

*Estudio de la respuesta innata
de trofoblastos humanos
expuestos a plaguicidas*

2021

Tesis para optar por el título de Doctor en Biología

LIC. DIEGO SEBASTIAN GOMEZ

Dirigido por Dra. Natalia Guiñazú

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que me acompañaron en este trayecto e hicieron posible que se concrete este trabajo de tesis doctoral.

En primera instancia agradecer a la Universidad Nacional del Comahue, universidad pública que me cobijó todos estos años. En particular a la Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud por darme las herramientas para emprender este viaje, y al Centro Regional Universitario Bariloche.

Quiero agradecer al CITAAC-LIBIQUIMA, instituto de bipertenencia, por el lugar de trabajo y las instalaciones necesarias para llevar a cabo la labor diaria.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por el apoyo económico, a través de mi beca doctoral y de subsidios a proyectos de investigación que contribuyeron a la realización de este trabajo.

Particularmente agradecer a mi directora, Natalia Guiñazú, por el acompañamiento, ayuda, conocimiento y guía a través de estos años. Por todos los encuentros y tantos otros desencuentros, gracias.

Quiero agradecerle a Vicky, inmensamente. Amiga y colega que, a pesar de no figurar en papeles, cumplió roles incomparables. Más que nadie me guió y acompañó en este arduo camino. Quién me instruyó y aconsejó, se arremangó y trabajó codo a codo. Compañera en tantas risas y tantos llantos. Gracias Vicky.

A Pame, Lau, Maru, Vale, Piu y Eli, mis amigos y compañeros, por su cariño, apoyo y afecto. Por cada momento y cada día compartido, desde una charla, un experimento, un mate, gracias por hacer del día a día algo agradable.

A mis compañeros de laboratorio por sus aportes, compañía, risas y consejos: Berta, Ana María, Ana Cecilia, Male, Nati P., Josefina, Jime, Betsy, Moni, Andrés, Euge, Lore, Belén, Isra, Marcos, Enrique. Gracias.

A Graciela, una gran y generosa maestra. Por confiar y permitir crecer.

A Santiago (El Tape), mi compañero incondicional, mi amor, por ser el sosten incluso en los peores momentos, por todas esas sonrisas, por el aliento cuando estaba al borde de abandonar todo, por darme esos empujoncitos. Gracias por

confiar y creer en que podía lograrlo, incluso cuando ya había dejado de creerlo.
Gracias.

A mi familia, por apoyarme siempre. En especial a papá, que lamentablemente no pudo ver concretada esta instancia por que la vida decidió un camino diferente para el.

Finalmente, a mis amigos y amigas de la vida. A Lau, Maru, Marión, Juli, Silvi, Nair, Fiore. A mis claroscuros del corazón, Bian, Belu, San, More, Fabri, Lulu, Mili, Tincho, Pablito, Valen. Quienes son mi cable a tierra.

Gracias.

Índice

Índice de contenidos

Resumen	14
Abstract	17
1.Introducción	20
1.1 Plaguicidas.....	21
1.1.1 Definición y clasificación	21
1.1.2 Composición y formulación	24
1.1.3 Plaguicidas organofosforados.....	26
1.1.4 Plaguicidas neonicotinoides.....	30
1.2 Mecanismo de toxicidad de organofosforados y neonicotinoides	36
1.2.1 Generalidades del sistema colinérgico.....	36
1.2.1.1 Receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR)	37
1.2.1.2 Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)	38
1.2.1.3 Acetilcolinesterasa.....	41
1.2.1.4 Sistema colinérgico no neuronal.....	42
1.2.2 Blancos de toxicidad de organofosforados y neonicotinoides.....	43
1.2.2.1 Blancos principales.....	43
1.2.2.2 Blancos alternativos	46
1.2.3 Respuesta inmune innata	47
1.2.3.1 Receptores tipo toll (TLR).....	49
1.2.3.2 Citoquinas	54
1.2.4 Balance oxidativo.....	55
1.2.4.1 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	55
1.2.4.2 Defensa antioxidante y balance oxidativo.....	57
1.2.4.3 Estrés oxidativo y daño a macromoléculas.....	60
1.2.4.3.1 Efecto sobre ácidos nucleicos.....	61
1.2.4.3.2 Efectos sobre las proteínas.....	62
1.2.4.3.3 Efecto sobre los lípidos	63
1.3 Exposición ambiental a organofosforados y neonicotinoides.....	64
1.4 Placenta	69
1.4.1 Características y funcionamiento	69
1.4.2 Desarrollo placentario, diferenciación e invasión trofoblástica.....	70
1.4.3 Respuesta inmune y tolerancia al feto	73
1.4.4 Balance oxidativo en la placenta.....	73
1.5 Exposición a plaguicidas OF y Neo durante el embarazo.....	74

1.5.1 Modelos para estudios de efectos tóxicos sobre la placenta humana	76
2. Hipótesis.....	79
3. Objetivos.....	81
3.1 Objetivo general	82
3.2 Objetivos específicos.....	82
4. Materiales y métodos.....	83
4.1 Reactivos	84
4.2 Condiciones generales de cultivo celular.....	84
4.2.1 Trofoblastos del primer trimestre: línea celular HTR-8/SVneo.....	84
4.2.2 Trofoblastos del tercer trimestre: línea celular JEG-3.....	85
4.2.3 Criopreservación y descongelamiento de células.....	85
4.2.4 Mantenimiento celular	86
4.2.5 Tratamientos con insecticidas	86
4.3 Estudio de efecto de clorpirifos sobre trofoblastos HTR-8/SVneo.....	89
4.3.1 Actividad de acetilcolinesterasa	89
4.3.2 Niveles de expresión de transcritos para TLR y citoquinas	89
4.3.2.1 Extracción de ARN y transcripción reversa.....	89
4.3.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	91
4.3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	94
4.3.4 Expresión proteica de TLR por western blot.....	94
4.3.4.1 Obtención y preparación de muestras	94
4.3.4.2 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	95
4.3.4.3 Transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa.....	96
4.3.4.4 Coloración de proteínas en la membrana de nitrocelulosa	96
4.3.4.5 Bloqueo de la membrana de nitrocelulosa e incubación con anticuerpos	96
4.3.4.6 Revelado de membranas.....	97
4.4 Estudio de efecto de Neo sobre trofoblastos HTR-8/SVneo y JEG-3.....	98
4.4.1 Viabilidad celular.....	98
4.4.2 Apoptosis - expresión proteica de Bax y Bcl-2 por western blot	98
4.4.3 Migración celular – ensayo de herida.....	99
4.4.4 Niveles de expresión de transcritos de $\alpha 7$ nAChR	100
4.4.5 Análisis de los niveles de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	102
4.4.6 Evaluación de las defensas antioxidantes.....	105
4.4.6.1 Actividad de enzima superóxido dismutasa	105
4.4.6.2 Actividad de enzima catalasa	105

4.4.6.3 Actividad de enzima glutatión S-transferasa	106
4.4.6.4 Contenido de GSH total.....	106
4.4.7 Evaluación de biomarcadores de daño oxidativo	107
4.4.7.1 Oxidación de proteínas.....	107
4.4.7.2 Peroxidación lipídica.....	108
4.4.7.3 Daño en ADN	108
4.5 Determinación de proteínas.....	110
4.6 Análisis estadístico.....	110
5. Resultados.....	112
5.1 Efecto de clorpirifos en la respuesta inmune innata de trofoblastos humanos .	113
5.1.1 Estudio de la actividad de acetilcolinesterasa	113
5.1.2 Alteración de la respuesta inmune innata de trofoblastos humanos.....	115
5.1.2.1 Expresión de receptores tipo toll (TLR).....	115
5.1.2.2 Expresión proteica de TLR	119
5.1.3 Efecto de clorpirifos en la respuesta inflamatoria	120
5.2 Toxicidad de insecticidas neonicotinoides en trofoblastos humanos.....	124
5.2.1 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la viabilidad celular de trofoblastos de primer y tercer trimestre.....	124
5.2.2 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la producción de especies reactivas de oxígeno en trofoblastos de primer y tercer trimestre	127
5.2.3 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la producción de especies reactivas de nitrógeno.....	131
5.2.4 Estudio de la vía de muerte celular gatillada por el neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial.....	132
5.2.5 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la migración celular.....	134
5.2.6 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la expresión receptor nicotínico de acetilcolina.....	136
5.2.7 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la defensa antioxidante celular.	138
5.2.7.1 Actividad de superóxido dismutasa	138
5.2.7.2 Actividad de catalasa.....	139
5.2.7.3 Actividad de glutatión S-transferasa	141
5.2.7.4 Contenido de glutatión reducido	142
5.2.8 Daño oxidativo a biomacromoléculas inducido por el neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial.....	143
5.2.8.1 Oxidación de proteínas.....	143

5.2.8.2 Oxidación de lípidos	145
5.2.8.3 Daño en el ADN	146
5.2.9 Efecto de pre incubación con antioxidantes	149
5.2.9.1 Efecto del antioxidante N-acetil l-cisteína en la prevención de la muerte celular inducida por el neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial .	149
5.2.9.2. Efecto del antioxidante N-acetil l-cisteína en la prevención del daño celular a biomacromoléculas inducido por el neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial	150
6. Discusión	152
6.1 Discusión general.....	153
6.2 Impacto de clorpirifos en la respuesta inmune innata de trofoblastos	158
6.3 Toxicidad de Neonicotinoides en trofoblastos humanos	170
7. Conclusión.....	185
8. Bibliografía.....	188
9. Trabajo de respaldo	227

Índice de figuras

Figura 1: Estructura química general de los plaguicidas organofosforados	27
Figura 2: Estructura química de siete neonicotinoides de relevancia comercial.	32
Figura 3: Representación de la secuencia y estructura del receptor muscarínico.	37
Figura 4: Estructura de receptores nicotínicos de acetilcolina.	39
Figura 5: Sinapsis colinérgica.	42
Figura 6: Interacción de OF con acetilcolinesterasa.	44
Figura 7: Esquema y localización de TLR.	50
Figura 8: TLR en el reconocimiento de algunos patógenos.	53
Figura 9: Principales especies reactivas, fuentes y vías de detoxificación.	56
Figura 10: Dinámica de plaguicidas en el ambiente.	65
Figura 11: Representación esquemática de la placenta humana.	70
Figura 12: Diferenciación y migración de trofoblastos.	71
Figura 13: Diagrama de flujo de las líneas de trabajo del trabajo de tesis	88
Figura 14: Extracción de ARN.	90
Figura 15: Reacción de reducción de azul de formazán (NBT) a formazán	103
Figura 16: Mecanismo de de-esterificación de DCFH-DA	104
Figura 17: Escala de fragmentación de ADN empleada en ensayo cometa.	110
Figura 18: Actividad de la enzima acetilcolinesterasa en trofoblastos HTR-8/SVneo.	114
Figura 19: Productos de amplificación de genes endógenos. S.	115
Figura 20: Productos de amplificación de TLR.	116
Figura 21: Puesta a punto de cebadores específicos de TLR.	117
Figura 22: Expresión relativa del transcrito para TLRs en trofoblastos HTR-8/SVneo.	118
Figura 23: Expresión proteica de TLR-4 en trofoblastos HTR-8/SVneo.	119
Figura 24: Productos de amplificación de citoquinas.	121
Figura 25: Puesta a punto de primers específicos de citoquinas.	122
Figura 26: Expresión relativa de citoquinas en trofoblastos HTR-8/SVneo.	123
Figura 27: Viabilidad de trofoblastos HTR-8/SVneo.	125
Figura 28: Viabilidad de trofoblastos JEG-3. p.	126
Figura 29: Niveles de especies reactivas de oxígeno en trofoblastos HTR-8/SVneo.	128
Figura 30: Niveles de especies reactivas de oxígeno en trofoblastos JEG-3.	129
Figura 31: Niveles de expresión proteica de Bax y Bcl-2.	133
Figura 32: Migración celular de trofoblastos HTR-8/SVneo.	135
Figura 33: Migración celular de trofoblastos HTR-8/SVneo.	136
Figura 34: Puesta a punto de cebadores específicos de $\alpha 7$ nAChR.	137
Figura 35: Expresión relativa del transcrito para $\alpha 7$ nAChR en trofoblastos HTR-8/SVneo.	138
Figura 36: Actividad de la enzima superóxido dismutasa en trofoblastos HTR-8/SVneo.	139
Figura 37: Actividad de la enzima catalasa en trofoblastos HTR-8/SVneo.	140
Figura 38: Actividad de la enzima glutatión S-transferasa en trofoblastos HTR-8/SVneo.	141
Figura 39: Contenido de glutatión reducido en trofoblastos HTR-8/SVneo.	142
Figura 40: Daño oxidativo a proteínas en trofoblastos HTR-8/SVneo.	144
Figura 41: Daño oxidativo a lípidos en trofoblastos HTR-8/SVneo.	146
Figura 42: Daño en ADN en trofoblastos HTR-8/SVneo.	147
Figura 43: Daño en ADN en trofoblastos HTR-8/SVneo.	148
Figura 44: Efectos de los insecticidas organofosforados y neonicotinoides sobre trofoblastos humanos.	187

Índice de tablas

Tabla 1: Clasificación de plaguicidas según organismo blanco.	22
Tabla 2: Clasificación de plaguicidas según estructura química.....	22
Tabla 3: Clasificación de plaguicidas según su persistencia.....	23
Tabla 4: Clasificación de plaguicidas según toxicidad.....	24
Tabla 5: Características principales de clorpirifos	30
Tabla 6: Características principales de acetamiprid.....	35
Tabla 7: Expresión y ligandos de TLR 2 y 4 en mamíferos.....	51
Tabla 8: Ligandos endógenos y sus respuestas	52
Tabla 9: Comparación de las características de distintos sistemas de estudio para la evaluación toxicológica en la placenta.	77
Tabla 10: Secuencias de cebadores específicos y sus características.....	93
Tabla 11: Reactivos para PCR	93
Tabla 12: Preparación de gel separador al 10%	95
Tabla 13: Preparación de gel concentrador	95
Tabla 14: Listado de anticuerpos y condiciones de incubación	97
Tabla 15: Preparación de solución de revelado	97
Tabla 16: Preparación de gel separador al 12%	99
Tabla 17: Listado de anticuerpos y condiciones de incubación	99
Tabla 18: Secuencias de cebadores específicos y sus características	102
Tabla 19: Eficiencias y coeficientes de determinación (R ²) de cebadores específicos para genes de TLR y 18s	116
Tabla 20: Eficiencias y coeficientes de determinación (R ²) de primers específicos para los genes de citoquinas	121
Tabla 21: Producción de especies reactivas de oxígeno en trofoblastos humanos luego de la exposición a acetamiprid y su formulación comercial.....	130
Tabla 22: Producción de especies reactivas de nitrógeno en trofoblastos HTR-8/SVneo luego de la exposición a acetamiprid y su formulación comercial luego de 4 y 24 h de exposición. .	132
Tabla 23: Eficiencias y coeficientes de determinación (R ²) de primers específicos para $\alpha 7$ nAChR e YWHAZ.	137
Tabla 24: Efecto del pretratamiento con el antioxidante N-acetil L-cisteína (NAC) en la viabilidad celular en la exposición a acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) por 24 h.....	149
Tabla 25: Efecto del pretratamiento con el antioxidante N-acetil L-cisteína (NAC) en el daño a biomoléculas inducido por la exposición a acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) por 24 h.	151

Abreviaturas

ACh: acetilcolina

AChE: enzima acetilcolinesterasa

AMPC: adenosín monofosfato cíclico

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

ATP: adenosín trifosfato

BuChE: butirilcolinesterasa

CAT: catalasa

CE: carboxilesterasa

ChAT: colina acetiltransferasa

CL50: concentración letal 50

CP: clorpirifos

CSF: factor estimulador de colonias

CT: citotrofoblasto

DDT: Dicloro difenil tricloroetano

DL50: dosis letal 50

ENT: esterasa neurotóxica

EO: estrés oxidativo

ERN: especies reactivas de nitrógeno

ERO: especies reactivas de oxígeno

EVT: trofoblasto extravelloso

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GABA: ácido γ -aminobutírico

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

GST: glutatión S-transferasa

HLA: molécula de histocompatibilidad

IL: interleuquina

INF γ : interferón gama

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IP₃: inositol trifosfato

LPS: lipopolisacárido

mAChR: receptores muscarínicos de acetilcolina

MAP: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MDA: malondialdehído

MyD88: proteína de la respuesta primaria de diferenciación mieloide

nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina

Neo: neonicotinoide

NF κ B: factor nuclear *kappa* de células B activadas

NK: células asesinas naturales (*natural killers*)

NLR: receptor tipo NOD (NOD like receptor)

NOS: óxido nítrico sintasa

OF: organofosforado

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: principio activo

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PAOP: productos avanzados de oxidación proteica

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PIP₂: 4,5-difosfato de fosfatidilinositol

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RRP: receptores de reconocimiento de patrones

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

SOD: superóxido dismutasa

ST: sincitiotrofoblasto

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCPy: 3,5,6 tricloro-2-piridinol

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TLR: receptor tipo toll (toll like receptor)

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

US EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

Resumen

Resumen

El uso de plaguicidas es una reconocida estrategia principalmente en la industria agrícola, para el control de plagas. Dos familias ampliamente utilizadas en el mundo son los insecticidas neurotóxicos organofosforados (OF) y neonicotinoides (Neo). La exposición ambiental a plaguicidas es un hecho bien documentado, sobre todo en poblaciones que residen en cercanías de sitios de aplicación. Considerando que la exposición a tóxicos ambientales durante el embarazo puede repercutir en la salud de la madre y el embrión, y que esto puede estar relacionado con mecanismos toxicológicos clásicos y no clásicos, se estudió el efecto de OF y Neo sobre la respuesta innata en trofoblastos humanos.

Se estudió en un modelo *in vitro* con trofoblastos HTR-8/SVneo el efecto del OF clorpirifos (CP), 0,01-100 μM , en la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE) a 4 y 24 h de exposición; cómo así también la modulación de la expresión de receptores tipo toll (TLR) y el balance de citoquinas pro y anti-inflamatorias. CP redujo significativamente la actividad de AChE a altas concentraciones (10 y 100 μM) a 24 h de exposición, no observándose cambios a tiempos más cortos (4 h). En las condiciones en las que se observó reducción de actividad AChE, CP aumentó significativamente los niveles de transcritos para TLR-2 y TLR-4 (10 y 100 μM), acompañado de aumentó de los niveles de proteína del receptor TLR-4. CP incrementó significativamente los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 y la citoquina inmunomoduladora TGF- β a altas concentraciones (100 μM) Estos resultados demuestran el impacto del OF CP en su blanco clásico (AChE) en trofoblastos HTR-8/SVneo y ponen de manifiesto el impacto sobre componentes de la respuesta inmune innata, modulando la expresión de receptores propios de esta respuesta y resultando en cambios en la expresión de citoquinas vinculadas al proceso de inflamación/reparación de tejidos.

En consideración del amplio uso de Neo a nivel mundial y local, y que los formulados comerciales son mezclas que contienen otros compuestos además del principio activo, se realizó un estudio comparativo entre el Neo acetamiprid (Ace) y una formulación comercial disponible en Argentina (Ace CF). Se estudiaron dos modelos *in vitro* de trofoblastos humanos: HTR-8/SVneo y JEG-

3 (primer y tercer trimestre de gestación, respectivamente). Se evaluó citotoxicidad y producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) a concentraciones de 0,1–100 μ M durante 4 y 24 h de exposición. A 4 h de exposición, solamente en trofoblastos HTR-8/SVneo y altas concentraciones de Ace CF (10–100 μ M) se observó reducción de viabilidad celular acompañado de aumento de ERO. En cambio, a tiempos más prolongados, Ace y Ace CF alteraron la viabilidad celular e indujeron la producción de ERO en trofoblastos HTR-8/SVneo; mientras que sólo Ace CF resultó citotóxico en trofoblastos JEG-3. En este contexto, se estudió la modulación de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) como mecanismo clásico de toxicidad de Neo y el estrés oxidativo como posible mecanismo asociado a los efectos observados previamente. En trofoblastos HTR-8/SVneo se evaluó el efecto de Ace y Ace CF en la inducción de apoptosis, expresión de nAChR, migración celular y biomarcadores de estrés oxidativo. Ambas formulaciones resultaron en aumento significativo de la relación Bax/Bcl-2, con un aumento más notorio en trofoblastos expuestos a Ace CF. No se observaron cambios en los transcritos de la subunidad α 7 de nAChR. En las condiciones ensayadas, Ace y Ace CF no alteraron la capacidad migratoria de este tipo celular. No obstante, Ace redujo la actividad de la enzima antioxidante catalasa, mientras Ace CF disminuyó la actividad de catalasa, superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa. En este escenario pro-oxidante, se observó oxidación de proteínas luego de la exposición a Ace y Ace CF, sumado a oxidación de lípidos (TBARS) y daño genotóxico (ensayo cometa) en exposiciones a Ace CF. Estos efectos fueron prevenidos parcialmente cuando la línea celular fue tratada con el antioxidante N-acetil l-cisteína (2 mM) previo al tratamiento con Neo, demostrando que el estrés oxidativo sería un mecanismo que participa de la toxicidad de estos insecticidas en trofoblastos humanos.

Estos resultados indican la capacidad de OF y Neo de modificar distintos componentes de la respuesta innata en trofoblastos humanos y que este desbalance podría alterar la funcionalidad de la placenta como órgano regulador del desarrollo intrauterino. Asimismo, ponen de manifiesto la mayor toxicidad que presentan las formulaciones comerciales frente a sus principios activos.

Abstract

Abstract

The use of pesticides is a recognized strategy mainly in the agricultural industry for pest control. Two families widely used in the world are the organophosphate (OF) and neonicotinoid (Neo) neurotoxic insecticides. Environmental exposure to pesticides is a well-documented fact, especially in populations that reside near application sites. Considering that exposure to environmental toxins during pregnancy can affect the health of the mother and the embryo, and that this may be related to classical and non-classical toxicological mechanisms, the effect of OF and Neo on the innate response in human trophoblasts was studied.

The effect of OF chlorpyrifos (CP), 0.01-100 μM , on the enzymatic activity of acetylcholinesterase (AChE) at 4 and 24 h of exposure was studied in an *in vitro* model with HTR-8/SVneo trophoblasts; as well as the modulation of the expression of toll-like receptors (TLR) and the balance of pro and anti-inflammatory cytokines. CP significantly reduced AChE activity at high concentrations (10 and 100 μM) at 24 h of exposure, with no changes being observed at shorter times (4 h). Under the conditions in which a reduction of AChE activity was observed, CP significantly increased the levels of transcripts for TLR-2 and TLR-4 (10 and 100 μM), accompanied by an increase in the protein levels of the TLR-4 receptor. CP significantly increased the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and the immunomodulatory cytokine TGF- β at high concentrations (100 μM). These results demonstrate the impact of OF CP on its classic target (AChE) in HTR-8 / SVneo trophoblasts and show the impact on components of the innate immune response, modulating the expression of receptors that are characteristic of this response and resulting in changes in the expression of cytokines linked to the process of inflammation / tissue repair.

In consideration of the wide use of Neo worldwide and locally, and that commercial formulations are mixtures that contain other compounds in addition to the active principle, a comparative study was carried out between Neo acetamiprid (Ace) and a commercial formulation available in Argentina (Ace CF). Two *in vitro* models of human trophoblasts were studied: HTR-8 / SVneo and JEG-3 (first and third trimester of gestation, respectively). Cytotoxicity and production of reactive oxygen species (ROS) were evaluated at concentrations of 0.1 - 100 μM during 4 and 24 h of exposure. At 4 h of exposure, only in HTR-

8/SVneo trophoblasts and high concentrations of Ace CF (10 - 100 μ M) was a reduction in cell viability accompanied by an increase in ROS. In contrast, at longer times, Ace and Ace CF altered cell viability and induced ROS production in HTR-8/SVneo trophoblasts; while only Ace CF was cytotoxic in JEG-3 trophoblasts. In this context, the modulation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) was studied as a classic mechanism of Neo toxicity and oxidative stress as a possible mechanism associated with the previously observed effects. In HTR-8/Svneo trophoblasts, the effect of Ace and Ace CF on the induction of apoptosis, expression of nAChR, cell migration and biomarkers of oxidative stress was evaluated. Both formulations resulted in a significant increase in the Bax/Bcl-2 ratio, with a more noticeable increase in trophoblasts exposed to Ace CF. No changes were observed in the transcripts of the α 7 nAChR subunit. In the conditions tested, Ace and Ace CF did not alter the migratory capacity of this cell type. However, Ace reduced the activity of the antioxidant enzyme catalase, while Ace CF decreased the activity of catalase, superoxide dismutase, and glutathione S-transferase. In this pro-oxidant scenario, protein oxidation was observed after exposure to Ace and Ace CF, in addition to lipid oxidation (TBARS) and genotoxic damage (comet assay) in exposures to Ace CF. These effects were partially prevented when the cell line was treated with the antioxidant N-acetyl l-cysteine (2 mM) prior to treatment with Neo, showing that oxidative stress would be a mechanism that participates in the toxicity of these insecticides in human trophoblasts.

These results indicate the ability of OF and Neo to modify different components of the innate response in human trophoblasts and that this imbalance could alter the function of the placenta as a regulatory organ of intrauterine development. Likewise, they show the greater toxicity that commercial formulations present compared to their active principles.

1.Introducción

1.1 Plaguicidas

1.1.1 Definición y clasificación

La organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define a los plaguicidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias cuyo objetivo es prevenir, destruir o controlar cualquier clase de plaga. Dentro de las plagas se incluye a: los vectores de enfermedades humanas y animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y subproductos o alimentos para animales (FAO, 1996). Dentro de los plaguicidas se incluyen a sustancias tan diversas como las destinadas a utilizarse como controladores de plagas, reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes y después de la cosecha para proteger al producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte, entre otras aplicaciones.

Dada la multiplicidad de sustancias que se pueden incorporar en este término es que los plaguicidas pueden clasificarse de acuerdo a diversos aspectos o características principales. Una de las principales formas para clasificarlos es de acuerdo a la plaga o tipo de organismo para el cual están destinados a actuar, como se muestra en la Tabla 1. Otra de las formas usuales para su clasificación es en relación a la familia de sustancias a la que pertenecen, la cual está caracterizada de acuerdo similitudes en la estructura química (Tabla 2).

Tabla 1: Clasificación de plaguicidas según organismo blanco.

Clasificación	Organismo blanco
Insecticida	Insectos
Acaricida	Ácaros
Nematicida	Nemátodos
Fungicida	Hongos
Molusquicida	Caracoles, babosas
Herbicida	Malezas (plantas)
Rodenticida	Roedores

Fuente: adaptado de INTA (2014)

Tabla 2: Clasificación de plaguicidas según estructura química

Clasificación	Ejemplos
Organofosforados	Malatión, clorpirifos, metilazinfos
Organoclorados	DDT, aldrin, endosulfan
Carbamatos	Carbaril, carbofuran, pirimicarb
Tiocarbamatos	Maneb, zineb
Piretroides	Cypermctrina, fenvalerato
Derivados biperidilos	Paraquat, diquat
Derivados de ácido fenoxiacético	Silvex, picloram
Derivados cloronitrofenólicos	Dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazina, simazina
Neonicotinoides	Acetamiprid, imidacloprid, tiacloprid
Compuestos inorgánicos	Arsénico, mercurio, talio, cloruro de mercurio
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, piretrinas, azadiractina

Fuente: adaptado de Ramírez y Lacasaña (2001)

En este trabajo de tesis se referirá solo a algunas de las familias mencionadas en la Tabla 2, como los plaguicidas organofosforados y los neonicotinoides, debido principalmente al volumen de uso en la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén y a sus potenciales efectos tóxicos sobre la salud. Es por ello que resulta importante considerar dos criterios más de clasificación que abordan la persistencia en el ambiente y su toxicidad o peligrosidad.

La persistencia de los plaguicidas en el ambiente, entendiendo a la persistencia como la capacidad de una sustancia o compuesto de permanecer en un sustrato del ambiente luego de haber cumplido el objetivo para el cual se aplicó, permite clasificarlos de acuerdo a su vida media. Es decir, permite clasificarlos de acuerdo al tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto o mezcla aplicada. Se pueden clasificar en: no persistentes, moderadamente persistentes, persistentes, permanentes (Tabla 3) (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Tabla 3: Clasificación de plaguicidas según su persistencia

Clasificación	Vida media	Ejemplos
No persistentes	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, acetamiprid, clorpirifos*
Moderadamente persistentes	De 1 a 8 meses	Paratión, lannate
Persistentes	De meses a 20 años	DDT, aldrin, dieldrin
Permanentes	Indefinidamente	Productos a base de mercurio, plomo y arsénico

*clorpirifos, dependiendo de la matriz en la que se encuentre (agua, suelos ricos en materia orgánica o suelos pobres en materia orgánica), es clasificado como no persistente a moderadamente persistente.

Fuente: adaptado de Ramírez y Lacasaña (2001)

Otro aspecto importante para clasificar a los plaguicidas es de acuerdo a su toxicidad. En este sentido la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los plaguicidas en distintas clases de toxicidad (Tabla 4). Para esta clasificación,

la toxicidad se mide según la dosis letal media (DL50) o concentración letal media (CL50). Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo, etc.), la vía de entrada al organismo (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo, etc. Al basarse en observaciones en animales no proporciona información sobre los efectos crónicos, ni sobre la citotoxicidad de algún compuesto (Ramírez y Lacasaña 2001).

Tabla 4: Clasificación de plaguicidas según toxicidad

Clase	Toxicidad	DL50 ¹ para ratas (mg/Kg de peso corporal)		Ejemplos
		Oral	Dérmica	
Ia	Extremadamente peligroso	<5	<50	Paratión, dieldrin
Ib	Altamente peligroso	5-50	50-200	Eldrin, diclorvos
II	Moderadamente peligroso	50-2000	200-2000	DDT, clorpirifos, acetamiprid
III	Ligeramente peligroso	>2000		Malatión, piretroides, glifosato
U	Poco probable de representar un peligro agudo	5000 o mayor		

¹ DL50: dosis de una sustancia que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba en determinadas condiciones de exposición. Los valores de DL50 son usados como un indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia. Fuente: modificado de Clasificación según OMS (2019)

1.1.2 Composición y formulación

Los plaguicidas, al igual que muchos otros productos, se comercializan en distintas formulaciones. En cada producto comercializado normalmente hay solo

una sustancia que tiene efecto plaguicida, a esta sustancia se la denomina principio o ingrediente activo (PA). Existen también productos comerciales que incluyen más de un PA a fin de combinar los efectos de todos ellos, pero muy raramente se incluyen más de tres PA en un mismo producto comercial. Normalmente la cantidad PA requerido para controlar una plaga por unidad de superficie es tan baja que sería imposible aplicarla pura, logrando una distribución aceptablemente correcta. Por otra parte, muchas veces se trata de sustancias pesadas y altamente viscosas difíciles de aplicar directamente. Por ello, los PA se aplican en formulaciones que contienen otros ingredientes (INTA, 2014). Estos compuestos, según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA), pueden ser denominados inertes y otros ingredientes. Estos no poseen acción biocida específica, sin embargo, algunos inertes pueden poseer toxicidad propia (US EPA 2012).

Los ingredientes inertes cumplen importantes funciones en cuanto a la efectividad y aplicabilidad de los plaguicidas. Actúan como solventes para ayudar al PA a penetrar en la superficie foliar de las plantas, facilitar la aplicación a campo, extender la vida postcosecha, evitar la degradación debido a la exposición a radiación solar, entre otros (US EPA 2012). Entre los distintos compuestos inertes podemos encontrar:

- Solventes (puede ser agua o algún solvente derivado del petróleo o de otro tipo)
- Humectantes (a fin de permitir su dilución en agua)
- Espesantes
- Tensioactivos (permiten un mejor contacto de la gota pulverizada con el objetivo)
- Adherentes
- Conservantes
- Esparcidores
- Estabilizadores
- Antiespumantes
- Agentes de aviso: colorantes, sustancias de olor, etc.

La combinación de estas sustancias en el producto comercial, es lo que se denomina composición o formulación. Un mismo PA puede ser comercializado bajo diferentes formulaciones, por lo que es preciso conocer sus características y composición. En nuestro país, todo producto fitosanitario comercializado está regulado y debe indicar en su información básica el PA que contiene y el contenido del mismo en relación al contenido neto del producto comercial (SAGPYA-SENASA, 1999).

El Alto Valle de Río Negro y Neuquén es una de las regiones históricamente más importantes en cuanto a producción agrícola argentina, en particular de frutales de pepita (Torzano 2016). En este contexto, se emplean distintas familias de plaguicidas durante un periodo que se extiende de septiembre a febrero. Dentro de los plaguicidas más utilizados se encuentran los pertenecientes a la familia de los organofosforados, los cuales se emplean desde 1990; y los neonicotinoides, que comenzaron a aplicarse recientemente desde el año 2000 (Cichón y col., 2013). Las características principales de estas familias se describirán a continuación.

1.1.3 Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados (OF) han sido el grupo de insecticidas más ampliamente utilizados por muchas décadas (Cechi y col., 2012) para el control de plagas tanto en la agricultura como en los hogares (Costa 2006; Li 2007). Esta familia de compuestos comprende un grupo muy diverso de estructuras químicas: ésteres, amidas o tioles derivados del ácido fosfórico (Ramírez y Lacasaña 2001). Su uso se relaciona fundamentalmente con el control de las plagas que afectan la producción, elaboración, almacenamiento, transporte y/o comercialización de alimentos y productos agrícolas (OMS 2003, US EPA 2015a). Sin embargo, también se han empleado como retardantes de fuego, agentes terapéuticos, plastificantes, lubricantes, aditivos de combustibles y como agentes químicos de guerra (Anguiano y col., 2011).

La estructura química de un OF comprende un átomo central de fósforo y el característico enlace fosfórico (P=O) o tiosfosfórico (P=S), como puede observarse en la Figura 1. El símbolo X representa el grupo saliente que es

desplazado (por sustitución nucleofílica) cuando el OF fosforila la enzima acetilcolinesterasa (AChE), principal blanco de acción de estos insecticidas (Costa 2006, Elersek y Filipic 2011).

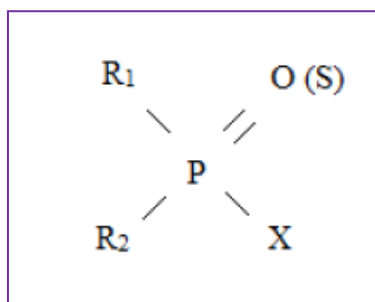


Figura 1: Estructura química general de los plaguicidas organofosforados

En los gases de guerra muy tóxicos, el grupo saliente consiste en fluoruro (F^-), el cual se hidroliza fácilmente produciendo la inhibición de la enzima AChE. Mientras que en OF menos tóxicos, el grupo saliente consiste generalmente en grupos alquilo o arilo (Elersek y Filipic 2011). Por otro lado, R_1 y R_2 son sustituyentes que generalmente consisten en grupos alcoxi (H_3CO o H_5C_2O), aunque otros sustituyentes son posibles. Mayoritariamente los OF tienen estructura de fosforotionato, como el paratión, clorpirifos (Tabla 5) y diazinón, y de fosforotioato, como el malatión, dimetoato y metilazinfos.

Dentro de sus características fisicoquímicas, los OF son sustancias poco solubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, con lipofilidad variable según su estructura química. Son estables a pH neutro, pero casi todos son hidrolizados a pH alcalino. Se degradan principalmente por oxidación e hidrólisis, dando origen a productos más hidrosolubles (Ramírez y Lacasaña 2001). Son relativamente menos persistentes que otras familias de plaguicidas (como los organoclorados) y suelen ser poco acumulables en el organismo humano.

Los OF poseen efectos neurotóxicos, los cuales se deben principalmente a la inhibición de la enzima AChE. La AChE es una proteína que hidroliza al neurotransmisor acetilcolina (ACh), produciendo ácido acético y colina (Ballantyne y col., 1992). ACh interactúa con dos tipos de receptores

postsinápticos (nicotínicos y muscarínicos), y es responsable de la transmisión del impulso nervioso de: las fibras colinérgicas postganglionares simpáticas y parasimpáticas de las células efectoras (receptores muscarínicos); las neuronas preganglionares a las postganglionares en los sistemas parasimpáticos y simpáticos (receptores nicotínicos); los nervios motores al musculo esquelético (receptores nicotínicos); y algunas terminaciones nerviosas del Sistema Nervioso Central (SNC) (Lotti y col., 1995). En cuanto a la interacción entre AChE y OF, ya que el neurotransmisor ACh es degradado continuamente por AChE, al inhibirse la enzima se acumula ACh en las terminaciones nerviosas lo que resulta en una estimulación constante de los receptores de ACh. De esta manera se produce una hiperestimulación nerviosa responsable de los síntomas colinérgicos de la intoxicación aguda con OF.

Los efectos tóxicos agudos de los plaguicidas OF son potencialmente mortales y están relacionados con una serie de manifestaciones en el sistema nervioso central, cardiovascular, respiratorio, y en el sistema nervioso periférico con alteraciones sensoriales. También se han observado secuelas neuropsiquiátricas vinculadas al déficit de atención, memoria, abstracción y depresión a largo plazo, luego de exposiciones agudas (Terry 2012). En modelos *in vitro* numerosos blancos moleculares potenciales han sido propuestos en concentraciones de OF que inhiben AChE. Entre los que se han reportado: citotoxicidad; efecto en la síntesis de macromoléculas como ADN, ARN y proteínas; interacción con distintos receptores; interacción en la diferenciación neuronal; entre otros (Eaton 2008). En modelos *in vivo* murinos el dietiltiofosfato, un metabolito común de la mayoría de los OF, ha mostrado efectos genotóxicos en eritrocitos de sangre periférica a dosis de 0,05 g/Kg, además de mostrar efectos inmunotóxicos impactando sobre células T y células *Natural Killer*, así como efectos inmunomodulatorios sobre macrófagos a dosis de 0,01 g/Kg luego de 20 días de exposición (Medina-Vuelvas y col., 2019).

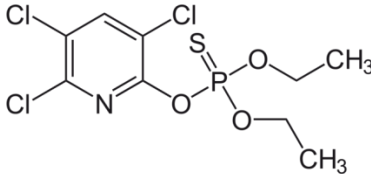
Más allá de los conocidos efectos neurotóxicos ampliamente estudiados, producto de la inhibición de AChE, se han vinculado exposiciones sostenidas en el tiempo a concentraciones bajas a OF con una variedad de trastornos a mediano y largo plazo. Entre los que se han identificado distintos tipos de cáncer (Lee y col., 2004; Mostafalou y col., 2013), alteraciones en la reproducción y

alteración del sistema nervioso (US EPA 2015b), dentro de otros problemas dependientes principalmente del OF al que se esté expuesto (Sharp y col., 1984; Maroni y col., 1993). En este sentido la exposición crónica a OF ha sido asociada con anomalías a nivel neuroconductual, con enfermedades como Parkinson y Alzheimer como así también con enfermedades metabólicas como diabetes y obesidad (Chakraborty y col., 2009; Hancock y col., 2008; Hayden y col., 2010; Jokanovic 2018).

Uno de los insecticidas OF más comúnmente utilizados a nivel mundial es el clorpirifos (CP), principalmente para fines agrícolas, pero también para industriales e incluso domiciliarios. CP es utilizado en el control de termitas y hormigas en productos de madera; para controlar pulgas, garrapatas y piojos en animales domésticos y ganadería; también se lo utiliza para combatir moscas y mosquitos en espacios públicos. En Argentina, el uso de CP para control de plagas en domicilios actualmente está prohibido por la Administración Nacional de Medicamentos (ANMAT) según disposición del año 2008 (ANMAT 2008). Sumado a esto, el ministerio de Salud de la Nación prohibió la importación, producción, comercialización y uso de formulaciones de productos para el control sanitario domiciliario a excepción de cebos con cierre a prueba de niños, con un contenido de hasta 0,5% de PA (Res. 456 Ministerio de Salud 2009). Sin embargo, se continúa empleando para el control de plagas en la agricultura.

Por lo expuesto, para la realización de este trabajo de tesis se seleccionó el organofosforado CP. CP es un sólido blanco cristalino, clasificado dentro del grupo de toxicidad clase II, o moderadamente tóxico. En la Tabla 5 se resumen sus características principales. Si bien presenta baja solubilidad en agua, este compuesto es relativamente estable en soluciones acuosas de pH neutro o ácido y su estabilidad decrece a medida que el medio que lo contiene se alcaliniza (OMS 2009). Estas características, junto con su baja volatilidad y elevada constante de partición en solventes orgánicos (Kow), traen como consecuencia la concentración del plaguicida en sedimentos y partículas orgánicas en ambientes naturales, lo cual incrementa la persistencia de CP en el medio, favoreciendo su acumulación (Dzul-Caamal y col., 2014; US EPA 2012).

Tabla 5: Características principales de clorpirifos

Familia	Organofosforado
Nombre IUPAC	O, O-dietil O-3,5,6-tricloro-piridil -2-il fosforotiato
Número CAS	2921-88-2
Fórmula química	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Estructura química	
Peso molecular	350,59 g/mol
Productos de comercialización	Lorsban, Dursban, Suscon Green, Empire, Equity
Volatilidad	Media
Punto de fusión	44-45 °C
Densidad	1,4 g/cm ³
Solubilidad en agua a 25 °C	2 mg/L
Coefficiente de partición Kow	5,27
Coefficiente de adsorción Koc	6,07
Tiempo de vida media en agua	20 días aproximadamente
Factor de bioconcentración	1,374
Bioacumulación	Potencial
Toxicidad aguda en mamíferos	Clase II – moderadamente tóxico DL50 oral en rata 82 mg/kg CL50 inhalación en rata >200mg/m ³ DL50 cutáneo en rata >2000 mg/kg DL50 interperitoneal en ratón 192 mg/kg

Fuente: Extraído y modificado de hoja de seguridad de Merk-SigmaAldrich y Quintana (2017).

1.1.4 Plaguicidas neonicotinoides

Los plaguicidas neonicotinoides (Neo) son una clase de insecticida relativamente nuevos que se han convertido en la familia más ampliamente utilizada en el mundo, empleándose para una variedad de usos tanto agrícolas como urbanos (Thompson y col., 2020). Los Neo comprenden un grupo diverso de compuestos que son análogos sintéticos de la nicotina y fueron desarrollados principalmente

en la década del setenta. No obstante, su uso se ha impulsado en los últimos años debido a su perfil de seguridad favorable, las restricciones mundiales impuestas a otros tipos de insecticidas y su utilidad para la gestión de la resistencia en insectos (Jeschke y col., 2011; Simon-Delso y col., 2015). Por ello se los ha considerado como los reemplazos ideales para familias de insecticidas como los organofosforados y carbamatos (Thompson y col., 2020).

El término “neonicotinoide” fue originalmente propuesto por Izuru Yamamoto para algunos de los primeros compuestos que caracterizarían posteriormente a esta familia, como así también para diferenciarlos de los insecticidas nicotinoides como por ejemplo el alcaloide (s)-nicotina (Jeschke y Nauen 2008). Conforme se fueron incorporando nuevas sustancias a este variado grupo de insecticidas se los fueron subdividiendo en diferentes generaciones de neonicotinoides, principalmente en función a la fecha de lanzamiento al mercado.

Los Neo actúan como agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), donde su potencia y efectividad están determinadas principalmente por las características estructurales de la molécula (Casida 2011). En su estructura general poseen dos farmacóforos, es decir, dos partes de la molécula que producen los efectos fisiológicos específicos del insecticida. Uno de ellos es una molécula olefínica compuesta por el grupo $=\text{NNO}_2$, $=\text{CHNO}_2$ o $=\text{NCN}$ como grupo donador de electrones selectivo para el reconocimiento de los nAChR en insectos (Honda y col., 2006). Esta estructura esta conjugada con una variedad de grupos de diversa índole y dan lugar a los distintos compuestos que encontramos en esta familia. A esta estructura se la suele denominar molécula central y nos permite clasificar a los Neo en 3 grupos: compuestos de cloropiridinilo, compuestos de clorotiazolilo y compuestos de tetrahidrofurilo (Casida 2011). En la Figura 2 se muestran los Neo comercialmente más destacados agrupados de acuerdo a su componente estructural y los sustituyentes.

Grupo	Neonicotinoide	Componentes estructurales
Cloropiridinilo	Imidacloprid	A1B1C1
	Nitenpiram	A1B2C2
	Tiacloprid	A1B3C3
	Acetamiprid	A1B4C3
Clorotiazolilo	Clotianidina	A2B5C1
	Tiametoxam	A2B6C1
Tetrahidrofurilo	Dinotefuran	A3B5C1

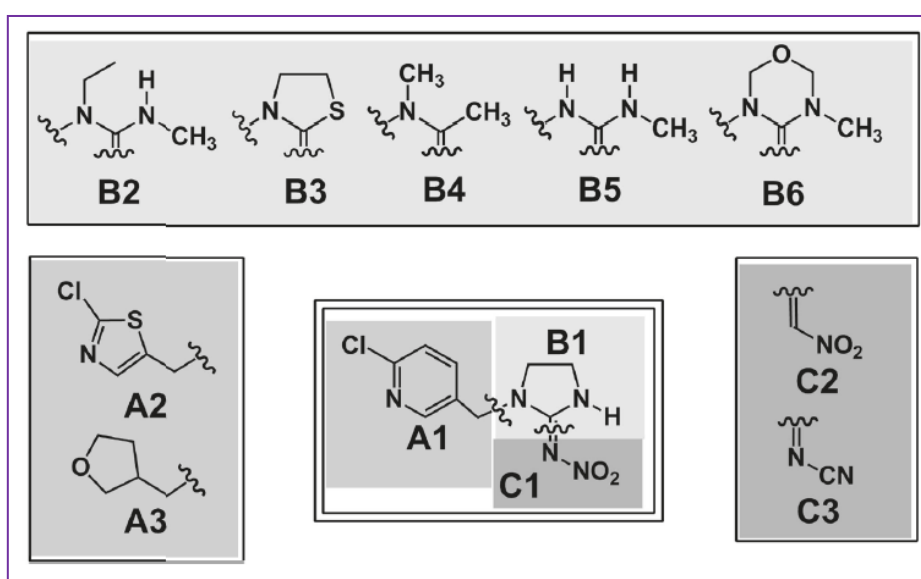


Figura 2: Estructura química de siete neonicotinoides de relevancia comercial. Se detalla el componente estructural (A, B y C) y los sustituyentes. A: enlace heterocicliometilo, B: espaciador heterocíclico o acíclico y C: extremo =NNO₂, =CHNO₂ o =NCN. Extraído de Casida (2011)

En cuanto a las propiedades físico-químicas de los Neo, al ser una familia con una variedad estructural muy amplia, estas propiedades son variables de acuerdo al principio activo que se refiera. En general son sustancias muy poco volátiles y exhiben una larga vida media dependiendo del Neo en cuestión. Son resistentes a la hidrólisis a pH neutro y ácido, son moderadas a altamente solubles en agua generando su uso idóneo como insecticida sistémico. En general, como consecuencia de su alta solubilidad y persistencia en suelos, estos compuestos poseen un riesgo de contaminación acuífera, particularmente después de eventos de lluvia, ya que son arrastrados por dichas precipitaciones

hasta alcanzar cuerpos de agua superficiales e incluso acuíferos de poca profundidad (Salazar García y col., 2018; Thompson y col., 2020).

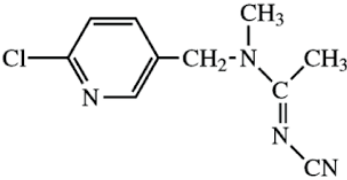
Como se mencionó anteriormente, el principal blanco de acción de los Neo son los receptores nicotínicos de ACh de los insectos (Taira 2014). Estos refieren a un complejo receptor que incluye un canal iónico regulado por agonistas y responsable de la neurotransmisión rápida. Los Neo causan sus efectos toxicológicos en insectos mediante la estimulación de nAChR, interfiriendo así con la transmisión del impulso nervioso. Su acción prolongada interfiere con el funcionamiento normal del sistema nervioso y este desorden repercute, en la mayoría de los casos, en consecuencias letales. Asimismo, también posee efectos subletales vinculados al rechazo, reducción o cese de la alimentación, reducción e interrupción de actividades reproductivas, reducción de movimiento, entre otros (Matsuda y col., 2005). A pesar de tener alta selectividad y eficacia para actuar sobre el sistema colinérgico de insectos (Calderón Segura y col., 2012), se han informado efectos adversos en otros organismos no blancos, como mamíferos y se los ha clasificado como moderadamente tóxicos (clase II). En este sentido, Chao y Casida (1997) y Sheets (2014) informaron que algunos Neo producen signos transitorios de actividad nicotínica (como temblores) en ratas y ratones después de la administración oral aguda. En cuanto a la toxicidad de Neo en humanos, si bien los datos son limitados, se destaca que el efecto se produce sobre receptores nAChR post-sinápticos (Ping Li y col., 2013; Taira 2014; Eddleston 2016). Si bien el tipo de receptor nAChR de humanos y mamíferos en general difiere del presente en insectos, existe una creciente preocupación por los posibles efectos de Neo en humanos y animales de experimentación sobre el desarrollo del sistema nervioso.

En relación a esto, la preocupación sobre los efectos dañinos potenciales del uso de Neo ha crecido en años recientes, debido principalmente a los efectos negativos sobre los polinizadores (Henry y col., 2012). La Autoridad Europea de Seguridad Alimenticia (EFSA) postuló que los Neo presentan un inaceptable y alto riesgo para abejas (EFSA 2013a). En 2013, la Unión Europea (UE) detuvo el uso de imidacloprid, clotianidina y tiametoxam en cultivos en momentos de floración, como maíz, debido a la evidencia de que estos pesticidas dañaban abejas domésticas asociadas a apicultura (EFSA 2013b) y determinó su

completa prohibición en 2018 (UE, 2018a). Esta prohibición fue permanente y extendida a todo cultivo realizado a campo abierto (UE, 2018b). La Agencia Regulatoria para el Manejo de Plagas de Canadá (PMRA) planifica la prohibición del uso de algunos Neo en periodos de 3 a 5 años, mientras que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) canceló el uso de 12 productos que contenían clotianidina y tiametoxam en 2019 (US EPA, 2019). En 2018, la UE renovó la aprobación del uso de acetamiprid debido principalmente a que no presentaría alto riesgo para polinizadores (UE, 2018b). En nuestro país las regulaciones aún permiten el uso de varios de los neonicotinoides que actualmente están siendo discutidos y restringidos por los organismos mencionados. En el país y en particular en Patagonia Norte se utiliza principalmente acetamiprid para el control de distintas plagas como la carpocapsa, insecto que afecta la producción de peras y manzanas (INTA, 2019).

En este contexto, para el desarrollo de este trabajo de tesis se seleccionó al Neo acetamiprid (Ace) para estudiar su toxicidad en organismos no blancos. Particularmente Ace es un sólido cristalino blanco, inodoro, y forma parte del grupo de los cloropiridinilo, sus características principales están descriptas en la Tabla 6. Debido a sus propiedades, Ace en suelo y agua prácticamente no se volatiliza, sin embargo, puede sufrir una relativamente rápida degradación biológica en condiciones aerobias (vida media entre 1 y 8 días), por lo cual se considera relativamente menos persistente en comparación a otros neonicotinoides. Su movilidad en suelos y sedimentos varía de moderada a alta, no obstante, su lixiviación parecería no ser significativa ya que sería rápidamente biodegradado. La hidrólisis y la fotólisis en agua, y la acumulación en sedimentos, no constituirían destinos ambientales importantes.

Tabla 6: Características principales de acetamiprid

Familia	Neonicotinoide
Nombre IUPAC	(E)-N1-[(6-cloro-3-piridil) metil]-N2-ciano-N1-metilacetamidina
Número CAS	135410-20-7
Fórmula química	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄
Estructura química	
Peso molecular	222,48 g/mol
Productos de comercialización	Assail, Epik, Mospilan, Prize, etc
Volatilidad	Muy baja
Punto de fusión	98,9 °C
Densidad	1,330
Solubilidad en agua a 25 °C	4250 mg/L
Coeficiente de partición Kow	0,80
Coeficiente de adsorción Koc	132-267
Tiempo de vida media en agua	1-8 días
Factor de bioconcentración	2
Bioacumulación	No observada
Toxicidad aguda en mamíferos	Clase II – moderadamente tóxico DL50 oral en rata macho 217 mg/kg, en rata hembra 146 mg/kg CL50 inhalación en rata (macho y hembra) >0,29 mg/L DL50 cutáneo en rata (macho y hembra) >2000 mg/kg

Fuente: adaptado de Taira (2014), Jenske y Nauen (2005), Quintana (2017) y Resumen de compuesto de Pubchem, NCBI. Disponible: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetamiprid#section=LC-MS>

1.2 Mecanismo de toxicidad de organofosforados y neonicotinoides

Los plaguicidas OF y Neo pertenecen a dos familias de insecticidas distintas, como se explicó anteriormente. Sin embargo, ambas familias están diseñadas para actuar sobre el sistema nervioso de insectos, y poseen un mecanismo de toxicidad de base neurotóxica. Ambas actúan sobre distintos componentes del sistema colinérgico. Por ello, a continuación, se desarrollará brevemente dicho sistema.

1.2.1 Generalidades del sistema colinérgico

La acetilcolina (ACh) fue el primer neurotransmisor caracterizado tanto en el sistema nervioso periférico (SNP) como en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. Participa en la regulación de diversas funciones como fenómenos de activación cortical, el paso de sueño a vigilia y procesos de memoria y asociación, entre otros. La ACh se sintetiza a partir de la colina y del acetil CoA, en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa (ChAT) y existen mecanismos que regulan de manera precisa su síntesis y liberación (Sánchez Chavez y Salceda 2008).

La ACh puede interactuar con distintas clases de receptores. Las técnicas de clonación molecular han permitido la identificación de dos clases, los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) y los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Flores Soto y Segura Torres 2005). Los mAChR se caracterizan por respuestas prolongadas, resultado de interacciones con sistemas de segundos mensajeros mediados por proteínas G. Por el contrario, las respuestas nicotínicas suelen ser más rápidas y breves, ya que, el complejo neurotransmisor-receptor provoca cambios en su estructura que conducen a la apertura de un canal iónico, selectivo para cationes (Sanabria-Castro y col., 2017).

1.2.1.1 Receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR)

Los mAChR pertenecen al grupo de receptores acoplados a proteínas G, estructuralmente son glicoproteínas con siete segmentos helicoidales constituidos por aproximadamente 24 aminoácidos que atraviesan la membrana (Figura 3). Los segmentos transmembrana se organizan formando un anillo en cuya parte interna se agrupan diferentes aminoácidos hidrofílicos. La unión entre segmentos se da por medio de secuencias de aminoácidos que forman distintos bucles intracelulares (i1-i4) o extracelulares. A su vez, en la cara citoplasmática de la membrana se orienta el extremo carboxílico terminal, estando el extremo amino terminal orientado al ambiente extracelular (González 2013).

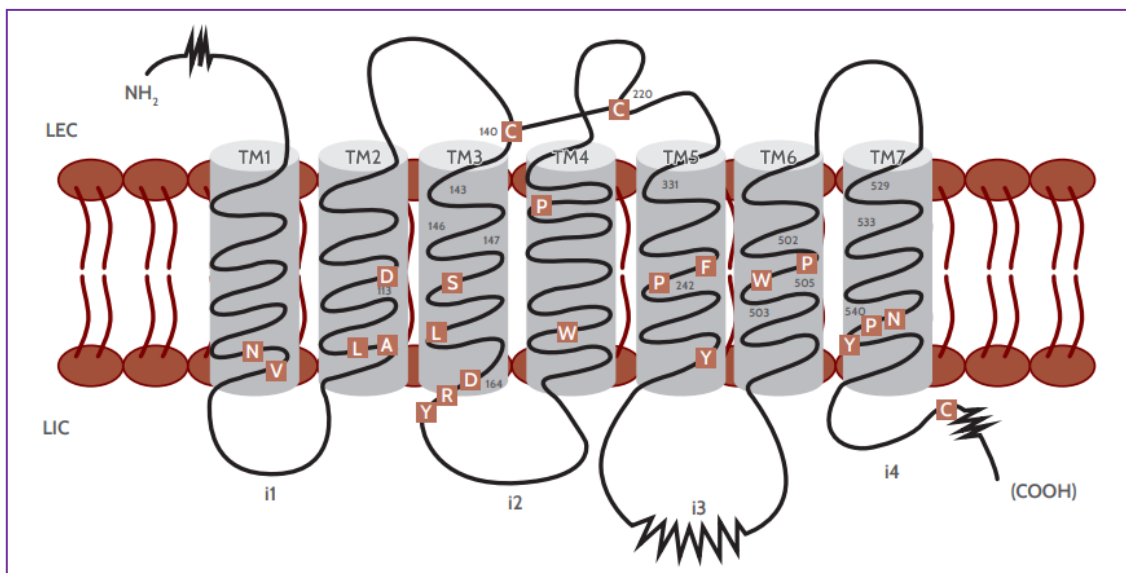


Figura 3: Representación de la secuencia y estructura del receptor muscarínico. Presencia de los segmentos transmembrana (TM1-TM7) bucles extracelulares e intracelulares (i1-i4). El bucle i3 puede tener secuencias de aminoácidos de longitud variable según la proteína G en cuestión, sección que se representa como una serie de líneas en zigzag. LEC: Líquido extracelular, LIC Líquido intracelular. Extraído de Sanabria-Castro y col. (2017).

Los mAChR se localizan principalmente en la membrana plasmática de células de músculo liso, músculo cardíaco, a nivel cerebral y de algunas glándulas. Estos receptores se activan por muscarina y son antagonizados por atropina (Spalding y Burstein 2006). Se han descrito cinco tipos distintos de receptores

muscarínicos (M1-M5), que median la mayoría de las acciones de la ACh tanto a nivel central como periférico (Heinrich y col., 2009, Sanabria-Castro y col., 2017).

La activación de los mAChR M1, M2 y M5, conduce a la activación de proteínas G con la consecuente producción del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPC) a partir del ATP por adenil ciclasas unidas a la membrana celular. Los efectos funcionales de AMPC incluyen: activación de proteína quinasa C (PKC) y fosforilación de proteínas; inhibición de fosfatasa que removerían los grupos fosfato de proteínas previamente fosforiladas; regulación directa de canales iónicos (por ejemplo, canales catiónicos no selectivos que muestran alta permeabilidad a Ca^{2+}); regulación de expresión de genes por medio de la traslocación al núcleo de subunidades catalíticas de la proteína quinasa A (PKA) que fosforilan a proteínas nucleares que estimulan la transcripción de un número importante de genes (Alberts y col., 1994; Scott y Soderling 1992; Mujica y col., 2001; Ximmerman 1995; Zimmerman 1993, Soto Flores y Segura Torres, 2005). Se ha reportado también en el SNC, que la activación de M1, M2 y M3 induce la producción de otros segundos mensajeros como el inositol trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol, por estimulación de fosfolipasas C que catalizan la hidrólisis del 4,5-difosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), un fosfolípido presente en la membrana celular (Chung 1989; Taylor 1990; Chen y col., 2003; Soto Flores y Segura Torres, 2005).

1.2.1.2 Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)

Los nAChR son receptores ionotrópicos, es decir canales iónicos activados por ligandos. Estos receptores constituyen por si mismos un canal iónico donde su activación permite un flujo selectivo de iones al interior celular, modificando así el potencial de reposo de la célula. El grado de despolarización o hiperpolarización de la membrana celular determina la generación o no de la señal propagada y, por tanto, de la transmisión de la información.

Los nAChR son receptores de la familia de receptores tipo *cys-loop*, los cuales estructuralmente presentan dos cisteínas altamente conservadas en el dominio

amino terminal importantes para la unión al ligando y, además, están constituidos por cinco subunidades dispuestas de forma asimétrica formando un poro por donde se da el flujo iónico, como puede observarse en la Figura 4 (Mnatsakanyan y col., 2015). Cada subunidad posee cuatro segmentos transmembrana en forma de α -hélice, un dominio amino y otro carboxilo terminal localizados en la región extracelular, así como un dominio citoplasmático con sitios de fosforilación (Sanabria-Castro y col 2017).

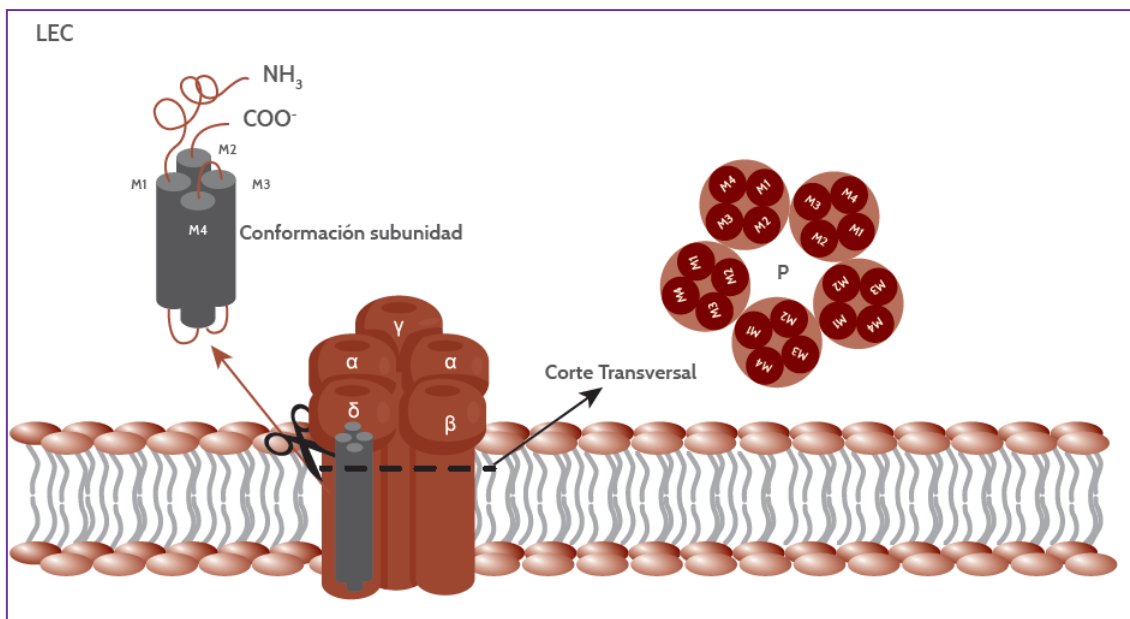


Figura 4: Estructura de receptores nicotínicos de acetilcolina. Conformación y acoplamiento de los segmentos transmembrana y las subunidades del receptor nicotínico de acetilcolina. α , β , γ , δ : subunidades que componen el receptor. Cada subunidad está formada por cuatro segmentos transmembrana: M1, M2, M3 y M4. NH_3 : extremo amino terminal, COO^- extremo carboxilo terminal; LEC: líquido extracelular. Extraído de Sanabria-Castro y col. (2017).

Las distintas combinaciones de las subunidades favorecen un número elevado de nAChR con propiedades farmacológicas y localizaciones muy variadas (Velázquez-Flores y Salceda 2011), pudiendo localizarse en neuronas, unión neuromuscular o en ganglios autónomos (Yakel 2010; Gotti y col 2006). Como se mencionó, estos receptores son pentámeros compuestos por distintas unidades. En los vertebrados existen diecisiete subunidades homólogas que componen los nAChR: $\alpha 1$ a $\alpha 10$, $\beta 1$ a $\beta 4$, γ , δ y ϵ (Nashmi y Lester 2006;

Albuquerque y col., 2009; Sanabria-Castro y col., 2017). A nivel neuronal, los pentámeros de los nAChR están constituidos únicamente por subunidades α y β . El ensamblaje de dichos receptores da lugar a heteropentámeros u homopentámeros. En el caso de los heteropentámeros, las conformaciones se basan en las posibles combinaciones de las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$, $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$. En el caso de los homopentámeros están principalmente constituidos por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$. A nivel neuronal, los receptores más abundantes están constituidos por heteropentámeros $\alpha 4_3\beta 2_2$ y homopentámeros $\alpha 7$ ($\alpha 7_5$) (Schliebs y Arendt 2011; Ren y col., 2005; Flores-Soto y Segura Torres 2005; Sanabria-Castro y col., 2017).

Ya que los receptores nicotínicos forman canales permeables a los cationes, la unión de ACh a estos receptores origina un flujo de iones positivos Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Donde principalmente se produce la entrada de iones sodio y una salida de iones potasio específicamente para los receptores $\alpha 4_2\beta 2_3$, también se ha descrito la entrada a la célula de iones calcio en el caso de los receptores $\alpha 4_3\beta 2_2$ y principalmente $\alpha 7_5$ (Hernández y col., 2008; Sanabria-Castro y col., 2017).

Debido a la gran cantidad de combinaciones posibles, es que se los ha vinculados a distintas funciones en el sistema nervioso. Se ha determinado que en el sistema nervioso central y periférico, $\alpha 7_5$ tiene amplia distribución y sumado a que su permeabilidad a Ca^{2+} es la mayor de todos los receptores nicotínicos, se le atribuyen sus efectos en relación al incremento de la liberación de ACh en los ganglios simpáticos y parasimpáticos; el incremento de la liberación de glutamato; control a nivel presináptico de la liberación de noradrenalina en muchas áreas del cerebro medio. En cuanto a receptores heteroméricos conteniendo subunidades α y β , se los ha relacionado con el control de la secreción de dopamina; incremento de la liberación de ácido γ -aminobutírico (GABA) de las inter neuronas, así como a la liberación de noradrenalina, entre otras funciones (McDermont y col., 1999; Miler y col., 1999; Wu y Saggau 1997; Wonnacott 1997; Flores Soto y Segura Torres 2005).

1.2.1.3 Acetilcolinesterasa

La ACh liberada al espacio sináptico actúa sobre sus receptores y consecuentemente es hidrolizada por acción de la enzima AChE (Flores Soto y Segura Torres 2005) (Figura 5). La AChE es una B-esterasas que al hidrolizar ACh termina la transmisión sináptica. Además, la AChE pertenece al grupo de las glicoproteínas y puede estar unida a membranas o ser liberada al espacio extracelular, localizándose en uniones neuromusculares principalmente en la hendidura sináptica. Las moléculas de ACh que no se unen inmediatamente con un receptor, o las liberadas después de la unión a receptor, son hidrolizadas casi instantáneamente por AChE (Sánchez-Chávez y Salceda 2008). Finalmente, la colina es absorbida por la terminal nerviosa y reutilizada para la síntesis de ACh.

Existen grandes diferencias en los efectos que desencadena la ACh en diferentes sitios de transmisión colinérgica. En las terminaciones autónomas la ACh puede actuar como excitador o inhibidor según el órgano implicado, mientras que a nivel cerebral constituye uno de los principales neurotransmisores excitadores; regula de manera central la función motora extra piramidal y posee un efecto excitador de los ganglios basales que contrarresta la acción inhibitoria de la dopamina (Velázquez-Flores y col., 2011; Dani y Bertrand 2005).

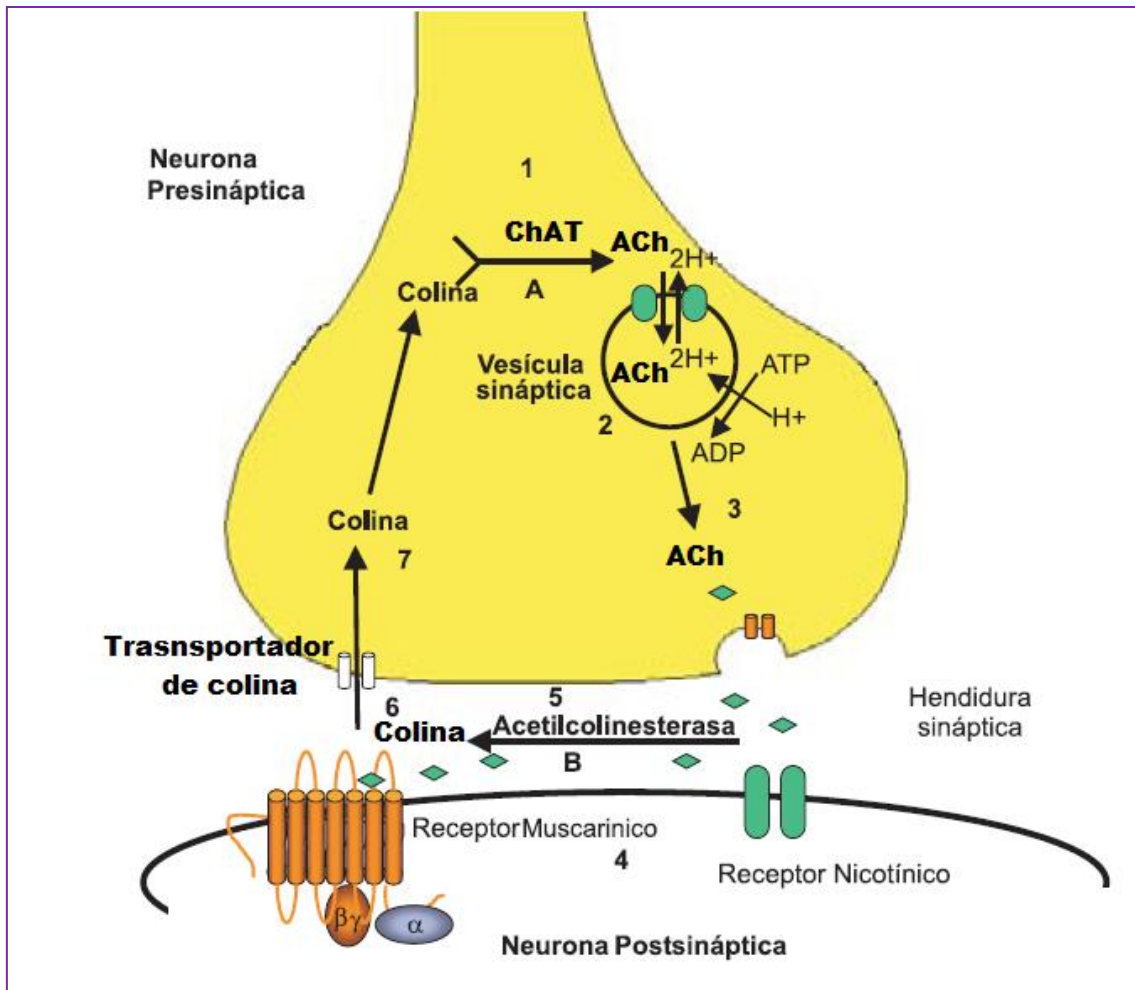


Figura 5: Sinapsis colinérgica. La acetilcolina (ACh) es sintetizada a partir de colina y acetyl CoA por la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) (1) y liberada al espacio sináptico por exocitosis a través de las vesículas sinápticas (2) o bien, liberada directamente (3), para luego unirse a receptores nicotínicos o muscarínicos (4). Las moléculas de ACh que no se unen inmediatamente con un receptor o las liberadas después de la unión a receptor, son hidrolizadas casi instantáneamente por la enzima acetilcolinesterasa (5), liberando colina (6) la cual es transportada al citoplasma a través de transportadores de colina (7) para ser reutilizada en la síntesis de ACh. Extraído y adaptado de Flores Soto y Segura Torres (2005).

1.2.1.4 Sistema colinérgico no neuronal

Si bien se considera a la ACh como un neurotransmisor clásico del sistema nervioso, se sabe que es una molécula filogenéticamente conservada que se encuentra distribuida en células eucariotas y procariontas. Por esto, es probable que evolutivamente haya tenido un rol previo como citotransmisor (Martínez Pulido 2015). En la actualidad, se conoce que además de ser sintetizada en

neuronas, la ACh se encuentra ampliamente en células no neuronales reforzando su importancia en la regulación de funciones celulares básicas como la proliferación celular, diferenciación, migración, adhesión, organización del citoesqueleto, contacto célula-célula, funciones inmunes, secreción y reabsorción de fluidos. Se ha sugerido que la ACh tiene un rol como intermediario en la interacción de las células no neuronales con el ambiente externo, hormonas, factores de crecimiento y citoquinas. Por otra parte, un aumento de la producción de ACh ha sido vinculado con la etiología de distintas enfermedades inflamatorias e incluso con el cáncer (Wessler y Kirkpatrick 2008). Por ello, a finales de los '90 se definió la existencia del sistema colinérgico no neuronal (Wessler y col 1998), incluyéndose dentro de este a la propia ACh; la enzima encargada de su síntesis: la enzima ChAT; la enzima AChE y los receptores mAChR y nAChR (Kawashima y Fujii 2008).

1.2.2 Blancos de toxicidad de organofosforados y neonicotinoides

1.2.2.1 Blancos principales

Como se indicó anteriormente, el mecanismo de acción de los insecticidas organofosforados y neonicotinoides está vinculado al sistema colinérgico. No obstante, actúan sobre distintos componentes de este sistema.

Particularmente para los insecticidas OF, el blanco primario de acción es la enzima AChE. Los OF, previamente bioactivados a su forma oxón fosforilan el grupo -OH, en el sitio activo de AChE, inhibiendo su actividad (Costa 2006; Li 2007; Elersek y Filipic 2011). La inhibición de AChE por insecticidas OF es análoga al proceso de hidrólisis de su sustrato natural ACh (Figura 6). Teniendo en cuenta la estructura básica de OF, el sitio aniónico polariza el enlace P=O y activa el átomo de fósforo lo que favorece el ataque nucleofílico del átomo de oxígeno del -OH de una serina en el sitio esterásico. La serina es fosforilada y el grupo saliente del insecticida se disocia de la enzima. A pesar de que la enzima acetilada es rápidamente hidrolizada cuando reacciona con su sustrato ACh, cuando se fosforila como resultado de la acción de OF, la unión es muy estable y el proceso de regeneración es muy lento. Esto lleva al envejecimiento de la

enzima, por lo que AChE permanece inhibida irreversiblemente. La recuperación de los niveles de actividad de AChE tiene lugar cuando se produce la síntesis *de novo*, proceso que lleva días (Costa 2006).

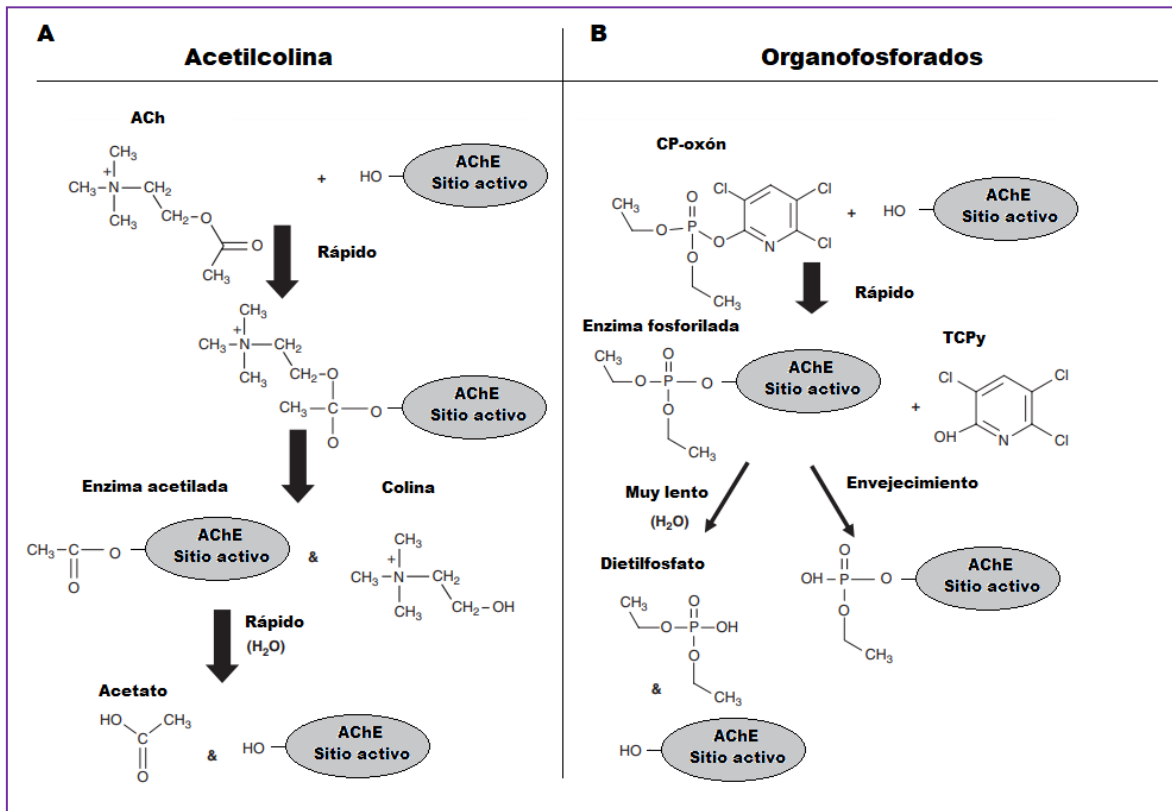


Figura 6: Interacción de OF con acetilcolinesterasa. Esquema de la interacción de acetilcolina (ACh) (A) y del organofosforado clorpirifos oxón (CP-oxón) (B) con el sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). TCPy: 3, 5,6 tricloro-2-piridinol, metabolito de CP. Extraído de Barry y col (2009).

La inhibición de AChE por OF provoca la acumulación de ACh y la consecuente activación de receptores muscarínicos y nicotínicos, produciendo una hiperestimulación nerviosa (Ranjbar y col., 2005). Se han reportado diversos síntomas que aparecen rápidamente luego de la exposición aguda, entre los cuales se puede mencionar: visión borrosa, náuseas, vómitos, secreciones bronquiales, bronco constricción, entre otros, e incluso las intoxicaciones agudas pueden llegar a producir muerte. (Nouira y col., 1995; Palacios Nava y col., 1999).

Por otro lado, la enzima esterasa neurotóxica (ENT) es otro blanco primario de acción de OF (Costa, 2006). Dependiendo de su estructura química, varios OF

pueden inhibir esta enzima. La fosforilación de ENT es similar a la observada para AChE, pero produce otro tipo de manifestación toxicológica conocida como polineuropatía retardada, cuyos efectos no se observan sino hasta después de varios días ocurrida la intoxicación aguda con OF (Fernández y col., 2010). Otras enzimas pertenecientes a la familia de las B-esterasas son susceptibles de ser inhibidas por OF. Entre ellas se pueden identificar la butirilcolinesterasa (BuChE), cuya inhibición parece no producir síntomas adversos de intoxicación, no obstante, es inhibida a concentraciones mucho más bajas que AChE. La familia de las carboxilesterasas (CE), enzimas de fase I, catalizan la hidrólisis de esteres carboxílicos actuando como enzimas detoxificantes. Estas también son inhibidas por OF. Al detoxificar OF, las CE forman una unión covalente análoga a la de AChE-OF. No obstante, esta inhibición tampoco ha sido relacionada con algún efecto fisiológico agudo particular (Casida y Quistad 2005; Espinoza y col., 2016).

En el caso de los plaguicidas Neo, también actúan sobre el sistema colinérgico pero sus efectos se explican a través de su interacción con los receptores de ACh. Su mecanismo de acción está dado por unión con los receptores nAChR en las neuronas postsinápticas del sistema nervioso central, tanto en vertebrados como en invertebrados (Estrada y col., 2016). Es importante resaltar que por su afinidad por nAChR de invertebrados y su alta hidrosolubilidad, se ha hipotetizado que no cruzarían bien la barrera hematoencefálica en humanos (Phua y col., 2009). No obstante, ha sido demostrado que el Neo acetamiprid es rápidamente metabolizado en hombres adultos (Harada y col., 2016). Sumado a esto, en modelos murinos, Ford y Casida (2006) han reportado que Ace es metabolizado y tanto el insecticida parental como sus metabolitos han sido observados en cerebro, hígado, plasma y orina. Dado su mecanismo de acción, interfieren con la transmisión de impulsos en el sistema nervioso central. Cuando estos compuestos se unen a los receptores, se genera una acción no controlada con la consecuente neurotoxicidad (Simon-Delso y col., 2015).

Debido a su incorporación más reciente al mercado mundial en comparación con otras familias de plaguicidas como los OF, los estudios de blancos neurotóxicos tanto para mamíferos como para humanos son más limitados. Aunque en la bibliografía se encuentran reportados casos fatales por intoxicación aguda (Pei-

Chen y col., 2013), los estudios referidos a la toxicidad de Neo en la exposición humana y en modelos celulares humanos son escasos (Mesnage y col., 2014). No obstante, en estudios realizados en neuronas de ratón se ha reportado que el Neo imidacloprid es capaz de alterar el potencial de membrana, sugiriendo que exposiciones crónicas a bajas concentraciones de este insecticida pueden alterar funciones neuronales (Bal y col., 2010). Análogamente, Sheets y col. (2016) señalan que el Neo Ace tiene mayor afinidad por nAChR de mamíferos que otros insecticidas de la misma familia, sugiriendo que puede provocar efectos a nivel del hipotálamo con alteraciones socio-reproductivas en ratones machos expuestos (Sheets y col., 2016; Sano y col 2016). Estos resultados marcan el potencial de los Neo de presentar efectos neurotóxicos en mamíferos.

1.2.2.2 Blancos alternativos

Históricamente, el análisis de los efectos de sustancias tóxicas como los plaguicidas ha sido enfocado en el estudio de los principales blancos de acción de cada familia. Sin embargo, la aplicación en grandes volúmenes de agroquímicos causa una grave contaminación ambiental, lo cual se debe principalmente a la capacidad que tienen estas sustancias de migrar en distintos componentes del ambiente y alcanzar sitios lejanos al cual fueron aplicados. Esto resulta en potenciales riesgos para la salud humana en general, que podrían estar asociados a exposiciones crónicas a bajas dosis o incluso impacto sobre nuevos blancos de acción.

Ha sido estudiado en animales de laboratorio que formulaciones comerciales de plaguicidas OF, carbamatos, triazinas, entre otros, pueden alterar la homeostasis del sistema neuroendócrino, explicando la acción de estos plaguicidas como disruptores endócrinos incluso a bajas concentraciones (Morales Ovalles y col., 2014, Cocca y col., 2015; Ventura y col., 2016). También ha sido postulado que podrían presentar efectos inmunotóxicos como resultado de exposiciones a grandes dosis o bien exposiciones crónicas a bajas dosis (García y col., 2016). Sumado a esto, se han destacado mecanismos moleculares de toxicidad que relacionan a la exposición a plaguicidas con efectos como la peroxidación de lípidos o daño oxidativo en el ADN, como resultado de estrés oxidativo (Cortés-

Iza y Rodríguez 2018). En este escenario las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno pueden incrementar procesos oxidativos intracelulares produciendo daño celular y tisular. Sin embargo, los mecanismos por los cuales los plaguicidas inducen estos efectos toxicológicos todavía no han sido comprendidos en su totalidad.

Este trabajo de tesis se centra en indagar sobre los posibles mecanismos vinculados a alteraciones en la respuesta inmune innata y al balance oxidativo como resultado de la exposición a plaguicidas. Por ello, los blancos alternativos abordados en esta tesis se describen a continuación.

1.2.3 Respuesta inmune innata

La respuesta inmune incluye una serie de acontecimientos coordinados que en conjunto muestran una elevada complejidad. El principal objetivo biológico del sistema inmune es defender al organismo ante diferentes noxas. El sistema inmune puede ser diferenciado entre la respuesta innata y adquirida, estando ambas estrechamente relacionadas. Mientras que la inmunidad innata forma parte de todos los tipos de organismos multicelulares, la inmunidad adquirida solo existe en vertebrados (Chie y col., 2009).

De acuerdo a Toche (2012), dentro de los componentes del sistema inmune innato se pueden mencionar: barreras físicas y químicas, como los epitelios y las enzimas, que impiden el ingreso de patógenos ya sea constituyendo una barrera física o química; el sistema de complemento, que incluye proteínas que circulan inactivas en el plasma capaces de dirigir la lisis y la opsonización (marcado de un patógeno para su ingestión); polimorfonucleares o neutrófilos, células que constituyen la primera línea de defensa contra microorganismos, involucrados a la fagocitosis y lisis de microorganismos; células NK (*Natural Killer* o asesinas naturales) que son una subclase de linfocitos que destruyen las células infectadas y células que han perdido la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I (HLA I); macrófagos que se encuentran como monocitos circulantes o macrófagos tisulares y están encargados de la fagocitosis, lisis bacteriana y degradación de antígeno a péptido; y citoquinas

que son secretadas por las células del sistema inmune innato y adquirido en respuesta a microorganismos y otros antígenos, estimulando el crecimiento y diferenciación de los linfocitos y monocitos hacia células efectoras involucradas en la eliminación de los microorganismos y en la inflamación.

La inmunidad innata (natural o inespecífica) es un sistema en el que participan componentes celulares y humorales, para eliminar todo aquello que no sea "propio" y que ha ingresado al organismo. Los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, entre otras, son las células efectoras más importantes de la inmunidad innata (Chie y col., 2009). La respuesta innata carece de especificidad y de memoria, sin embargo, constituye la primera línea de defensa del organismo, ya que sus componentes están siempre presentes y disponibles para actuar inmediatamente, sin requerir un tiempo de latencia para desencadenar dicha respuesta (Duran y col., 2009). Las células involucradas en la inmunidad innata reconocen sustancias extrañas, como por ejemplo componentes bacterianos, por su unión y activación de determinados receptores que a su vez regulan la activación de otras células mediante la producción y liberación de citoquinas. Además, las células pertenecientes a la inmunidad innata pueden fagocitar los cuerpos extraños y activar el sistema inmune adquirido presentando parte del cuerpo fagocitado (Takeda y Akira 2005). Una de las consecuencias del proceso de reconocimiento y respuesta, es la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Matsuzawa y col., 2005).

Sumado a los componentes antes descritos, es importante mencionar que los microorganismos expresan distintos patrones moleculares que son específicos y diferenciables de los del hospedador. Estos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) incluyen: virus de ARN bicatenario; dinucleótidos de citosina y guanina metilados comunes en el ADN bacteriano pero escasos en el ADN de vertebrados; manoproteínas de hongos; glicopéptidos de las micobacterias; lipoproteínas de bacterias y parásitos; ácidos lipoteicoicos de bacterias gram positivas y lipopolisacárido (LPS) de gram negativas. Los seres humanos a lo largo de la evolución han desarrollado receptores de reconocimiento de patrones específicos (RRP) para detectar PAMPs. Funcionalmente, dichos receptores pueden dividirse en receptores secretados, endocíticos y de señalización. Estos últimos son capaces de inducir la expresión de una variedad de citoquinas que

subsecuentemente amplifican la respuesta inmunitaria innata y dirigen la adaptativa (Duran y col., 2009; Abbas y col., 2008; Janeway y Medzhitov 2002).

Los RRP se encuentran distribuidos con perfiles particulares en cada tipo de célula, pero su función es la misma independientemente de su localización celular. Además, un solo receptor genera una respuesta celular mediante su interacción con varios ligandos que son estructuralmente distintos. No obstante, el nivel de especificidad de los RRP es tal que dos receptores distintos distinguen porciones de una misma molécula y no entrecruzan sus respuestas (Gersuk y col., 2006; Juárez Carvajal y col., 2009). Una vez activados los RRP, disparan eventos de señalización intracelular que llevan a la producción de mediadores de la inflamación (Bérubé y col., 2009). Las dos familias de RRP más estudiadas son los receptores tipo toll o TLR (del inglés *toll like receptors*) y los NLR (del inglés *NOD like Receptors*) (Fritz y col., 2006; O'Neill 2006). Sin embargo, existen otros RRP menos estudiados pero cuya participación en la respuesta a la infección cada vez se conoce mejor, entre ellos se pueden mencionar las helicasas tipo RIG o RLR, lectinas tipo C o CLR, receptores purinérgicos, *scavengers* entre otros (Taylor y col., 2005; Carvajal y col., 2009).

Recientemente se ha reportado que el mecanismo de toxicidad asociado a las alteraciones inducidas por la exposición a distintos plaguicidas, como el fungicida metilditiocarbamato (Deng y col., 2013), el herbicida paraquat (Dong y col., 2013) y el OF diazinon (Win-Shwe y col., 2012), al menos en parte depende de la señalización de TLR. En este trabajo de tesis se indagará el efecto de plaguicidas OF sobre TLR, es por ello que los aspectos más importantes de este tipo de receptores se detallan a continuación.

1.2.3.1 Receptores tipo toll (TLR)

Los TLR son sensores de reconocimiento de membrana evolutivamente conservados, propios de la inmunidad innata que reconocen características en los patógenos o compuestos liberados por tejido necrótico (Durán y col., 2014). Son receptores transmembrana de tipo 1 que presentan homología con la proteína Toll de *Drosophila* y el receptor de la interleuquina 1 (IL-1) (IL-1R). La

mayoría de estos receptores se expresan en la superficie celular mientras que una minoría se encuentran presentes en compartimientos endosomales (Figura 7a). Los TLR son homodímeros o heterodímeros que comparten un elemento común en su región extracelular, segmentos de 24-29 aminoácidos que contienen repeticiones ricas en leucina (LRR). El dominio intracelular se denomina dominio Toll/receptor IL-1 (TIR), estos dominios presentan tres regiones altamente conservadas entre los miembros de la familia TIR denominadas “cajas” 1, 2 y 3 (Figura 7b). Estas regiones son lugares de unión para proteínas intracelulares que participan en las vías de señalización mediadas por TLR (Herrero 2010)

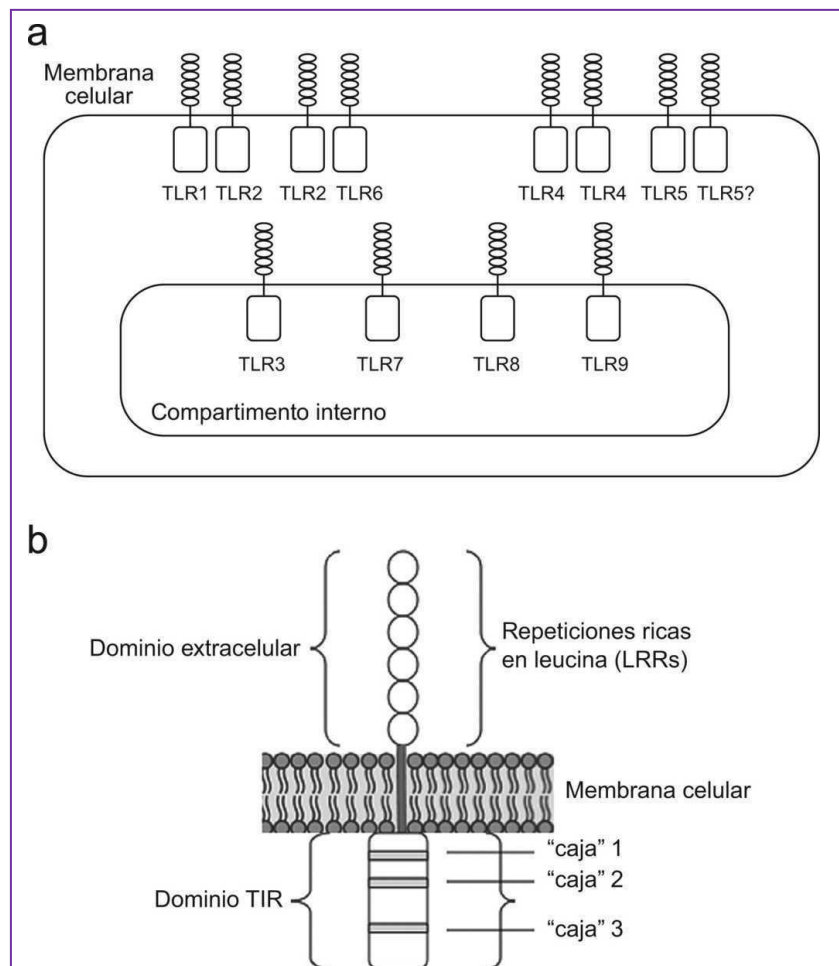


Figura 7: Esquema y localización de TLR. Localización celular de receptores tipo toll (TLR) sobre la membrana celular o en compartimientos endosomales (a) y estructura general de TLR (b). Extraído de Herrero (2010)

En la actualidad se conocen 11 TLR en humanos (TLR-1-11) que tienen un patrón de expresión variable en tejidos linfoides y no linfoides. De modo característico, los TLR tienen un amplio rango de ligandos que incluyen PAMPs de bacterias, hongos, levaduras y parásitos (Tabla 7) como así también de componentes derivados del propio organismo (Tabla 8).

Tabla 7: Expresión y ligandos de TLR-2 y 4 en mamíferos

Receptor	Expresión (ARNm)	Ligando	Origen del ligando
TLR-1 (con TLR-2)	M, N, LB, NK, CDi, CDpl	Lipopolipéptidos triacilados (Pam3Cys) Factores solubles	Bacterias y micobacterias <i>Neisseria meningitidis</i>
	TLR-2	PMN, M, CD, CDi	Lipoproteínas y lipopéptidos Peptidoglicano Ácido lipoteicoico Lipoarabinomanano Modulina soluble en fenol Glicoinositol fosfolípidos Glicolípidos Porinas Lipopolisacárido atípico Zymosan
TLR-4	Cend, M, N, CD	Lipopolisacárido (LPS) Proteína de fusión Proteína de la envoltura HSP60	Gram – Virus sincitial respiratorio Virus tumor mamario <i>Chlamydia pneumoniae</i>
TLR-6 (con TLR-2)	M, CDi, CDpl	Lipopéptidos diacilados (Pam2Cys) LTA Zymosan	Mycoplasma Gram+ Hongos

M: monocito; N: neutrófilos, CD: célula dendrítica; CDi: CD inmadura; CDpl: CD plasmocitoide; Cend: célula endotelial; NK: célula *Natural Killer*; PMN: células polimorfonucleares; LB: linfocitos
B. Extraído de Mesa-Villanueva y Patiño (2006)

Tabla 8: Ligandos endógenos y sus respuestas

Estímulo endógeno	TLR involucrado	Respuesta celular activada
Proteína de choque térmico (HSP)	TLR-4 (HSP60) TLR-2/TLR-4 (HSP70, GP96)	Activación de NFκB, maduración de CD, síntesis de citoquinas
Hialuronano	TLR-4	Activación de NFκB, maduración de CD, síntesis de citoquinas
Proteína surfactante A	TLR-4	Activación de NFκB, síntesis de citoquinas
Células necróticas	TLR-2	Activación de NFκB, maduración de CD, inducción de genes de reparación tisular
Fibronectina, fibrinógeno, heparan	TLR-4	Inducción de genes inflamatorios, maduración de CD

Extraído de Mesa-Villanueva y Patiño (2006)

La unión de TLR con su ligando causa la dimerización del receptor. Después de la dimerización, la porción citoplasmática del TLR se une a diferentes moléculas adaptadoras a través de su dominio TIR. El adaptador mejor caracterizado en la señalización de la mayoría de los TLR es MyD88, el cual recluta protein-quinasa del receptor de IL-1 (IRAK), factor 6 del receptor de TNF (TRAF6) y la quinasa 1 activada por TGF-β (TAK1) (Figura 8). Luego del reclutamiento de estas proteínas, se pueden activar cuatro vías principales de señalización: la vía del factor de nuclear de transcripción κB (NFκB) y tres vías de protein-quinasa activadas por mitógeno (MAP) como ERK1/ERK2, p38 y JNK (Juárez Carvajal y col., 2009). También se ha descrito para TLR-3 y TLR-4 una vía de señalización independiente de MyD88 y dependiente del activador de interferón asociado al receptor Toll (TRIF) y la molécula asociada al receptor Toll (TRAM) (Sabroe y col., 2008). La activación de estas vías de señalización gatilla la transcripción de genes asociados a la producción de citoquinas pro-inflamatorias, péptidos

antimicrobianos, quimiocinas, proteínas para la remodelación tisular, intermediarios reactivos de oxígeno, interferones antivirales e incluso la apoptosis (Juárez Carvajal y col., 2009).

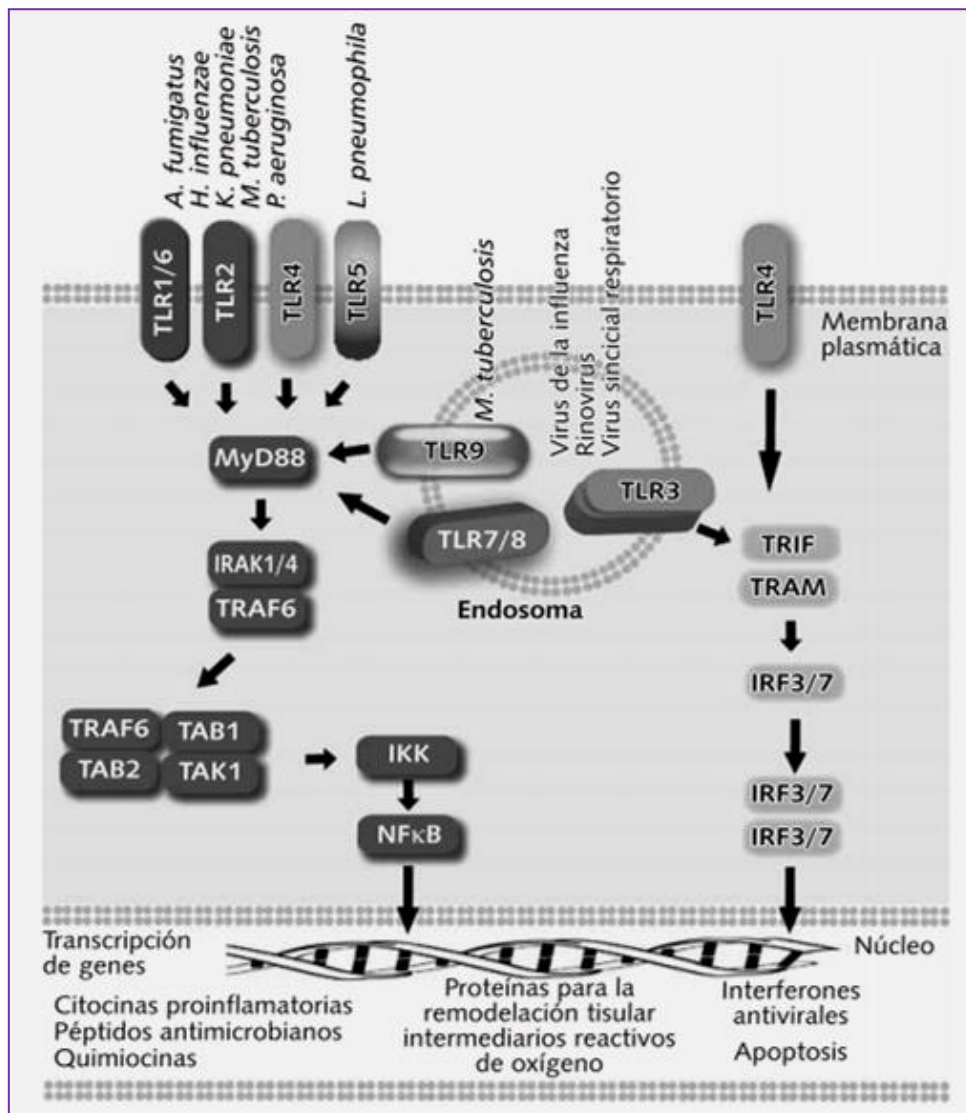


Figura 8: TLR en el reconocimiento de algunos patógenos. Los TLR reconocen una variedad de PAMPs conservados en microorganismos. La activación de TLR resulta en cascadas de señalización que culminan en la traslocación al núcleo de NFκB con la posterior activación de genes correspondientes a los programas inmunológicos disponibles para cada tipo celular. Extraído de Juárez Carvajal y col. (2009).

1.2.3.2 Citoquinas

Las citoquinas son un grupo de proteínas y glicoproteínas producidas por diversos tipos celulares que actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmunitaria e inflamatoria. Asimismo, intervienen como factores de crecimiento y moduladores de distintas células, actuando a concentraciones del orden de nano o pico molar. Las citoquinas constituyen de esta manera una compleja red de interacciones que conectan distintos tipos celulares y favorecen de manera sinérgica o bien antagonizan los efectos biológicos de otras citoquinas. Una característica común, es su efecto redundante, es decir que varias citoquinas pueden cumplir el mismo rol biológico, de aquí la importancia de su función reguladora (Filella y col., 2002).

Existen distintas clases de citoquinas, con múltiples funciones biológicas. Algunas tienen funciones similares y otras antagónicas. El efecto biológico de cada citoquina va a depender de la citoquina en cuestión y del tipo celular con el cual interaccione. Las citoquinas se pueden dividir en varios grupos, según su contexto de activación, la clase de células que las producen, etc. Por lo general, se encuentran los siguientes:

- **Interleuquinas (IL):** se encargan principalmente de regular la activación de las células del sistema inmune y de controlar la diferenciación y proliferación de algunas subpoblaciones celulares. Algunas tienen funciones pro-inflamatorias y otras anti-inflamatorias. También activan el endotelio y aumentan la permeabilidad vascular, facilitando la migración de células del sistema inmune desde el torrente sanguíneo hacia los distintos tejidos, promueven la secreción de anticuerpos y controlan la respuesta de los linfocitos T.
- **Factores de necrosis tumoral (TNF):** son citoquinas importantes durante las primeras etapas de la respuesta inflamatoria. Son producidas por una gran variedad de células y tienen un papel central en infecciones virales, así como en la proliferación y muerte celular (apoptosis).
- **Interferones (IFN):** los interferones α , β y γ tienen un papel importante en la respuesta innata ante virus u otros microorganismos patógenos. Son, por tanto, secretados como señales de peligro: promueven la actividad antiviral y la activación de las células NK.

- **Factores estimuladores de colonias (CSF):** son factores de crecimiento. Estimulan la proliferación y diferenciación de células madre a células especializadas del sistema inmune. Sus funciones están asociadas a la inflamación y la producción de otras citoquinas.
- **Quimiocinas o quimioquinas:** estimulan la motilidad de las células del sistema inmune, como los neutrófilos, y las dirigen por ejemplo hacia el lugar de inflamación, mediante un fenómeno denominado quimiotaxis.

La función de las células inmunocompetentes está fuertemente influenciada por el balance o equilibrio entre las sustancias antioxidantes y prooxidantes, de forma que una alta proporción de agentes antioxidantes ejerce un papel fundamental en la protección de las células inmunocompetentes (De la Fuente 2002). Además, se conoce que la exposición a plaguicidas, como el Neo imidacloprid, puede modular procesos oxidativos e inflamatorios (Duzguner y Erdogan 2010) y que el metabolismo de plaguicidas puede resultar en la liberación de especies reactivas (Calderón-Segura y col., 2012). Por ello, los aspectos más relevantes del balance oxidativo se detallan a continuación.

1.2.4 Balance oxidativo

1.2.4.1 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) forman parte del mecanismo de defensa innato de las células y también son producto del metabolismo fisiológico de los procesos celulares. Las ERO consisten en pequeñas moléculas de diversa naturaleza derivadas del O₂ que poseen un electrón desapareado en su último orbital (Figura 9) (Turrens y col., 1985, Kehrer 2015). Las ERO incluyen a radicales libres derivados del oxígeno, como el anión superóxido (O₂^{·-}), el radical hidroxilo (HO·), el radical peroxilo (RO₂·) y el radical alcoxilo (RO·); como así también a especies no radicalarias derivadas de la reducción molecular del oxígeno, y que además son muy reactivos, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el ácido hipocloroso (HClO), entre otras sustancias que fácilmente pueden ser convertidos en radicales (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005).

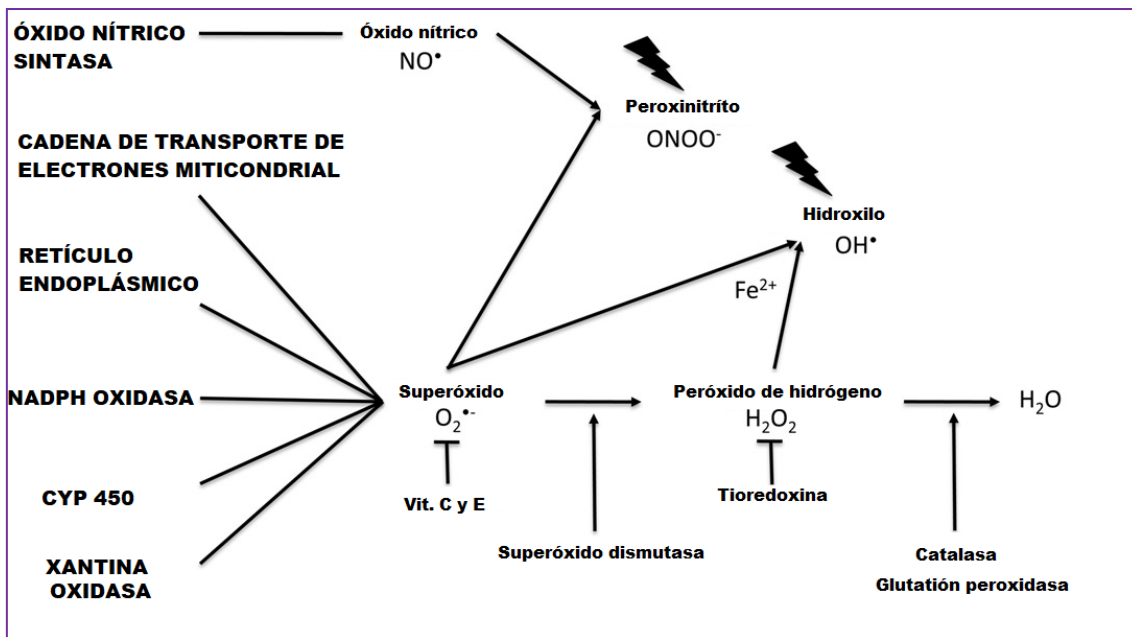


Figura 9: Principales especies reactivas, fuentes y vías de detoxificación. Extraído y modificado de Graham y col (2011).

El $O_2^{\cdot-}$ no es un oxidante fuerte, pero es el precursor de la mayoría de las ERO, y además está involucrado en la propagación de las reacciones oxidativas en cadena. Por dismutación espontánea o reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (Kono y Fridovich, 1982) se produce H_2O_2 , el cual puede ser totalmente reducido a H_2O o parcialmente reducido a radical HO^{\cdot} . La generación de HO^{\cdot} ocurre *in vivo* en una reacción conocida como reacción de Fenton–Haber Weiss (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Bajo condiciones fisiológicas, $O_2^{\cdot-}$ es generado a través de la activación de NADPH oxidasa y hacia el espacio extracelular dismuta en H_2O_2 . Debido a su capacidad de difusión a través de membranas y su afinidad para oxidar cisteínas, H_2O_2 puede actuar como una molécula señalizadora en procesos de transducción de señales y como mensajero secundario en cascadas intracelulares. En este contexto, regula la actividad de fosfatasa y quinasas, y a nivel de expresión genética modula factores de transcripción relacionados a la proliferación, diferenciación y apoptosis (Bevilacqua y col., 2012). Por otro lado, las ERO funcionan como mediadores inflamatorios y están implicadas en mecanismos de la defensa antimicrobiana (Choi y col., 2006; Bevilacqua y col., 2012).

Además de las ERO, existen especies reactivas del nitrógeno (ERN) que pueden ser o no radicales libres y se producen en forma constitutiva principalmente a través de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Entre las ERN se encuentran el radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y dióxido de nitrógeno (NO_2) y los no radicales como el catión nitronio (NO_2^+) y el peroxinitrito (ONOO^-), entre otros. Dentro de las ERN, el NO es de gran importancia debido a que es una molécula de señalización que está involucrada en numerosos procesos biológicos y participa en el control de la presión sanguínea, la inhibición de la agregación plaquetaria y en procesos de neurotransmisión (Cárdenas-Rodríguez y col., 2006).

Otra fuente de ERO es el metabolismo de plaguicidas, ya que la biotransformación de los mismos puede generar metabolitos reactivos entre los que se encuentran las ERO y las ERN. En este sentido ha sido postulado que el metabolismo de OF catalizado por enzimas del metabolismo de drogas y xenobióticos, como la familia citocromo P450, favorece la producción de ERO y altera la homeostasis de óxido-reducción o *redox* (Chambers y col., 2001). Asimismo, se ha vinculado como posible mecanismo de toxicidad de Neo, la producción de especies reactivas y su impacto en biomoléculas como el ADN, proteínas y lípidos (Duzguner y Erdogan 2010; Calderón-Segura y col., 2012).

1.2.4.2 Defensa antioxidante y balance oxidativo

En organismos aerobios, un complejo sistema de defensas antioxidante ha evolucionado para mantener el balance de las especies reactivas y proteger al organismo (Graham y col., 2011). Un antioxidante es cualquier sustancia que, a bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato. De acuerdo a Halliwell y Gutteridge (2015), en la defensa celular contra las especies reactivas se pueden identificar dos componentes o sistemas antioxidantes que son complementarios: uno no enzimático y otro enzimático.

En el sistema antioxidante no enzimático, cumplen un rol crucial agentes o sustancias de bajo peso molecular que son de origen endógeno o exógeno (principalmente de la dieta como el ácido ascórbico) y aquellas proteínas

secuestradoras de metales. Entre uno de los antioxidantes no enzimáticos de gran relevancia se encuentra el glutatión (GSH), que representa el principal “tampón *redox*” de las células. El GSH tiene una elevada capacidad antioxidante, ya que en condiciones fisiológicas solo el 1 % del GSH celular se encuentra en su forma oxidada (GSSG). Es sustrato en reacciones catalizadas por las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-transferasa (GST). Además, de tener la capacidad de neutralizar ERO, está involucrado en otros procesos metabólicos como el mantenimiento de los niveles de ascorbato, la comunicación intracelular y la prevención de oxidación de grupos –SH de las proteínas (Forman y col., 2009).

Dentro de las enzimas antioxidantes más relevantes se encuentran las que se detallan a continuación:

- **La enzima superóxido dismutasa (SOD).** Se han descrito tres isoformas de la enzima superóxido dismutasa: Cu, Zn-SOD o SOD citosólica, Mn-SOD o SOD mitocondrial y la Cu, Zn-SOD extracelular. Las tres isoformas son producto de distintos genes, pero todas catalizan la dismutación de anión superóxido en peróxido de hidrógeno. El descubrimiento de las SOD dio sustento a la idea del anión superóxido como principal responsable de la toxicidad del oxígeno, planteando así a esta enzima como la primera defensa antioxidante, por lo que se la suele denominar la enzima centinela del sistema de defensa antioxidante (Quintana 2017). La SOD citosólica se encuentra como homodímero y, como su nombre lo indica se localiza en el citoplasma celular, generalmente en el tejido vascular. Se expresa constitutivamente, sin embargo, algunos factores como la presencia de la proteína de *shock* térmico, el aumento de peróxido de hidrogeno y el óxido nítrico aumentan su expresión (Yoo y col., 1999; Frank y col., 2000). Por otro lado, la SOD mitocondrial es un homotetrámero con un átomo de manganeso en su sitio activo y se localiza en mitocondria de la mayoría de los tipos celulares. La actividad de esta isoforma representa aproximadamente el 15% de la actividad SOD total. Se ha visto que distintos factores, como aumento en cambios en los niveles de citoquinas, pueden modificar el nivel de expresión de esa isoforma (Thongphasuk y col., 1999). En cuanto a la SOD extracelular, es una glicoproteína hidrofóbica de aproximadamente 135 KDa, que contiene un átomo de cobre y otro de zinc en cada subunidad. Se encuentra en forma de

tetrámero generalmente, aunque en ocasiones se lo ha encontrado en forma de dímero (Fattman y col., 2000). Esta isoforma se localiza fundamentalmente en corazón, pulmón, vasos sanguíneos, placenta y riñón. Se ha visto que factores como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factores vasoactivos como la serotonina, angiotensina y oxitocina (Brady y col., 1997; Stralin y Marklund, 2001) pueden aumentar su expresión. Asimismo, se ha visto disminuida su expresión frente a factores de crecimiento fibroblástico (PDGF) o factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Marklund 1992).

- **La enzima catalasa (CAT).** La CAT es un homotetrámero formado por cuatro subunidades, conteniendo en su sitio activo un grupo ferroporfirina (grupo hemo). Se localiza fundamentalmente en los peroxisomas y en el citosol. La función de la catalasa es doble: en primer lugar, catalizar la degradación de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno molecular. En segundo lugar, indirectamente, detoxifica a las células de anión superóxido ya que promueve la dismutación de este anión a peróxido por parte de la SOD, por la disminución de los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno. La CAT tiene un rol importante en condiciones de niveles bajos de glutatión o de baja actividad enzimática de glutatión peroxidasa, otra enzima cuya función es degradar peróxido de hidrógeno. Por otro lado, la CAT es la principal enzima implicada en la respuesta adaptativa de la célula en condiciones de estrés oxidativo, esto se debe fundamentalmente a la capacidad que tiene de actuar en condiciones de altas concentraciones de H_2O_2 (Garrido 2007). En la mayor parte de los tejidos, se encuentra en los peroxisomas, debido a que en estas organelas se ubican la mayoría de las enzimas productoras de H_2O_2 (Halliwell y Gutteridge 2015).
- **Glutatión S-transferasa (GST).** GST es una enzima que está vinculada al proceso de detoxificación de xenobióticos, pero también se la vincula dentro de las defensas antioxidantes. Se han encontrado las isoformas GST citosólicas y GST microsomales. Las GST citosólicas están divididas en cuatro familias principales: α , μ , π y θ , y en cuatro familias minoritarias. Están constituidas por dos subunidades proteínicas idénticas, mientras que las GST microsomales son trímeros (Sharma y col., 2004). Su función primaria es catalizar la conjugación de GSH con una gran cantidad de xenobióticos, incluidos los plaguicidas. Sin embargo, se ha demostrado que las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de glutatión peroxidasa independiente de

selenio. Además, pueden detoxificar al 4-hidroxinonal, que es un producto de la peroxidación de lípidos (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri 2005).

Frente a un escenario en el cual aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno, ya sea por condiciones fisiológicas normales o por el metabolismo de xenobióticos como los plaguicidas, el sistema de defensa antioxidante actúa en concierto para evitar posibles daños celulares y tisulares. No obstante, es conocido que puede producirse un desbalance entre la cantidad de especies reactivas y la capacidad del sistema antioxidante para contrarrestarlas. Este desbalance oxidativo puede llevar a consecuencias reversibles o irreversibles, dañando distintos componentes celulares e incluso tejidos.

1.2.4.3 Estrés oxidativo y daño a macromoléculas.

Por diversas causas puede perderse el balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes. Esto puede deberse a un aumento en la producción de ERO/ERN o bien una disminución en los sistemas antioxidantes y de reparación, o incluso a una combinación de estos factores. A esta condición se la denomina estrés oxidativo (EO). En esta situación se presentan daños a las macromoléculas. El estudio del EO ha cobrado considerable importancia debido a las consecuencias que puede tener sobre la salud humana, sobre todo en escenarios de exposición a sustancias que pueden favorecer el desbalance oxidativo, como puede ser la exposición a plaguicidas.

En este contexto, las células pueden tolerar un EO moderado y a menudo pueden sobreponerse a este estado por medio de la síntesis de componentes del sistema antioxidante. No obstante, en condiciones de excesivo EO las ERO/ERN pueden reaccionar con distintas macromoléculas orgánicas por sus dominios no catalíticos, y producir el aumento de reactivos secundarios. De esta manera pueden dañar moléculas biológicamente importantes como el ADN, proteínas y producir peroxidación lipídica, llevando a la disfunción, muerte celular, daño tisular y al posible desarrollo de enfermedades (Orrenius 2004; Zamudio y col., 2007).

En este sentido los insecticidas OF, además de su capacidad de inhibir la AChE y generar efectos colinérgicos, han sido vinculados con la generación de EO en distintos modelos experimentales (Lukaszewicz-Hussain 2010; Ortega y col., 2016, Quintana 2017). En cuanto a plaguicidas Neo, se conoce que la exposición de ratas a imidacloprid produce efectos oxidativos e inflamatorios (Duzguner y Erdogan 2010). Se ha reportado también que formulaciones comerciales de distintos Neo producen efectos citotóxicos en linfocitos humanos, pudiendo estar relacionados a la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno debido al metabolismo de los mismos (Calderón-Segura y col., 2012).

1.2.4.3.1 Efecto sobre ácidos nucleicos

Las especies reactivas dañan al ADN al reaccionar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. El daño oxidativo al ADN es de extrema importancia debido a que las bases nitrogenadas dañadas pueden generar mutaciones que a su vez pueden resultar en carcinogénesis, apoptosis, necrosis y aun vincularse a enfermedades hereditarias. Se ha observado que en presencia de las ERO, el ADN sufre procesos de fragmentación. Aparecen fragmentos internucleosomales, formados por la ruptura de ADN entre los nucleosomas, ocasionando con ello problemas en la compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005). Como resultado de esto, surgen alteraciones en las propiedades funcionales de la misma cromatina, la cual tiene un rol más que importante en la regulación de la transcripción génica.

Cabe destacar que no todas las especies reactivas dañan de igual manera al ADN. El HO· produce una multitud de productos de oxidación ya que reacciona con los azúcares, las purinas y las pirimidinas. La 8-OH-guanina es uno de los productos de oxidación más frecuente y se ha visto que altera la capacidad de la enzima encargada de metilar las citocinas adyacentes. De esta manera, puede alterar los patrones de metilación del ADN, impactando en la regulación de la expresión génica. Los radicales formados en la peroxidación lipídica (RO₂·, RO·) son también capaces de dañar el ADN. En el caso de las ERN como NO₂·, ONOO·, entre otras, se ha vinculado su efecto con la nitración, nitrosilación y desaminación de distintas bases del ADN. En resumen, el daño en ADN producido por los radicales libres y especies reactivas en general, es debido a

su capacidad de producir rupturas en la doble cadena y degradar la desoxirribosa (Hartwig 2000). Sin embargo, existen mecanismos como escisión de bases o escisión de nucleótidos, que funcionan como mecanismos de reparación del ADN y se activan en momentos en que éste sufre modificaciones oxidativas. Para ello, deben funcionar de manera óptima una batería de enzimas encargadas de este proceso de reparación. Sin embargo, este requisito no siempre se cumple y entonces sobrevienen cambios permanentes que provocan distintas mutaciones (Paredes Salido y Fernández, 2002).

1.2.4.3.2 Efectos sobre las proteínas

Uno de los aspectos más críticos del estrés oxidativo es el daño causado a las proteínas, debido a que pueden causar la pérdida de la actividad catalítica de enzimas, daños en la integridad estructural de las proteínas o interrumpir la regulación de las vías metabólicas. A diferencia de los ácidos nucleicos, los sistemas de reparación de las proteínas solo se limitan a los residuos de metionina, por lo que las proteínas oxidadas deben ser hidrolizadas para evitar su disfunción en la red metabólica o su interacción con otras proteínas. Es por ello que el daño oxidativo a proteínas es de gran importancia *in vivo* por que suele involucrar la interferencia de la función biológica a las que están asociadas a dichas proteínas. En este sentido, puede provocar daño a receptores, enzimas, vías de traducción de señales, sistemas de transporte, mecanismos de mantenimiento de la homeostasis intracelular de iones, mecanismos enzimáticos de reparación de ADN, entre muchas otras.

Los efectos de ERO sobre proteínas están vinculados a la oxidación de residuos de los aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación de proteínas. El ataque de HO· puede generar múltiples productos de oxidación (Dalle-Donne y col., 2006). La reacción de ERN con la tirosina lleva a la producción de 3-nitrotirosina, sin embargo, también puede ocurrir la nitración de fenilalanina y triptófano. El ataque directo de ERO/ERN o por daño secundario por medio de la peroxidación lipídica, llevan a la producción de derivados carbonilos y productos avanzados de oxidación proteica. Estos productos, como los derivados carbonilos, pueden ser empleados como marcadores para

establecer daño oxidativo ya que son más estables, se forman tempranamente y se mantienen por más tiempo en circulación en comparación con los peróxidos lipídicos (Dalle-Donne y col 2003a y b). Como resultado de estos procesos, se ha vinculado una diversidad de enfermedades con la presencia de las proteínas oxidadas, entre las que se mencionan la enfermedad de Alzheimer y la artritis reumatoide (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005).

1.2.4.3.3 Efecto sobre los lípidos

El efecto principal de las especies reactivas sobre los lípidos es la lipoperoxidación o peroxidación lipídica, que se produce al contacto con los lípidos de las membranas con un agente oxidante, como cualquiera de las ERO dependiendo de su reactividad. En esta reacción el radical libre formado oxida una cadena insaturada de lípido, dando lugar a la formación de un lípido hidroperoxidado y un radical alquilo. El alquilo reacciona con una molécula de oxígeno y regenera la especie inicial, constituyendo así una reacción que se repite, es decir una reacción en cadena. Esta formación de hidroperóxido lipídico (LOOH) comprende un simple evento de iniciación, pero puede llevar a la formación de múltiples moléculas de peróxido como resultado de esta reacción en cadena.

Este proceso de lipoperoxidación trae como consecuencia alteraciones en la membrana, afectando su fluidez e integridad. Este proceso genera especies como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal, los cuales son considerados citotóxicos. Esto debido a que pueden funcionar como agentes electrofílicos capaces de interactuar con otros componentes celulares, principalmente proteínas y ADN. El MDA es uno de los productos mayoritarios de esta reacción en cadena y es capaz de reaccionar con ácido tiobarbitúrico (TBA), dando lugar a un aducto coloreado que puede medirse espectrofotométricamente (Bustos y col., 2016). Este proceso de peroxidación lipídica que trae aparejado la pérdida de fluidez de membranas, puede repercutir también en aumentos en la permeabilidad de H^+ y otros iones, caídas en el potencial de membrana y pérdida de la funcionalidad de muchos componentes proteicos que están embebidos en las membranas (Halliwell y Gutteridge 2015).

Cabe destacar también que la lipoperoxidación es un proceso identificado con enfermedades cardiovasculares. Uno de los procesos importantes es la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, efecto que se ha correlacionado con la aterosclerosis.

1.3 Exposición ambiental a organofosforados y neonicotinoides

El objetivo de la industria moderna de plaguicidas es producir sustancias que sean efectivas en cantidades cada vez más pequeñas, que posean mayor especificidad con los organismos blanco y que presenten menor persistencia en el ambiente. Por ello, actualmente más de 500 formulaciones diferentes de plaguicidas son aplicadas en el ambiente, y la agricultura es la principal actividad que demanda su uso (Gavrilescu 2005). Sin embargo, se estima que de las toneladas de plaguicidas aplicadas anualmente a campo, una pequeña proporción alcanza a la plaga que buscan controlar mientras que el resto se disemina por los distintos compartimentos ambientales (Pimentel 1983; Zhang y col., 2004).

En el ambiente los plaguicidas sufren procesos de transporte, procesos de transferencia y procesos de transformación o degradación (Narvaes Valderrama y col., 2012; Aparici y col., 2015). Estos procesos implican el transporte de sustancias entre distintos compartimientos del ambiente (aire, agua, suelo y biota) sin que exista degradación significativa de la sustancia, o bien en un mismo compartimiento puede existir degradación del plaguicida por parte de microorganismos o por incidencia de la radiación solar. El destino del mismo será determinado por las propiedades fisicoquímicas de cada sustancia, pero también por las características del medio con el que interactúa (Calamari y Barg 1993) (Figura 10). Algunos plaguicidas son solubles en agua, lo cual implica que se podrán mover hacia cualquier sitio donde el agua se mueva. Algunos plaguicidas se volatilizan rápidamente, por lo que pasarán a su fase vapor y podrán así diseminarse en el aire y ser trasladados por vientos. Una vez que alcancen determinado compartimiento ambiental, estas sustancias pueden sufrir procesos de degradación o cambios estructurales, rápida o lentamente de acuerdo a sus tiempos de vida media. Durante los procesos de transformación, algunos

plaguicidas pueden volverse inocuos tanto para la plaga blanco como para el ambiente en general. Sin embargo, pueden ocurrir procesos degradativos que resulten en sustancias más tóxicas que el plaguicida parental u original. Estos metabolitos o productos de degradación pueden ser tóxicos incluso para parte de la biota a la cual no estaban destinados a controlar. Sumado a esto, el cambio de la estructura química debido a procesos degradativos puede ocurrir en cualquier compartimiento ambiental y puede favorecer su pasaje entre compartimientos (Gavrilescu, 2005; Bonmatin y col., 2015).

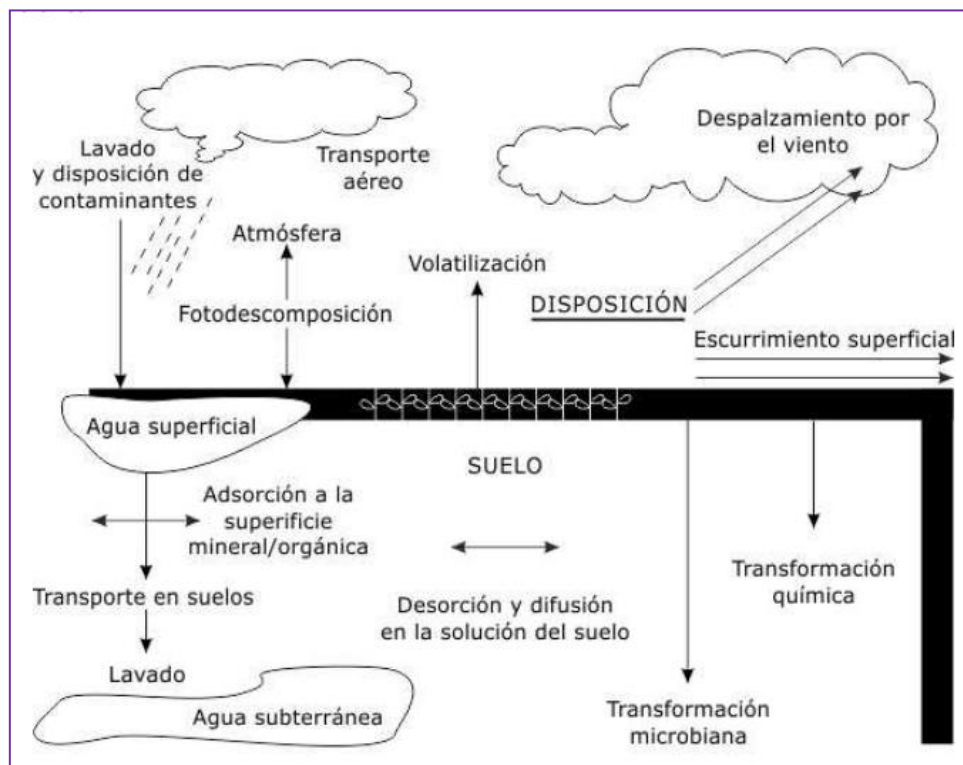


Figura 10: Dinámica de plaguicidas en el ambiente. Extraído de Rodríguez y col (2014)

La OMS (2003) ha señalado que más de 2 millones de personas pueden estar expuestas a la acción de los plaguicidas de forma directa o indirecta de diferentes maneras. La posibilidad de escenarios de exposición aumenta en un contexto mundial donde la necesidad de producción de alimentos y la agricultura intensiva traen aparejada la presencia de residuos de plaguicidas en el aire, suelo y agua pudiendo entrar en contacto con diversidad de organismos incluidos los seres humanos (Aktar y col., 2009). Dentro de las poblaciones en riesgo, se ha demostrado exposición a plaguicidas en residentes en zonas rurales o en sus cercanías (Magnarelli 2015). Se ha señalado que las mujeres en edad

reproductiva son el sector de la población en mayor riesgo a los efectos adversos de los contaminantes, siendo la pobreza y la marginación factores que favorecen la exposición a estos contaminantes pudiendo incluso exacerbar sus efectos tóxicos (Carrizales y col., 1999).

En nuestro país, no existe suficiente información epidemiológica o registros de los perjuicios de los plaguicidas en la salud humana, y los existentes se refieren a exposiciones agudas (Huerga y San Juan, 2004). En este sentido, el diagnóstico que tiene el Ministerio de Salud de la Nación, señala distintos aspectos alarmantes en los que destacan que la información existente no evidencia la magnitud real del problema en salud y ambiente; que no hay políticas sanitarias acordes a la gravedad del problema y que los sistemas de vigilancia que hoy existen, tienen importantes fallas. Esto último ya sea por desconocimiento en la población o por déficit en los sistemas de salud para la detección, manejo y prevención (Quintana 2017).

Los efectos tóxicos agudos de los OF son potencialmente mortales y están relacionados con una serie de manifestaciones en el sistema nervioso central, cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal y en el sistema nervioso periférico con alteraciones sensoriales y motoras (Terry 2012, Jokanovic 2018). En cuanto a la exposición crónica, como se mencionó anteriormente, está asociada con anomalías a nivel neuroconductual conocidas como Trastornos Crónicos Neuropsiquiátricos inducidos por OF, como ansiedad, depresión, síntomas psicóticos, déficit en la memoria a corto plazo, el aprendizaje, coordinación ojo-mano y tiempo de reacción (Terry 2012). Sumado a esto, se los vincula con riesgo de enfermedades como diabetes y obesidad (desordenes metabólicos), como así también Parkinson y Alzheimer (Chakraborty y col., 2009; Hancock y col., 2008, Hayden y col., 2010; Jokanovic 2018).

Por otro lado, intoxicaciones agudas con Neo han resultado en manifestaciones clínicas variadas que difieren en los distintos sistemas: desde síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos, dolor abdominal y lesiones corrosivas; agitación, confusión, fasciculaciones musculares, convulsiones en cuanto al sistema nervioso central; taquicardia, bradicardia, híper e hipotensión y palpitations en manifestaciones cardiovasculares (Nistor y col., 2017). Se han

reportado incluso casos fatales por envenenamientos agudos con Neo (Cimino y col., 2017). Debido a su relativamente nueva incorporación, estudios de efectos tóxicos de exposiciones crónicas son escasos (Chen y col., 2020), no obstante, se han reportado estudios en los que remarcan una asociación entre exposición crónica a Neo y efectos adversos en el desarrollo y neurológicos, entre los que se mencionan la tetralogía de Fallot, anencefalia, trastornos del espectro autista, pérdida de memoria y temblores (Cimino y col., 2017).

El Alto Valle de las provincias de Río Negro y Neuquén se ha destacado históricamente dentro de aquellas regiones del país con importante actividad agrícola, íntimamente relacionada a esta actividad está el uso de agroquímicos para evitar pérdidas de la producción. En este sentido, múltiples plaguicidas se aplican durante un periodo que se extiende desde septiembre hasta febrero, pudiendo así entrar en contacto con la población en general y particularmente con grupos vulnerables entre ellos las mujeres embarazadas y niños, como se mencionó previamente. En este contexto, Cecchi y col., (2012) demostraron que embarazadas residentes rurales del Alto Valle mostraron aumentos significativos en los niveles de cortisol plasmático materno en el primer y segundo trimestre de embarazo en el periodo en el que se aplican intensivamente plaguicidas OF, comparadas con muestras colectadas durante periodo de receso de aplicación. Asimismo, estos autores remarcan que hallaron valores individuales de cortisol y progesterona por encima de rangos de referencia tanto en aplicación como en receso. Sumado a esto, en muestras de placenta provenientes de residentes rurales del Alto Valle expuestas a OF, se vio alterado el perfil lipídico de la fracción nuclear y mitocondrial del sincitiotrofoblasto. Estos cambios resultan compatibles con eventos de proliferación celular (Vera y col., 2012). Adicionalmente, las placentas colectadas en periodos de pulverización en esta misma zona rural, presentaron incremento de la frecuencia de expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-13, asociado al aumento de las enzimas implicadas en la reparación de tejidos tales como ornitina decarboxilasa y arginasa, comparadas con placentas del grupo control (Bulgaroni y col., 2013).

Por otro lado, Quintana (2017) reportó que CP aumento los niveles de ERO en eritrocitos de sangre de cordón umbilical, viéndose afectada la actividad de la enzima antioxidante CAT, vinculando al desbalance *redox* provocado por la

exposición ambiental a CP y su afectación en el desarrollo intrauterino. Asimismo, estudios en modelos *in vitro* de trofoblastos humanos expuestos a CP, se vio incrementada la expresión del transcripto y proteína para TLR-4, y del transcripto para TLR-2 (Zappa 2014). En condiciones similares de exposición *in vitro* a OF se observó un incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 (Guiñazú y col., 2012). Estos reportes ponen de manifiesto mecanismos de toxicidad de OF alternativos a la inhibición de AChE, particularmente en mujeres embarazadas.

Debido a la reciente utilización de los Neo, se dispone de escasos datos respecto a su toxicidad en mujeres embarazadas y en la placenta, así como de sus efectos tóxicos *in vitro* en modelos de células humanas, como los trofoblastos. No obstante, en modelos murinos, se hallaron trazas de imidacloprid en las crías de madres expuestas durante la gestación, comprobando el pasaje del Neo hacia las crías además de observar cambios duraderos en el comportamiento y la función cerebral de los mismos (Burke y col., 2018). Ha sido demostrado que imidacloprid produce cambios pato-morfológicos y desbalance inmune en ratas hembra (Kapoor y col., 2011) y es inmunotóxico en modelo de exposición prenatal en ratas (Gawade y col., 2013). Por otro lado, se ha observado que la exposición prenatal a Ace en fetos de ratón cuyas madres fueron expuestas desde el día embrionario 4 al 13, resultó en hipoplasia de la lámina cortical y disminución de la neurogénesis (Kagawa y Nagao 2018).

En cuanto a la exposición prenatal de Neo en humanos, se considera que la barrera placentaria permite la transferencia hacia el feto de diversos xenobióticos (Fisher y col., 2016; Wang y col., 2016). En este sentido, se han reportado residuos de Neo como imidacloprid y acetamiprid en neonatos de modelos murinos (Ford y Casida 2006; Burke y col., 2018), sumado a esto se han hallado metabolitos de Ace en orina de neonatos humanos en el día posnatal 2 (Ichikawa y col., 2009). Esto sugiere que la capacidad que tienen los Neo de atravesar la barrera placentaria y llegar al embrión o al feto. Por otro lado, se ha reportado también que formulaciones comerciales de distintos Neo, incluido Ace, producen efectos genotóxicos y citotóxicos en linfocitos humanos, pudiendo estar relacionados a la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno debido al metabolismo de los mismos (Calderón-Segura y col., 2012).

En general, se ha estudiado que plaguicidas neurotóxicos (como lo son CP y Ace) dificultan el desarrollo de estructuras cerebrales, el aprendizaje y el comportamiento en modelos de ratas, no obstante, las dosis empleadas en este tipo de modelos no han sido completamente vinculadas con efectos adversos en embarazos a término (Slotkin 2004). Sin embargo, las enfermedades neurocomportamentales, así como otras enfermedades crónicas, son evidentes cuando la exposición ocurre durante el periodo sensible de formación del tubo neural, que comienza aproximadamente tres semanas después de la concepción en seres humanos. Esto pone de manifiesto que un aspecto importante a considerar en la exposición prenatal a plaguicidas es el momento en el cual se produjo la exposición y los efectos que pueden desencadenarse en ese estadio del embarazo. Por ello, a continuación, se abordan algunos aspectos relacionados al desarrollo del embarazo, la placenta como órgano transitorio y fundamental para el mantenimiento del mismo, y modelos *in vitro* asociados a alteraciones durante el embarazo.

1.4 Placenta

1.4.1 Características y funcionamiento

La placenta es un órgano fundamental para el desarrollo embrionario y fetal, y el éxito de la gestación humana es el resultado de una sucesión de procesos que se dan en forma coordinada en tiempo y espacio en la interfase materno, placentario, embrionario y fetal. (Carlson 2014; Rodríguez Cortés y col., 2014). La placenta humana es de tipo hemocorial, es decir que el tejido fetal penetra el endometrio hasta el punto de estar en contacto con la sangre materna (Figura 11), lo cual implica una gran invasión a la decidua. Macroscópicamente, la placenta a término es discoidal con un diámetro de 15-20 cm aproximadamente y un grosor de 2 a 3 cm, pesando aproximadamente 500 a 600 g. Presenta una cara fetal que se denomina placa coriónica y la placa basal que corresponde a la cara materna. La membrana que separa los compartimientos maternos y fetales es delgada, de aproximadamente 3,5 μm y consiste en el epitelio trofoblástico que cubre las vellosidades, el tejido conectivo coriónico, y el

endotelio capilar fetal. El área promedio de intercambio es aproximadamente 15 m², y la tasa de flujo sanguíneo es aproximadamente 450 ml/min (Carlson 2014).

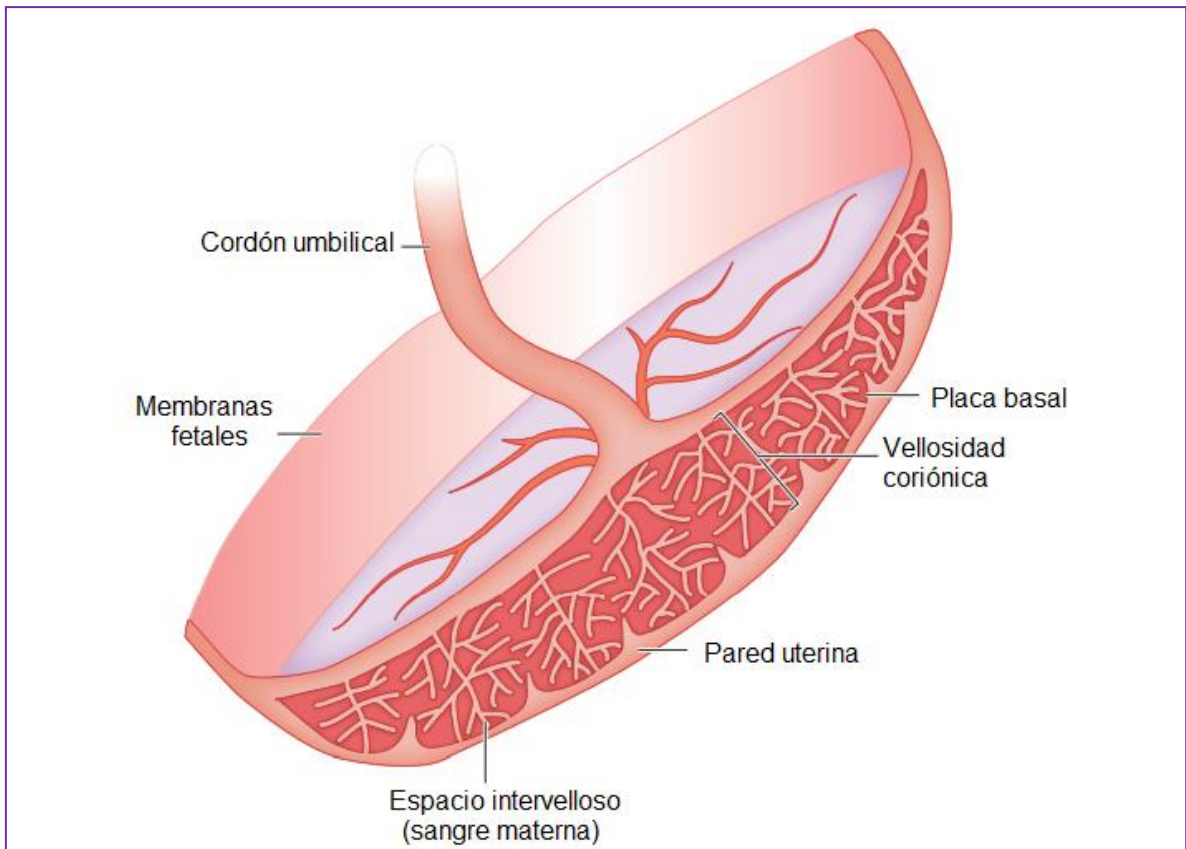


Figura 11: Representación esquemática de la placenta humana. La placenta humana está compuesta por vellosidades coriónicas que se proyectan hacia el espacio intervelloso, que es bañado por sangre materna. Los vasos sanguíneos fetales pasan a través del cordón umbilical hacia la placenta y se sumergen en las vellosidades coriónicas, en donde se lleva a cabo el intercambio de gases, nutrientes y desechos. Extraído de Maltepe y Fisher (2015).

1.4.2 Desarrollo placentario, diferenciación e invasión trofoblástica

El desarrollo de la placenta ocurre en paralelo al desarrollo embrionario, luego de que el óvulo es fecundado por un espermatozoide, y puede dividirse en tres fases: prelagunar, lagunar y vellosa. En la fase prelagunar (a partir del cuarto día luego de la fecundación) las células embrionarias indiferenciadas comienzan a dividirse y dan origen al blastocito. El blastocito está formado por la masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo. La MCI está formada por células que luego darán lugar a la formación del embrioblasto, del cordón umbilical, el amnion. La capa externa o trofoectodermo es el epitelio precursor de la placenta y el primer componente del sistema de estructuras extraembrionarias. Entre los días 6-7

después de la fecundación, el trofoectodermo establecerá contacto con la mucosa uterina, comenzando el proceso de implantación del embrión en el útero materno y el desarrollo de la placenta. (Wang y Zhao 2010).

Durante estas etapas de formación de la placenta, el desarrollo y mantenimiento de las funciones placentarias involucra procesos de diferenciación e invasión celular sumamente importantes. Una vez implantado el blastocito, la capa de trofoblastos se diferencia en dos capas distintas: el sincitiotrofoblasto (ST), que es la más externa y está formada por células multinucleares alineadas que hacen contacto directo con la sangre materna; y el citotrofoblasto (CT), que es la capa más interna compuesta por células mononucleares (Figura 12). Las células progenitoras del CT se fusionan unas con otras para formar el ST en un proceso denominado sincialización.

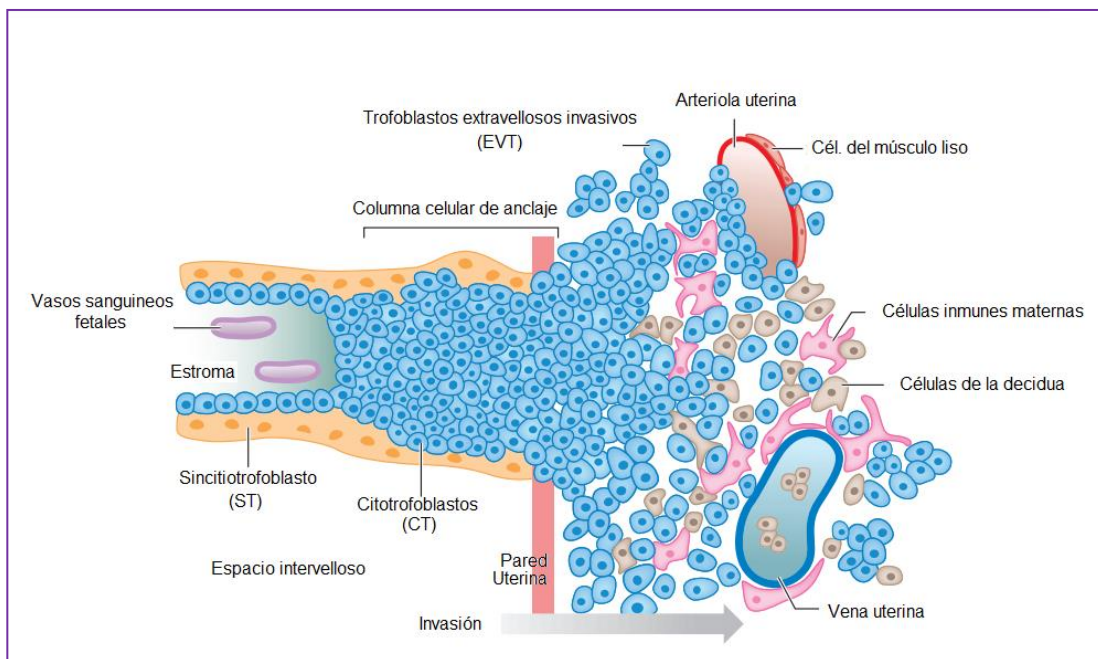


Figura 12: Diferenciación y migración de trofoblastos. Representación esquemática de la lámina basal de la placenta humana, resaltándose la composición celular de una vellosidad de anclaje y su relación con las estructuras maternas. Una capa multinucleada de sincitiotrofoblastos (ST) cubre las proyecciones de las vellosidades y que realizan las funciones de transporte de la placenta. Una capa de células de citotrofoblastos vellosos (CT) situada debajo de la capa de ST, estas células se fusionan para dar lugar al ST. En el extremo de la vellosidad coriónica donde se produce el anclaje con la pared uterina, las células CT proliferan y se diferencian a trofoblastos extravellosos invasivos (EVT). Los EVT invaden y remodelan las arterias espirales maternas, y se diferencian a células de tipo endotelial. Los EVT también invaden las venas maternas, pero no las remodelan. Extraído y modificado de Maltepe y Fisher (2015).

La fase lagunar comienza hacia el octavo día cuando aparecen pequeñas vacuolas en el sitio de implantación. De manera progresiva, las vacuolas crecen y confluyen formando lagunas entre las trabéculas sincitiales. Las lagunas crean un espacio que se convertirá en la cámara intravellosa. Una vez ocurrido esto comienza la fase vellosa, a partir del día 13-14 luego de la fecundación, los citotrofblastos invaden las trabéculas del sincitio para formar las vellosidades primarias. Alrededor del día 14 después de la implantación, el CT da lugar a un grupo celular denominado trofblastos extravelosos (EVT). La diferenciación de CT a ST o EVT es controlado por diferentes agentes tales como factores de transcripción, genes específicos, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y niveles de oxígeno. Las células EVT tienen un fenotipo invasivo e infiltran el tejido uterino materno por dos vías: por migración endovascular, formando columnas de células trofbástica que ocluyen las arterias espirales maternas; y por invasión intersticial, la que requiere un proceso bioquímico de adhesión al citotrofblasto y migración a través de la decidua y miometrio asociado a degradación proteolítica de componentes de la matriz extracelular (Lash y col 2015). La invasión de EVT es un proceso coordinado en tiempo y espacio y la alteración de este ajustado control está asociada con perdida gestacional temprana y tardía, pre eclampsia y restricción del crecimiento intrauterino (Apaza Valencia 2014)

Dos semanas más tarde, las vellosidades primarias son invadidas por el mesénquima embrionario y constituyen las vellosidades secundarias. Por último, en el eje mesenquimatoso aparecen capilares fetales y se constituye una red vascular que caracteriza la formación de la vellosidad terciaria. De forma paralela, la red vascular fetal alcanza la placa coriónica y se conecta con los vasos de los troncos vellositarios. La vellosidad coriónica aparece con su forma definitiva hacia la tercera semana luego de la fecundación. A término, entre las placas coriónicas, las vellosidades coriónicas flotan en la cámara intervellosa, en la cual circula la sangre materna.

1.4.3 Respuesta inmune y tolerancia al feto

El embarazo es un proceso inmunológico privilegiado, cuyo éxito dependerá en parte del reconocimiento del embrión (semialogénico) por parte de la madre del embrión y la generación de tolerancia inmunológica. La placenta si bien participa activamente en la generación de tolerancia, conserva la capacidad de reaccionar frente a la posible invasión de patógenos (Mor y Cárdenas 2010). Los trofoblastos pueden comportarse como células inmunes innatas, de hecho, reconocen y responden a microorganismos mediante la expresión de diversos receptores de la inmunidad innata (Mulla y col., 2013). En este sentido, se ha indicado que los trofoblastos expresan TLR (Fest y col., 2007; Koga y Mor 2014). Como se ha descrito previamente, los TLR son una parte importante del sistema de respuesta frente a señales de peligro ya que participan en el inicio de la respuesta inflamatoria inducida por microorganismos, estrés celular y/o daño a los tejidos (Tangerås y col., 2014). La activación de los TLR principalmente resulta en la rápida liberación de citoquinas inflamatorias tales como IL-6, IL-8 y TNF- α (Takeuchi y Akira 2010), y el balance de citoquinas juega un rol importante en la tolerancia al feto.

1.4.4 Balance oxidativo en la placenta

La gestación es un estado caracterizado por un aumento, estrictamente regulado, de los procesos oxidativos en la madre y el embrión-feto, determinado por un aumento en el consumo de oxígeno molecular y el uso de especies reactivas de ERO y ERN en varios procesos celulares importantes para el desarrollo materno-fetal. El desbalance a corto y/o largo plazo entre especies reactivas y la capacidad antioxidante, a favor de las primeras, provoca estrés oxidativo y daño a biomoléculas, pérdida de funciones y muerte celular, lo que puede afectar la evolución normal de la gestación (Corría Ozorio y Cruz-Manzano 2009).

La influencia de las especies reactivas sobre la circulación útero-placentaria es esencial para garantizar la morfogénesis adecuada (Biondi y col., 2005), lo que implica una estricta regulación de la expresión espacial y temporal de las enzimas antioxidantes. Por ejemplo, un adecuado flujo sanguíneo entre útero-

placenta-feto es esencial para un buen crecimiento fetal. El óxido nítrico liberado por las células endoteliales de la placenta, arterias uterinas y vasculatura umbilical, inhibe la activación plaquetaria y promueve la dilatación de la vasculatura, por lo que disminuye la resistencia vascular en estas estructuras facilitando el flujo de sangre hacia el feto. Durante el embarazo existe un aumento de la peroxidación lipídica y altos niveles de marcadores de estrés oxidativo, tales como aumento de concentración de anión superóxido, hidroperóxidos, malondialdehído y otras sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, que alcanzan sus concentraciones máximas durante el segundo trimestre de embarazo. Luego los niveles de estos marcadores, declinan hacia el final de la gestación (Biondi y col 2005; Qanungo y Mukherjea 2000; Uotila y col 1991; Tamura y col 2001). Paralelamente, se ha comprobado un aumento progresivo en la actividad del sistema antioxidante materno principalmente hacia el tercer trimestre (Qanungo y Mukherjea 2000; Tamura y col 2001).

1.5 Exposición a plaguicidas OF y Neo durante el embarazo

Los efectos potenciales sobre la salud asociados con la exposición a plaguicidas durante el embarazo se han convertido en un importante problema de salud pública debido a la alta sensibilidad fetal a xenobióticos. La exposición comienza desde la vida intrauterina, en la que los mecanismos de detoxificación y el sistema inmunológico no están completamente desarrollados (Vizcaino y col., 2014) y en la que existen periodos de mayor susceptibilidad definidos por diferencias en los procesos dinámicos a nivel molecular, celular y fisiológico. Se sabe además que la barrera hematoencefálica del feto es inmadura y por lo tanto más permeable a agentes neurotóxicos como los plaguicidas OF y Neo. Si bien la llegada de los plaguicidas al embrión o al feto depende de las propiedades fisicoquímicas del xenobiótico, así como su unión a proteínas, la mayoría de estas sustancias poseen propiedades que favorecen su llegada al ambiente intrauterino. De hecho, se han encontrado residuos de plaguicidas OF y Neo en distintas matrices (Mayhoub y col., 2014; Leemans y col., 2019).

Los estudios sobre los efectos de la exposición intrauterina humana a OF han sido abordados con variedad de diseños experimentales, la transferencia de

estos plaguicidas a la placenta y su llegada al feto fue confirmada en modelos animales (Lasitter y col., 1999, Abu-Qare y col., 2001). Existe evidencia que indica que la exposición prenatal a los plaguicidas se asocia con el índice de madurez en la zona central de la placenta. En este sentido, Ezquenazi y col. (2004) vincularon aumentos de la circunferencia de la cabeza con el nivel de dialquilfosfato, un metabolito de OF, en orina materna en el inicio del embarazo. Sumado a esto, en otro estudio los autores hallaron disminuciones en el nivel de actividad de paraoxonasa 1 durante el embarazo y lo relacionaron con su impacto en el neurodesarrollo de esos niños en edad escolar (Ezquenazi y col., 2014). En cuanto a CP, se ha observado un adelgazamiento cortical frontal y parietal y una relación dosis respuesta inversa entre CP y el grosor cortical del encéfalo en niños con alta exposición a este plaguicida. Este estudio reporta una asociación importante entre la exposición prenatal a neurotóxicos ambientales con cambios estructurales en el desarrollo del cerebro humano (Rauh y col., 2012). Por otro lado, Quintana (2017) reportó que CP aumentó los niveles de ERO en eritrocitos de sangre de cordón umbilical, viéndose afectada la actividad de la enzima antioxidante CAT, vinculando al desbalance redox provocado por la exposición ambiental a CP y su afectación en el desarrollo intrauterino. Asimismo, estudios en modelos *in vitro* de trofoblastos humanos expuestos a CP, se vio incrementada la expresión del transcripto y proteína para TLR-4, y del transcripto para TLR-2 (Zappa 2014). En condiciones similares de exposición *in vitro* a OF se observó un incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 (Guiñazú y col., 2012). Estos reportes ponen de manifiesto mecanismo de toxicidad de OF alternativos a la inhibición de AChE.

Como se mencionó anteriormente, debido al hecho de que los Neo aparecieron en el mercado mundial mucho después que los OF su impacto en la salud humana y, en particular durante el embarazo, está menos estudiada. No obstante, se han reportado residuos de Neo como imidacloprid y acetamiprid en neonatos de modelos murinos (Ford y Casida 2006; Burke y col., 2018), sumado a esto se han hallado metabolitos de Ace en muestras de orina de neonatos humanos (Ichikawa y col., 2009); así como el potencial efecto de Ace en alterar el balance *redox* en sangre de cordón (Quintana 2017). Esto sugiere que la

capacidad que tienen los Neo de atravesar la barrera placentaria y llegar al embrión o al feto y producir efectos tóxicos durante el embarazo.

1.5.1 Modelos para estudios de efectos tóxicos sobre la placenta humana

El estudio de efectos tóxicos de xenobióticos, incluidos los plaguicidas, sobre el desarrollo del embarazo representa un aspecto crítico, sobre todo por las implicancias éticas involucradas de estudios en humanos. En este sentido, la placenta es un órgano que contiene un amplio espectro de tipos celulares y tejidos, tales como trofoblastos, células inmunes, fibroblastos, células endoteliales, vasos, membranas, entre otros. En muchos casos se consideran de gran relevancia los resultados obtenidos en estudios toxicológicos empleando este órgano, o derivados del mismo como modelos experimentales (Tabla 9). Este aspecto sobre todo debido a las diferencias en cuanto a la estructura y metabolismo de la placenta humana comparada con el tipo de placenta de otras especies animales y los modelos disponibles que suelen emplearse (como modelos murinos). De acuerdo a Göhner y col. (2014), el estudio de efectos tóxicos de xenobióticos sobre la placenta puede realizarse en diferentes niveles, los cuales influyen en la calidad y cantidad de la información obtenida, así como en los costos y la dificultad de acceder a cada modelo. De acuerdo al sistema o modelo empleado, se pueden obtener datos relacionados a la transferencia de sustancias a través de la barrera placentaria, producción de hormonas y otros factores, identificación inmunohistoquímica, procesos de apoptosis y necrosis, etc.

Tabla 9: Comparación de las características de distintos sistemas de estudio para la evaluación toxicológica en la placenta humana.

Sistema	Tiempo de exposición	Disponibilidad	Reproducibilidad	Carga de trabajo (replicas experimentales)	Funciones
Líneas celulares	Ilimitada	Ilimitada	Alta	Baja	Apoptosis/necrosis, producción de hormonas y moléculas intracelulares, expresión de receptores, etc
Explantos de placenta	Pocos días	Alta	Dependiente de la paciente	Baja	Apoptosis/necrosis, producción de hormonas, expresión de receptores, inmunohistoquímica
Cultivos primarios	Pocos días	Limitada	Dependiente de la paciente	Media	Estudios concretos de los tipos celulares presentes

Extraído y modificado de Göhner y col (2014).

Ciertamente la obtención de muestras de placenta a término o en los primeros estadios de gestación representa generalmente una gran dificultad. Por ello, muchos grupos de investigación centran sus estudios en modelos celulares que permitan abordar aspectos particulares de la toxicidad de xenobióticos, contemplando las limitaciones de dichos modelos y extrapolando los resultados al funcionamiento a nivel órgano de la placenta y su rol durante el proceso de gestación.

Distintas líneas celulares han sido establecidas para enfocar estudios toxicológicos en la placenta. Las más destacadas son las líneas celulares JEG-3, BeWo y JAR, que representan modelos celulares obtenidos de células de coriocarcinoma humano, y que han sido desarrolladas desde 1970. También se utilizan modelos de células trofoblásticas no cancerosas inmortalizadas a partir

de transfección de cultivos primarios con distintos genes, como por ejemplo la línea celular HTR-8/SVneo derivada de células de trofoblastos extravellosos del primer trimestre de gestación inmortalizadas a partir de la transfección con un plásmido conteniendo el antígeno T grande del virus de simio 40 (SV40) (Graham y col., 1993), entre otras líneas celulares.

2. Hipótesis

Hipótesis

Por lo expuesto previamente, para abordar este trabajo de tesis se planteó la siguiente hipótesis

“La exposición de trofoblastos a plaguicidas organofosforados y neonicotinoides puede modular procesos celulares tales como: la respuesta a receptores tipo toll, la producción de citoquinas y la inducción de estrés oxidativo”

3. Objetivos

Objetivos

3.1 Objetivo general

Investigar las alteraciones en la respuesta innata de trofoblastos inducida por plaguicidas organofosforados y neonicotinoides.

3.2 Objetivos específicos

1. Indagar si la exposición al organofosforado clorpirifos induce cambios en la respuesta de receptores tipo toll a sus ligandos específicos y la producción de citoquinas, esclareciendo la participación del mismo y sus metabolitos en la modulación de la respuesta inmune innata en trofoblastos.
2. Examinar si el estrés oxidativo es un mecanismo toxicológico de daño producido por la exposición a insecticidas neonicotinoides.
3. Realizar un estudio comparativo entre la toxicidad del neonicotinoide acetamiprid en relación a un formulado comercial.
4. Indagar la toxicidad de acetamiprid y su formulación comercial en trofoblastos del primer y tercer trimestre de gestación.
5. Evaluar el efecto de acetamiprid y su formulación comercial en distintos parámetros celulares como la migración celular y daño a macromoléculas.

4. Materiales y métodos

4.1 Reactivos

Dimetilsulfóxido (DMSO), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), N-acetil l-cisteína (NAC), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), azul de nitrotetrazolio (NBT), 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), reactivo de Griess, riboflavina, metionina, 1,1,3,3 tetraetoxipropano (MDA), 1-cloro,2,4-dinitrobenzeno (CDNB), ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), ioduro de acetiltiocolina y L-glutati3n reducido (GSH) fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los anticuerpos policlonales de conejo anti-Bax, anti-Bcl-2 y anti- β -actina fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnologies (Texas, USA). El anticuerpo secundario anti-IgG conejo conjugado a peroxidasa se obtuvo de Sigma Aldrich.

En cuanto a los insecticidas empleados, el organofosforado clorpirifos, CP (nombre de la IUPAC: O, O-dietil O-3, 5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato) fue obtenido de ChemService (ChemService, West Chester, PA, USA) con un grado de pureza del 99,5%. El neonicotinoideacetamiprid, Ace (Nombre IUPAC: N-[(6-chloro-3-pyridyl) methyl]-N'-cyano-N-methyl-acetamide), est3andar grado anal3tico fue provisto por AccuStandard Inc (New Heaven, USA) de pureza 99,5%. La formulaci3n comercial de acetamiprid (Ace CF), Assail® (SUMMIT AGRO), contiene 70% principio activo y 30% otros ingredientes (gentilmente donado por la Dra. Liliana Cich3n, Instituto Nacional de Tecnolog3a Agropecuaria, Argentina).

4.2 Condiciones generales de cultivo celular

4.2.1 Trofoblastos del primer trimestre: l3nea celular HTR-8/SVneo

La l3nea celular de trofoblastos de primer trimestre HTR-8/SVneo fue gentilmente donada por la Dra. Alicia Damiano (Facultad de Farmacia y Bioqu3mica, Universidad de Buenos Aires). Esta l3nea celular deriva de explantos de vellosidades cori3nicas de placenta humana del primer trimestre de gestaci3n, las cuales fueron inmortalizadas en cultivo celular por medio de la transfecci3n con el ant3geno T grande del virus SV40 (*simian virus 40*) (Graham y col., 1993). Para la realizaci3n de los experimentos las c3lulas fueron crecidas en medio

RPMI-1640 (Sigma Aldrich), suplementado con 5% de suero bovino fetal -SBF- (Natocor, Córdoba, Argentina), 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, USA), a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de dióxido de carbono hasta llegar a una confluencia de 80-90% para ser repicadas, congeladas o utilizadas en los distintos experimentos.

4.2.2 Trofoblastos del tercer trimestre: línea celular JEG-3

Se utilizó la línea celular JEG-3 (ATCC, HTB-36) derivada de coriocarcinoma humano, provistas por la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA). Esta línea celular fue establecida en cultivo en 1966, a partir de coriocarcinoma posparto trasplantado en forma seriada en hámster, la cual presenta varias de las características del trofoblasto normal (Pelkonen, y col., 2006). Para la realización de los experimentos, las células fueron cultivadas en medio Dulbecco's modificado por Eagle -DMEM- (Invitrogen) suplementado con SBF al 10%, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, USA), mantenidas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ hasta llegar a una confluencia de 80-90% para ser repicadas, congeladas o utilizadas en los distintos experimentos.

4.2.3 Criopreservación y descongelamiento de células

La criopreservación se realizó a partir placas de petri estériles de 100 mm conteniendo la línea celular HTR-8/SVneo o JEG-3, incubadas bajo condiciones de cultivo estándares hasta alcanzar el 80-90% de confluencia, se procedió a despegar la monocapa celular con 0,1% de tripsina/EDTA, trasvasar a tubos estériles y centrifugar a 1000 x g durante 3 minutos para obtener el pellet celular. Posteriormente, se procedió a resuspender el pellet en 1 ml de mezcla DMSO-SBF (1:9) y trasvasar a criotubos debidamente rotulados. Todos los criotubos fueron colocados en contenedor de congelamiento celular a base de alcohol isopropílico al 100% y luego almacenado a -80°C, para mantener una velocidad de congelamiento de -1°C/minuto. Finalmente, los criotubos fueron almacenados en termos con nitrógeno líquido hasta su utilización.

Para descongelar las células se preparó una placa de cultivo debidamente rotulada, con 9 ml de DMEM o RPMI-1640 suplementado con 20% suero bovino fetal a una temperatura aproximada de 37°C. Inmediatamente, las células, almacenadas en criotubos, fueron rápidamente descongeladas a 37°C, lavadas con medio de cultivo y cultivadas en condiciones estándar en la placa debidamente preparada. Una vez adheridas, el medio de cultivo fue renovado y reemplazado con medio conteniendo el porcentaje de SBF antes mencionado de acuerdo a la línea celular empleada.

4.2.4 Mantenimiento celular

El mantenimiento celular fue realizado mediante la renovación del medio de cultivo cada 48 hs hasta el momento del repique. Para la realización de los repiques el medio de cultivo fue removido y las células fueron lavadas dos veces con 5 ml de buffer fosfato salino (PBS) estéril (pH 7,4) atemperado con el fin de eliminar el SBF y asegurar la efectividad del tratamiento con tripsina/EDTA. Para despegar las células de la placa, se agregó 0,5 ml de tripsina/EDTA 0,1% (P/V) e incubó a 37°C durante 3-5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las células fueron recuperadas con 10 ml de medio de cultivo, y centrifugadas durante 3 minutos a 1000 x g. El pellet celular se suspendió cuidadosamente en 3 ml de medio de cultivo suplementado con SBF y las células fueron repicadas a placas de petri conteniendo 10 ml final de medio suplementado con SBF.

4.2.5 Tratamientos con insecticidas

Previo a la realización de cada experimento, se plaquearon 1×10^6 células (HTR-8/SVneo o JEG-3) en placas de petri estériles de 100 mm. Las mismas fueron incubadas bajo condiciones de cultivo estándares hasta alcanzar el 80-90% de confluencia. Posteriormente se despegó la monocapa celular con 0,1% de tripsina/EDTA en PBS (pH 7,4) y las células fueron llevadas nuevamente a placas de cultivo celular, en el número y condiciones descritas para cada ensayo. En cada experimento las células fueron contadas en cámara de

Neubauer y se agregó el volumen pertinente a cada placa en cuanto al número de células requeridas (ver apartado de cada técnica).

Para el tratamiento con el insecticida CP, las concentraciones utilizadas (0,01 – 100 μM) se seleccionaron en función a reportes previos en los que se observó efecto inhibitorio de la enzima acetilcolinesterasa en células JEG-3 (Espinoza y col., 2016), las cuales se encuentran en el rango de concentraciones utilizadas en otros estudios *in vitro* (Chiapella y col., 2013; Espinoza y col., 2016; Guiñazú y col., 2012). La concentración más baja utilizada (0,01 μM), se encuentra dentro del rango de los niveles de OF determinados en muestras humanas (Ostrea y col., 2009; Pluth y col., 1996; Sanghi y col., 2003). El insecticida fue disuelto en DMSO y preparado en el momento de uso. Como control de los tratamientos se empleó DMSO al 0,02% en medio de cultivo.

En cuanto al tratamiento con el Neo Ace o su formulación comercial (Ace CF) se emplearon las concentraciones desde 0,1 a 100 μM . Los insecticidas fueron disueltos en DMSO y preparados en el momento de uso. Como control de los tratamientos se empleó DMSO al 0,02% en medio de cultivo. El rango de concentraciones empleado para los tratamientos con Neo se seleccionó en relación a la concentración de insecticida aplicada a campo, ya que al momento de realizar esta tesis no se disponía de valores ambientales. La concentración sugerida a campo es 5 g/hl, la cual se corresponde con 157 μM de principio activo, aproximadamente (Cichón y col., 2017).

En la Figura 13 se muestra un resumen de las líneas de trabajo estudiadas en esta tesis doctoral, con la especificación de las técnicas empleadas para cada caso. Dichas técnicas serán explicadas en detalle en este apartado de la tesis.

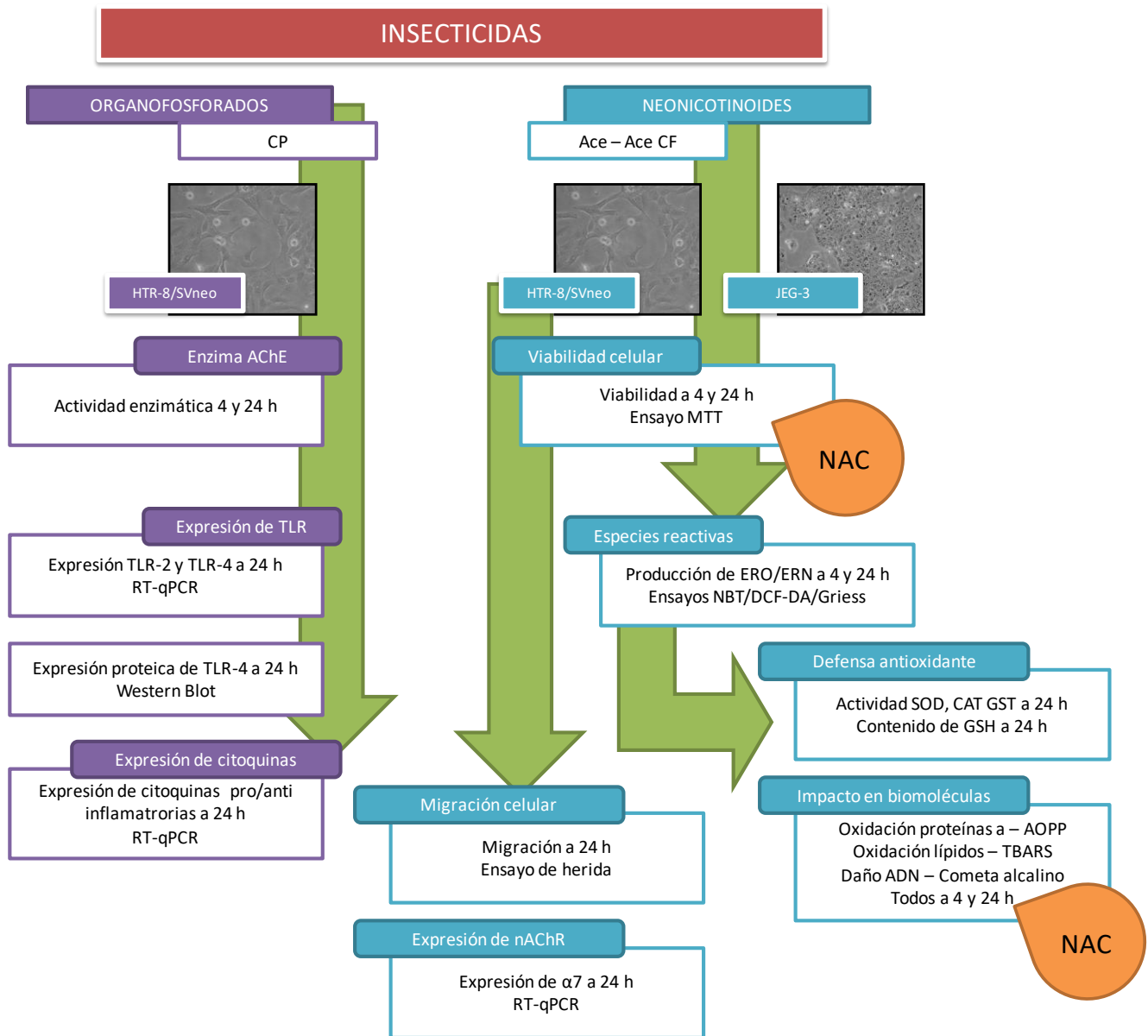


Figura 13: Diagrama de flujo de las líneas de trabajo del trabajo de tesis

4.3 Estudio de efecto de clorpirifos sobre trofoblastos HTR-8/SVneo

4.3.1 Actividad de acetilcolinesterasa

La actividad de acetilcolinesterasa (AChE), se determinó por el método de Ellman y col. (Ellmany col., 1961). El ioduro de acetilcolina fue usado como sustrato para la enzima y la tiocolina, producto de su degradación, se detectó colorimétricamente por reacción con ácido DTNB. Para el ensayo, 2×10^5 células HTR-8/SVneo/ml fueron cultivadas en placas de 6 pocillos y luego de alcanzar 80-90 % de confluencia fueron tratadas con CP durante 4 y 24 h. Las células tratadas fueron obtenidas en 500 μ l de buffer fosfato de sodio 1 M conteniendo 0,5% Triton X-100, pH 6,5, lisadas y posteriormente centrifugadas a 1000 x g durante 20 segundos. Posteriormente, se diluyeron 50 μ l de sobrenadante en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8 conteniendo 10 mM de DTNB y 0,75 mM de ioduro de acetiltiocolina. El cambio en la absorbancia se registró a 412 nm de manera continua durante 100 segundos a una temperatura constante de 30°C (Espectrómetro UV/vis 16030 Shimadzu). Los cálculos se realizaron empleando el coeficiente de extinción molar del TNB (producto de reacción entre el DTNB y los ésteres de la colina) $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, previa corrección de la absorbancia debido a hidrólisis espontánea no enzimática del sustrato. Las condiciones de linealidad fueron previamente ajustadas. La actividad de AChE fue expresada como nmol de sustrato hidrolizado/minuto x mg de proteína. El contenido de proteínas fue cuantificado por el método de Bradford (1976).

4.3.2 Niveles de expresión de transcriptos para TLR y citoquinas

4.3.2.1 Extracción de ARN y transcripción reversa

Para estudiar la expresión de distintos genes de interés, se realizó la extracción de ARN de cultivos celulares y luego se procedió a hacer la retrotranscripción de ARN en ADN copia (ADNc). Para ello, se cultivaron 2×10^5 células/ml en placas de 6 pocillos y una vez alcanzada la confluencia se expusieron al insecticida, CP, Ace o Ace CF según corresponda, durante 24 h. El ARN total se extrajo de cada muestra empleando el reactivo TRIzol® de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para ello, se retiró y descartó el medio de cultivo con estímulos de

cada pocillo, posteriormente se adicionó 700 μ l de TRIzol®, enjuagando varias veces para asegurar el lisado de las células. Una vez realizado el lisado, se trasvasó el contenido de cada pocillo a tubos debidamente rotulados y se dejó reposar 5 minutos. Luego 140 μ l de cloroformo fueron incorporados a cada tubo para la separación de fases, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugó durante 15 minutos, a 4°C y 12.000 rpm. Se retiró la fase que contiene el ARN (Figura 14), trasvasándolo a un nuevo tubo.

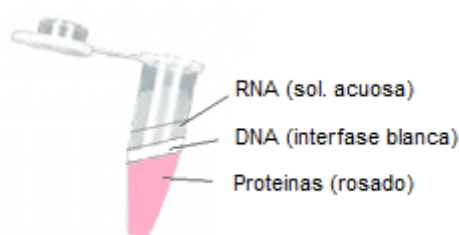


Figura 14: Extracción de ARN. Separación de fases luego de extracción con TRIzol® seguido de adición de cloroformo y centrifugación. La fase superior incolora es la que contiene el ARN deseado.

Posteriormente se adicionaron 350 μ l de isopropanol en la fase acuosa para precipitar el ARN, se mezcló por inversión y dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 8 minutos a 4°C y 12.000 rpm y se verificó la presencia del pellet para confirmar que el ARN haya precipitado y se retiró el sobrenadante. Se adicionaron 700 μ l de etanol al 75% para lavar y luego se agitó en vortex. Se centrifugó nuevamente 8 minutos a 4°C y 12.000 rpm y se descartó el sobrenadante y dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se adicionó 40 μ l de agua DEPC y se almacenó hasta su utilización a -80°C.

Del ARN extraído se determinó la pureza midiendo la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm (Espectrómetro UV/vis 16030 Shimadzu), además se determinó la concentración de ARN en los extractos previo a la retrotranscripción en ADN copia (ADNc). Para ello, 5 μ l de muestra fueron adicionados a 495 μ l de agua destilada, obteniéndose la concentración de ARN a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración}_{\text{muestra}} = \text{Absorbancia}_{260 \text{ nm}} \times 40 \times \frac{100}{1000}$$

El ADNc se sintetizó a partir del ARN extraído, usando el kit de transcriptasa reversa Starscript (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para ello se retro-transcribió 1 µg de ARN en un volumen final de 20 µl. Se utilizaron 3 µl del cebador Oligo-DT (0,08 µg/µl) y se llevó a baño seco por 5 min a 65°C. Las muestras fueron incubadas a 42°C durante 60 minutos con 1 µl de dNTPs, 0,1 µl de inhibidor de ARNasa, 0,3 µl de la enzima transcriptasa reversa (Thermo Fisher Scientific), 4 µl de buffer transcriptasa reversa y 2,1 µl de agua DEPC. Luego se continuó el baño seco a 70°C por 10 minutos. El ADNc sintetizado fue conservado a -20°C, debidamente rotulado, hasta su utilización. Todas las muestras de ADNc empleadas para los ensayos de PCR, no superaron 1 mes luego de su síntesis.

4.3.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La expresión de los genes de interés fue determinada empleando el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Para ello, previamente se seleccionaron cebadores específicos, los cuales fueron obtenidos de la bibliografía o diseñados por medio del software Clone Manager 7.1. Las secuencias de cebadores directo y reverso (forward, F, y reverse, R, respectivamente) se detallan en la Tabla 10. Posteriormente los productos de amplificación fueron evaluados en cuanto a su especificidad, presencia de dímeros o productos inespecíficos, mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR).

Para la amplificación se empleó el kit comercial Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), y el protocolo de amplificación se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, para cada gen de interés se prepararon en tubos de PCR estériles debidamente rotulados, 4,2 µl de mezcla de reacción de acuerdo a Tabla 11, luego se adicionaron 3 µl de ADNc obtenido de acuerdo a la sección 4.3.2.1. A cada tubo se le adicionó 12,80 µl de enzima polimerasa

(0,15 µl de enzima en 12,65 µl de agua DEPC) para alcanzar un volumen final de 20 µl. Los tubos fueron llevados a termociclador Progene (Tecne, Cambridge, UK), las condiciones de amplificación consistieron en: 1 ciclo a 95°C por 3 min; 45 ciclos consistentes en 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 32°C; luego el ciclado finalizó con 1 ciclo a 72°C por 10 minutos y una rampa de enfriamiento a 4°C durante 10 minutos. Los productos de PCR fueron luego visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, empleándose GelRed® Nucleic Acid Gel Stain para la tinción. Para ello se sembraron 10 µl de muestra a las cuales previamente se le adicionaron 3 µl de buffer de siembra (Sigma-Aldrich) en cada pocillo del gel. La electroforesis de los productos de PCR se realizo durante 60 minutos a 90 V constante y luego se visualizaron en transiluminador UV.

Tabla 10: Secuencias de cebadores específicos y sus características

Gen	Secuencia 5'→3'	Tamaño cebador	Largo producto (pb)	Accession number	Proveedor
TLR-2 ^a	F: GGAAGAATCCTCCAATCAGGC	21	101	NM_001318787.2	SigmaAldrich
	R: CTTCTGTGAGCCCTGAGGGA	20			
TLR-4 ^b	F: GGTCACCTTTTCTTGATTCCA	21	118	NM_003266.4	SigmaAldrich
	R: TCAGAGGTCATCAAACATCAC	22			
IL-6 ^c	F: GTGTGAAAGCAGCAAAGAGG	20	166	NM_001318095.1	Macrogen
	R: TCTGTTCTGGAGGTACTCTAGG	22			
IL-10 ^c	F: TCCGAGATGCCTTCAGCAGAG	21	117	NM_000572.3	Macrogen
	R: AGGCTTGGCAACCCAGGTAAC	21			
TGF-β ^c	F: CTGGACACGCAGTACAGCAAG	21	166	KJ897662.1	Macrogen
	R: AGGAGCGCACGATCATGTTGG	21			
RNA 18s ^d	F: GGAGTATGGTTGCAAAGCTGA	21	129	NR_003286.4	SigmaAldrich
	R: ATCTGTCAATCCTGTCCGTGT	21			
YWHAZ ^e	F: CCTGCATGAAGTCTGTAAGTCTGAG	23	120	EF094937.1	SigmaAldrich
	R: TTGAGACGACCCTCCAAGATG	21			
Ciclofilina ^f	F: GTCAACCCACCGTGTCTT	20	97	AK290085.1	SigmaAldrich
	R: CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT	21			

^a Gutiérrez-Ceñas y col. (2006); ^bMargaritopoulos y col. (2010); ^c Secuencias propias diseñadas con software Clone Manager 7.1; ^d Moura y col. (2017); ^eChoudhury y col. (2017); ^fPidoux y col. (2015)

Tabla 11: Reactivos para PCR

Reactivo	Volumen (μl)
Buffer TAQ 10 X	2 μl
dNTPs (2 mM)	0,2 μl
MgCl ₂	1 μl
Cebador F	0,5 μl
Cebador R	0, 5 μl
Volumen total por tubo	4,2 μl

4.3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

La expresión de los genes de interés fue determinada empleando el ensayo de qPCR en el Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf). Para ello, 5 µl de una dilución 1:25 o 1:12,5 de cada muestra fue amplificada en un volumen final de reacción de 15 µl, conteniendo el reactivo IQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), cebadores específicos y agua DEPC. El gen del polipeptido zeta de la proteína de activación de tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa (YWHAZ) o el gen de ARN 18s fueron empleados como controles internos para normalizar la expresión de los genes de interés. Las especificaciones de los cebadores se encuentran detalladas en la Tabla 10.

Se estudio la eficiencia de los cebadores, las mismas alcanzaron el 100%. EL programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación los cuales consistieron en 95 °C por 15 segundos seguido de 60 °C por 60 segundos. Se realizó también el análisis de las curvas de disociación. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en triplicados y controles sin molde fueron incluidos. Los productos de PCR fueron confirmados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed ® Nucleic Acid Gel Stain. La expresión relativa de los genes fue calculada mediante el método para cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.3.4 Expresión proteica de TLR por western blot

4.3.4.1 Obtención y preparación de muestras

La expresión de proteínas de interés se estudio mediante el ensayo de western blot. Para ello, 2×10^5 células/ml fueron cultivadas en placas de 6 pocillos estériles y tratadas con el insecticida organofosforados CP a las concentraciones previamente mencionadas, durante 24 h.

Luego se obtuvieron los homogenatos correspondientes en buffer RIPA (1 % Triton X-100, 0.5 % desoxicolato de sodio, 9% SDS, 5% DTT, 1 mM ortovanadato de sodio, 10 µg fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) y 30 µg aprotinina). La cantidad de proteínas totales presentes en el sobrenadante fue determinada por

la técnica de de Bradford (1976). Igual cantidad de proteínas de muestra (50 µg) fueron diluidas en buffer de siembra (Tris-HCl 0,5 M, pH=6,8; glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 1%) conteniendo β-mercapto etanol al 6%, calentadas a 100°C durante 1 minuto.

4.3.4.2 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Se prepararon los geles separador y concentrador de acuerdo a lo descrito en las Tablas 12 y 13. Se seleccionó el porcentaje de gel separador de acuerdo al tamaño de las proteínas que se querían separar y determinar. Se utilizaron geles separadores de 10 % para TLR-4 y actina.

Tabla 12: Preparación de gel separador al 10%

Reactivos	Volumen
Agua destilada	2
Buffer Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,25 ml
SDS 10 %	50 µl
Acrilamida/bisacrilamida 30 %	1,67 ml
Persulfato de amonio 10%	100 µl
TEMED	2,5 µl

Tabla 13: Preparación de gel concentrador

Reactivos	Volumen (ml)
Agua destilada	3,05
Buffer Tris-HCl 0,5 M pH = 6,8	1,25
SDS 10 %	0,05
Acrilamida/bisacrilamida 30 %	0,65
Persulfato de amonio 10%	0,1
TEMED	0,005

Una vez solidificados los geles, se sembró 4 µl del marcador de peso molecular (Sigma Aldrich), y 50 µg de muestra aproximadamente por calle. La separación

electroforética se realizó a 150 V durante aproximadamente 120 minutos utilizando buffer de corrida (Tris base 24,7 mM, glicina 0,19 M, SDS 10%; H₂O destilada, pH 8,3). La corrida electroforética se realizó con un equipo Mini PROTEAN® Tetra Cell 4-gel HandcastingSystem de BioRad siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.3.4.3 Transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa

Luego de la migración, las proteínas fueron electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) a 100 V durante 1 hora empleando buffer de transferencia pH 8,1 conteniendo Tris-Base 24,7 mM; glicina 0,19 M; metanol 200 ml; H₂O destilada cantidad suficiente para 1 litro.

4.3.4.4 Coloración de proteínas en la membrana de nitrocelulosa

Las membranas fueron teñidas en una solución de Rojo Ponceau (0,5 mM en ácido acético al 1%) durante 5 minutos para colorear las proteínas transferidas. Posteriormente fueron fijadas con ácido acético al 1%. Una vez visualizadas las bandas, fueron escaneadas para verificar la calidad del procedimiento. Para eliminar por completo el colorante, las membranas fueron lavadas varias veces con buffer TBS (Tris HCl 0,02 M; NaCl 136,8 mM; H₂O destilada, pH 7,6).

4.3.4.5 Bloqueo de la membrana de nitrocelulosa e incubación con anticuerpos

Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con buffer TBS conteniendo 0,005% de Tween 20 y 5% de leche en polvo descremada. Luego del bloqueo, las membranas se lavaron con TBS y se incubaron durante la noche a 4 °C en agitación suave, con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 14). Luego de lavarse las membranas, se incubaron con anticuerpo secundario anti IgG conjugado HPR (anti-conejo peroxidasa, 1:10000) por 1 h a temperatura ambiente. Luego del tratamiento con anticuerpo secundario, las membranas

fueron lavadas con buffer TBS conteniendo 0,005% de Tween 20 cuatro veces durante 5 minutos y luego cada 15 minutos hasta completar la hora.

4.3.4.6 Revelado de membranas

Los complejos proteína-anticuerpo fueron revelados y visualizados con un sistema de detección de quimioluminiscencia, para lo cual se mezclaron 5 ml de solución A y 5 ml de solución B (Tabla 15), incubados durante 30 segundos, y colocándose en cassette de revelado el tiempo necesario de acuerdo al anticuerpo empleado. La intensidad de las bandas fue evaluada utilizando el software Gel-Pro Analyzer 3.2, las mismas se normalizaron con los valores de β -actina correspondiente con cada muestra. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias.

Tabla 14: Listado de anticuerpos y condiciones de incubación

Anticuerpo	Marca	Peso Molecular proteína (kDa)	Dilución del anticuerpo	Tiempo de revelado (minutos)
Anti-TLR-4	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, Texas USA	95	1:500	20
Anti- β actina	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, Texas USA	43	1:5000	10
Anti IgG- conejo	Sigma (St. Louis, MO, USA).	-	1:10000	-

Tabla 15: Preparación de solución de revelado

Reactivo	Solución A	Solución B
Tris HCl 100 mM pH 8,6	5 ml	5 ml
Luminol 250 mM (en DMSO)	50 μ l	
Cumárico 90 mM (en DMSO)	22 μ l	
H ₂ O ₂		3 μ l

4.4 Estudio de efecto de Neo sobre trofoblastos HTR-8/SVneo y JEG-3

4.4.1 Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por la técnica de MTT (Mosmann, 1983). Las líneas celulares HTR-8/SVneo y JEG-3. 1×10^4 células/ml, fueron cultivadas en placas de 96 pocillos estériles y tratadas con Ace o Ace CF 0,1, 1, 10 y 100 μM por 4 y 24 h a 37°C. Luego de la exposición con insecticidas, estos fueron removidos y se adicionó MTT (0,5 mg/ml) y se incubaron por 2 h a 37°C. Posteriormente, se removió el exceso de solución de MTT y se adicionaron 150 μl de DMSO y se agitó la placa durante 30 minutos. La absorbancia fue registrada a 570 nm (Thermo Max microplatereader) y los resultados fueron expresados como porcentajes en relación a los valores del control.

En trofoblastos HTR-8/SVneo se estudió también el efecto del antioxidante N-acetil-l-cisteína (NAC) en la viabilidad celular previo al tratamiento con Ace o Ace CF. La viabilidad celular se determinó por la técnica de MTT (Mosmann, 1983) como se describió previamente. Para ello, se incorporó NAC (2 mM) disuelto en medio de cultivo y se incubó durante 2 h. Luego de este lapso de tiempo, se incorporó al cultivo celular los tratamientos correspondientes a Ace, Ace CF y DMSO (como control).

4.4.2 Apoptosis - expresión proteica de Bax y Bcl-2 por western blot

La expresión de proteínas de interés se estudio mediante el ensayo de western blot. Para ello, 2×10^5 células /ml fueron cultivadas en placas de 6 pocillos estériles y neonicotinoides (Ace o Ace CF) a las concentraciones previamente mencionadas, durante 24 h. Los pasos seguidos para el desarrollo de esta técnica están detallados en la sección 4.3.4. Algunas consideraciones particulares para este ensayo se describen a continuación.

Se prepararon los geles separador y concentrador de acuerdo a lo descripto en la sección 4.3.4.2. Debido al tamaño de las proteínas de interés Bax y Bcl-2, se seleccionó el porcentaje de gel separador al 12%, para que se lograra una correcta separación y determinación (Tabla 16). El gel concentrador se realizó de acuerdo a lo descripto en la Tabla 13.

Tabla 16: Preparación de gel separador al 12%

Reactivos	Volumen
Agua destilada	1,67
Buffer Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,25 ml
SDS 10 %	50 µl
Acrilamida/bisacrilamida 30 %	2 ml
Persulfato de amonio 10%	25 µl (100 µl)
TEMED	2,5 µl

La incubación con anticuerpos específicos, lavados y revelado se realizaron de acuerdo a lo descrito en las secciones 4.3.4.5 y 4.3.4.6. Particularmente, la incubación con anticuerpos específicos de este apartado, se realizó de acuerdo a la Tabla 17.

Tabla 17: Listado de anticuerpos y condiciones de incubación

Anticuerpo	Marca	Peso Molecular proteína (kDa)	Dilución del anticuerpo	Tiempo de revelado (minutos)
Anti-BAX	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, Texas USA)	21	1:1000	10
Anti-Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, Texas USA)	26-28	1:1000	30
Anti-β actina	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, Texas USA	43	1:5000	10
Anti IgG- conejo	Sigma (St. Louis, MO, USA).	-	1:10000	-

4.4.3 Migración celular – ensayo de herida

La capacidad migratoria de trofoblastos HTR-8/SVneo fue evaluada mediante el ensayo de herida (*wound healing*) de acuerdo a Grada y col. (2017). Para ello se cultivaron 1×10^4 células/ml en placa de 96 pocillos estériles. Se dejó desarrollar la monocapa celular hasta alcanzar el 80-90% de confluencia. Se eliminó el medio de cultivo y se lavo con PBS 1X estéril. Posteriormente se realizaron las

heridas con un tip de 10 µl colocado a 30-45° y se lavó la monocapa con PBS 1X para evitar que las células desprendidas vuelvan a adherirse. Se realizó una herida por pocillo por cada estímulo (DMSO como control, 0,1 – 100 µM Ace y Ace CF), repitiéndose por lo menos 4 heridas por cada tratamiento. Se repitió el lavado con PBS dos veces para eliminar células flotantes que puedan adherirse nuevamente en el espacio de la herida. Se adicionaron a las concentraciones previamente mencionadas correspondientes con el insecticida y el control y las células se cultivaron por 24 hs. Cada concentración del insecticida y el control se preparó con medio suplementado al 1% con SBF. Estas condiciones de bajo suero permiten a las células migrar y no provocar la muerte celular, minimizando la proliferación celular ya que esta podría apantallar el proceso de migración (Grada y col., 2017).

Se procedió al registro del área correspondiente a la herida realizada y a su recuperación. Para ello se tomaron fotografías en microscopio invertido en aumento 10X en el comienzo del ensayo (0 h de exposición) y luego de 24 h de exposición. Se determinó el área de herida remanente comparando el porcentaje de recuperación de cada tratamiento a 24 h comparado con el área correspondiente al inicio del tratamiento por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Área de herida remanente (\%)} = \frac{\text{Área}_{0h} - \text{Área}_{24h}}{\text{Área}_{0h}} \times 100$$

Los resultados se expresaron como porcentaje de herida remanente considerando el área de herida del control de tratamiento como 100%.

4.4.4 Niveles de expresión de transcripto de $\alpha 7$ nAChR

Para estudiar la expresión del receptor $\alpha 7$ nAChR, se realizó la extracción de ARN de cultivos celulares, luego se procedió a hacer la retrotranscripción de ARN en ADNc y finalmente se determinó el nivel de expresión de genes de interés. Para ello, se cultivaron 2×10^5 células/ml en placas de 6 pocillos y una

vez alcanzada la confluencia se expusieron a Ace o Ace CF según corresponda, durante 24 h. Se procedió a la extracción del ARN y posterior retrotranscripción en ADNc, como se describió en la sección 4.3.2.

La expresión de $\alpha 7$ nAChR fue evaluada mediante el ensayo de qPCR, para ello previamente se seleccionaron cebadores específicos, los cuales fueron obtenidos de la bibliografía. Las secuencias de cebadores directo y reverso (forward, F, y reverse, R, respectivamente) se detallan en la Tabla 18. Posteriormente los productos de amplificación fueron evaluados en cuanto a su especificidad, presencia de dímeros o productos inespecíficos, mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR), como se describió en la sección 4.3.2.2, seguido de la electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 2% y visualizados en transiluminador UV.

Los niveles de expresión de $\alpha 7$ nAChR fueron evaluados mediante qPCR en el equipo Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf). Para ello, 5 μ l de una dilución 1:25 de cada muestra fue amplificada en un volumen final de reacción de 15 μ l, conteniendo el reactivo IQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), cebadores específicos y agua DEPC. El gen YWHAZ fue empleado como control interno para normalizar la expresión de $\alpha 7$ nAChR.

Tabla 18: Secuencias de cebadores específicos y sus características

Gen	Secuencia 5'→3'	Tamaño cebador	Largo producto (pb)	Accession number	Proveedor
$\alpha 7$ nAChR ^a	F: GTACGCTGGTTTCCCTTTGA	20	139	NM_000746.4	SigmaAldrich
	R: CCACTAGGTCCCATTCTC	18			
YWHAZ ^b	F: CCTGCATGAAGTCTGTAAGTGAAG	23	120	EF094937.1	SigmaAldrich
	R: TTGAGACGACCCTCCAAGATG	21			

^a Machaalani y col. 2015; ^b Choudhury y col. 2017

Se estudio la eficiencia de los cebadores, las mismas alcanzaron el 100%. EL programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación los cuales consistieron en 95 °C por 15 segundos seguido de 60 °C por 60 segundos. Se realizó también el análisis de las curvas de disociación. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en triplicados y controles sin molde fueron incluidos. Los productos de PCR fueron confirmados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA). La expresión relativa de los genes fue calculada mediante el método para cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.4.5 Análisis de los niveles de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la línea celular HTR-8/SVneo y JEG-3 fue determinada mediante el ensayo colorimétrico de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) (Choi y col., 2006) y el ensayo fluorescente con la sonda DCFH-DA (Yang y col., 2009).

El NBT es un compuesto de color amarillo que en presencia de anión superóxido es reducido dando como producto un compuesto insoluble en agua de intenso color azul (azul de formazan, Figura 15), que puede ser monitoreado espectrofotométricamente (De la Torre Binimelis, 1994; Tuncy col., 2010). Para

este ensayo 1×10^4 células/ml fueron cultivadas en placas de 96 pocillos y tratadas con Ace o Ace CF (0,1, 1, 10, 10 μ M) durante 4 y 24 h a 37 °C. Luego de los tratamientos, el medio de cultivo fue removido y se adicionó solución de NBT (0,01 %) conteniendo forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (0,125 μ M) e incubados durante 45 minutos a 37 °C. Luego, se removió el excedente de solución de NBT y se adicionó 250 μ l de solución de lisis (115 μ l KOH 2N y 135 μ l de DMSO) y los cristales de formazán fueron solubilizados en agitación durante 10 minutos. Se registró la absorbancia a 630 nm (Lector de microplacas Rayto TR 2100C). Los resultados fueron expresados como porcentajes comparados contra el control.

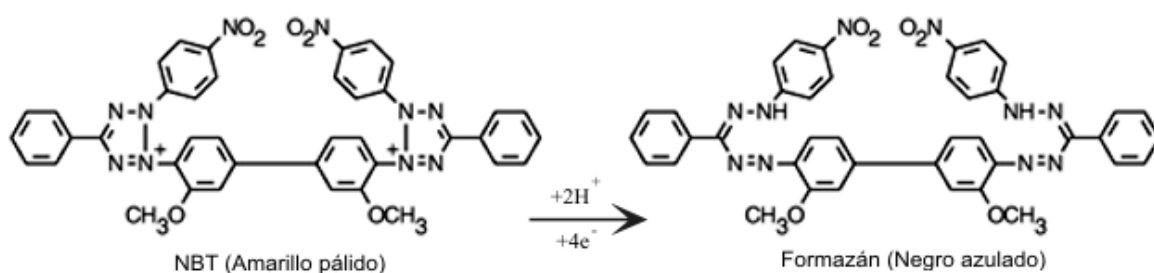


Figura 15: Reacción de reducción de azul de formazán (NBT) a formazán (Choi y col. 2006)

Un rango más amplio de ERO fue determinado por medio de la sonda fluorescente DCFH-DA. Este compuesto es capaz de difundir a través de la membrana celular, y es hidrolizado por esteraras intracelulares al compuesto 2',7'- diclorodihidrofluoresceina (DCFH). Por otra parte, ERO como peróxido de hidrógeno, anión hidroxilo, e hidroperóxidos oxidan de DCFH a 2',7'- diclorofluoresceina (DCF) (Figura 16), un compuesto fluorescente (Gomes y col., 2005; Wang y Joseph, 1999). Para llevar a cabo este ensayo se incubaron 1×10^4 células/ml en placas opacas de 96 pocillos y se trataron con Ace y Ace CF 0,1, 1, 10 y 100 μ M por 4 y 24 h a 37 °C. Posteriormente se incorporó la sonda DCFH-DA (25 μ M) a cada pocillo y se incubaron por 30 minutos. Se registro la fluorescencia a 485 nm para la excitación y 535 nm para la emisión (espectrofluorómetro Hitachi H700). Los resultados fueron expresados como

porcentajes de unidades relativas de fluorescencia en comparación contra los controles.

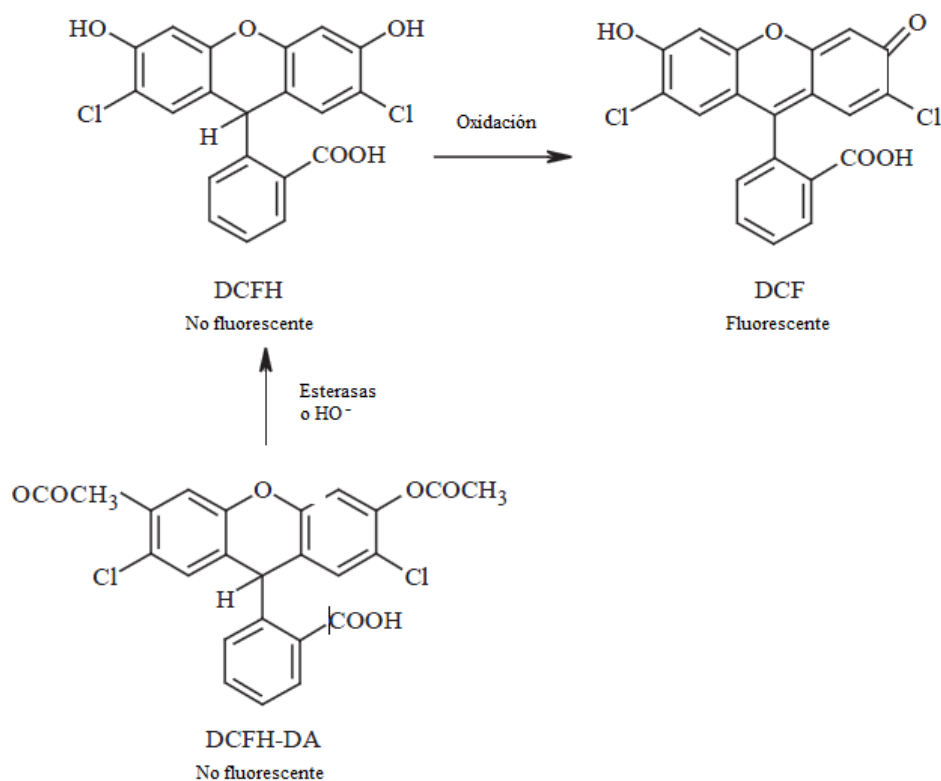


Figura 16: Mecanismo de de-esterificación de 2',7'- diclorodihidrofluoresceinadiacetato (DCFH-DA) a 2',7'- diclorodihidrofluoresceina (DCFH), y la consiguiente oxidación a 2,7-diclorofluoresceina (DCF) por medio de especies reactivas de oxígeno (Gomes y col., 2005).

La estimación de ERN se realizó determinando la concentración de óxido nítrico, la cual fue evaluada indirectamente mediante la medición de la concentración de nitritos en sobrenadantes de cultivos celulares, de acuerdo a la reacción de Griess (Guiñazú y col., 2012). Para ello, 1×10^4 células/ml se sembraron en placas de 96 pocillos y posteriormente fueron tratadas con Ace o Ace CF 0,1, 1, 10 y 100 μM por 4 y 24 h a 37 °C. Se tomaron los sobrenadantes de los cultivos celulares (100 μl) y se mezclaron con 100 μl de solución de Griess (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Luego de 30 minutos de incubación en oscuridad, se midió la absorbancia de las mezclas a 540 nm (ThermoMax, Molecular Devices). La concentración de nitritos fue calculada utilizando una curva de concentración de nitrito de sodio (0 - 50 μM) como estándar.

4.4.6 Evaluación de las defensas antioxidantes

4.4.6.1 Actividad de enzima superóxido dismutasa

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se determinó indirectamente a través de la reducción de NBT de acuerdo a Bustos y col. (2016). El anión superóxido puede reducir al NBT a azul de formazán el cual puede ser determinado espectrofotométricamente. En relación a esto, una menor reducción de NBT representa mayor actividad de SOD. Para llevar a cabo este ensayo, 1×10^4 células/ml se sembraron en placas de 96 pocillos estériles y fueron expuestas a Ace o Ace CF (0,1, 1, 10 y 100 μM) por 4 o 24 h. Luego, sin remover el medio, se adicionaron 175 μl de mezcla de reacción (riboflavina 2 mM, metionina 13 mM, EDTA 100 nM y NBT 75 μM) fue adicionada a cada pocillo y se expusieron a radiación de lámpara fluorescente de 20 W durante 15 minutos. La absorbancia del producto se midió a 560 nm. Los resultados se expresaron como unidades de SOD. De acuerdo a Beauchamp y Fridovich (1971), una unidad SOD está definida como el equivalente de enzima para reducir el 50 por ciento la reducción de NBT.

4.4.6.2 Actividad de enzima catalasa

La actividad de la enzima catalasa (CAT) fue determinada por medio del registro del decaimiento de la absorbancia a 240 nm, como se ha descrito previamente (Rivero Osinami y col., 2016). Para ello, 2×10^5 células/ml se cultivaron en placas estériles de 6 pocillos y luego se trataron con Ace o Ace CF (0,1, 1, 10 y 100 μM) por 4 o 24 h. Posteriormente, se obtuvieron lisados celulares con Na_2HPO_4 50 mM conteniendo 0,1% tritón X-100. La actividad de CAT fue determinada en 500 μl de mezcla de reacción (Na_2HPO_4 50 mM pH 7,0, H_2O_2 81,5 mM) a 37 °C luego del agregado de 10 μg de proteína por muestra. La línea de base de absorbancia de mantuvo constante y la absorbancia de la mezcla de reacción fue estrictamente controlada para que partiera de 1,000 unidades de absorción. La actividad de CAT se expresó como U/ml, usando un coeficiente de absorción

molar del peróxido de hidrógeno ($40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El contenido de proteínas fue cuantificado mediante el método de Bradford (1976).

4.4.6.3 Actividad de enzima glutatión S-transferasa

La actividad de Glutathion S-transferasa (GST) fue determinada espectrometricamente a 340 nm de acuerdo a Rivero Osimani y col. (2016). Para ello, 2×10^5 células/ml se cultivaron en placas estériles de 6 pocillos y luego se trataron con Ace o Ace CF (0,1, 1, 10 y 100 μM) por 4 o 24 h. Los lisados celulares fueron obtenidos en buffer fosfato de sodio (0,1 M, pH 6,5) conteniendo 50 mM de glutatión y CDNB 50 mM disuelto en acetonitrilo, en un volumen final de 1 ml. La actividad fue expresada como unidades de GST. Una unidad de GST fue definida como el equivalente de enzima para producir el conjugado con CDNB (nmol/min x mg proteína) utilizando el coeficiente de absortividad molar del conjugado ($9,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El contenido de proteínas fue cuantificado mediante el método de Bradford (1976).

4.4.6.4 Contenido de GSH total

El contenido de glutatión reducido (GSH) fue determinado mediante la técnica colorimétrica de Ellman (1959). La cual se basa en el desarrollo de color luego de que el ácido 5,5'-ditio bis-2-nitrobenzoico (DTNB) interaccione con los grupos sulfhidrilos del GSH. Para ello, 2×10^5 células/ml fueron cultivadas en placas estériles de 6 pocillos y tratados con Ace o Ace CF (0,1, 1, 10 y 100 μM) por 4 o 24 h. Se obtuvieron los lisados celulares en buffer fosfato de sodio (0,1 M, pH 6,5) y se cuantificó la concentración de proteínas con el método de Bradford (1976). Luego, 250 μl de cada lisado fueron tratados con ácido tiobarbitúrico (10%) y centrifugados a 10.000 g a 4 °C durante 10 minutos. La reacción se inició al momento de adicionar el reactivo de Ellman (1,5 mM DTNB en buffer fosfato de sodio 0,25 M). Para la cuantificación de GSH se realizó una curva de calibración con estándar GSH (0 a 8 nmol). Las determinaciones se realizaron a 412 nm (espectrofotómetro UV/vis 16030 Shimadzu). Los resultados se expresaron como porcentajes de GSH comparados con el control.

4.4.7 Evaluación de biomarcadores de daño oxidativo

Para evaluar el posible daño oxidativo vinculado a la exposición a Neo en la línea celular HTR-8/SVneo, se analizó el efecto de Ace y Ace CF en las principales biomoléculas plausibles de ser dañadas en un escenario de estrés oxidativo. Para ello se estudió la oxidación de proteínas por medio de la técnica de Productos Avanzados de Oxidación Proteica (PAOP); la peroxidación de lípidos por medio de la determinación de Sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico (TBARS); y la fragmentación en el ADN como medida de daño genotóxico, a través del ensayo cometa alcalino. Las técnicas mencionadas se describen a continuación.

4.4.7.1 Oxidación de proteínas

La oxidación de proteínas fue determinada mediante la técnica de Productos Avanzados de Oxidación Proteica -PAOP- (Advanced Protein Oxidation Products) como ha sido descripta previamente (Virginia y col., 2013). Para ello, 3×10^5 células/ml fueron cultivadas en placas estériles de 12 pocillos y luego de alcanzar la confluencia fueron tratadas con Ace o Ace CF (0,1, 1, 10 y 100 μM) por 4 y 24 h a 37 °C o pre-incubados con NAC (2 mM) previo al tratamiento con Neo. Se obtuvieron los homogenatos de los tratamientos en PBS y 150 μl de los mismos se mezclaron con ácido acético al 10% (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) y 1,16 M de ioduro de potasio. La absorbancia del producto fue registrada a 340 nm (espectrofotómetro UV/vis 16030 Shimadzu). Para la cuantificación se empleó estándar de cloramina T (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) para la curva de calibración. Los resultados se expresaron como μmol cloramina/mg proteína. La determinación de la concentración de proteínas se llevo a cabo por el método de Bradford (1976).

4.4.7.2 Peroxidación lipídica

La peroxidación de lípidos fue determinada por medio de la determinación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, por su sigla en inglés), de acuerdo a Bustos y col. (2016). En resumen, 3×10^5 células/ml fueron cultivadas en placas estériles de 12 pocillos y tratadas con el insecticida Ace o su formulación comercial Ace CF, durante 4 y 24 h de exposición a las concentraciones previamente mencionadas. Asimismo, se evaluó la preincubación con el antioxidante NAC (2 mM) 2 h previos a la exposición con los insecticidas. Luego del tratamiento, se obtuvieron los homogenatos celulares en 250 μ l de PBS pH 7,4. 200 μ l de homogenato fueron mezclados con mezcla de reacción formada por ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5%), ácido clorhídrico (HCl 0,25N) y ácido tricloroacético (TCA 15%). Posteriormente, 350 μ l de butanol:piridina (15:1) fueron incorporados para extraer los productos de peroxidación lipídica. Las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos y la absorbancia de la fase orgánica fue registrada a 540 nm (espectrofotómetro UV/vis 16030 Shimadzu). Para la cuantificación se empleó la curva de calibración obtenida a partir de malondialdehído como estándar (concentraciones entre 0 y 100 nM). El contenido de proteínas fue determinado por el método de Bradford (1976) y los resultados fueron expresados nmol MDA/mg proteína.

4.4.7.3 Daño en ADN

El daño al ADN fue determinado por el ensayo cometa alcalino, como se describió previamente de acuerdo a Simoniello y col. (2010). Para ello 2×10^5 células/ml fueron cultivadas en placas estériles de 12 pocillos y tratadas con Ace y Ace CF durante 4 y 24 h. Además, se estudió también el efecto de la preincubación con NAC (2 mM) 2 h previo al tratamiento con los insecticidas. Luego de la exposición a Neo, los tratamientos fueron removidos y las células suspendidas en PBS pH 7,4. Posteriormente, las células fueron fijadas en porta objetos los cuales contenían agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Los porta objetos fueron colocados en buffer de lisis frío (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, 10mM Tris, pH 10,0-10,5), al cual se le adiciono Tritón X-100 (1% v/v) y DMSO

(10% v/v), durante 1-5 días máximo. Posteriormente, los porta objetos fueron incubados durante 20 minutos en oscuridad en cuba de electroforesis conteniendo solución de buffer alcalino (NaOH 10 N y Na₂EDTA 200 mM, pH>10). Al finalizar este periodo, se realizó la electroforesis del ADN durante 20 minutos a 25 V - 300 mM. Luego de la electroforesis, se retiraron los porta objetos y la solución alcalina remanente fue neutralizada con lavados sucesivos con Tris-Hcl 0,4 M (pH 7,5) a temperatura ambiente y los porta objetos fueron fijados con etanol absoluto.

Para el análisis de microscopía de los cometas, los porta objetos fueron codificados, mezclados y seleccionados al azar para su determinación. En el momento de la determinación se adicionó bromuro de etidio (20 µg/ml) en cada porta objetos. Luego se contabilizaron 100 células en cada porta objetos por triplicado por cada tratamiento. Esta determinación se realizó observando cada porta objeto a 20X en microscopio de epifluorescencia Nikon® 80i, con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm acoplado con cámara digital. Los cometas fueron analizados visualmente y categorizados en una escala de I a IV, de acuerdo al nivel de ADN dañado (Figura 17). Las cuatro categorías están establecidas de acuerdo a la longitud total del cometa: categoría I (<20 µm), categoría II (20-40 µm), categoría III (40-80 µm) y categoría IV (>80 µm) (Cortés-Gutiérrez y col., 2012; Quintana y col., 2017). Los resultados fueron expresados como valores promedio de Índice de daño genotóxico, siendo este determinado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de daño genotóxico} = \sum_{i=1}^4 i \times (\text{Número de células}_{\text{Categoría } i})$$



Figura 17: Escala de fragmentación de ADN empleada en ensayo cometa. Ordenados de izquierda a derecha de acuerdo a la longitud total del cometa: categoría I (<20 μm), categoría II (20-40 μm), categoría III (40-80 μm) y categoría IV (>80 μm). Fuente: modificado de Cortés-Gutiérrez y col. (2012)

4.5 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas en las muestras en todo el trabajo de tesis, se realizó por medio de la técnica de Bradford (1976). Se empleó el reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad) diluyéndolo en agua destilada en un factor de dilución 1:5 en el momento de la cuantificación. Para la reacción se tomaron entre 1 y 5 μl de muestra (lisados celulares de acuerdo a cada técnica descrita a previamente), luego se agregó 1,2 ml de la solución de Bradford. La mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz solar y posteriormente la absorbancia del compuesto coloreado fue monitoreada espectrofotométricamente a 595 nm (espectrofotómetro UV/vis 16030 Shimadzu). Adicionalmente, se utilizó blanco de reactivos y una curva de calibración, con un testigo de albúmina sérica bovina de 1 mg/ml. La concentración de proteínas de la muestra biológica fue determinada en base a la curva estándar de albúmina sérica bovina, la cual incluyó concentraciones desde 0,015 a 1 mg/ml.

4.6 Análisis estadístico

Todos los datos fueron obtenidos de por lo menos tres réplicas biológicas y los resultados fueron mostrados como promedio \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por medio de Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnet como prueba a *posteriori* para evaluar diferencias significativas en comparación al control de tratamientos. Un nivel de significancia

de 5% ($p < 0,05$) fue seleccionado para evaluar diferencias significativas. El análisis estadístico y los gráficos de barras fueron realizados con el software GraphPad Prism v5.

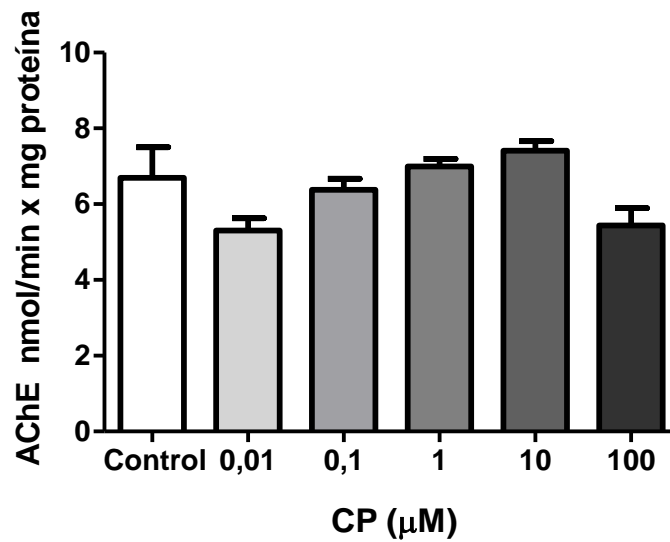
5. Resultados

5.1 Efecto de clorpirifos en la respuesta inmune innata de trofoblastos humanos

5.1.1 Estudio de la actividad de acetilcolinesterasa

El blanco primario de acción de los insecticidas OF es la enzima AChE, su inhibición resulta en la acumulación de acetilcolina y por consiguiente en los efectos neurotóxicos reportados (Burke y col., 2018). Para evaluar el posible efecto de clorpirifos (CP) sobre la respuesta innata de trofoblastos humanos, como blanco alternativo, se analizó inicialmente el efecto del OF sobre la actividad del blanco primario. En este sentido, para estudiar si CP es capaz de inhibir la enzima AChE en trofoblastos humanos HTR-8/SVneo se evaluó la actividad basal de la enzima por el método de Ellman descrito previamente. Se determinó que la enzima AChE presenta actividad basal en esta línea celular ($6,37 \pm 0,404$ nmol/min x mg de proteína). Se estudió la actividad enzimática luego de la exposición a CP (0,01 a 100 μ M) durante 4 y 24 h de exposición (Figura 18). El insecticida CP no indujo cambios significativos en la actividad de AChE a tiempos cortos de exposición (4 h), como se muestra en la Figura 18.A. Sin embargo, a tiempos más prolongados (24 h), se observa una disminución significativa de la actividad enzimática a altas concentraciones del plaguicida, 10 y 100 μ M (Figura 18.B).

A



B

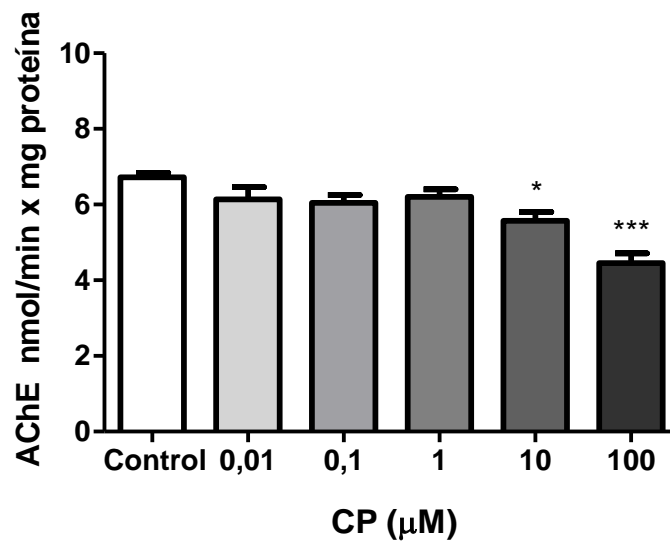


Figura 18: Actividad de la enzima acetilcolinesterasa en trofoblastos HTR-8/SVneo. La actividad de AChE fue determinada luego de la exposición al insecticida clorpirifos (CP) (0,01-100 μM) luego de 4 (A) 24 (B) h de exposición. La actividad AChE fue expresada como nmol/minuto x mg de proteína. Los gráficos muestran valores promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.1.2 Alteración de la respuesta inmune innata de trofoblastos humanos

5.1.2.1 Expresión de receptores tipo toll (TLR)

Los receptores tipo toll (TLR) son componentes de la respuesta inmune innata y participan en el inicio de la respuesta inflamatoria inducida por microorganismos, estrés celular y/o daño a los tejidos (Tangerås y col., 2014). Para estudiar si el organofosforado CP modula la expresión de receptores TLR en trofoblastos HTR-8/SVneo, se evaluó en las condiciones en las que se encontraron cambios en la actividad de AChE la expresión del transcripto para los receptores tipo toll TLR-2 y TLR-4. Para ello se empleó la técnica qPCR luego de la exposición por 24 h con el insecticida CP. Inicialmente se procedió al análisis de los productos de amplificación (específicos e inespecíficos) por medio de PCR cualitativa, de los distintos genes endógenos YWHAZ, 18s y ciclofilina (Figura 19); y de TLR-2 y TLR-4 (Figura 20).

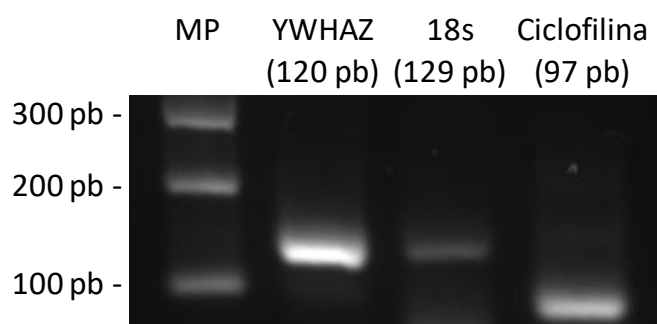


Figura 19: Productos de amplificación de genes endógenos. Se estudió el producto de amplificación de los genes endógenos disponibles para la normalización de los genes de interés, se evaluó la presencia de productos específicos e inespecíficos por medio de PCR convencional. Imagen representativa de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

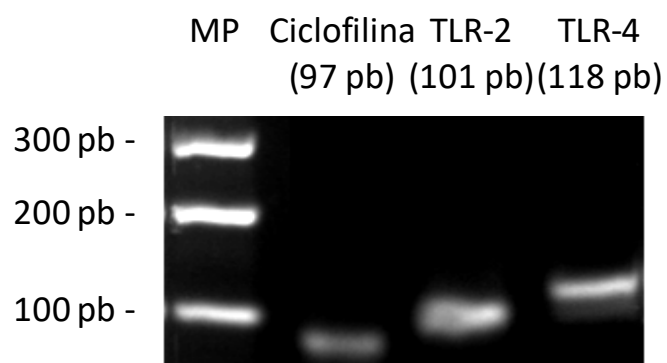


Figura 20: Productos de amplificación de TLR. Se estudió el producto de amplificación de TLR-2 y TLR-4, se evaluó la presencia de productos específicos e inespecíficos por medio de PCR convencional. Imagen representativa de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Una vez evaluada la especificidad de los productos de amplificación, se procedió a evaluar en condiciones basales la eficiencia de cebadores específicos para cada receptor como así también para el gen estándar interno 18s. La Tabla 19 resume la eficiencia de cada par de cebadores y los coeficientes de determinación para cada ajuste lineal. La Figura 21 muestra los resultados de los ajustes de las curvas de calibración para los cebadores estudiados y la especificidad de los productos a través de curvas de disociación.

Tabla 19: Eficiencias y coeficientes de determinación (R^2) de cebadores específicos para genes de TLR y 18s

Gen	Eficiencia	R^2
TLR-2	0,90	0,98
TLR-4	0,89	0,99
18s	1,07	0,95

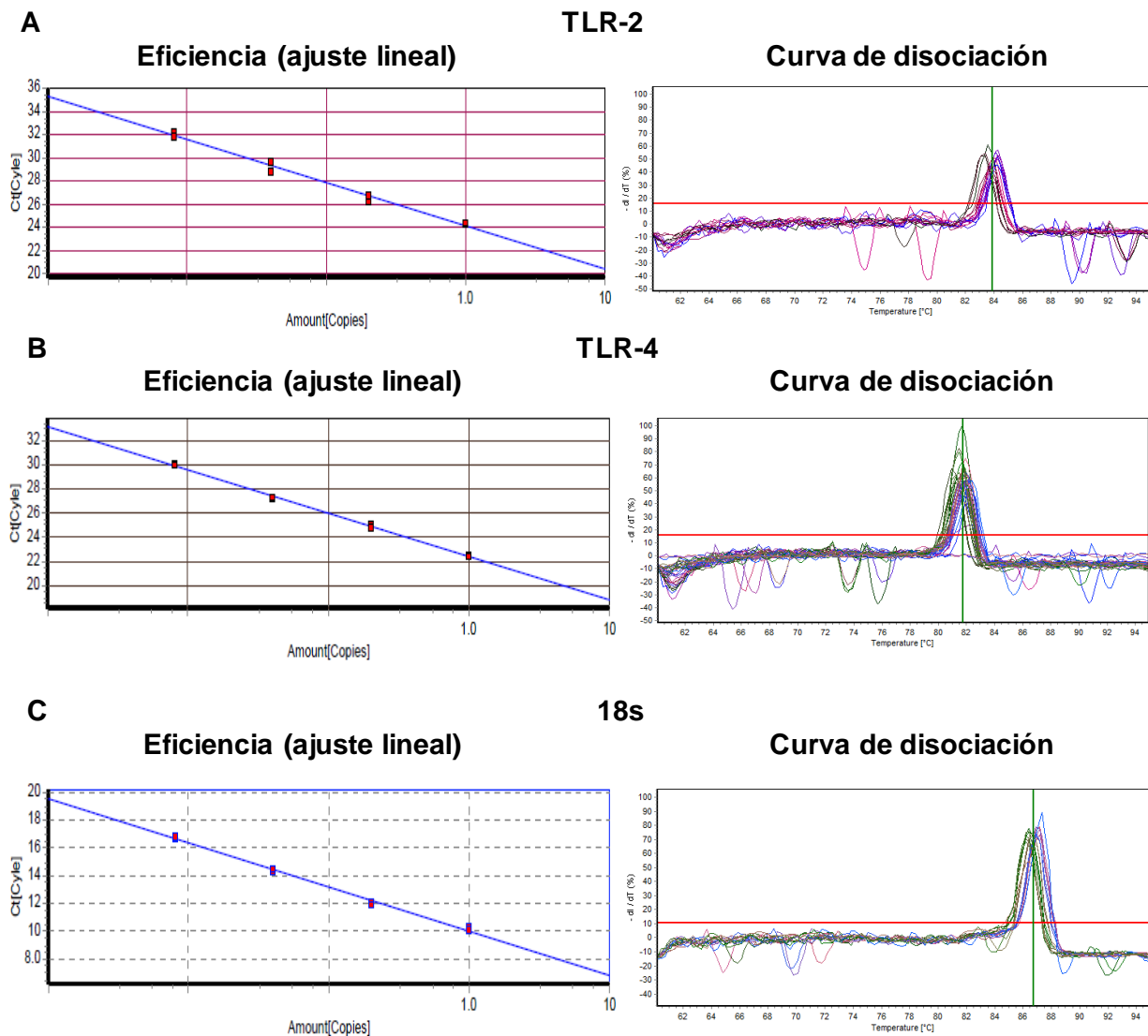
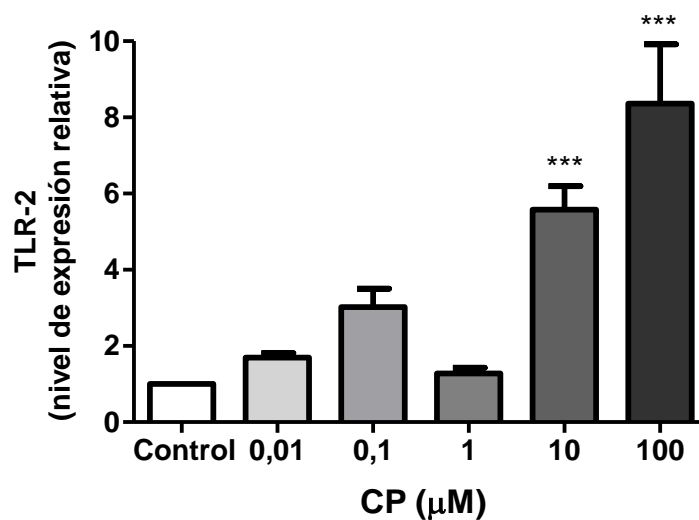


Figura 21: Puesta a punto de cebadores específicos de TLRs. Evaluación eficiencia y especificidad de los cebadores específicos en cuanto a ajustes lineales (izquierda) y curvas de disociación (derecha) para TLR-2 (A), TLR-4 (B) y del estándar interno 18s (C).

A continuación, se estudió el nivel de expresión de los transcritos de TLR-2 y TLR-4 luego de la exposición al insecticida CP por 24 h. Como se muestra en la Figura 22, se observa que la exposición de trofoblastos HTR-8/SVneo a concentraciones de 10 y 100 μM de CP indujo un aumento significativo del transcripto para TLR-2 (5,6 y 8,4 veces respecto al control, respectivamente) y para TLR-4 (3,7 y 3,8 veces respecto al control, respectivamente) (Figura 22.A y 22.B, respectivamente).

A



B

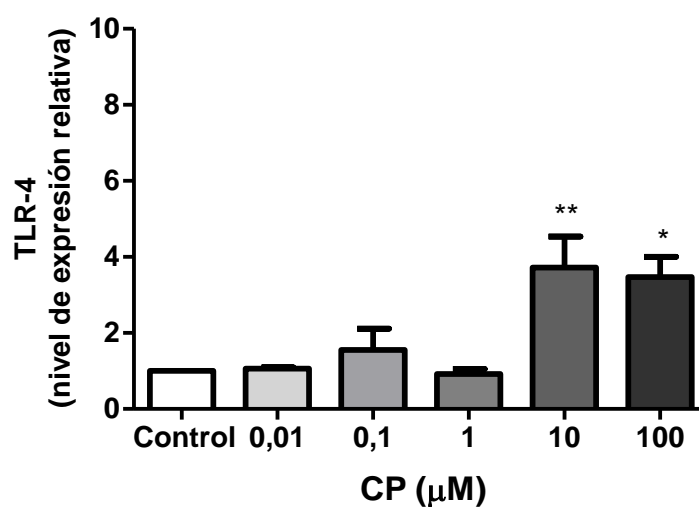


Figura 22: Expresión relativa del transcrito para TLRs en trofoblastos HTR-8/SVneo. Efecto del organofosforado clorpirifos (CP) (0,01-100 μM) en los niveles del transcrito para los receptores tipo toll TLR-2 (A) y TLR-4 (B), determinado por qPCR luego de 24 h de exposición al insecticida. La expresión del ARNm fue representada como valores relativos comparados al control (promedio ± desviación estándar) de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, diferencias significativas respecto al grupo control.

5.1.2.2 Expresión proteica de TLR

Se estudió los niveles de proteína del receptor tipo toll TLR-4 mediante la técnica de western blot, en trofoblastos HTR-8/SVneo luego de la exposición a CP (0,01 a 100 μ M) luego de 24 h de exposición, además se empleó lipopolisacárido (LPS, 10 μ g/ml) como control positivo. Se observó aumento significativo de los niveles de TLR-4 luego de la exposición a LPS, además se denotó un aumento significativo de los niveles de proteína de este receptor en todas las concentraciones ensayadas del insecticida (Figura 23)

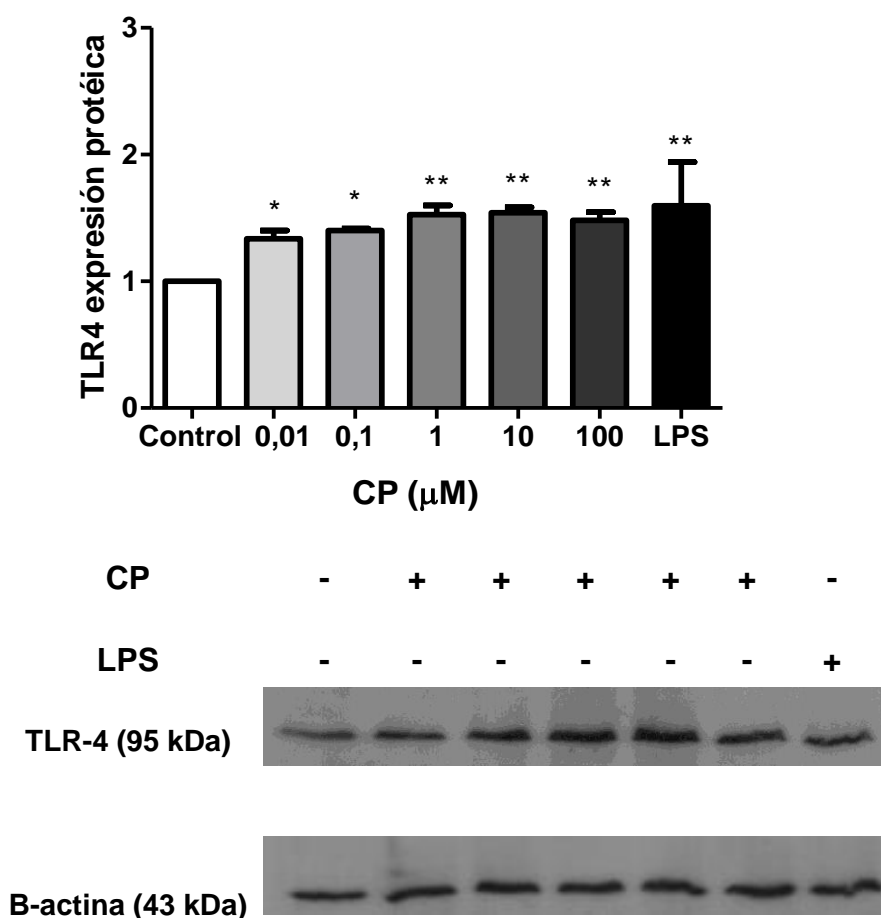


Figura 23: Expresión proteica de TLR-4 en trofoblastos HTR-8/SVneo. La expresión de TLR-4 fue evaluada en trofoblastos HTR-8/SVneo luego de la exposición por 24 h al organofosforado CP (0,01-100 μ M) y a LPS (10 μ g/ml) como control positivo, por medio de western blot. La intensidad relativa de las bandas fue estimada por estandarización con β -actina, el análisis de la densitometría se realizó con el software Gel Pro3 Analyzer 3.2 program. Los resultados están expresados como promedio \pm desviación estándar. * p <0,05 y ** p < 0,01, diferencias significativas con respecto al grupo control.

En cuanto al estudio de los niveles de proteína del receptor tipo toll TLR-2, se procedió a analizar los niveles en condiciones basales y en condiciones de exposición al plaguicida CP por western blot análogamente a lo descrito con TLR-4. Sin embargo, los anticuerpos anti-TLR-2 empleados durante el desarrollo de esta tesis no resultaron los óptimos para evaluar los niveles de proteína en las condiciones estudiadas.

5.1.3 Efecto de clorpirifos en la respuesta inflamatoria

La activación de receptores tipo toll puede resultar en la liberación de citoquinas (Juárez Carvajal y col., 2009). Para evaluar el posible efecto de la regulación de TLR en trofoblastos HTR-8/SVneo, se evaluó la expresión del transcripto para las citoquinas interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) por qPCR luego de la exposición por 24 hs con el insecticida CP. Para ello, previamente se evaluaron los productos de amplificación con los cebadores específicos para dichas interleuquinas por PCR cualitativa (Figura 24). En la línea celular HTR-8/SVneo se comprobó la presencia de transcriptos para IL-6 y TGF- β , como puede observarse en la Figura 24. No obstante, en las condiciones ensayadas no se comprobó la expresión de citoquina IL-10 (Figura 24.A). En este sentido, para comprobar la efectividad de los cebadores de IL-10, se empleó como control la línea celular de queratinocitos inmortalizados a partir de piel humana adulta HaCaT. Esta línea celular es ampliamente utilizada para ensayar distintos procesos *in vitro* de diferenciación, inflamación y reparación, entre otros, como modelo de queratinocitos humano (Colombo y col., 2017).

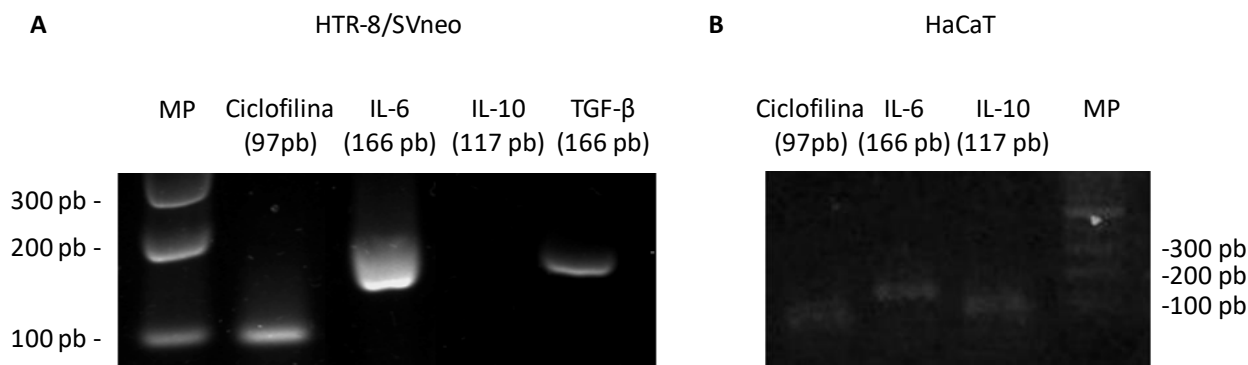


Figura 24: Productos de amplificación de citoquinas. Se estudió el producto de amplificación de interleuquinas 6 (IL-6) y 10 (IL-10) y del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β). Se evaluó la presencia de productos específicos e inespecíficos por medio de PCR convencional en trofoblastos HTR-8/SVneo (A) y en queratinocitos HaCaT (B). Imagen representativa de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

En condiciones basales, se procedió a evaluar la eficiencia de cebadores específicos para IL-6 y TGF-β, como así también para el gen estándar interno 18s, por qPCR. La Tabla 20 resume la eficiencia de cada par de cebadores y los coeficientes de determinación para cada ajuste lineal. La Figura 25 muestra los resultados de los ajustes de las curvas de calibración para IL-6 y TGF-β y la especificidad de los productos a través de curvas de disociación. En cuanto al gen estándar interno 18s, estos resultados se encuentran en la Figura 21.C.

Tabla 20: Eficiencias y coeficientes de determinación (R^2) de cebadores específicos para los genes de citoquinas

Gen	Eficiencia	R^2
IL-6	1,2	0,99
TGF-β	0,92	0,99

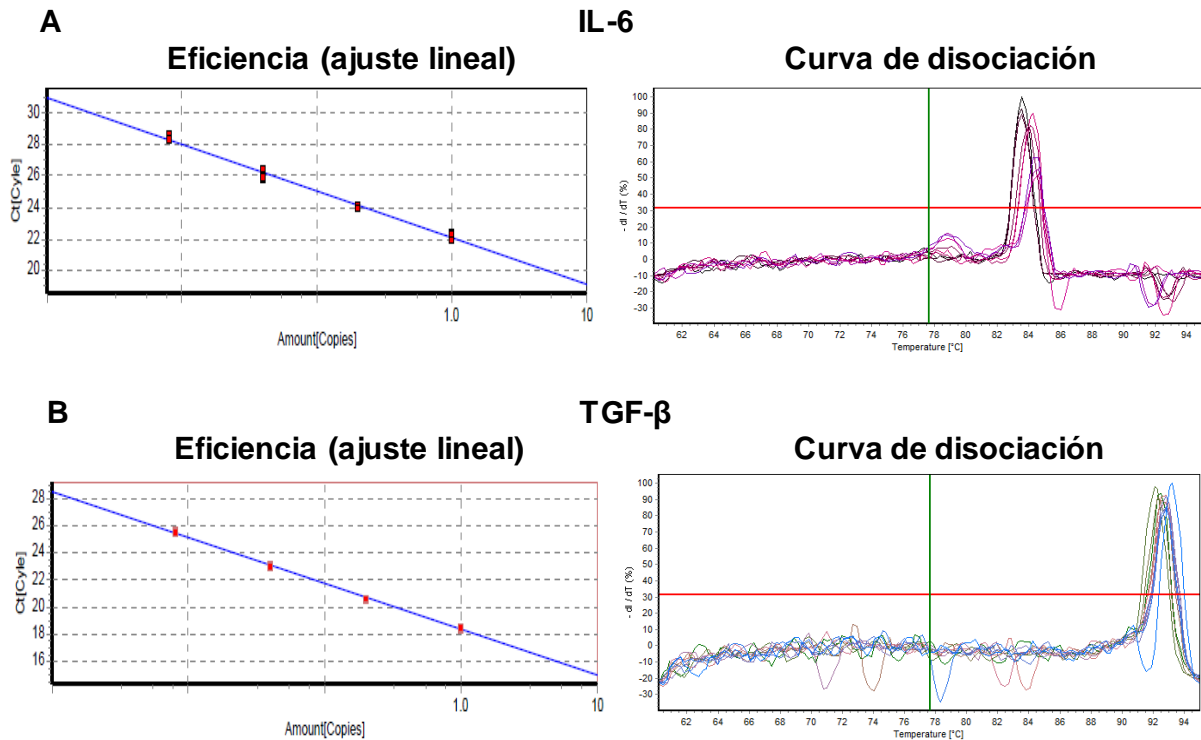
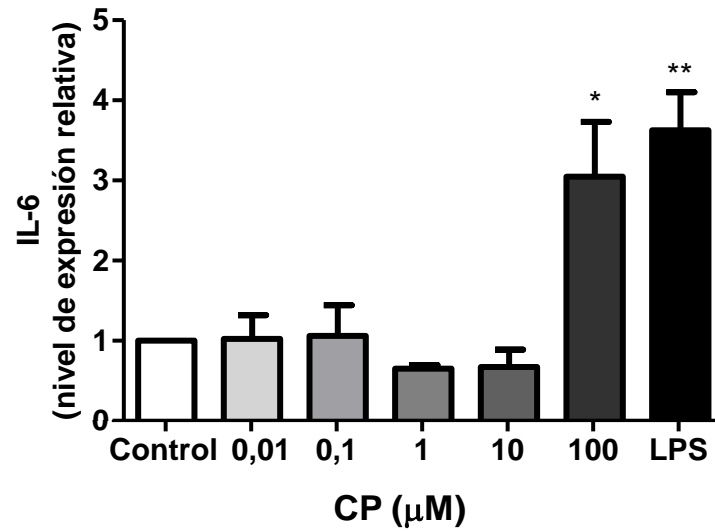


Figura 25: Puesta a punto de cebadores específicos de citoquinas. Evaluación de eficiencia y especificidad de los cebadores específicos en cuanto a ajustes lineales (izquierda) y curvas de disociación (derecha) para citoquina pro inflamatoria IL-6 (A) y citoquina anti-inflamatoria TGF- β (B).

A continuación, se estudió el nivel de expresión de los transcritos de IL-6 y TGF- β en trofoblastos HTR-8/SVneo luego de la exposición al insecticida CP (0,01 a 100 μ M) durante 24 h. Como control positivo, se empleo LPS (10 μ g/ml) ya que es un reconocido agonista de TLR-4. Como se muestra en la Figura 26, se observa que la exposición de trofoblastos HTR-8/SVneo a concentraciones de 100 μ M de CP indujo un aumento significativo del transcripto para IL-6 y TGF- β (3,1 y 2,7 veces respecto al control, respectivamente). Resultados similares se observaron con LPS (3,6 y 4,2 veces respecto al control, respectivamente) (Figura 26.A y 26.B, respectivamente).

A



B

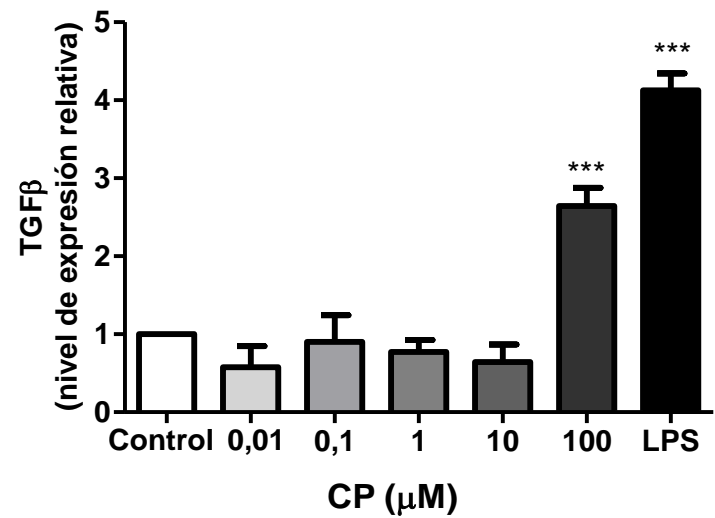


Figura 26: Expresión relativa de citoquinas en trofoblastos HTR-8/SVneo. Efecto del organofosforado CP (0,01-100 µM) en los niveles del ARNm para las citoquinas IL-6 (A) y TGF-β (B), determinado por qPCR luego de 24 h de exposición al insecticida y a LPS (10 µg/ml) como control positivo. La expresión del ARNm fue representada como valores relativos comparados al control (promedio ± desviación estándar) de tres experimentos independientes. *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001, diferencias significativas respecto al grupo control.

5.2 Toxicidad de insecticidas neonicotinoides en trofoblastos humanos

5.2.1 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la viabilidad celular de trofoblastos de primer y tercer trimestre

Los efectos de Neo sobre el embarazo, y en particular sobre la placenta y sus tipos celulares durante el proceso de gestación, son escasos. En este sentido, se estudiaron posibles alteraciones en la viabilidad celular inducido por el Neo acetamiprid, en el tipo celular específico de la placenta: el trofoblasto. Con el objetivo de comparar el posible efecto de Neo sobre la viabilidad de trofoblastos de distintos estadios del embarazo, se emplearon dos líneas celulares: trofoblastos HTR-8/SVneo representativos del primer trimestre de gestación (Graham y col., 1993) y trofoblastos JEG-3, representativos del tercer trimestre de gestación (Göhner y col., 2014; Vota y col., 2016). La viabilidad celular fue evaluada por la técnica de MTT, luego de la exposición a acetamiprid (Ace) o su formulación comercial (Ace CF), en concentraciones de 0,1 a 100 μM durante 4 y 24 h de exposición.

Luego de 4 h de exposición, no se observaron cambios significativos en la viabilidad de trofoblastos HTR-8/SVneo expuestos a Ace, mientras que la exposición a 10 y 100 μM de Ace CF redujo significativamente la viabilidad celular (Figura 27. A). Esta mayor toxicidad de Ace CF también fue evidenciada en el ensayo de exposición de 24 h. Se determinó una reducción significativa de la viabilidad solo con la mayor concentración ensayada de Ace mientras que con Ace CF se observó disminución de la viabilidad con todas las concentraciones ensayadas (Figura 27.B).

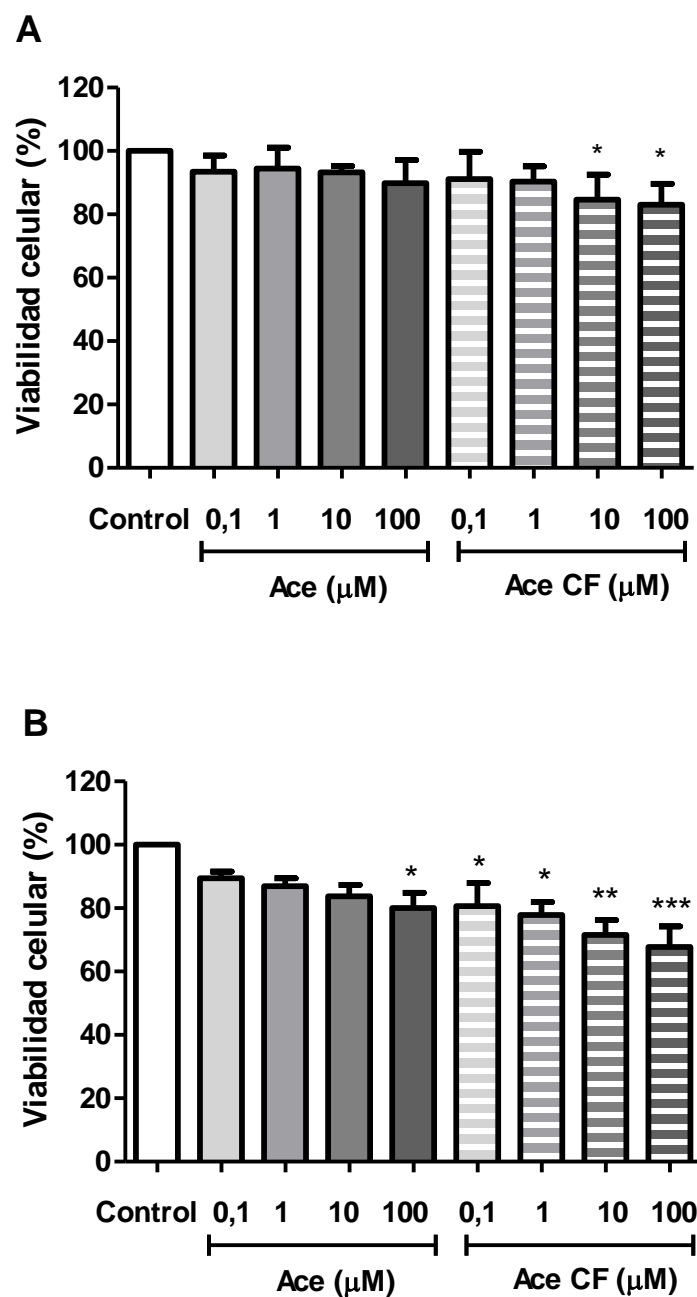


Figura 27: Viabilidad de trofoblastos HTR-8/SVneo. El efecto de acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) (0,1-100 μ M) en la viabilidad celular de trofoblastos HTR-8/SVneo fue determinada por medio del ensayo con MTT luego de 4 (A) y 24 (B) h de exposición al insecticida. La viabilidad celular está expresada como porcentaje promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y $p < 0,001$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

Adicionalmente, se evaluaron cambios en la viabilidad celular en la línea celular de tercer trimestre. Los trofoblastos JEG-3 mostraron tendencias similares en cuanto a la pérdida de viabilidad luego de la exposición con Ace y Ace CF. En la exposición a Ace por 4 h, no se hallaron cambios significativos en la viabilidad celular. Mientras que, a 4 h, la exposición a 1, 10 y 100 μM de Ace CF redujo significativamente la viabilidad celular (Figura 28.A). A diferencia de trofoblastos HTR-8/SVneo, la exposición por 24 h a Ace no resultó en cambios significativos en la viabilidad celular (Figura 28.B). Mientras que a 24 h se observó una reducción significativa de la viabilidad en todas las concentraciones ensayadas con Ace CF (Figura 28.B).

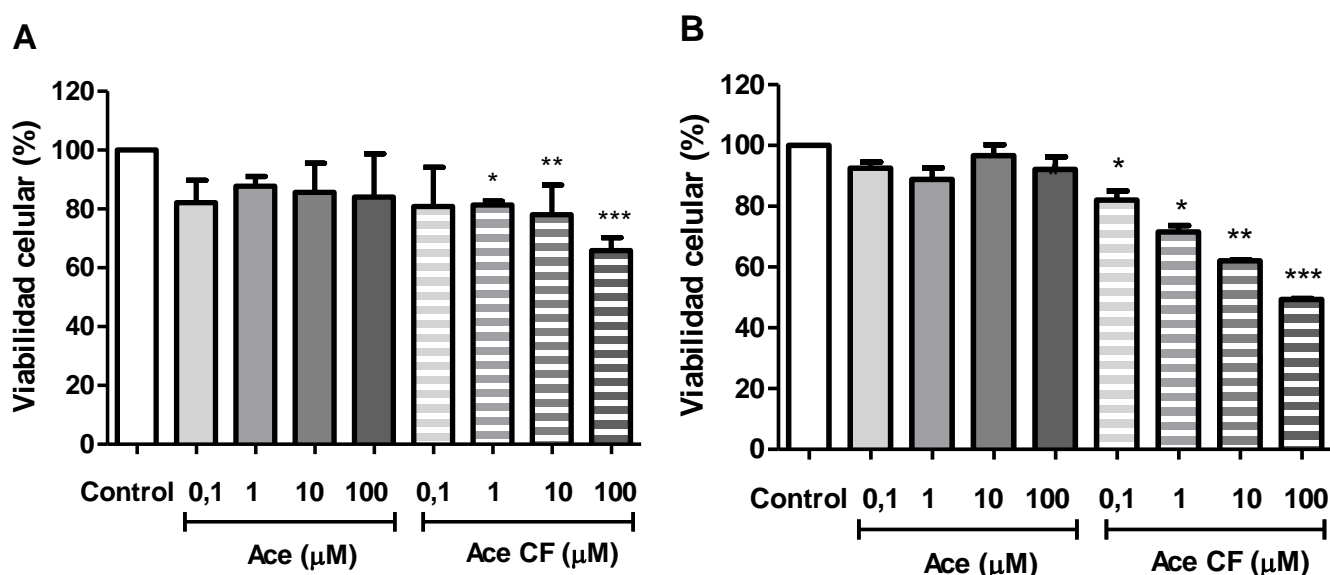


Figura 28: Viabilidad de trofoblastos JEG-3. El efecto de acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) (0,1-100 μM) en la viabilidad celular de trofoblastos JEG-3 fue determinada mediante el ensayo de MTT luego de 4 h (A) y 24 h (B) de exposición al insecticida. La viabilidad celular está expresada como porcentaje promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y $p < 0,001$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.2.2 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la producción de especies reactivas de oxígeno en trofoblastos de primer y tercer trimestre

Se estudió la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) luego de la exposición al neonicotinoide Ace y su formulado comercial Ace CF. Los niveles ERO se evaluaron, por un lado, mediante la técnica de reducción del NBT tanto en trofoblastos HTR-8/SVneo como en JEG-3. El ensayo de reducción de NBT permite determinar principalmente la presencia de anión superóxido, el cual es el precursor de otras ERO.

Los resultados indicaron que en trofoblastos HTR-8/SVneo la incubación por 4 h con Ace no indujo cambios significativos en los niveles de anión superóxido, mientras que la formulación comercial Ace CF aumento significativamente los niveles de esta especie reactiva a concentraciones de 10 y 100 μM , con respecto al control (Figura 29.A). A tiempos más prolongados de exposición (24 h) con los insecticidas, Ace no indujo cambios significativos en los niveles de anión superóxido mientras que la exposición a Ace CF resultó en aumento significativo a concentraciones de 10 y 100 μM , con respecto al control (Figura 29.B).

En cuanto a la producción de anión superóxido en la línea celular JEG-3, no se observaron diferencias significativas luego de la exposición durante 4 h con Ace, mientras Ace CF indujo aumentos en los niveles de anión superóxido en todas las condiciones ensayadas (Figura 30.A). Tendencias similares fueron observadas luego de 24 h de exposición con Ace y su formulación comercial (Figura 30.B).

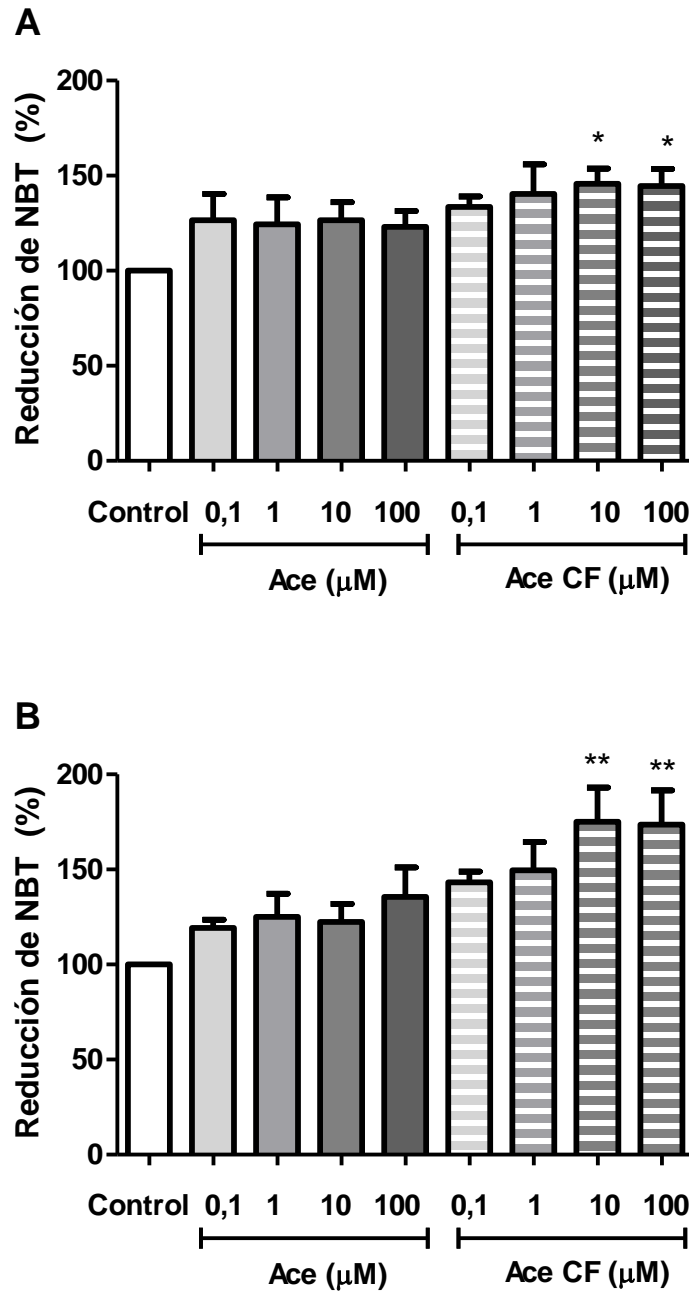


Figura 29: Niveles de especies reactivas de oxígeno en trofoblastos HTR-8/SVneo. El efecto del neonicotinoide acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) (0,1-100 µM) en la producción de especies reactivas de oxígeno fue evaluada mediante la técnica de reducción del NBT luego de 4 h (A) y 24 h (B) de exposición al insecticida. La reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) fue expresada como porcentaje (promedio ± desviación estándar) de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

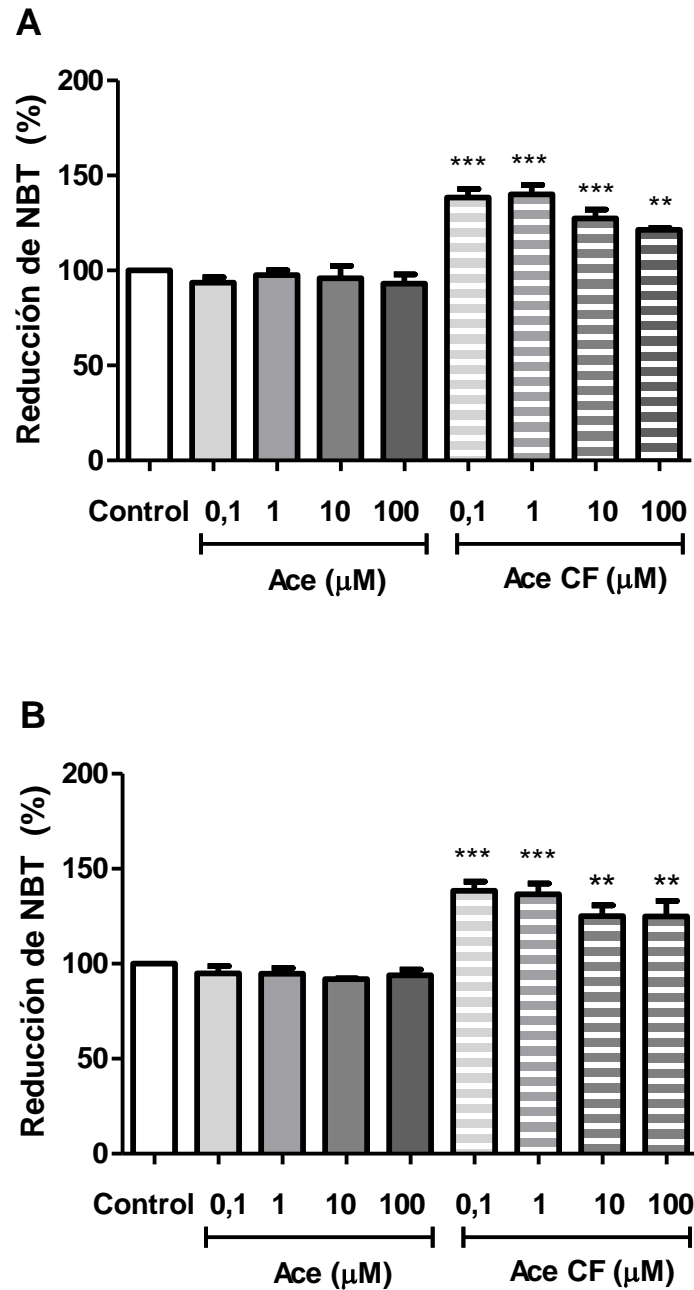


Figura 30: Niveles de especies reactivas de oxígeno en trofoblastos JEG-3. El efecto del neonicotinoide acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) (0,1-100 μM) en la producción de especies reactivas de oxígeno fue evaluada mediante la técnica de reducción del NBT luego de 4 h (A) y 24 h (B) de exposición al insecticida. La reducción del NBT fue expresada como porcentaje (promedio ± desviación estándar) de tres experimentos independientes. * $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

Adicionalmente, un rango más amplio de ERO (como el radical hidroxilo, peróxido de hidrogeno, entre otros) fue determinado por la técnica de

fluorescencia con la sonda DCFH-DA. Los resultados demostraron que solo la exposición de trofoblastos HTR-8/SVneo a Ace CF (10 y 100 μ M) por 4 h de incubación resultó en un aumento significativo de los niveles de ERO. Por otro lado, la exposición más prolongada de 24 h, a Ace 10 y 100 μ M aumentó los niveles de ERO. Sumado a esto, la exposición durante 24 h a Ace CF incrementó significativamente los niveles de ERO a todas las concentraciones ensayadas (Tabla 21).

En trofoblastos JEG-3, se evaluó la producción de ERO a 24 h de exposición a Ace y Ace C. No se observaron cambios significativos en los niveles de ERO cuando las células fueron expuestas a Ace, mientras que su formulación comercial Ace CF aumentó significativamente los niveles de estas especies en todas las concentraciones ensayadas (Tabla 21).

Tabla 21: Producción de especies reactivas de oxígeno en trofoblastos humanos luego de la exposición a acetamiprid y su formulación comercial

	HTR-8/SVneo				JEG-3	
	4 h		24 h		24 h	
	Ace	Ace CF	Ace	Ace CF	Ace	Ace CF
Control	100,00 \pm 16,08		100,00 \pm 5,43		100,00 \pm 8,62	
0,1 μ M	102,09 \pm 6,14	118,61 \pm 13,96	95,34 \pm 0,98	131,71 \pm 5,36***	104,2 \pm 11,53	218,5 \pm 35,34***
1 μ M	104,88 \pm 7,72	125,98 \pm 16,41	109,23 \pm 10,66	145,93 \pm 5,76***	111,9 \pm 5,77	214,5 \pm 40,96***
10 μ M	106,87 \pm 4,43	130,28 \pm 15,50*	115,06 \pm 7,64*	170,46 \pm 1,89***	110,0 \pm 19,23	226,9 \pm 51,10***
100 μ M	110,52 \pm 4,37	141,66 \pm 28,78**	115,45 \pm 2,45*	180,82 \pm 6,81***	105,5 \pm 14,14	177,0 \pm 42,26*

Los resultados están expresados como porcentaje de intensidades de fluorescencia relativa comparados contra el control (promedio \pm desviación estándar) de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y $p < 0,001$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

Considerando que en el periodo de gestación en el cual ocurre la exposición es determinante de los efectos tóxicos y del desarrollo del embarazo; y que el desarrollo embrionario y de la placenta durante el primer trimestre de gestación constituye una ventana crítica de vulnerabilidad (Coles 1994; Sánchez Capel 2012) y que la toxicidad celular de Ace se encuentra presente en los trofoblastos de primer trimestre (Figura 29.B, Tabla 21), es que se decidió continuar con la evaluación de los mecanismos la toxicidad de Neo en trofoblastos HTR-8/SVneo.

5.2.3 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la producción de especies reactivas de nitrógeno

Las especies reactivas de nitrógeno (ERN), junto a las ERO, son moléculas muy reactivas que en concentraciones controladas cumplen funciones biológicas. Sin embargo, un incremento marcado de las mismas puede estar acompañado de alteraciones en las funciones celulares como así también daño a biomoléculas, produciendo daño placentario (Wu y col., 2015). Una forma de medir la producción de ERN es a través de la determinación de óxido nítrico. De esta manera, se evaluó la producción de ERN mediante la técnica de Griess. Para ello, se expuso a la línea celular HTR-8/SVneo a Ace o Ace CF (0,1 a 100 μ M) durante 4 y 24 h. Los resultados no mostraron cambios significativos en los niveles de ERN en las condiciones ensayadas, en comparación con el control (Tabla 22).

Tabla 22: Producción de especies reactivas de nitrógeno en trofoblastos HTR-8/SVneo luego de la exposición a acetamiprid y su formulación comercial luego de 4 y 24 h de exposición.

	4 h		24 h	
	Ace	Ace CF	Ace	Ace CF
Control	1,250±0,202		1,485±0,229	
0,1 µM	1,477±0,557	1,091±0,186	1,250±0,261	1,508±0,381
1 µM	1,227±0,241	1,087±0,023	1,091±0,182	1,393±0,225
10 µM	1,424±0,210	1,304±0,172	1,273±0,413	1,350±0,098
100 µM	1,636±0,129	1,365±0,029	1,455±0,091	1,407±0,186

Los resultados están expresados como concentración de óxido nítrico (µM) (promedio ± desviación estándar) de tres experimentos independientes.

5.2.4 Estudio de la vía de muerte celular gatillada por el neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial

La apoptosis es tipo de muerte celular programada cuya función es regular y eliminar células que no deben permanecer en el organismo ya sea por que estén dañadas, infectadas o sean redundantes. Es por ello que la apoptosis es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, para el desarrollo embrionario y para el correcto funcionamiento del sistema inmune. Se conocen dos vías que median la activación de este proceso fisiológico: la vía extrínseca de los receptores de muerte, activada por la unión de ligandos extracelulares a receptores de muerte de la membrana plasmática; y la vía intrínseca o mitocondrial, que es desencadenada principalmente como respuesta a señales de estrés celular. Las proteínas de la familia Bcl-2 tienen un importante papel en la regulación de la vía intrínseca. Dentro de este grupo de proteínas encontramos una gran variedad de proteínas vinculadas a funciones pro-apoptóticas y anti-apoptóticas (Ramirez-Garcia y col., 2014).

Con el objetivo de indagar si la apoptosis era una posible vía de muerte vinculada a la exposición con Neo en trofoblastos HTR-8/SVneo, se estudió el nivel de

expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la relación entre estas (Bax/Bcl-2). El estudio de los niveles de las proteínas Bax/Bcl-2 se realizó por western blot luego de la exposición de las células a Ace o Ace CF (0, 0,1 1, 10 y 100 μM) por 24 h. Se determinó que Ace y Ace CF alteraron significativamente la relación Bax/Bcl-2 en este modelo. Ace incrementó la relación Bax/Bcl-2 en las concentraciones 1, 10 y 100 μM (Figura 31.A) mientras que tras la exposición con Ace CF se observó un aumento de esta relación en todas las concentraciones ensayadas (Figura 31.B).

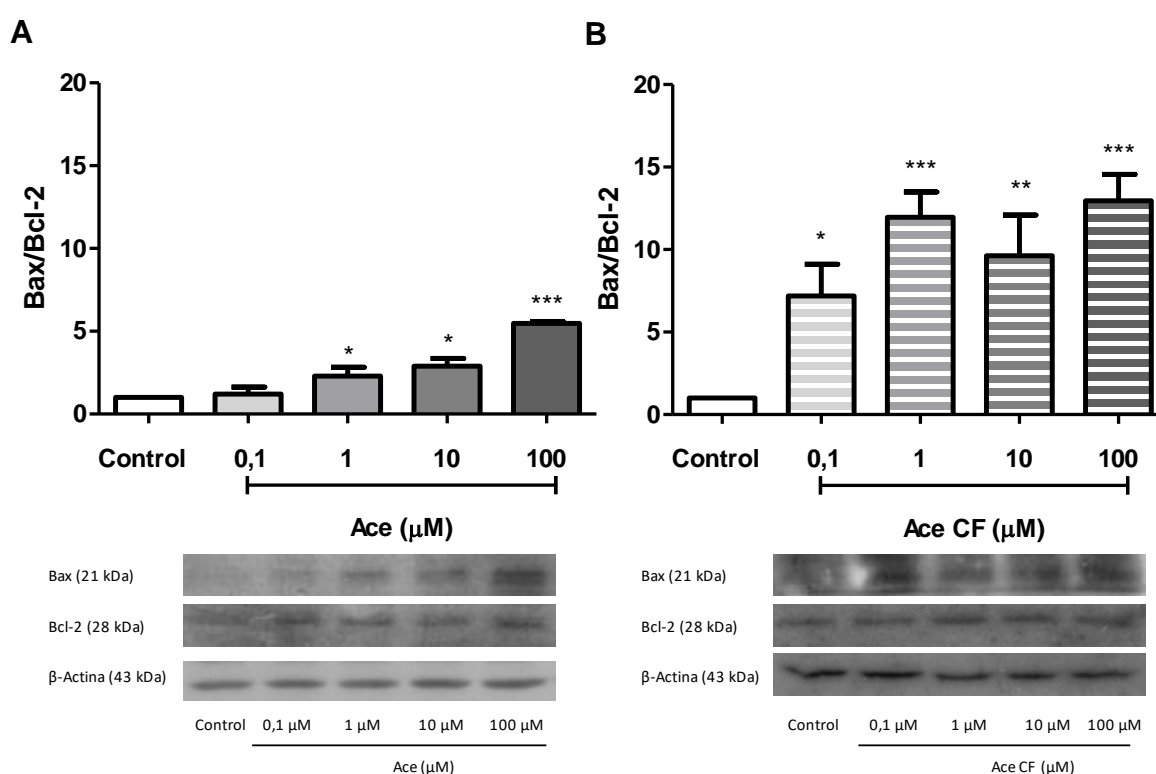


Figura 31: Niveles de expresión proteica de Bax y Bcl-2. La expresión de Bax y Bcl-2 fue evaluada en trofoblastos HTR-8/SVneo luego de la exposición por 24 h al neonicotinoide acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) (0,1-100 μM), por medio de western blot (A y B respectivamente). La intensidad relativa de las bandas fue estimada por estandarización con β -actina, el análisis de la densitometría se realizó con el software Gel Pro3 Analyzer 3.2 program. Los resultados están expresados como media \pm desviación estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.2.5 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la migración celular

La migración celular es un proceso importante en el desarrollo y mantenimiento del organismo y en el embarazo representa, junto a la invasión, un proceso clave para la correcta implantación del embrión. Se evaluó la migración celular de trofoblastos HTR-8/SVneo mediante el ensayo de herida (*wound healing*), luego de la exposición durante 24 h a Ace y Ace CF (Figura 32.A y 32.B). No se observaron cambios significativos en la capacidad migratoria de la línea celular en las condiciones ensayadas (Figura 33).

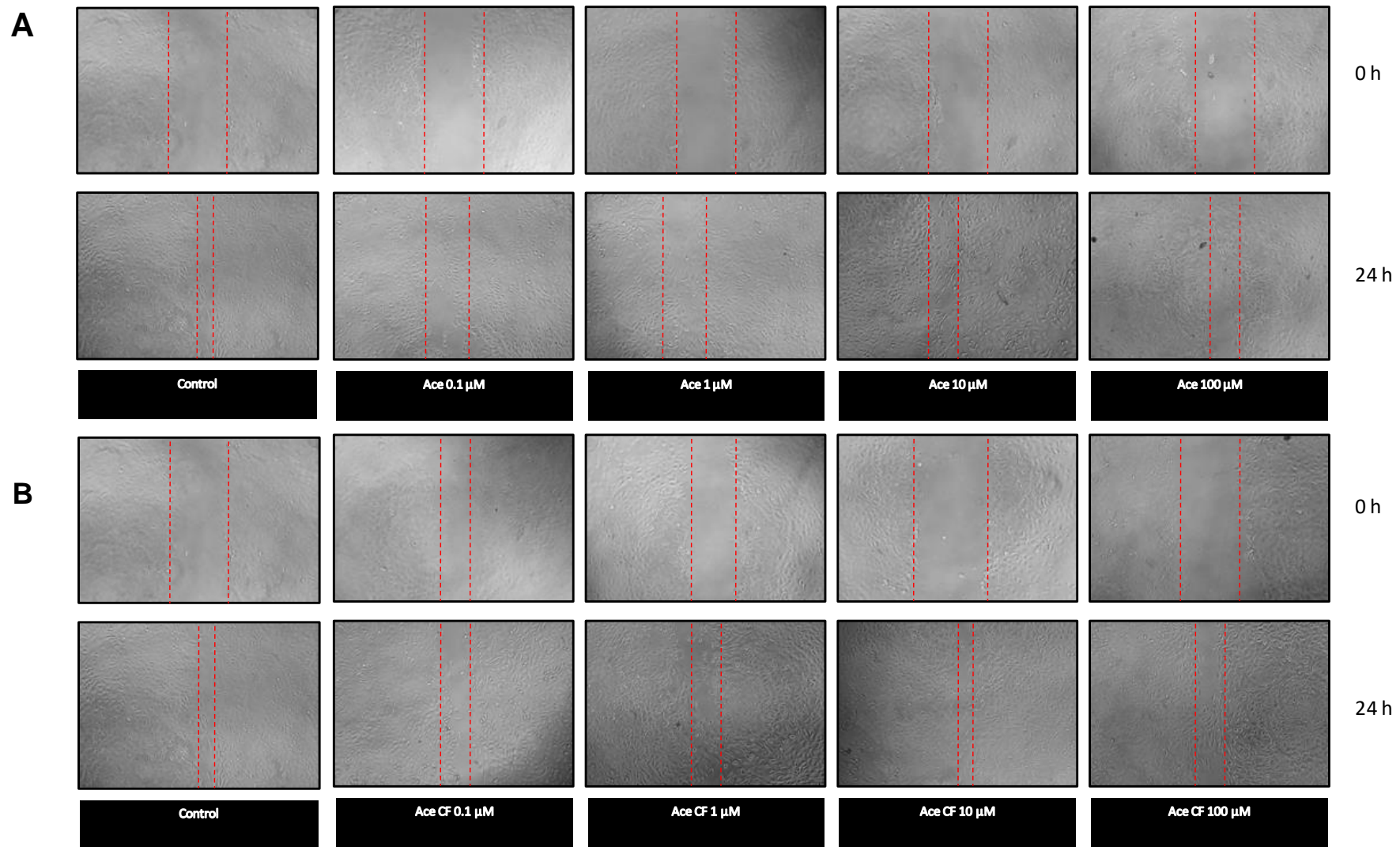


Figura 32: Migración celular de trofoblastos HTR-8/SVneo. La capacidad de migración de la línea celular HTR-8/SVneo fue evaluada mediante ensayo de herida luego de 24 h de exposición al insecticida Ace (A) y Ace CF (B), imágenes representativas de campo claro (10X).

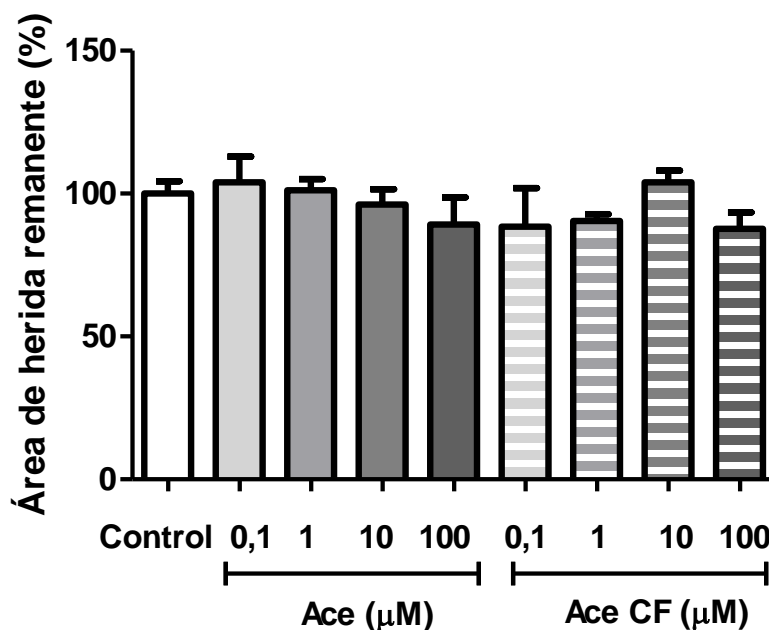


Figura 33: Migración celular de trofoblastos HTR-8/SVneo. La capacidad de migración de la línea celular HTR-8/SVneo fue evaluada mediante ensayo de herida luego de 24 h de exposición al insecticida Ace y Ace CF. Los resultados se expresaron como porcentaje de área de herida remanente (promedio \pm desviación estándar) de tres experimentos independientes.

5.2.6 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la expresión receptor nicotínico de acetilcolina

El blanco primario de acción de Neo son los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Bass y Field 2018). Por ello se estudió el efecto de Neo en la expresión de nAChR en trofoblastos HTR-8/SVneo. Se procedió a evaluar la eficiencia de cebadores específicos para $\alpha 7$ nAChR, empleándose el gen YWHAZ como gen estándar interno (Figura 34). La Tabla 23 resume la eficiencia de cada par de cebadores y los coeficientes de determinación para cada ajuste lineal.

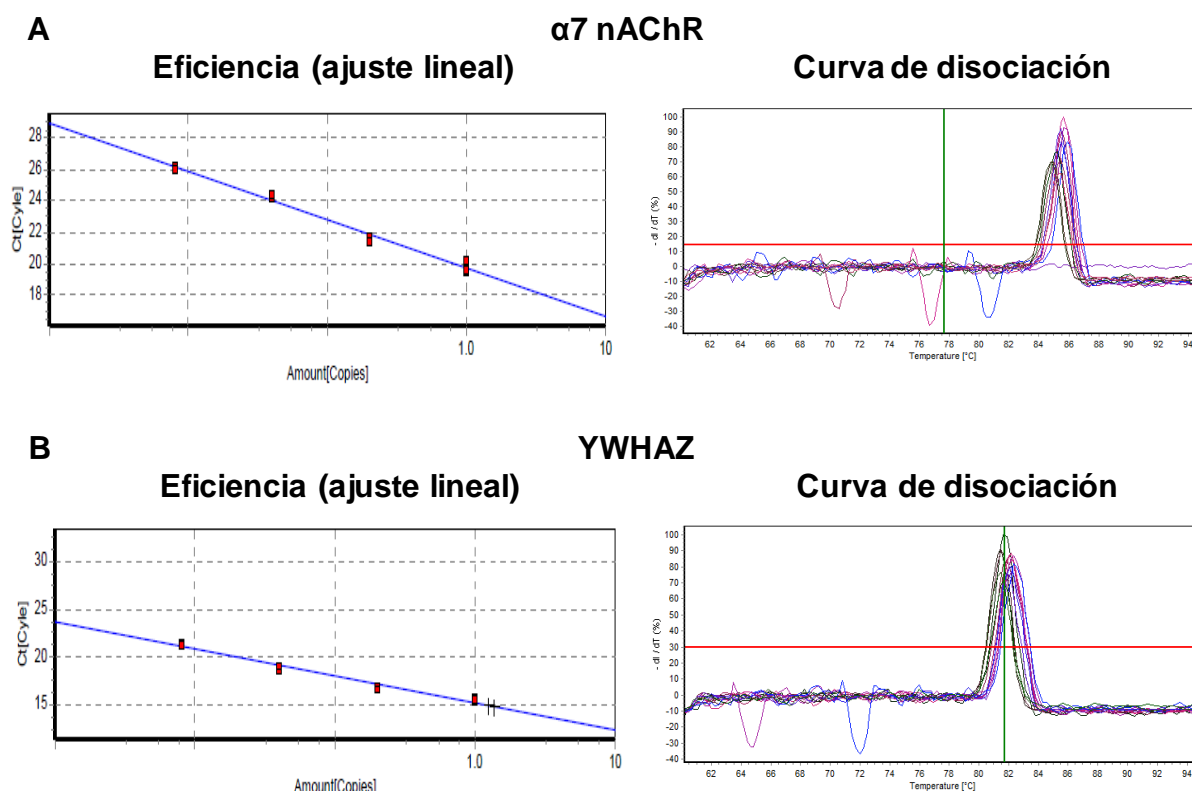


Figura 34: Puesta a punto de cebadores específicos de $\alpha 7$ nAChR. Evaluación eficiencia y especificidad de los cebadores específicos en cuanto a ajustes lineales (izquierda) y curvas de disociación (derecha) para $\alpha 7$ nAChR (A) y gen estándar interno YWHAZ (B).

Tabla 23: Eficiencias y coeficientes de determinación (R^2) de cebadores específicos para $\alpha 7$ nAChR e YWHAZ.

Gen	Eficiencia	R^2
$\alpha 7$ nAChR	1,07	0,97
YWHAZ	1,20	0,98

La expresión del transcripto de la subunidad $\alpha 7$ de los receptores nicotínicos de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) fue analizado luego de la exposición por 24 hs con el principio activo Ace y con su formulación comercial (Ace CF). Estos resultados indican que los trofoblastos HTR-8/SVneo expresan la subunidad $\alpha 7$ nAChR, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión en las condiciones ensayadas (Figura 35).

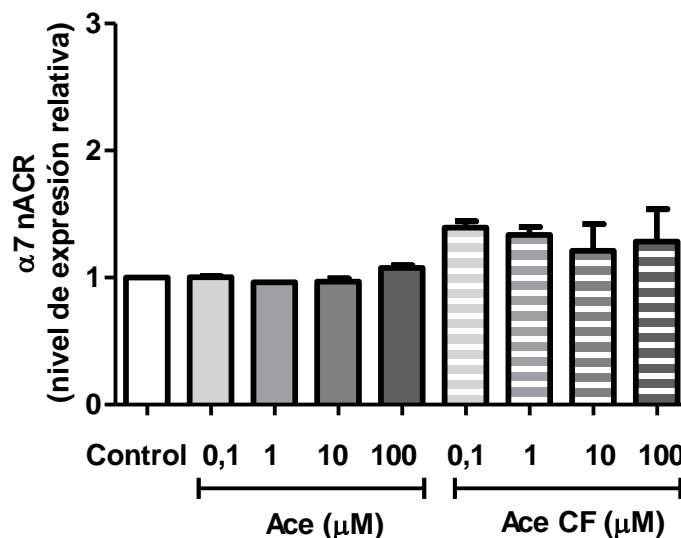


Figura 35: Expresión relativa del transcrito para $\alpha 7$ nAChR en trofoblastos HTR-8/SVneo: el efecto del neonicotinoide acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) (0,1-100 μ M) en los niveles del transcrito para la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) fue determinado por qPCR luego de 24 h de exposición al insecticida. La expresión del ARNm fue expresada como valores relativos comparados al control (promedio \pm desviación estándar) de dos experimentos independientes.

5.2.7 Efecto del neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial en la defensa antioxidante celular.

El desbalance oxidativo puede ocurrir como resultado del aumento de especies reactivas, disminución de las moléculas enzimas antioxidantes y moléculas encargadas de eliminar especies reactivas, o una combinación de ambas (Sies 2015). Se evaluó la homeostasis *redox* mediante la determinación de la actividad de las enzimas vinculadas a la defensa antioxidante: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión S-transferasa (GST), además se determinó el contenido de glutatión (GSH); luego de la exposición a Ace y su formulado comercial Ace CF.

5.2.7.1 Actividad de superóxido dismutasa

La actividad de SOD en trofoblastos HTR-8/SVneo se determinó indirectamente a través de la reducción de NBT (Bustos y col., 2016) en las células expuestas 0,1-100 μ M de Ace y Ace CF por 4 h y 24 h. El estudio de la actividad de la

enzima SOD indicó que Ace no modificó significativamente la actividad de esta enzima en las condiciones y tiempos ensayados. Por el contrario, el formulado comercial Ace CF a altas concentraciones (10 y 100 μM) redujo significativamente la actividad tanto a 4 h como a 24 h de exposición (Figura 36.A y 36.B).

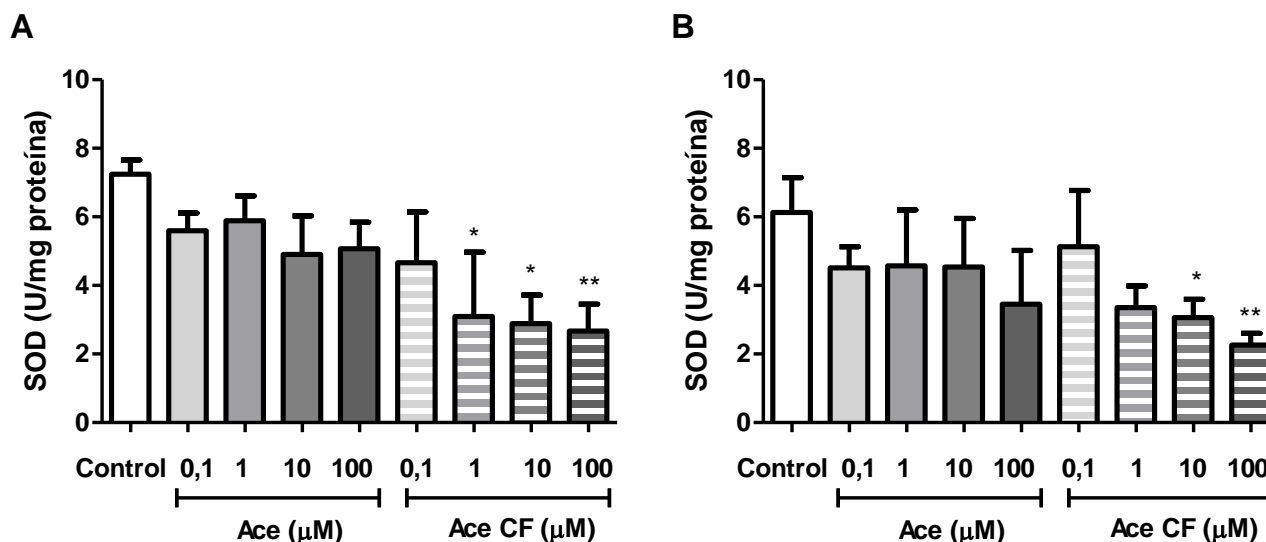


Figura 36: Actividad de la enzima superóxido dismutasa en trofoblastos HTR-8/SVneo. La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) fue determinada luego de la exposición al insecticida acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) (0,1-100 μM) por 4 h (A) y 24 h (B) de exposición. La actividad SOD fue expresada como U/mg de proteína. Los gráficos muestran valores promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.2.7.2 Actividad de catalasa

La actividad de CAT en trofoblastos HTR-8/SVneo se determinó mediante el registro del decaimiento de la absorbancia del peróxido de hidrógeno (Rivero-Osimani y col. 2016), en las células expuestas 0,1-100 μM de Ace y Ace CF por 4 h y 24 h. Los resultados demuestran que la actividad de la enzima CAT disminuyó luego de 4 h de exposición a la concentración más alta de Ace empleada, mientras que, a tiempos más prolongados, la actividad se redujo significativamente a 10 y 100 μM de Ace. En cuanto al formulado Ace CF, se observó una disminución de la actividad de CAT a 10 y 100 μM luego de 4 h de

exposición, mientras que en tiempos más prolongados la actividad disminuyó significativamente en concentraciones 1, 10 y 100 μM del formulado Ace CF (Figura 37.A y 37.B).

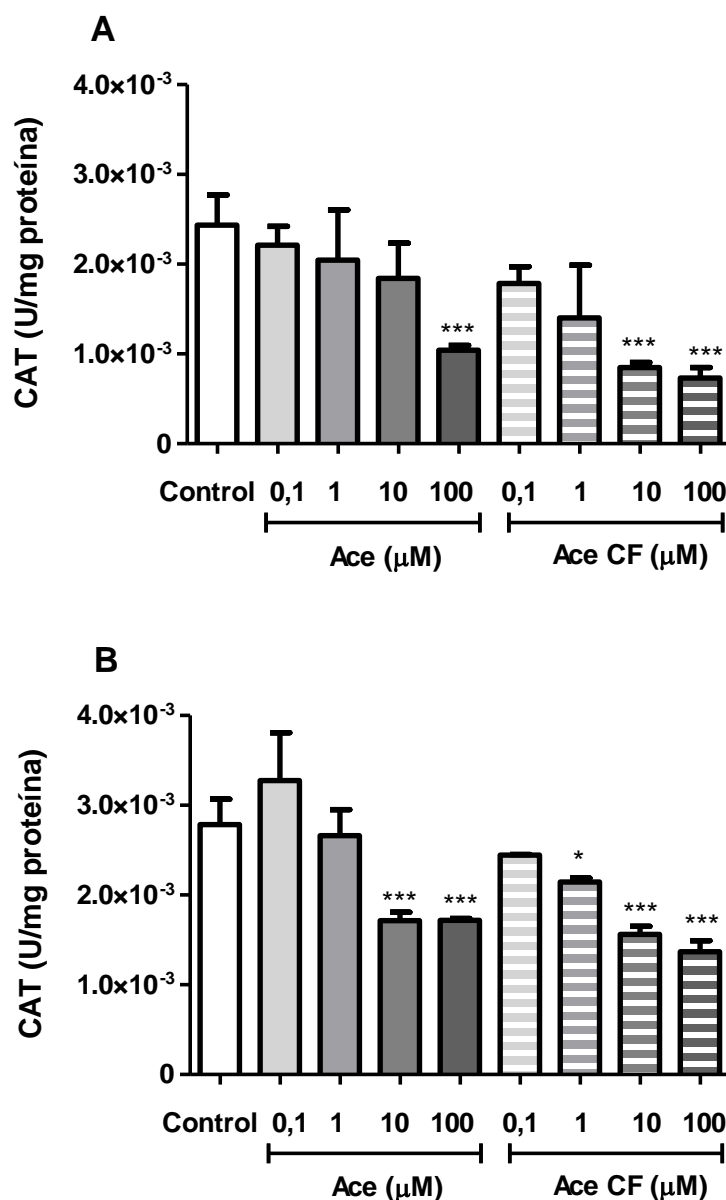


Figura 37: Actividad de la enzima catalasa en trofoblastos HTR-8/SVneo. La actividad de la enzima catalasa (CAT) fue determinada luego de la exposición al insecticida acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) (0,1-100 μM) por 4 h (A) y 24 h (B) de exposición. La actividad CAT fue expresada como U/mg de proteína. Los gráficos muestran valores promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.2.7.3 Actividad de glutatión S-transferasa

La actividad de GST en trofoblastos HTR-8/SVneo fue determinada espectrofotométricamente, como se ha descrito previamente (Rivero Osimani y col., 2016). El análisis de la actividad de GST indicó que el principio activo Ace no fue capaz de alterar la actividad de esta enzima en todas las condiciones y tiempos ensayados. En contraste, el formulado comercial Ace CF disminuyó significativamente la actividad de GST a concentraciones de 1, 10 y 100 μM , en la condición más prolongada de cultivo de 24 h (Figura 38.A y 38.B).

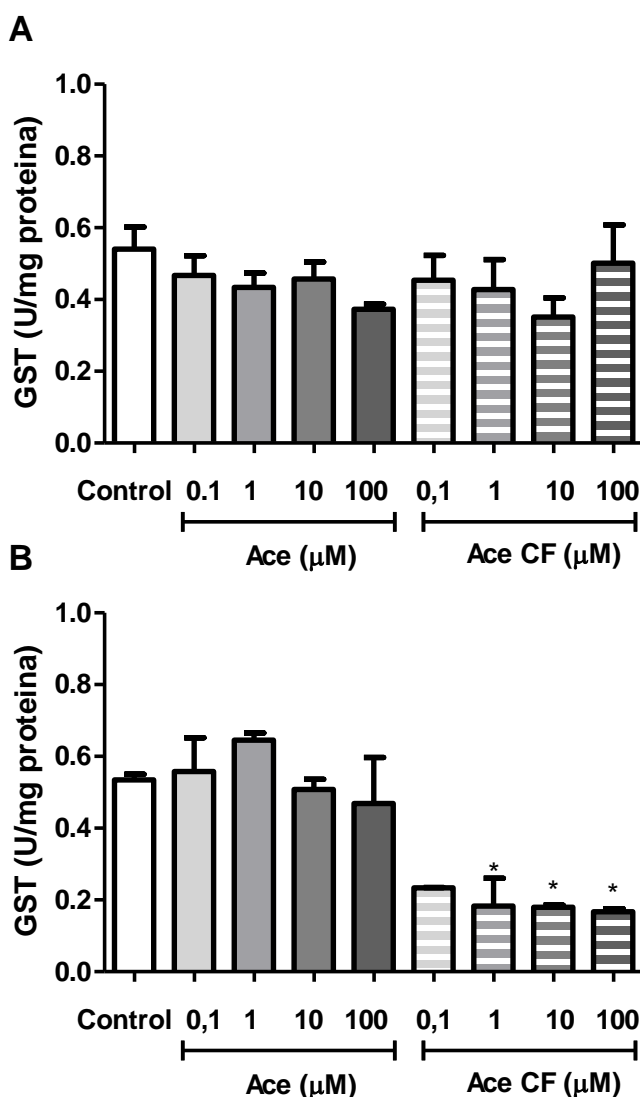


Figura 38: Actividad de la enzima glutatión S-transferasa en trofoblastos HTR-8/SVneo. La actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST) fue determinada luego de la exposición al insecticida acetamidrid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) (0,1-100 μM) por 4 h (A) y 24 h (B) de exposición. La actividad GST fue expresada como U/mg de proteína. Los gráficos muestran valores promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.2.7.4 Contenido de glutatión reducido

El nivel de glutatión reducido (GSH) en trofoblastos HTR-8/SVneo fue determinado colorimétricamente con el reactivo de Ellman (1959), en las células expuestas 0,1-100 μM de Ace y Ace CF por 4 h y 24 h. Los resultados demuestran que el contenido de GSH luego de la exposición a Ace y Ace CF no mostró cambios significativos en comparación al control en todas las condiciones estudiadas (Figuras 39.A y 39.B).

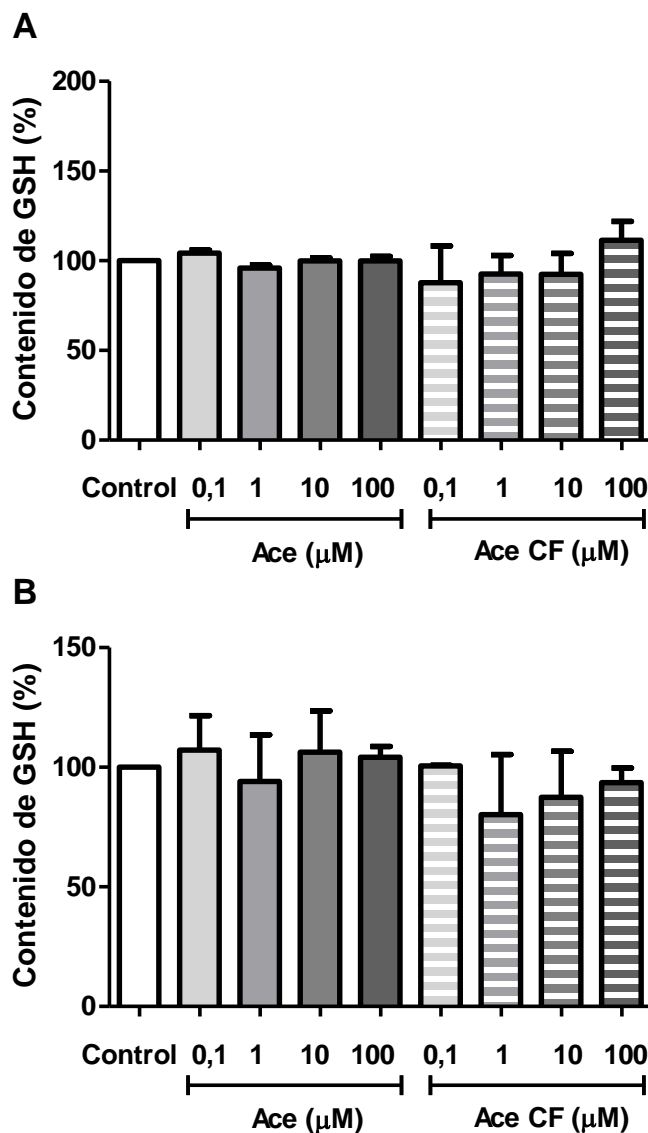


Figura 39: Contenido de glutatión reducido en trofoblastos HTR-8/SVneo. El contenido de glutatión reducido (GSH) fue determinado luego de la exposición al insecticida acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) (0,1-100 μM) por 4 h (A) y 24 h (B) de exposición. El contenido de GSH fue expresado como porcentaje (promedio \pm desviación estándar) de tres experimentos independientes comparado contra el control.

5.2.8 Daño oxidativo a biomacromoléculas inducido por el neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial

Con el objetivo de determinar si el estrés oxidativo inducido por Ace y Ace CF impacta en las macromoléculas celulares, se determinaron en las células tratadas con Ace y Ace CF, distintos biomarcadores de daño oxidativo: productos avanzados de oxidación proteica (PAOP), peroxidación de lípidos (TBARS) y daño en el ADN (ensayo cometa). El efecto directo o indirecto de especies reactivas, llevan a la producción de derivados carbonilos y PAOP. Estos últimos suelen ser empleados como marcadores para establecer daño oxidativo ya que son más estables, se forman tempranamente y se mantienen por más tiempo en circulación en comparación con los peróxidos lipídicos (Dalle-Donne y col., 2003a). En relación a la peroxidación de lípidos, se conoce que este proceso genera especies como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal. Particularmente, el MDA es uno de los productos mayoritarios de esta reacción en cadena y es capaz de reaccionar con ácido tiobarbitúrico (TBA), dando lugar a un aducto coloreado que puede medirse fácilmente por medio de técnicas espectrométricas (Bustos y col., 2016). Dentro de estos biomarcadores de daño oxidativo, el ensayo cometa es un marcador indirecto de daño cromosómico que detecta un amplio espectro de daño al ADN y está validado para estudios regulatorios de genotoxicidad (Tice y col., 2000; Muniz y col., 2008; Simoniello y col., 2008). El ensayo cometa es una prueba citogenética molecular cuya sensibilidad permite detectar pequeños daños genéticos (como roturas de cadena, sitios lábiles al álcali, entre otros) que se presentan como daño basal en células normales o como resultado de la exposición a xenobióticos (Lodoño-Velasco y col., 2019).

5.2.8.1 Oxidación de proteínas

Los niveles de proteínas oxidadas se determinaron mediante la técnica de productos avanzados de oxidación proteica (PAOP) en células HTR-8/SVneo expuestas 0,1-100 μM de Ace y Ace CF por 4 h y 24 h. Los resultados demuestran que la incubación de las células por 4 h con Ace no indujo cambios significativos en PAOP, mientras que las concentraciones de 10 y 100 μM del formulado comercial Ace CF incrementaron significativamente la oxidación de

proteínas (Figura 40.A). La incubación a tiempos más prolongados (24 h) resultó en un aumento significativo en los niveles de PAOP en 100 μM de Ace y en todas las concentraciones ensayadas con Ace CF (Figura 40.B).

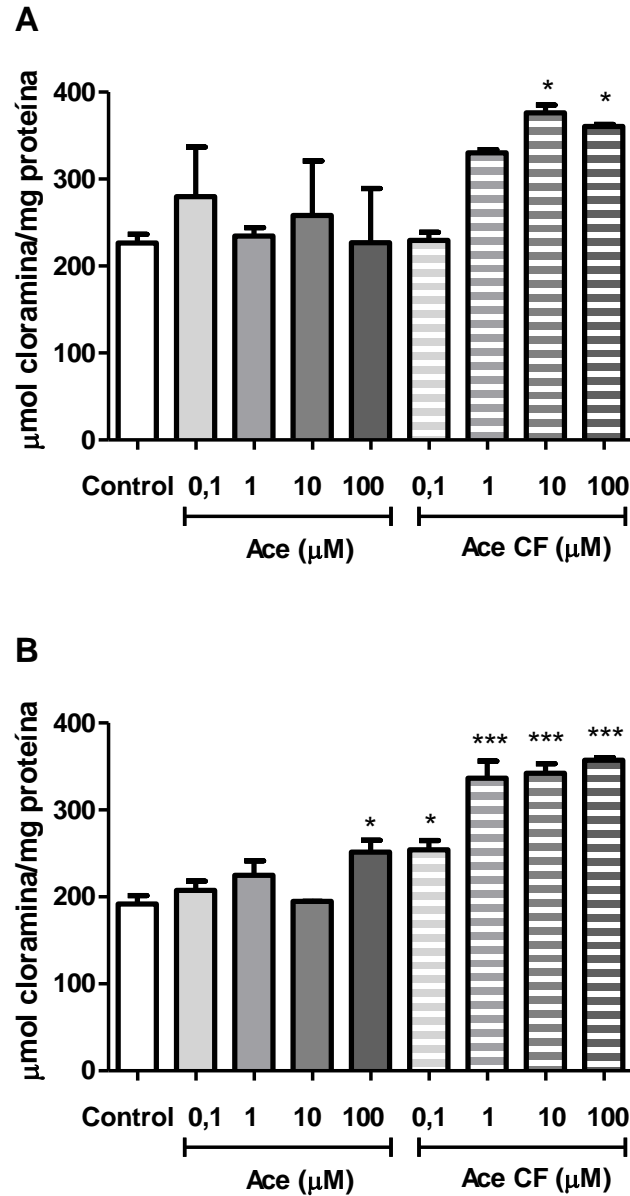


Figura 40: Daño oxidativo a proteínas en trofoblastos HTR-8/SVneo. El daño oxidativo a proteínas fue determinado por el método Productos Avanzados de Oxidación Proteica (PAOP), luego de la exposición a acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) luego de 4 h (A) y 24 h (B) de exposición al insecticida. Se determinaron los PAOP y los resultados fueron expresados como μM de cloramina/mg de proteína (promedio \pm desviación estándar) de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

5.2.8.2 Oxidación de lípidos

Los niveles de lípidos oxidados se estudiaron mediante la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); en las células expuestas 0,1-100 μM de Ace y Ace CF por 4 h y 24 h. Los resultados demuestran que la exposición a Ace por 4 y 24 h no indujo aumentos significativos en los niveles de MDA celulares (Figura 41). En contraste la exposición de los trofoblastos a Ace CF por 4 h incrementó significativamente los niveles de MDA a altas concentraciones (10 y 100 μM) (Figura 41.A). Asimismo, la exposición de las células a Ace CF por 24 h, resultó en un aumento significativo en los niveles de MDA en las concentraciones de 1, 10 y 100 μM (Figura 41.B).

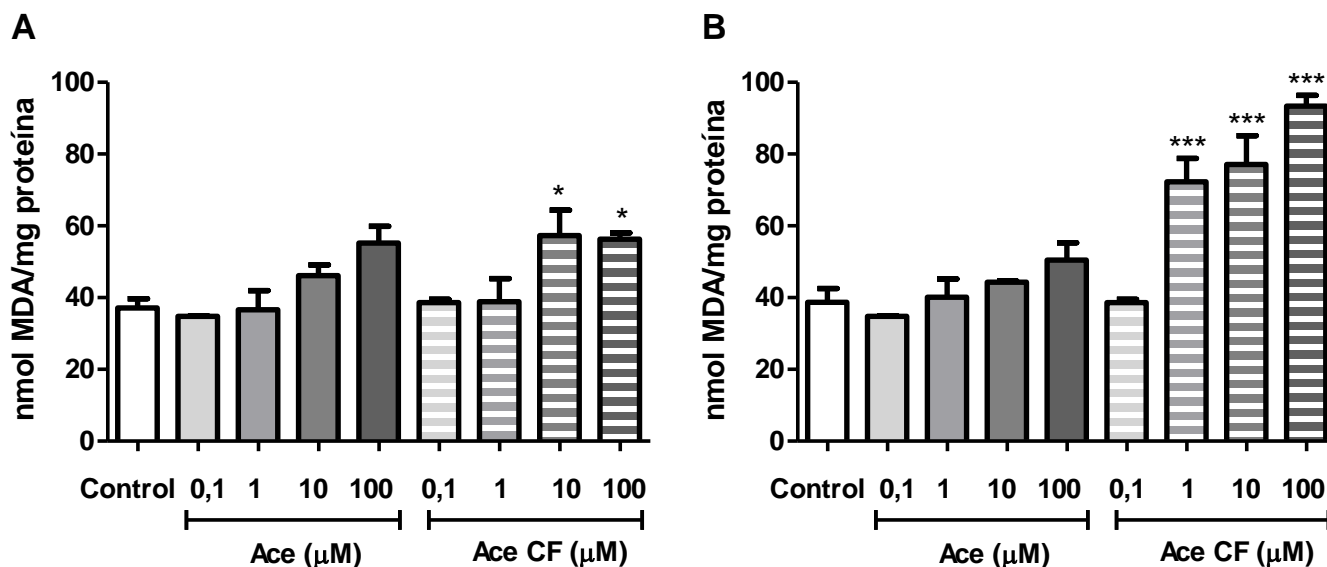


Figura 41: Daño oxidativo a lípidos en trofoblastos HTR-8/SVneo. El daño oxidativo a lípidos fue determinado por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), luego de la exposición a acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) luego de 4 h (A) y 24 h (B) de incubación. Se determinaron las TBARS y los resultados fueron expresados como nM de MDA/mg de proteína (promedio \pm desviación estándar) de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ diferencias significativa con respecto al grupo control.

5.2.8.3 Daño en el ADN

La posible presencia de daño en el DNA fue investigada mediante el ensayo de cometa alcalino. Las células HTR-8/SVneo fueron tratadas con Ace y Ace CF en las concentraciones previamente establecidas por 4 y 24 h. El tratamiento con Ace no mostró cambios significativos en el índice de daño genotóxico en las condiciones ensayadas (Figuras 42.A y 42.B). Asimismo, el índice de daño genotóxico fue significativamente mayor en las células tratadas con Ace CF 0,1, 1, 10 y 100 μ M en comparación contra el control, tanto en exposiciones de 4 h como de 24 h (Figuras 42.A y 42.B). En la Figura 43 se muestran Imágenes representativas de cada condición luego de 24 hs de exposición.

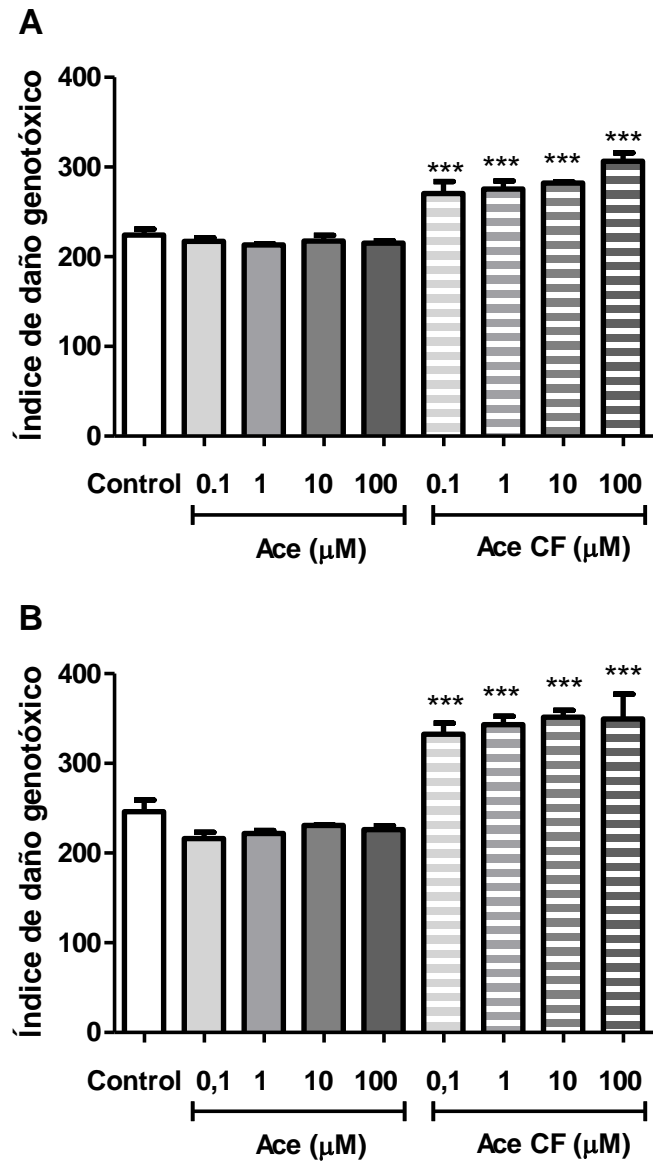


Figura 42: Daño en ADN en trofoblastos HTR-8/SVneo. El daño en el ADN fue determinado luego de la exposición a acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) luego de 4 h (A) y 24 h (B) h de incubación. Se determinó el índice de daño genotóxico por medio del ensayo cometa alcalino. Los resultados fueron expresados promedio \pm desviación estándar, ** $p < 0,001$ diferencias significativas con respecto al grupo control.

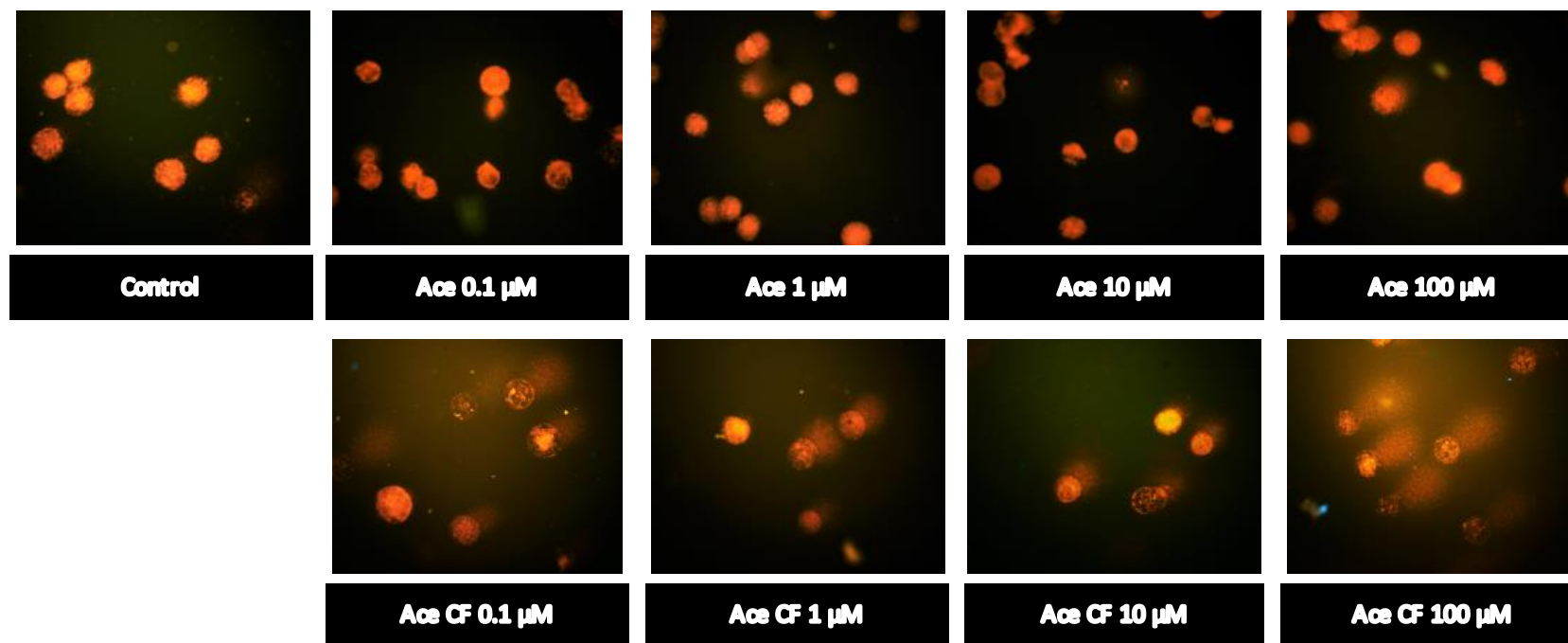


Figura 43: Daño en ADN en trofoblastos HTR-8/SVneo. El daño en el ADN fue determinado luego de la exposición a acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) luego de 24 h de incubación. La figura muestra imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de cometas en trofoblastos HTR-8/SVneo luego de electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión al 1%.

5.2.9 Efecto de pre incubación con antioxidantes

5.2.9.1 Efecto del antioxidante N-acetil L-cisteína en la prevención de la muerte celular inducida por el neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial

Para estudiar si el estrés oxidativo observado estaba asociado con la muerte celular inducida por el tratamiento con Neo, los trofoblastos fueron pre-incubados con el antioxidante de amplio espectro N-acetil L-cisteína (NAC, 2 mM) previo a la exposición con Ace y Ace CF. Se determinó la viabilidad celular con el ensayo de MTT en las células expuestas al principio activo y el formulado comercial y a las células previamente tratadas con NAC y posteriormente expuestas a Neo. Los resultados demuestran que el pre-tratamiento con NAC previno significativamente la pérdida de la viabilidad celular a 10 y 100 μM (Tabla 24).

Tabla 24: Efecto del pre tratamiento con el anitoxidante N-acetil L-cisteína (NAC) en la viabilidad celular en la exposición a acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) por 24 h.

		NAC (2mM)	
Control		100,00 \pm 9,47	100,00 \pm 6,05
Ace (μM)	0,1	94,66 \pm 13,55	107,20 \pm 13,37
	1	92,82 \pm 11,68	94,66 \pm 8,67
	10	86,46 \pm 6,32	102,00 \pm 7,57
	100	79,26 \pm 5,04**	98,66 \pm 6,15 ^a
Ace CF (μM)	0,1	62,42 \pm 10,14***	99,36 \pm 10,42 ^b
	1	70,53 \pm 5,78***	98,20 \pm 7,29 ^b
	10	67,60 \pm 16,48***	99,55 \pm 7,21 ^b
	100	56,92 \pm 15,84***	98,12 \pm 5,31 ^b

Los resultados fueron expresados como promedio \pm desviación estándar, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ representan diferencias estadísticas comparadas contra el control de tratamientos. ^a $p < 0,05$ y ^b $p < 0,01$, representan diferencias significativas entre cada tratamiento con el insecticida vs insecticida + NAC, en las condiciones en las que previamente se observaron reducción en la viabilidad.

5.2.9.2. Efecto del antioxidante N-acetil l-cisteína en la prevención del daño celular a biomacromoléculas inducido por el neonicotinoide acetamiprid y su formulado comercial

Para estudiar si el estrés oxidativo gatillado por Neo estaba efectivamente asociado con el daño a biomacromoléculas observado, los trofoblastos fueron incubados con el antioxidante de amplio espectro NAC (2 mM) previo a la exposición con Neo. En las condiciones en las que se observaron daños a biomoléculas, se determinó comparativamente los niveles de proteínas oxidadas (PAOP), lipoperóxidos (TBARS), y daño genotóxico (ensayo cometa), en las células expuestas al principio activo y el formulado comercial y en las células previamente tratadas con NAC y posteriormente expuestas a Neo. Particularmente, para Ace se evaluó el efecto en la viabilidad de células HTR-8/SVneo y la oxidación de proteínas, ya que es donde se observaron alteraciones significativas (Figuras 27.B y 40.B, respectivamente); mientras que para Ace CF se evaluó el efecto del tratamiento con NAC tanto en la alteración de la viabilidad celular, oxidación de proteínas y lípidos y daño en ADN (Figuras 27.B, 40.B, 41.B y 42.B, respectivamente). Los resultados demostraron que el tratamiento previo con NAC previno significativamente la oxidación de proteínas comparado con las células tratadas solamente con 100 μ M de Ace (Tabla 25). La peroxidación lipídica y el daño en el ADN no fueron estudiados en células pre-tratadas NAC, ya que como se indicó previamente la exposición de trofoblastos con Ace no muestra cambios significativos en estos parámetros celulares.

Por otro lado, el pre-tratamiento con NAC evitó el daño en el ADN comparado con a las células expuestas solamente con Ace CF, en todas las concentraciones ensayadas. En el caso de los niveles de oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos, el pre-tratamiento con NAC no fue suficiente para prevenir en su totalidad el daño observado comparado contra los valores de los controles (Tabla 25). Una reducción parcial significativa en los niveles de TBARS fue observada en la condición Ace CF 100 μ M + NAC comparada con Ace CF 100 μ M.

Tabla 25: Efecto del pre tratamiento con el antioxidante N-acetil L-cisteína (NAC) en el daño a biomoléculas inducido por la exposición a acetamiprid (Ace) y su formulación comercial (Ace CF) por 24 h.

		PAOP (μmol cloramina/mg proteína)		TBARS (nmol MDA/mg proteína)		Daño en ADN (Índice de daño genotóxico)	
		NAC (2mM)		NAC (2mM)		NAC (2mM)	
Control		197,59 \pm 36,13	205,61 \pm 39,03	35,74 \pm 0,95	38,35 \pm 7,84	253,00 \pm 2,83	223,00 \pm 1,41
Ace (μM)	0,1	180,30 \pm 29,77	174,63 \pm 11,39	34,77 \pm 0,29	ND	216,00 \pm 12,49	ND
	1	209,78 \pm 2,58	193,48 \pm 28,34	40,14 \pm 7,17	ND	221,67 \pm 6,11	ND
	10	195,09 \pm 8,39	218,47 \pm 10,43	44,28 \pm 0,58	ND	230,67 \pm 1,53	ND
	100	265,19 \pm 0,86 [*]	171,06 \pm 6,68 ^a	50,48 \pm 8,27	ND	226,33 \pm 7,23	ND
Ace CF (μM)	0,1	315,83 \pm 71,82 [*]	262,80 \pm 40,33	38,63 \pm 1,58	49,27 \pm 2,68	332,67 \pm 20,79 ^{**}	227,50 \pm 2,12 ^b
	1	340,71 \pm 48,63 ^{**}	264,60 \pm 26,56	72,72 \pm 9,22 ^{***}	67,52 \pm 13,47	343,00 \pm 16,64 ^{***}	218,00 \pm 2,82 ^b
	10	304,57 \pm 46,06 [*]	282,90 \pm 22,56	77,15 \pm 11,28 ^{***}	61,62 \pm 0,29	351,33 \pm 13,32 ^{***}	222,50 \pm 4,95 ^b
	100	339,04 \pm 20,99 ^{**}	294,40 \pm 16,10	93,35 \pm 5,19 ^{***}	62,27 \pm 4,61 ^b	348,50 \pm 38,89 ^{**}	217,00 \pm 1,41 ^b

Los resultados fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. ^{*}p < 0,05, ^{**}p < 0,01 y ^{***}p < 0,001 representan diferencias estadísticas comparadas contra el control de tratamientos, mientras que ^ap < 0,05 y ^bp < 0,01, representan diferencias significativas entre cada tratamiento con el insecticida vs insecticida + NAC. ND: no determinado.

6. Discusión

6.1 Discusión general

La exposición ambiental a plaguicidas es un tema de gran relevancia tanto a nivel mundial como a nivel regional. Representa una problemática ampliamente reconocida que lleva décadas de estudio. No obstante, el avance constante en la industria de los plaguicidas con el fin de generar sustancias más amigables con el ambiente o incluso la reutilización de familias de plaguicidas que en algún momento dejaron de usarse, pone de manifiesto la necesidad de dilucidar los efectos adversos que pueden producir sobre la salud humana. Por ello, actualmente se reconoce al uso de plaguicidas como un importante problema sanitario y ambiental (García-Gómez y col., 2011; Vadillo y col., 2018).

Luego de la aplicación de un plaguicida, entre el 30 y 80% del mismo se distribuye en el ambiente quedando principalmente dispuesto en el suelo (Querejeta y col., 2012; Queyrel y col., 2016, Hendriks y col., 2019) y en menor medida en la atmosfera y cursos de agua superficiales y subterráneas (Loewy y col., 2011; Sánchez y col., 2019; Hendriks y col., 2019). Así, la dispersión de plaguicidas en el ambiente propicia el contacto con organismos no blanco, es decir, con aquellos organismos que no se espera que tomen contacto. Ejemplo de esto es la exposición a plaguicidas de seres humanos y de polinizadores, entre otros organismos no blanco (Buszewski y col., 2019).

Se pueden diferenciar distintos escenarios de exposición, aquellas personas como los trabajadores rurales, que sufren una exposición ocupacional, y la población rural, que sufre una exposición ambiental y residencial. Distintas investigaciones documentan las consecuencias en la salud de niños, adolescentes y adultos expuestos a plaguicidas, ya sea por la actividad laboral como por vivir en cercanías de predios agrícolas e incluso por la aplicación en los hogares (Muñoz-Quezada y Lucero 2019). Dentro de los grupos más vulnerables se destacan a los niños y las mujeres embarazadas. De hecho, ha sido reportado que en la población que vive en cercanías de lugares de cultivo intensivo donde se emplean plaguicidas, presentó residuos de estos xenobióticos en orina, meconio, suero, sangre de cordón umbilical y placenta (Ostrea y col., 2009; Bradman y col., 2011; Quirós-Alcalá y col.,

2012; Vizcaino y col., 2014). En este sentido, un estudio realizado en Estados Unidos con 203 niños de entre 4 y 6 años de edad, se encontraron en muestras de orina metabolitos dealquifosforados (asociados a plaguicidas OF) y piretroides, relacionándose estos residuos con la aplicación de plaguicidas en el interior de sus domicilios (Neaher y col., 2010). Otro estudio realizado en Canadá, reportó residuos de OF en muestras de orina de niños en el mismo rango etario (Valcke y col., 2006). Sumado a esto, en un estudio que analizó muestras de orina de 140 niños de que vivían en cercanía de plantaciones de banana y plátano, se detectó metabolitos de clorpirifos, mancozeb (ditiocarbamatos) y diversos piretroides (Van Wendel y col., 2016).

Por otro lado, los autores Sagiv y col. (2018) en el Valle de Salinas, California, realizaron un estudio que reclutó a 601 mujeres embarazadas a quienes se les recolectaron muestras de orina durante el embarazo y hallaron metabolitos de OF (Sagiv y col., 2018). Los autores correlacionaron estos resultados con efectos adversos en los hijos de este grupo de mujeres, observando rasgos relacionados con un bajo comportamiento social asociado a trastornos del espectro autista. Claramente, las investigaciones mencionadas son indicativas del impacto de la exposición a plaguicidas durante el embarazo y en el período prenatal. En este sentido Fernández-Cruz y col. (2020) estudiaron la exposición prenatal a contaminantes orgánicos (entre ellos incluidas distintas familias de plaguicidas) en el noroeste de España, evaluando la presencia de residuos de estas sustancias en 88 muestras de placenta y 53 muestras de meconio. Los autores encontraron en muestras de placenta residuos de organofosforados, piretroides y organoclorados en menor concentración, mientras que en meconio mayores concentraciones de organoclorados, seguido de piretroides y menor concentración de OF. Sumado a esto, un estudio de cohorte realizado en Bangladesh por Jaacks y col. (2019) reportó residuos de plaguicidas en muestras de orina de mujeres embarazadas. Los autores hallaron principalmente metabolitos de clorpirifos, paratión y los compuestos parentales, también encontraron metabolitos de diazinón y de ácido 3-fenoxibenzoico (un metabolito no específico pero común a varios piretroides), en menor concentración.

En las últimas décadas, los residuos ambientales de Neo han aumentado enormemente debido a su aplicación a gran escala en todo el mundo (Buszewski y col., 2019; Peng y col., 2020). La exposición materna a Neo durante el embarazo ha sido vinculada con resultados adversos en recién nacidos. Se han reportado asociaciones entre la exposición materna al Neo imidacloprid (por reportes propios de su uso o bien por residir en sitios cercanos a los cultivos) con un aumento del riesgo de patologías como tetralogía de Fallot (un defecto congénito del corazón), trastornos del espectro autista y anencefalia en recién nacidos (Lin y col., 2013; Keil y col., 2014; Carmichael y col., 2014, Yang y col., 2014). Un estudio realizado en 2019 que contempló muestras de orina de 57 neonatos de bajo peso al nacer reportó que el 24% de los niños presentaban residuos de desmetil-acetamiprid (un metabolito de Ace) mientras que al día posnatal 14 el 12% de esos niños mantenía concentraciones detectables de dicho metabolito (Ichikawa y col., 2019). En conjunto estos trabajos demuestran claramente que la exposición a plaguicidas OF y Neo, comienza en el periodo prenatal.

En Argentina la agricultura es un sistema productivo de gran importancia y el cual está caracterizado por el uso intensivo de plaguicidas. En este sentido, gran cantidad de estas sustancias se han encontrado en cursos de agua de zonas periurbanas (Mac Loughlin y col., 2017), suelos (Villaamil-Lepori y col., 2013), como así también en frutas y vegetales para consumo de la población (Mac Loughlin y col., 2018). Particularmente, el Alto Valle de Río Negro y Neuquén es una de las regiones históricamente más importantes en cuanto a producción agrícola argentina, especialmente de frutales de pepita representando el 34% de las exportaciones del país (Torzano 2016; Sánchez y col., 2019). En este contexto, en las provincias de Río Negro y Neuquén se emplean distintas familias de plaguicidas, entre las que se encuentran los OF y los Neo, entre otros (Cichón y col., 2015). Dependiendo de diversos factores (como el tipo de cultivo, de la plaga a combatir, la posible generación de resistencia por parte de esta y las restricciones en el uso de algunos plaguicidas como el OF metil azinfos), el INTA recomendó el uso de los OF clorpirifos, metidación, fosmet; de los carbamatos carbaril y metomil; y la incorporación de Neo como tiacloprid y Ace en el Alto Valle (Cichón y Garrido 2012,

Cichón y col., 2013), entre otras sustancias. En relación a esto, en la región se ha reportado la presencia de organofosforados como CP y metil azinfos, y de carbamatos como el carbaril, tanto en aguas superficiales como subterráneas (Loewy y col., 2011). En 2012 la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas (AIC) reportó las mayores frecuencias de aparición para los OF CP (13%) y metil azinfos (8,7%) en monitoreos sobre el río Neuquén, alcanzando concentraciones de hasta 0,032 µg/L, mientras que carbaril alcanzó una frecuencia de 2,9% (concentraciones hasta 0,12 µg/L) y no reportaron valores detectables de Neo (AIC 2012). Un estudio más reciente llevado a cabo durante periodo de aplicación de plaguicidas (octubre – abril) en canales de drenaje, reportó la presencia de CP y carbaril mientras que metil azinfos se encontró debajo de los límites de detección (Macchi y col., 2018). La dificultad de detección de Neo en las matrices mencionadas muchas veces puede deberse principalmente a su rápida degradación (como es el caso de Ace) y a que son plaguicidas sistémicos, es decir que son absorbidos por la planta y distribuidos en su organismo (Buszewski y col., 2019). En relación a esto, en frutas de pepita como la pera y la manzana se han encontrado residuos de Ace tanto en la provincia de Neuquén como en Río Negro (Cossi 2019).

En la región se ha demostrado la exposición ambiental a plaguicidas OF en mujeres embarazadas y niños residentes en comunidades rurales del Alto Valle, así como su impacto en la placenta humana (Magnarelli y Guiñazú 2012). En este sentido, Bulgaroni y col. (2012) llevaron a cabo un estudio en la región, en el cual estudiaron la actividad de AChE y de carboxilesterasas en muestras de saliva de madres e hijos en edad pre-escolar, residentes en cercanías de áreas agrícolas (durante periodos de aplicación y no aplicación de plaguicidas). Las autoras reportaron el impacto negativo en la actividad de ambas enzimas biomarcadores de exposición a OF tanto en las madres como en los niños, relacionándose estrechamente al momento de aplicación de estas sustancias (Bulgaroni y col., 2012). Sumado a esto, otro estudio realizado en la región analizó el impacto en la placenta de plaguicidas OF durante periodos de aplicación y de no aplicación de plaguicidas. Este estudio relacionó la disminución de la actividad de AChE sanguínea y carboxilesterasas en la placenta con el impacto en el balance de citoquinas y la actividad de las enzimas

ornitina decarboxilasa y arginasa (vinculadas a la reparación tisular). Las autoras resaltan el aumento de IL-13 y la relación en la disminución de carboxilesterasas con aumento en la actividad de las enzimas ornitina decarboxilasa y arginasa, como un posible efecto reparador frente al daño debido a OF (Bulgaroni y col., 2013). Por otro lado, en mujeres embarazadas que residen en zonas rurales y durante los periodos de aplicación intensiva, se demostró impacto en los biomarcadores de exposición. Se observó disminución de carboxilesterasa placentaria y aumento en sincitiotrofoblasto de la actividad de citocromo c oxidasa, acompañado de disminución de la expresión de óxido nítrico sintasa y progesterona (Rivero-Osimani 2016). Sumado a estos hallazgos en la región, Quintana (2017) reportó disminución de la actividad de SOD y daño genotóxico, en sangre de cordón umbilical de estas poblaciones, en las que también se determinaron diferencias en índice placentario, peso de la placenta y peso del recién nacido en comparación con mujeres controles, residentes urbanas (Quintana 2017).

En contraste a lo que se conoce de los OF, en la bibliografía se disponen de pocos datos relacionados a la toxicidad de Neo en mujeres embarazadas y su impacto en la placenta humana. Así como no se dispone de gran variedad de estudios poblacionales en humanos y sus posibles efectos en el desarrollo intrauterino, en particular. Sin embargo, es conocido que en la región se aplican Neo hace varios años (Cichón y col., 2013; Cichón y col., 2015). En la bibliografía disponible, Yang y col. (2014) asociaron la exposición a imidacloprid, durante el primer periodo de gestación de mujeres residentes en proximidad a sitios de aplicación de plaguicidas, con anomalías en los neonatos vinculadas a anencefalia y espina bífida (Yang y col., 2014). Sumado a esto, Keil y col. (2014) ponen en discusión si la exposición prenatal a imidacloprid estaría vinculada a trastornos del espectro autista, siendo en este caso el escenario de exposición el combate de plagas domiciliarias (Keil y col., 2014). Si bien se sabe que los Neo pueden ingresar al organismo principalmente a través de la dieta (Buszewski y col., 2019) no está ampliamente estudiado el efecto que podrían producir en el hombre. No obstante, estudios *in vitro* recientes han reportado múltiples efectos tóxicos incluso a bajas dosis (Ichikawa y col., 2019). En este sentido, en células PC12 de feocromocitoma de rata (derivadas de tumor de la

medula suprarrenal de la glándula adrenal) imidacloprid resultó neurotóxico, activando los receptores nicotínicos $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ y facilitando por esta vía la transcripción de tirosín hidroxilasa en concentraciones (3 – 30 μM) en concentraciones en las que normalmente el neurotransmisor ACh posee efectos fisiológicos (como la secreción de catecolaminas) (Kawahata y Yamakuni 2018). Sumado a esto, se ha reportado que el Neo clotianidina presentaría efectos inmunotóxicos en monocitos humanos, observándose que frente a la exposición a este xenobiótico se redujo la producción de TNF- α y por consecuencia la regulación de genes dependientes del promotor NF κ B (Di Prisco y col., 2017). Otros efectos reportados vinculan a la exposición de concentraciones ambientales de imidacloprid y tiacloprid de células de cáncer de mama, en las que observaron disrupción endócrina (Caron-Beaudoin y col., 2018). Dentro de estos mecanismos alternativos de toxicidad, Wang y col. (2018) proponen que la exposición a Neo puede resultar en estrés oxidativo y consecuentemente en daño genotóxico. En este sentido Quintana (2017) reporta que acetamiprid es capaz de inducir la producción de ERO y reducir la actividad de enzimas antioxidantes como CAT y SOD, en sangre de cordón umbilical humana.

6.2 Impacto de clorpirifos en la respuesta inmune innata de trofoblastos

En este trabajo de tesis se estudió primero el efecto del organofosforado CP sobre trofoblastos del primer trimestre de gestación. Para ello se empleó la línea celular HTR-8/SVneo como modelo *in vitro* de trofoblastos humanos extravellosos. El principal blanco de acción de plaguicidas OF es la enzima AChE, cuya inhibición resulta en la acumulación del neurotransmisor ACh y por lo tanto la hiperestimulación nerviosa (Costa 2006; Li 2007; Elersek y Filipic 2011). A pesar de que la placenta es un órgano no inervado y que los trofoblastos no son células nerviosas, se conoce que expresan todos los componentes del sistema colinérgico (Sastry 1997). Este sistema colinérgico no neuronal es responsable de muchas funciones, las que permiten el correcto funcionamiento placentario y el desarrollo del embarazo. Se conoce que en la placenta la liberación de ACh regula diferentes

procesos fisiológicos como el flujo sanguíneo, procesos de vascularización, el transporte de nutrientes vía activación de receptores nAChR y regulación mecanismos miogénicos a través de receptores mAChR (Beckmann y Lips 2013). En la placenta, la ACh no neuronal es sintetizada principalmente por citotrofoblastos y se la ha asociado al transporte de aminoácidos y hormonas, como así también la liberación de este neurotransmisor por parte de trofoblastos está vinculada a la comunicación intercelular y promueve la liberación de citoquinas y el reclutamiento de células inmunes maternas modulando la migración de monocitos y células dendríticas (Bhuiyan y col., 2006; Wessler y Kirkpatrick 2008; Wessler y col., 2012; Papparini y col., 2015). En este trabajo de tesis se observó que los trofoblastos extravellosos HTR-8/SVneo tienen la capacidad de bioactivar CP a su forma oxón y a su vez que éste impacta sobre su blanco primario de acción (AChE). CP redujo significativamente la actividad de AChE a 24 h de exposición a altas concentraciones (10 y 100 μM), sin embargo, no se observaron alteraciones a tiempos más cortos de exposición al organofosforado (4h), probablemente debido al tiempo de bioactivación requerido por el sistema, ya que CP por sí mismo es un pobre inhibidor de b-esterasas (Espinoza 2016).

En este sentido, se conoce que la exposición aguda a insecticidas organofosforados, en la forma oxón, repercute en la inhibición irreversible de AChE (Burke y col., 2017) y que este representa un biomarcador de exposición a insecticidas organofosforados (Vera y col., 2012). Escasos son los datos relacionados a los efectos de inhibición de AChE en trofoblastos HTR-8/SVneo. Sin embargo, nuestros resultados están en concordancia con efectos inhibitorios reportados en otros modelos *in vitro* de trofoblastos humanos. Específicamente en células JEG-3, se demostró que CP y metil azinfos son capaces de inhibir AChE en condiciones similares a las ensayadas en este trabajo (Espinoza y col., 2016). En ratas expuestas a OF como diazinón y metil paratión, se observó impacto en la actividad placentaria y fetal de colinesterasas como AChE y butirilcolinesterasa, dependientes de su bioactivación a metabolitos oxón (Abu-Qare y Abou-Donia 2001).

La inhibición de AChE resulta en la acumulación de ACh y por consiguiente la sobre estimulación de los receptores nicotínicos y muscarínicos de ACh (Costa 2006). En condiciones normales, la ACh funciona como el mensajero local de la placenta. Esta se forma principalmente en el citotrofoblasto y se libera en la placenta por la circulación materno-fetal (Colmenaro Salas y col., 2009). En este contexto, la activación de los receptores colinérgicos media la liberación del factor de relajación derivado del endotelio, promueve la relajación del músculo liso vascular inducida por ACh (Sastri 1997). No obstante, la constante activación de los receptores de ACh, como puede darse en exposiciones a OF, repercute en varias funciones a nivel del trofoblasto, entre ellas la proliferación celular, flujo de iones, movilidad y diferenciación celular (Bhuiyan y col., 2006). En este sentido Salisbury y col. (2007) demostraron que CP, vía su activación a CP-oxón, alteró la funcionalidad de trofoblastos JAR impactando en el potencial mitocondrial, condensación y fragmentación de núcleos y la estimulación de expresión de TNF- α , llevando a la muerte celular mediada por apoptosis.

En los últimos años, diferentes mecanismos alternativos de toxicidad asociados a OF han sido reportados, pudiendo estar vinculados a la inhibición de AChE y la consecuente acumulación de ACh (pero independientes de el efecto neurotóxico) o bien asociados al metabolismo y bioactivación de OF, entre otros. En este sentido, Guiñazú y col. (2012) demostraron que en trofoblastos JEG-3 CP (así como fosmet, otro OF) reduce significativamente la viabilidad celular en condiciones de concentración y tiempo de exposición similares a los empleados en este trabajo. Además, resaltan que este efecto citotóxico depende tanto del tiempo de exposición como de la concentración del insecticida. Sin embargo, en esta tesis el modelo de estudio fue la línea celular HTR-8/SVneo. Si bien, no se analizó el efecto citotóxico de CP sobre HTR-8/SVneo, Ridano y col., (2019) reportan que CP no presentó cambios en la viabilidad celular luego de la exposición durante 48 h a concentraciones de 0 a 200 μ M del insecticida, observándose sólo efectos citotóxicos en exposiciones a CP en condiciones reducidas de suero bovino fetal (Ridano y col., 2019). Sumado a esto, en citotrofoblastos vellosos aislados de placentas normales a término se mantuvo la viabilidad celular en concentraciones

de CP hasta 100 μM (Ridano y col., 2017), concentración que coincide con las más altas evaluadas en esta tesis.

Las diferencias entre estos modelos pueden deberse a la diferente capacidad de los trofoblastos del primer trimestre de resistir frente a los efectos citotóxicos de CP en comparación a trofoblastos del tercer trimestre (JEG-3). En este sentido, las diferencias entre trofoblastos del primer y del tercer trimestre reflejan diferencias intrínsecas en sus funciones, que son dependientes de la edad de la placenta y que se manifiestan en procesos como patrones de secreción de gonadotropina coriónica humana, lactógeno placentario humano o progesterona (Kato y Braunstein 1990). Sumado a esto, citotrofoblastos del primer trimestre en cultivo han presentado un fenotipo proliferativo e invasivo, mientras que citotrofoblastos del tercer trimestre presentan un fenotipo no proliferativo (Steinberg y Robins 2016). Estas características han sido observadas también en HTR-8/SVneo en comparación con JEG-3, presentando las primeras una marcada capacidad invasiva (Suman y Gupta 2012). Estas diferencias también se han reportado en cuanto a la respuesta frente a xenobióticos. Diferencias en la capacidad proliferativa y migratoria, expresión de genes de enzimas metabolizantes (como CYP19), se han observado en trofoblastos HTR-8/SVneo expuestos a contaminantes ambientales como bisfenol A y ftalatos en comparación a trofoblastos del tercer trimestre como JEG-3 (Huang y Leung 2009; Spagnoletti y col., 2015; Strakovsky y Schantz 2018). Estas consideraciones resultan interesantes desde el punto de vista del estadio de gestación en la que puede estar expuesta una mujer embarazada a este tipo de xenobióticos. Si bien, en trofoblastos JEG-3 CP pareciera tener mayor poder citotóxico, el impacto de OF durante la finalización de la gestación resultaría menos nocivo que si fuese durante el comienzo de la gestación. En este sentido, el hecho de que trofoblastos HTR-8/SVneo respondan de manera tal que puedan resistir el efecto citotóxico de CP es esperanzador. Claramente no se debe descartar el hecho de que exposiciones repetidas por intervalos de tiempo cortos, como los empleados en este trabajo, o bien concentraciones más elevadas a las ensayadas aquí, podrían exacerbar los efectos reportados.

De manera más reciente, ha sido propuesto que más allá del efecto en blancos primarios de acción, los plaguicidas podrían presentar efectos inmunotóxicos como resultado de exposiciones a grandes dosis o bien exposiciones crónicas a bajas dosis (García y col., 2016). El aumento de los niveles de ACh ha sido vinculado con la etiología de distintas enfermedades (Wessler y Kirkpatrick 2008) y se conoce que existe conexión entre la respuesta inmune innata y adaptativa con el sistema colinérgico (Borovikova y col., 2000). Cambios en los niveles de ACh han sido reportados en distintas enfermedades inflamatorias (Wessler y col., 2003). Como se mencionó, ACh puede interactuar con distintos receptores: nAChR y mAChR. Se ha identificado que la estimulación de la subunidad $\alpha 7$ del nAChR es capaz de controlar la respuesta inflamatoria en diversos tipos celulares (Wang H. y col., 2003; Li y col., 2011). La expresión de este receptor ha sido reportada en la placenta, y la misma se encuentra incrementada en embarazos que transitan distintas patologías como por ejemplo pre eclampsia (Kwon y col., 2007). En contraste, los receptores mAChR favorecen la producción de citoquinas con un perfil pro-inflamatorio, como TNF- α , IFN γ e IL-6, en la etapa temprana de una reacción inmune. Por lo tanto, ACh dependiendo del receptor con el cual interactúe, podría modular la respuesta inmune a través de la producción de citoquinas (Kawashima y col., 2012). En este sentido, el vínculo entre la regulación colinérgica y sistema inmune es cada día más reconocido. En trabajos recientes se ha demostrado que agonistas de nAChR como la nicotina pueden regular la producción de citoquinas y la expresión de TLR en células mononucleares umbilicales humanas (Takbiri y col., 2018), en un modelo de inflamación intestinal, se demostró que inhibidores de AChE eran capaces de modular la respuesta mediada por TLR-9, principalmente hacia una respuesta antiinflamatoria (Vaknine y Soreq 2020). Además, esta regulación podría ser en ambas direcciones, ya que también se ha vinculado la respuesta inflamatoria mediada por TLR-4, en microglia, con una reducción de la función neuroprotectora de la microglia a través de la regulación negativa del nAChR $\alpha 7$ (Nakamura y col., 2020). Esta interacción sistema colinérgico-respuesta inmune podría mostrar diferencias según el proceso y órgano estudiado, además de que podría ser recíproca.

La interfase materno-fetal representa un caso inmunológico particular ya que se debe promover por un lado la tolerancia al feto, mientras que se debe mantener la respuesta inmune frente a una diversa variedad de posibles patógenos (Abraham y Mor 2005). En este sentido, la activación de receptores TLR resulta en vías de señalización que pueden repercutir en la producción de citoquinas proinflamatorias (Juarez Carvajal y col., 2009). Asimismo, el balance de citoquinas juega un rol sumamente importante en la tolerancia al feto por parte del sistema inmune materno. Existe evidencia que los trofoblastos son capaces de reconocer y responder frente a patógenos a través de receptores TLR y que estos representan una parte importante de la inmunidad innata en la placenta (Abraham y Mor 2005; Koga y col., 2014). Los TLR participan en el inicio de la respuesta inflamatoria inducida por microorganismos, estrés celular y/o daño a los tejidos (Tangerås y col., 2014), ya que los TLR forman parte de los PRRs y pueden reconocer patrones moleculares asociados a patógenos originados en microorganismos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daños derivados del huésped (DAMP).

Para determinar si en este modelo ocurría alguna clase de modulación, por la exposición a CP en la respuesta inmune innata mediada por TLR, se estudió la expresión de receptores que participan de la inmunidad innata como así también el balance de citoquinas vinculadas a la respuesta inflamatoria/antiinflamatoria. Se conoce que todos los TLR están presentes en el tejido placentario a término normal a nivel de ARNm, pero solo TLR-2 y TLR-4 están completamente caracterizados a nivel de proteína (Firmal y col., 2020). En el modelo de estudio, se analizó la modulación de la respuesta inmune en las condiciones que se observó inhibición de AChE. Se estudió la expresión de los receptores TLR-2 y TLR-4 como así también de las citoquinas IL-6, IL-10 y TGF- β . Se observó que CP induce significativamente la expresión de transcritos de TLR-2 y TLR-4 a altas concentraciones (10 y 100 μ M) en trofoblastos HTR-8/SVneo. Asimismo, comprobamos el aumento en los niveles de proteína del receptor TLR-4 por western blot. En condiciones en las se observaron aumentos significativos de transcritos para TLR, también se halló incremento significativo de transcritos para la citoquina proinflamatoria IL-6 a 100 μ M de CP y de transcritos para la citoquina antiinflamatoria TGF- β . Posiblemente

el aumento observado en TGF- β sea una respuesta para contrarrestar el posible efecto inflamatorio que resultaría de la actividad de IL-6. Contrariamente, en las condiciones ensayadas no se observó expresión de IL-10.

Estos resultados son comparables con otros estudios realizados en modelos *in vitro* de trofoblastos expuestos a OF. En este sentido, Zappa (2014), reportó aumento significativo de transcripto y proteína para TLR-4 y de transcripto para TLR-2, en trofoblastos JEG-3 expuestos a CP en condiciones similares a las estudiadas en este trabajo. Sumado a esto, en Guiñazú y col. (2012) reportaron aumento de citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α en trofoblastos JEG-3 expuestos a los OF clorpirifos y fosmet en similares condiciones experimentales. En relación a IL-10, Guiñazú y col. (2012) reportaron resultados similares a los hallados en esta tesis en cuanto a la falta de expresión de esta citoquina en las condiciones evaluadas. Estos resultados demostrarían el impacto de plaguicidas OF en células trofoblásticas humanas, en relación a su efecto sobre receptores TLR y el consiguiente cambio en el patrón de citoquinas. No obstante, para esclarecer este escenario resultaría importante estudiar las vías de señalización cascada debajo de la activación de TLR-2 y TLR-4, evaluar los niveles de citoquinas liberados en estas condiciones y evaluar la activación de otras citoquinas pro y antiinflamatorias, así como su posible relación con el sistema colinérgico.

La exposición a OF resulta en la inhibición de AChE, como fue observado en esta tesis, y la acumulación de ACh. Se ha vinculado a la ACh con la respuesta inmune, identificándose la vía colinérgica antiinflamatoria como un sistema regulador natural que protege frente a fuertes respuestas inflamatorias durante procesos de sepsis para evitar el daño irreversible en el órgano donde se produzca (Andersson y Tracey 2012). En este sentido, la producción y liberación de ACh por células T detiene la activación de macrófagos y consecuentemente la liberación de citoquinas proinflamatorias, proceso conocido como reflejo anti-inflamatorio (Sadis y col., 2013). El efecto inmunomodulatorio de la vía colinérgica ha sido inicialmente descrita en componentes de la respuesta inmune innata, interactuando así frente a distintas señales de peligro o de daño por medio de distintos receptores como los

TLR, cuya activación repercute en la liberación de distintas citoquinas (Andersson y Tracey 2012). En relación a esto, en modelos de ratón se ha reportado que el efecto antiinflamatorio de ACh opera a través del receptor nicotínico $\alpha 7$ nAChR expresado en macrófagos (Takeshi y col., 2017), de hecho, en ratones *knock-out* para $\alpha 7$ nAChR se observó aumento en la sensibilidad a la exotoxemia (manifestación clínica asociada a una exagerada reacción inflamatoria) frente a ratones *wild-type* (Wang y col., 2004). Además, en este contexto y en modelos de endotoxemia, Wang y col. (2003) reportaron que en la vía mediada por $\alpha 7$ nAChR se suprimiría la liberación por parte de macrófagos de TNF- α e IL-1 β , para asegurar la supervivencia (Wang y col., 2003). Sumado a esto, en modelos de infección polimicrobiana en ratón Lee y col. (2014) reportaron que la activación del receptor $\alpha 7$ nAChR por medio de la exposición a nicotina, redujo significativamente la mortalidad, el daño a órganos y la liberación de citoquinas inflamatorias. Los autores resaltan que la estimulación del receptor $\alpha 7$ nAChR inducido por nicotina suprime la expresión de TLR-4 a través de la vía PI3K/Akt reduciendo la liberación de TNF- α (Lee y col., 2014). En este sentido, la activación de TLR no solo estimularía la respuesta inmune innata, llevando a la producción de citoquinas proinflamatorias, sino que regularía la actividad colinérgica en macrófagos y células dendríticas. Sumado a esto, la ACh sintetizada en estos tipos celulares contribuiría a la regulación de la respuesta inmune innata por medio de la producción de citoquinas a través de la activación de la vía autocrina y/o paracrina de nAChR, incluyendo $\alpha 7$ nAChR (Takeshi y col., 2017).

La toxicidad de plaguicidas OF, ha sido vinculada con la activación de TLR. En un modelo de ratón deficiente en TLR-4, Win-Swhe y col. (2012) reportaron que la vía de señalización de TLR-4 estaría involucrada en la neurotoxicidad inducida por el OF diazinón en hipocampo. En este sentido, los autores indican que la expresión de neurotrofina y del factor neurotrófico derivado del cerebro en el hipocampo de ratones TLR-4 deficientes, fue afectada significativamente en comparación con ratones TLR-4 normales; y que esta alteración se vio asociada al aumento de la expresión de la quimiocina proinflamatoria CCL3 y de la expresión de transcritos para la proteína pro-apoptótica Bax (Win-Swhe y col., 2012). TLR-4 es un importante

RRP, el cual activa células inmunes. Su activación por LPS o PAMPs lleva a la producción de citoquinas por la vía dependiente o independiente de MyD88 (Juárez Carvajal y col., 2009). La expresión de TLR ha sido descrita en la placenta humana (Abraham 2011) y en el trofoblasto, el tipo celular predominante en la expresión de estos TLR (Koga y col., 2009). No obstante, solo TLR-2 y TLR-4 han sido completamente caracterizados a nivel de proteína (Firmal y col., 2020). El perfil de expresión de TLR varía según el estadio de gestación, siendo TLR-2 y TLR-4 los receptores más expresados en citotrofoblastos vellosos y trofoblastos extravelosos de placentas del primer trimestre (Abrahams y col., 2004; Rindsjo y col., 2007; Beijar y col., 2006; Firmal y col., 2020). En contraste, placentas a término, presentan perfiles de expresión de TLR-2 y TLR-4 en citoplasma y sincitiotrofoblasto principalmente (Holmlund y col., 2002; Beijar y col., 2006; Firmal y col., 2020). Esto sugiere que no solo las células propias del sistema inmune, sino que los trofoblastos tienen la capacidad de responder frente a patógenos y señales de peligro, y que estos últimos representan una parte importante de la inmunidad innata y la protección de las funciones de la placenta (Koga y col., 2009).

La activación de TLR-2 y TLR-4 por ligandos específicos como zimosan y lipopolisacárido (LPS), respectivamente, resulta en producción de citoquinas IL-6 e IL-8 en la placenta (Holmlund y col 2002; Abraham y Mor 2005). En particular, estudios sobre trofoblastos del primer trimestre tratados con LPS resultaron en la producción de citoquinas como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y de la quimiocina ligando 5 (CCL) (Svinarich y col., 1996), y óxido nítrico (Nakatsuka y col., 2000). Además, Abraham y Mor (2005) reportaron en citotrofoblastos y trofoblastos vellosos, una respuesta clásica de TLR luego de la estimulación con LPS, caracterizado por la liberación de citoquinas pro y anti-inflamatorias. Sugiriendo que las células trofoblásticas pueden de hecho funcionar de manera similar a células propias del sistema inmune innato (Abrahams y col., 2004).

Durante el embarazo, la placenta es la única estructura que proporciona una interfase entre la sangre materna y fetal, para el intercambio de gases, nutriente y

desechos. En esta interfase materno-fetal existen varios mecanismos de tolerancia inmunológica como la HLA-G en los trofoblastos, síntesis de factores reguladores como las citoquinas y hormonas, equilibrio entre citoquinas Th1 y Th2, producción de TGF- β con un fenotipo inmunosupresor, células T-reguladoras, receptores TLR, entre otros. Mecanismos que se relacionan entre sí y se complementan para llevar a buen término el embarazo (Iglesias y col., 2002; Rico-Rosillo y Vega-Robledo 2012). En este contexto los trofoblastos pueden modular al sistema inmunológico materno por medio de la expresión y regulación de TLR, en presencia de infecciones intra-uterinas (Mor y col., 2005), y se ha establecido que esta respuesta influye en el éxito del embarazo (Abraham y Mor 2005). La activación de TLR resulta en la liberación de citoquinas pro y antiinflamatorias, las cuales participan en la tolerancia inmunológica al feto, sobre todo las que tienen un perfil Th2 con un fenotipo supresor que regula la evolución y el desarrollo de la placenta ya que en un ambiente inmunológico normal (sin tolerancia), el feto sería rechazado (Rico-Rosillo y Vega-Robledo 2012). El aumento en la liberación de citoquinas proinflamatorias cumple un rol crítico en la placentación y el parto (Lappas y col., 2003). En particular el aumento intrauterino en la concentración de citoquinas proinflamatorio como IL-6, IL-8 y TNF- α ha sido vinculado con partos prematuros (Vrachnis y col 2010).

Los resultados de esta tesis demuestran que CP impacta en la expresión de TLR-2 y TLR-4, con la consiguiente regulación de citoquinas vinculadas a la inflamación como IL-6 y TGF- β . El aumento de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias juega un rol crítico en la placentación y en el parto (Leppas y col 2003). Particularmente, el aumento en la concentración de IL-6, IL-1 β , IL-8 y TNF- α ha sido asociado con resultados adversos en embarazos humanos (Vrachnis y col., 2010). Además, citoquinas como IL-8 estimula la activación y reclutamiento de leucocitos en las membranas extra placentarias, resultando en corioamnionitis, una condición inflamatoria comúnmente asociada con nacimientos prematuros y bajos pesos de neonatos (Goncalves y col., 2002; Hendson y col., 2011). Sumado a esto, estudios realizados con LPS, ligando de TLR-4, vincula procesos de infección, respuesta proinflamatoria y estrés oxidativo en tejidos gestacionales (Hassan y col., 2016). En este sentido, la exposición de membranas fetales humanas a LPS resultó en estrés

oxidativo con el consiguiente aumento de 8-isoprostano (producto de peroxidación de ácidos grasos), efecto que fue revertido con el antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) (Leppas y col., 2003). En la línea celular JAR, Saulsbury y col. (2008) demuestran la toxicidad de CP en trofoblastos observando reducción de viabilidad celular acompañado del aumento de la transcripción de la citoquina proinflamatoria TNF- α , entre otros procesos asociados a la condensación y fragmentación nuclear, disminución de Bcl-2 anti-apoptótica. Estudios enfocados en el desarrollo inmune en modelos de ratón, en los cuales las madres fueron expuestas oralmente a CP desde el día post gestacional 12 y luego de la parición sus crías, refuerzan el hecho de que la exposición a CP durante el desarrollo puede causar inmunosupresión, particularmente en la adultez observándose supresión de la producción de citoquinas proinflamatorias (como TNF- α e IL-6), IFN- γ y cambios en la capacidad de respuesta frente a mitógenos por parte de linfocitos (Singh y col., 2013).

Por otro lado, se estudió también la expresión de IL-10 en trofoblasto, no pudiendo evidenciarse su expresión en las condiciones ensayadas en esta tesis. En este sentido, ha sido reportado que IL-10 tendría un rol importante durante el desarrollo placentario y en el proceso de remodelación de las arterias maternas (Thaxton y Sharma 2010). El modelo empleado en esta sección de la tesis es representativo de trofoblastos extravelosos del primer trimestre y es conocido que durante el comienzo de la gestación los trofoblastos extravelosos exhiben una pobre producción de IL-10 mientras que expresan altos niveles de metaloproteinasas (como MMP-9). Lo cual implica que este tipo celular desregula temporalmente la expresión de IL-10 con el fin de mantener su potencial invasivo, cuyo rol es sumamente importante para alcanzar y remodelar la vasculatura materna (Roth y Fisher 1999). No obstante, ha sido reportado que, tanto en placentas a término normales como en placentas pre eclámpticas, IL-10 es expresada (Markis y col., 2006). En esperable que, a nivel de órgano, los aportes en cuanto a la producción y actividad de IL-10 provengan de otros tipos celulares coexistentes en la placenta, ya que se ha comprobado la expresión de esta citoquina por parte del citotrofoblasto y en otras células inmunes (Thaxton y Sharma 2010).

El proceso de inflamación ha sido asociado a procesos de estrés oxidativo en distintas patologías del embarazo, las que incluyen pre eclampsia, partos prematuros y restricción del crecimiento intrauterino (Challis y col., 2009; Ferguson y col., 2015; Ferguson y col., 2014; Al-Gubory y col., 2010). De hecho, biomarcadores de daño oxidativo y de inflamación, como 8-isoprostano, IL-6 y TNF- α , han sido determinados en plasma de mujeres con pre eclampsia (Ouyang y col., 2009). Esto es indicativo de que el estrés oxidativo mediaría, por lo menos en parte, las respuestas proinflamatorias durante el embarazo. En este sentido, se ha vinculado la producción de ERO como resultado del metabolismo de plaguicidas, además la placenta tiene la capacidad de metabolizar xenobióticos. En relación a esto, se ha observado aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno en sangre de cordón umbilical (Quintan 2017) y en trofoblastos JEG-3 (Gomez 2015), y su impacto en la capacidad antioxidante (Rivero-Osimani 2016, Quintana 2017), en condiciones en las que se observó muerte celular. La toxicidad aguda de trofoblastos HTR-8/SVneo a xenobióticos ha sido vinculada con la activación de TLR, con el consiguiente aumento en la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-6 (Park y col., 2014), y que en modelos *in vitro* la producción de ERO media, al menos en parte, la liberación de IL-6 (Hassan y col., 2016).

Por lo expuesto, la activación de respuestas proinflamatorias puede alterar las funciones trofoblásticas necesarias para el desarrollo de la placenta y el éxito del embarazo. Es por ello que es importante considerar el escenario de exposición ambiental a plaguicidas OF como un factor que puede contribuir a las alteraciones de la respuesta inmune innata.

6.3 Toxicidad de Neonicotinoides en trofoblastos humanos

Los plaguicidas neonicotinoides (Neo) son insecticidas de amplio espectro con propiedades sistémicas que actúan principalmente como agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina en insectos (Taira, 2014). Si bien su uso es bastante reciente, ya ocupan gran parte del mercado global de insecticidas (Simon-Delso y col., 2015). Estas sustancias, además de ser propuestas como altamente selectivas en insectos, poseen una alta eficacia a bajas concentraciones. Sumado a esto, presentan baja persistencia en el ambiente y, en términos generales, baja toxicidad para mamíferos. Como resultado de estas propiedades es que su uso se ha incrementado en los últimos años y han comenzado a reemplazar a otras familias de insecticidas. Sin embargo, estudios demuestran sus efectos nocivos en animales y humanos. En relación a esto, la ingesta del Neo tiametoxam se vio relacionada con el desarrollo de daño hepático en ratón (Green y col., 2005). Tanto en modelos animales como en modelos *in vitro* humanos, ha cobrado interés en los últimos años la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, el estrés oxidativo y daño oxidativo como mecanismo toxicológico asociado a la exposición a Neo (Wang y col., 2017). En este sentido, ha sido estudiado *in vitro* que la exposición de linfocitos de sangre periférica a Ace y una formulación comercial que contiene 20% de PA estaría involucrado con daños genotóxicos ya que disminuyó el índice mitótico y el índice de división celular (Kocaman y Topaktas 2007). También, en linfocitos de sangre periférica, Calderón-Segura y col. (2012) reportaron que la exposición *in vitro* a formulaciones comerciales de los Neo tiacloprid, clotianidina e imidacloprid, resultó en efectos citotóxicos y daño en ADN. La exposición aguda a Neo ha sido asociada a casos fatales como así también a efectos adversos en el neurodesarrollo en exposiciones crónicas (Cimino y col., 2017).

En este trabajo de tesis se estudió el efecto del Neo Ace en la viabilidad celular de trofoblastos humanos del primer y del tercer trimestre de gestación (células HTR-8/SVneo y JEG-3, respectivamente). Nuestros resultados demuestran que Ace (10 y 100 μ M) es citotóxico para ambas líneas celulares de trofoblastos humanos. En este sentido, han sido reportado los efectos tóxicos de Ace en diferentes líneas celulares tales como citotoxicidad y daño al ADN en células hepáticas HepG2 y de

neuroblastoma SH-SY5Y (Şenyildiz y col., 2018), genotoxicidad en células intestinales humanas Caco-2 (Cavas y col., 2012), e impacto en índice mitótico e índice de división celular en cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica (Kocaman y Topaktas, 2007). Recientemente, ha sido demostrado que las células embrionarias son sensibles a la toxicidad de Neo, siendo tiacloprid el insecticida con mayor efecto perjudicial, seguido por acetamiprid, tiametozam y clotianidina (Babel'ova y col., 2017). Asimismo, la exposición transitoria a Neo durante la primera etapa del desarrollo indujo alteraciones en el comportamiento y función cerebral de ratones (Burke y col., 2018).

En contraste a los resultados observados con el principio activo, la formulación comercial de acetamiprid (Ace CF) produjo mayores efectos perjudiciales en la viabilidad celular en todos los tiempos analizados y con la mayoría de las concentraciones ensayadas en esta tesis. Estas diferencias entre el PA y el formulado comercial podrían deberse principalmente a la composición de este último. Si bien ambos contienen Ace, el formulado comercial contiene además una serie de agentes que hacen al producto comercial y están destinados a facilitar su aplicación a campo y su capacidad de controlar plagas de insectos. En Argentina, Ace es comercializado por distintas compañías y en distintas formulaciones (SENASA 2020). Particularmente Assail 70WP, la formulación empleada en esta tesis, contiene 70% de PA y 30% otras sustancias declaradas como inertes. Es comercializada por Summit Agro Argentina SA en una formulación basada en la desarrollada originalmente por la empresa japonesa Nippon Soda CO. LTD. En su manual técnico Summit Agro no especifica el contenido de estas denominadas sustancias inertes, solo hace referencia que el desarrollo de la formulación es en base a una arcilla local (Summit Agro Argentina SA, 2020). En cuanto a su desarrollo original por Nippon Soda CO. LTD, en su hoja de seguridad del producto declara que parte de los componentes inertes contienen dióxido de silicio amorfo, arcilla del tipo caolinitas, entre otras sustancias (Assail 70WP SDS). Si bien no fue posible determinar qué tipo de arcilla es la empleada en el Ace CF, se ha reportado que distintos minerales de arcilla presentan efectos antimicrobianos y además serían tóxicos en mamíferos y en humanos, efectos que en general están asociados a

citotoxicidad (dependiendo del mineral de arcilla) con diferentes mecanismos asociados como necrosis/apoptosis, estrés oxidativo o genotoxicidad (Maisanaba y col., 2015). En cuanto a su posible impacto durante el desarrollo, Patterson y Staszak (1977) demostraron que la ingesta particularmente de arcillas del tipo caolinita, en ratas durante la gestación, resultó en reducción significativa en hemoglobina, hematocrito y niveles de glóbulos rojos, indicando anemia materna. Asociado a esto, observaron reducción del peso de neonatos de aquellas madres que fueron alimentadas con dieta que contenía caolinita y presentaban anemia y que esto era revertido frente a una suplementación de hierro en la dieta (Patterson y Staszak 1977). Por otro lado, la inyección directa de caolinita en la cisterna cerebelomedular de fetos de cordero resultó en la inducción de hidrocefalia, denotando su posible impacto en el neurodesarrollo (Duru y col., 2019). Sumado a esto, se ha observado que la ingesta de arcillas comestibles (arcillas NZU) en ratas durante la gestación resultó en la reducción de la ganancia de peso corporal de las madres, reducción del crecimiento fetal, aumento en la reabsorción y pérdida del embarazo, comparado con ratas control (Aprioku y Ogwo-Ude, 2018).

Efectos tóxicos perjudiciales derivados de la exposición a xenobióticos, incluyendo a los plaguicidas, han sido vinculados con la inducción de desbalance oxidativo en modelos humanos y animales (Asghari y col., 2017; Wang y col., 2017). Los resultados obtenidos aquí claramente demuestran que Ace CF gatilla la producción de especies reactivas de oxígeno en ambos modelos de trofoblastos estudiados, HTR-8/SVneo y JEG-3. La producción de anión superóxido fue determinada por el ensayo de reducción de NBT, mientras que un rango más amplio de especies reactivas fue determinado por medio de la sonda fluorescente DCFH-DA (Niocel y col., 2019; Rastogi y col., 2010). Aumentos en los niveles de anión superóxido fueron observados luego de 4 y 24 h de exposición a elevadas concentraciones de Ace CF. Un resultado interesante es que la producción de ERO fue determinada luego de 24 h de exposición con ambas presentaciones del insecticida estudiado: el principio activo y la formulación comercial, en las células HTR-8/SVneo. Se ha establecido que el estrés oxidativo juega un importante rol dual en la placenta, ya que está asociado a procesos regulatorios beneficiosos como angiogénesis,

vasoactividad, inmunoregulación, invasión celular; como así también efectos adversos tales como apoptosis y daño oxidativo (Sharp y col., 2010; Wu y col., 2016), asociándose a patologías durante el embarazo (Duhid y col., 2016). En este sentido, altos niveles de especies reactivas de oxígeno en estadios tempranos del embarazo contribuyen a la patogénesis de pre eclampsia (Matsubara y col., 2015), restricción del crecimiento intrauterino (Gurugubelli Krishna y VishnuBhat, 2018) y nacimientos prematuros (Paules y col., 2019). En términos generales, la exposición a factores ambientales tales como contaminantes o xenobióticos (ftalatos, bisfenol, fenoles, anfetamina, metanfetamina) han sido vinculados a alteraciones relacionadas a producción de especies reactivas de oxígeno y a complicaciones en el embarazo (Bodin y col., 2015; LaRocca 2016; Malmqvist 2017; Correia-Branco y col., 2018; Philips 2019). Particularmente, se ha sugerido que los insecticidas Neo pueden presentar efectos perjudiciales durante el embarazo. En un estudio realizado por Babel'ová y col., (2017), los autores concluyen que los Neo y sus productos comerciales en el ambiente de la preimplantación embrionaria puede influenciar negativamente a su desarrollo, ya que observaron disminución en la proliferación celular e incremento en la incidencia de apoptosis en blastocitos. Los autores resaltan que cambios inducidos por Neo durante el periodo de implantación podría ser considerado como un potencial factor de riesgo para la reproducción de mamíferos (Babel'ová y col., 2017).

En embarazos a término, el estrés oxidativo ha sido asociado con rupturas de membranas previo al parto y se considera que contribuye al normal desarrollo del mismo (Agrawal y col., 2005). Sin embargo, se ha considerado que el estrés oxidativo podría estar vinculado con ruptura prematura de membranas, posiblemente asociado al estado oxidativo resultante de una infección (Duhid y col., 2016). Sumado a esto, estudios *in vitro* de membranas amnióticas expuestas a antioxidantes (vitamina C y E) resultaron resistentes a daños inducidos por ERO (Plessinger y col., 2000). Asimismo, estudios de los niveles de ERO y la actividad antioxidante total de la sangre de cordón de infantes prematuros demostró que los niños prematuros tienen potencial antioxidante significativamente menor cuando se los comparó con infantes de embarazos a término (Georgeson y col., 2002). Esta

falta de capacidad antioxidante dejaría a los neonatos prematuros susceptibles a daño celular inducido por ERO, lo cual ha sido asociado con patologías como displasia broncopulmonar y retinopatía (Auten y Dacis, 2009). En estudios *in vitro* de sangre de cordón, Quintana (2017) demostró que la exposición a Ace resulta en aumento en los niveles de ERO y disminución de la capacidad antioxidante enzimática. Claramente, las patologías mencionadas previamente, podrían verse exacerbadas en escenarios de exposición a xenobióticos que tengan la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno, como los plaguicidas (Asghari y col., 2017; Wang y col., 2017) y en especial a insecticidas neonicotinoides. Este aspecto es relevante ya que, durante estadios tempranos del embarazo, el ambiente intrauterino (feto y placenta) se considera hipóxico. La placenta depende de nutrición histotrófica por lo que recibe oxígeno de la circulación materna, el cual presenta un gradiente de concentración entre la madre y el feto. A finales del primer trimestre, la tensión de oxígeno comienza a aumentar, por consiguiente, los niveles de ERO también se elevan. No obstante, las funciones fisiológicas asociadas a este aumento de prooxidantes, viene acompañada de incremento en la transcripción de enzimas antioxidantes en pos de generar un balance oxidativo. Este cambio de la tensión de oxígeno es importante para la implantación embrionaria y la angiogénesis placentaria, que más adelante determinará el crecimiento fetal (Mora y col., 2019).

Se demostró que tanto Ace como su formulación comercial presentan efectos citotóxicos, y que la exposición a estos xenobióticos resulta en aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno. Considerando que esto fue observado tanto en modelos trofoblastos de primer como de tercer trimestre de gestación (células HTR-8/SVneo y JEG-3, respectivamente); teniendo en cuenta que el periodo de gestación en el cual ocurre la exposición es determinante de los efectos tóxicos y resultados del embarazo; sumado a que el desarrollo embrionario y de la placenta durante el primer trimestre de gestación constituyen una ventana crítica de vulnerabilidad, es que se decidió continuar evaluando la toxicidad de Neo en trofoblastos HTR-8/SVneo representativos de esta primera instancia en el desarrollo del embarazo. En este sentido, Blanco-Castañeda y col. (2020) presentan una interesante revisión sobre el metabolismo de xenobióticos durante el embarazo y la

capacidad metabólica por parte de la placenta, en la cual indican que la expresión y actividad de enzimas metabolizantes CYP es significativamente mayor durante el primer trimestre que en placentas a término. Los autores sugieren que el metabolismo de xenobióticos es crucial durante la embriogénesis y organogénesis (correspondientes al primer trimestre de embarazo), cuando el embrión o feto es más susceptible a efectos teratogénicos. Este aspecto es importante si consideramos que el metabolismo de xenobióticos, como los plaguicidas, puede resultar en la generación de ERO.

Se bien se conoce relativamente poco sobre el efecto de Neo en humanos y animales. Ciertamente estos insecticidas poseen capacidad de alterar la viabilidad de distintos tipos celulares y que parte de su metabolismo resulta en la producción de especies reactivas (Cavas y col., 2012; Şenyıldız y col., 2018). Reportes sobre vías de muerte celular, alteraciones de la funcionalidad celular e incluso mecanismos de toxicidad, entre otros aspectos relevantes son escasos. En este sentido, la necrosis, apoptosis y autofagia, son mecanismos de muerte que pueden ser gatillados por contaminantes ambientales (Narayanan y col., 2015). La familia Bcl-2, tanto la proteína pro-apoptótica Bax como la anti-apoptótica Bcl-2, son importantes en la vía intrínseca de la apoptosis (Elmore, 2007). Ha sido reportado que Bax y Bcl-2 puede ser regulado por insecticidas (Hsu y col., 2019). Recientemente Abd-Elhakim y col. (2018) demostraron que en ratas la exposición al Neo imidacloprid aumentó la expresión de Bax y disminuyó la expresión de Bcl-2. Los resultados presentados en este trabajo demuestran que el tratamiento con la formulación Ace CF por 24 h incrementa la relación Bax/Bcl-2, promoviendo apoptosis. La vía intrínseca de la apoptosis puede ser gatillada por una variedad de inductores de estrés intracelular, incluyendo daño en el ADN, estrés oxidativo, radiación gamma y UV, toxinas, privación de factores de crecimiento y estrés de retículo endoplásmico (Cory y col., 2003; Guicciardi y col., 2013). El estrés oxidativo, el daño en ADN y proteínas fueron determinados luego de la exposición a Ace en este trabajo, y probablemente participen como inductores de la apoptosis en el modelo empleado. Sin embargo, otras vías de muerte celular no estudiadas aquí deberían ser tomadas en cuenta.

Ha sido postulado que cualquier sustancia puede ser considerada como neurotóxica si es capaz de alterar la señalización colinérgica normal, como la nicotina (Wang y col., 2017). Los Neo son considerados neurotóxicos ya que actúan como agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en insectos y mamíferos (Wang y col., 2017). Comparado con otras familias de insecticidas, como los OF, se cree que los Neo presentan menor toxicidad debido a su presunta selectividad con receptores nicotínicos en insectos comparado con los receptores de vertebrados (Wang y col., 2017). Si bien la placenta no es un órgano inervado, se ha demostrado que tanto el órgano como las células trofoblásticas presentan todos los componentes del sistema colinérgico, incluyendo tanto a los receptores nicotínicos como a los muscarínicos (Sastry 1997). La activación de receptores nAChR producto de la unión a ACh en células no neuronales, como trofoblastos, está vinculada a distintos procesos, como la proliferación, diferenciación y migración celular, entre otros (Beckmann y Lips 2013). En este sentido, los trofoblastos extravelosos tienen un fenotipo invasivo, por lo cual, luego de la diferenciación, migran e invaden la vasculatura materna para remodelar las arterias espirales y garantizar un correcto flujo sanguíneo, proceso de suma importancia para el desarrollo del embrión. Se ha demostrado que la línea celular HTR-8/SVneo expresa las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 1$ y $\beta 2$ de los receptores nicotínicos de acetilcolina (Chen y col., 2020). Asimismo, se ha establecido que la subunidad $\alpha 7$ de nAChR presenta un importante rol regulatorio en células no neuronales (de Jonge y col., 2007; Schraufstatter y col., 2009). En este sentido, se ha estudiado que el $\alpha 7$ nAChR media algunos de los efectos de acetamiprid en cerebro (Kimura-Kuroda 2012) y que se expresa también en la placenta (Lips y col., 2005) además de expresarse en células HTR-8/SVneo (Komine-Aizawa y col., 2015; Chen y col., 2020).

Considerando que se ha vinculado a $\alpha 7$ nAChR en la modulación de la respuesta inflamatoria en sistemas no neuronales (Hajiasgharzadeh y col., 2019; Bouzat y col., 2018; Treinin y col., 2017) y el escenario inflamatorio observado luego de la exposición a Neo, se analizó el nivel de expresión de transcritos $\alpha 7$ nAChR en trofoblastos HTR-8/SVneo. Los resultados presentados en este trabajo indican que

HTR-8/SVneo expresa $\alpha 7$ nAChR en concordancia con reportes previos, sin embargo, los insecticidas empleados Ace y Ace CF no alteraron los niveles de transcritos para $\alpha 7$ nAChR en las condiciones ensayadas.

Particularmente la migración celular ha sido asociada a la subunidad $\alpha 7$ nAChR (Schraufstatter y col., 2009). En este trabajo, estudiamos el efecto de Ace y Ace CF en la migración celular de HTR-8/SVneo. No se observaron cambios en la capacidad migratoria en las condiciones ensayadas. En trofoblastos HTR-8/SVneo, Chen y col. (2020) observaron que la nicotina impactaba en la movilidad celular disminuyendo la capacidad invasiva de esta línea celular y que este efecto está mediado por la señalización de la citoquina CXCL12 luego de la activación de $\alpha 7$ nAChR. En nuestros resultados, no observamos cambios en los niveles de expresión de esta subunidad del receptor nicotínico, así como tampoco alteración en la movilidad celular. No obstante, estudios sobre la capacidad invasiva y actividad proteínicas asociadas a este proceso (como metaloproteinasas 2 y 9) deberían ser considerados. Si bien estos resultados parecerían ser alentadores y en correlación con la idea de que los Neo serían selectivos para nAChR de insectos y no impactarían en receptores de mamíferos (Honda y col., 2006), estudios más profundos son necesarios para revelar si la activación del receptor $\alpha 7$ nAChR modula los efectos observados en la línea celular HTR-8/SVneo o si se encuentran alteradas otras subunidades de nAChR. En este sentido, se conoce que la activación de nAChR resulta en el aumento del influjo de Ca^{2+} , lo cual es subsecuentemente amplificado por el almacenamiento intracelular de Ca^{2+} (Tsuneki y col., 2000). Esto puede llevar al aumento de la liberación de especies reactivas de oxígeno. En relación a esto, Kimura-Kuroda y col. (2012) reportaron que concentraciones mayores a $1 \mu M$ de acetamiprid resultaron en aumento del influjo de Ca^{2+} en cultivos primarios de células neuronales provenientes de neonatos de ratas que expresaban $\alpha 7$ nAChR y que este efecto se inhibió frente a antagonistas de nAChR. Asimismo, se ha sugerido que imidacloprid aumenta la señalización de nAChR en neonatos de ratón (Burke y col., 2018). Por otro lado, en cultivos de neuronas del hipocampo, en un modelo de inhibición de la glucólisis, se estudió que el aumento de calcio intracelular

modulado por el receptor N-metil-D-aspartato estimula la producción de ERO, resultando en muerte celular (Hernández-Fonseca y col., 2008).

Cambios en el balance oxidativo, tales como el incremento de especies reactivas, disminución en el sistema antioxidante o ambos, puede alterar la integridad celular. Los sistemas antioxidantes celulares consisten en componentes no enzimáticos, como el glutatión (GSH), y componentes enzimáticos como las enzimas SOD, CAT, GST, entre otras, las cuales conjuntamente contribuyen a reducir el estado oxidativo en la célula (Mehta y Gowder, 2015). Nuestros resultados indican que en trofoblastos HTR-8/SVneo, Ace incrementó la producción de ERO y disminuyó la actividad de la enzima CAT, principalmente a 24 h de exposición a la concentración más alta evaluada. La formulación comercial estudiada en este trabajo también indujo desbalance redox, mostrando una mayor y más rápida respuesta en la producción de ERO incluso a concentraciones más bajas comparado con el PA. Asimismo, alterando otros componentes de la defensa antioxidante como la enzima SOD. Chakroun y col. (2016) reportaron en un modelo murino de exposición, que la actividad de SOD y CAT disminuyó en hígado de rata luego de exposiciones subcrónicas a Ace. Otros autores han reportado que la administración de Ace a ratas Wistar redujo significativamente la actividad de CAT, pero aumentó la actividad de SOD, en cerebro (Gasmi y col., 2017). En otros organismos, como el mejillón mediterráneo (*Mytillus galloprovincialis*), expuestos al PA tiametoxam y a una formulación comercial, resultaron en la inhibición de la actividad de CAT luego de la exposición aguda a tiametoxam y la inhibición de CAT y SOD en tratamientos con el formulado comercial, denotando diferencias en el impacto sobre las defensas antioxidantes del PA y el formulado comercial (AlzbetaAstara y col., 2020). Diferencias en el modelo experimental empleado para estudiar el efecto de Neo en la respuesta antioxidante pueden ser la razón de las diferencias en las actividades enzimáticas de CAT y SOD observadas en este trabajo de tesis, en comparación a reportes previos. Sin embargo, el incremento de ERO y el estrés oxidativo es un aspecto compartido en cuanto a la toxicidad de Neo, en particular Ace, en la mayoría de los modelos experimentales incluido los empleados en esta tesis (Chakroun y col., 2016; Gasmi y col., 2017; Kong y col., 2017; Wang y col., 2017).

La enzima glutatión S-transferasa (GST), una familia de enzimas de detoxificación de fase II, protege las macromoléculas celulares del ataque de reactivos electrofílicos. Específicamente, GST cataliza la conjugación de GSH a una amplia variedad de componentes electrofílicos tanto endógenos como exógenos (Townsend y Tew 2003). El sistema GST participa en la detoxificación no solo de drogas y agentes químicos sino también de biomoléculas reactivas internas (Deyashi y Chakraborty 2016), en este sentido ayuda a mantener el desarrollo de las funciones normales de la célula. Se ha indicado la importancia de GST en la regulación de vías de señalización (quinasa c-Jun, quinasa estimulante de la apoptosis 1, factor 2 asociado a receptor de TNF), además de la regulación de canales iónicos teniendo un rol importante en la fisiología celular (Board 2007). En modelos murinos GST-deficientes se ha asociado el rol de GST en procesos de carcinogénesis (en piel y pulmón) principalmente asociados a ausencia de su función detoxificante (Henderson y Wolf, 2005). Nuestros resultados indican que la actividad de GST mostró una disminución significativa luego del tratamiento de trofoblastos HTR-8/SVneo con Ace CF por 24 h. En contraste, el contenido total de GSH no se vio alterado como resultado de la exposición a Ace y Ace CF. Resultados similares han sido reportados en estudios relacionados a la exposición a agentes tóxicos y plaguicidas (Gunderson y col., 2018). Henderson y col. (2000) reportan que la N-acetil-p-benzoquinoneimina (un metabolito del analgésico paracetamol) puede ser detoxificado por medio de la conjugación no enzimática con GSH y por conjugación con GSH catalizada por GST. Frente a una sobredosis, rápida depleción de GSH y aumento de la N-acetil-p-benzoquinoneimina, resulta en estrés oxidativo, daño celular y muerte. Los autores estudian el rol de GST en la hepatotoxicidad del paracetamol en un modelo de ratón que expresa GST, comparado con un modelo GST-deficiente. Si bien no observan diferencias en los efectos hepatotóxicos en ambos modelos, si observan que luego de una rápida disminución de GSH, solo el modelo GST-deficiente recupera los niveles normales de GSH (Henderson y col. 2000). La ausencia de GST en el modelo deficiente parecería demostrar una capacidad hepática aumentada para mantener la homeostasis de GSH frente al estrés oxidativo, quizás en parte debido a que no se observaron

cambios en los niveles de glutamato cisteína ligasa y glutatión sintetasa, enzimas encargadas de la biosíntesis de GSH y que favorecerían la homeostasis de GSH (Denzoin Vulcano y col., 2013).

La alteración de proteínas como resultado del estrés oxidativo, es un proceso irreversible. En este sentido, los productos avanzados de oxidación proteica (PAOP) son un biomarcador de daño oxidativo de proteínas ampliamente conocido (Gryszczynska y col., 2017). Por otro lado, el ensayo de medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), mide la concentración de malondialdehído que es producido debido a la degradación de peróxidos lipídicos inestables (Dasgupta y Klein 2014). Asimismo, el ensayo de cometa alcalino es un método ampliamente elegido para la medición de daño en ADN en células humanas, y constituye un ensayo sensible para la detección de genotoxicidad causado por diversos plaguicidas incluyendo los Neo (Calderón-Segura y col., 2012; Kocaman y Topaktas 2007; Quintana 2017). Los resultados presentados en este trabajo indican que el principio activo Ace indujo la oxidación de proteínas luego de 24 h de exposición a la concentración más alta ensayada. En contraste, la exposición de trofoblastos HTR-8/SVneo al formulado comercial Ace CF resultó en una marcada alteración en la oxidación de proteínas, en la peroxidación de lípidos e incluso en el daño en el ADN. En este sentido, los insecticidas Neo han sido vinculados con el daño genotóxico (Costa y col., 2009), de hecho, la incubación con 500 μM de Ace por 24 h indujo daño en ADN en células SH-SY5Y (Senyildiz y col., 2018). En este trabajo, la concentración más alta empleada de Ace (100 μM) no indujo daño genotóxico, mientras que todas las concentraciones ensayadas del formulado comercial resultaron en cambios en por lo menos dos marcadores de daño oxidativo.

La funcionalidad de las células que conforman la placenta, particularmente los trofoblastos, es clave para el desarrollo de la misma. La regulación de procesos como la apoptosis de células trofoblásticas ha sido asociada a complicaciones durante el embarazo como la pre eclampsia (Sharp y col., 2010). De hecho, se ha sugerido que el estrés oxidativo durante la pre eclampsia y el impacto de ERO en

macromoléculas incrementaría la apoptosis de trofoblastos (Murata y col., 2013). En condiciones normales, la producción de ERO es acompañada de aumento de actividad antioxidante para contrarrestar los efectos nocivos. Sin embargo, si la capacidad de sintetizar nuevos antioxidantes no es suficiente para atacar el exceso de ERO, el estrés oxidativo resulta en daño en ADN, oxidación de proteínas y peroxidación lipídica. El ADN es vulnerable al daño oxidativo ya que puede producir rupturas en las hebras e interferir en el plegamiento de la cromatina, en la transcripción e incluso alterar el proceso de reparación del ADN. El daño oxidativo a proteínas puede resultar en el plegado anormal del retículo endoplásmico o pérdida de funciones de enzimas y receptores en las membranas. La peroxidación lipídica afecta a la función normal de la célula ya que se puede producir la pérdida de la fluidez de la membrana. Estos efectos pueden llevar al daño y muerte celular (Schoots y col., 2018). Sumado a esto se ha asociado el aumento de ERO con la disminución de la diferenciación, expresión proteica y capacidad invasiva de trofoblastos extravelosos (Murata y col., 2013). La diferenciación e invasión de trofoblastos extravelosos durante estadios tempranos del embarazo, como la línea celular empleada en esta tesis, son procesos esenciales para el establecimiento normal de la circulación materno-fetal (Red-Horse y col., 2004). Si bien nuestros resultados indican que Ace y Ace CF no afectarían la capacidad migratoria de trofoblastos HTR-8/SVneo, si se observó disminución de la viabilidad e incluso aumento en la relación Bax/Bcl-2 indicando que, al menos en parte, la apoptosis sería una vía de muerte asociada a la exposición a estos xenobióticos. Además, estos efectos se observaron en un contexto de estrés oxidativo y daño a macromoléculas. En este sentido, distintas patologías del desarrollo pueden ser un resultado de la formación excesiva de ERO, tanto por mecanismos endógenos o bien por el metabolismo de xenobióticos, que dañan oxidativamente macromoléculas e incluso alterar la transducción de señales que traen como consecuencia disfunción celular, muerte intrauterina o teratogenicidad (Viada Pupo y col., 2017). Se ha demostrado que la exposición a oxidantes y el impacto de estos en macromoléculas durante el primer trimestre de embarazo se asocia con un mayor riesgo de anomalías congénitas graves, debido a que la mayoría de los órganos

vitales del embrión están en desarrollo y algunos comienzan a ser funcionales durante este periodo (Imosemi 2013).

Con el objetivo de evaluar si efectivamente el estrés oxidativo es un mecanismo de toxicidad en trofoblastos, previo al tratamiento con Neo la línea celular HTR-8/SVneo fue preincubada con un reconocido antioxidante: N-acetil-L-cisteína (NAC). La muerte celular y el daño en biomoléculas observado previamente con Ace y Ace CF fueron prevenidos en presencia de NAC, claramente indicando que el estrés oxidativo es al menos un mecanismo involucrado en la toxicidad de acetamiprid en trofoblastos HTR-8/SVneo. Estudios realizados en trofoblastos HTR-8/SVneo en un modelo de hipoxia-reperfusión, Ebeboni (2018) observó que el estrés oxidativo sería el responsable de los efectos observados en la pérdida de la viabilidad celular e inducción de apoptosis, ya que el tratamiento con flavonoides (conocidos antioxidantes) presentó un efecto protector evitando la pérdida de viabilidad y reduciendo la activación de caspasas. Por otro lado, NAC ha mostrado tener efectos protectores frente a estrés oxidativo y daño en otros modelos. En células epiteliales de intestino de cerdo expuestas a la micotoxina zearalenona, el pretratamiento con NAC previno parcialmente el daño oxidativo y la inducción de apoptosis observada con la micotoxina (Wang J. y col., 2018). Sumado a esto, en un modelo de ratas resistentes a la insulina, donde el estrés oxidativo juega un rol importante en la funcionalidad de las glándulas salivales, la incorporación a la dieta de NAC ayudó a aumentar la capacidad antioxidante total en las glándulas sublinguales y parótidas en comparación al grupo control y particularmente protegió a la glándula parótida del daño oxidativo observado en el grupo no tratado con NAC (Żukowski y col., 2018).

La exposición humana a plaguicidas es un escenario complejo, sin embargo, es reconocido que los seres humanos están expuestos a formulaciones comerciales más que a principios activos puros (Mesnage y col., 2014). Calderón-Segura y col., (2012) reportaron que la exposición a formulaciones comerciales de distintos neonicotinoides como Jade (imidacloprid), Gaucho (imidacloprid), Calypso (tiacloprid) y Poncho (clotianidina), disminuyeron significativamente la viabilidad

celular e incrementaron el daño en el ADN de linfocitos humanos. Acetamiprid es un compuesto ampliamente utilizado en la agricultura, el cual fue inicialmente comercializado en Japón por Nippon Soda en 1995. Este insecticida es comercializado a nivel mundial bajo distintas formulaciones como Mospilan®, Epik®, Assail® y Chipco™ (Renaud y col., 2018). Los resultados de esta tesis doctoral, están en relación a los previamente reportados por Mesnage y col., (2014), demostrando que las formulaciones comerciales de plaguicidas resultan ser más tóxicas para células humanas que sus respectivos principios activos declarados. Las formulaciones de plaguicidas son declaradas como un porcentaje de su principio activo y un porcentaje de otros ingredientes. Para la formulación comercial utilizada en este trabajo, algunas marcas comerciales especifican que además de acetamiprid, contienen silica gel (7,1-7,9%) y arcillas de la familia de las caolinitas (5-15%). Estos ingredientes ayudarían a incrementar la solubilidad del insecticida, aumentar su estabilidad, favorecer su penetración en insectos y protegerlos de la degradación (Szekacs y Darvas 2012) y, como se demostró en el desarrollo de esta tesis, también contribuirían a la toxicidad del PA.

En general, las personas estamos expuestas a mezclas (dos o más) de sustancias tóxicas. Este contacto puede darse durante procesos de producción, distribución o utilización de distintos productos como medicamentos, alimentos, productos de limpieza, plaguicidas, formulaciones industriales y distintos artículos para el hogar, incluso cuando alguna de estas sustancias es desechada en el ambiente e indirectamente estar en contacto con las mismas. Por lo general, las sustancias comercializadas son aprobadas previos ensayos de toxicidad en modelos animales. Lamentablemente, los ensayos regulatorios están abocados a evaluar los efectos tóxicos de los PA dejando muchas veces de lado que las formulaciones comerciales contienen sustancias que acompañan al PA, lo que comúnmente se denomina “inertes”. Usualmente para preservar las fórmulas de los productos, en las hojas de seguridad de las formulaciones comerciales no se detalla exhaustivamente el contenido y cantidad de sustancias que acompañan al PA, de esta manera resulta difícil evaluar las posibles interacciones entre PA e inertes y la toxicidad resultante sobre los organismos. Ciertamente, en los últimos años ha aumentado la

cantidad de datos que sustentan el hecho de que las formulaciones comerciales resultan más tóxicas que el principio activo por sí mismo. En este contexto deberíamos apuntar a que los ensayos regulatorios también contemplaran esta complejidad.

Los resultados expuestos demuestran el efecto de Neo en la inducción de estrés oxidativo, aumentando la producción de ERO y disminuyendo la capacidad antioxidante, así como su impacto en moléculas de importancia biológica como las proteínas, lípidos e incluso el ADN. Por lo expuesto en esta tesis, existe una relación entre el desbalance oxidativo y la modulación de la respuesta innata de trofoblastos. En este sentido, un escenario prooxidante podría verse vinculado a la liberación de citoquinas con un perfil proinflamatorio (como lo serían IL-6, TNF- α , entre otras) e impactar sobre el desarrollo normal del embarazo. Si bien en esta sección no estudiamos el balance de citoquinas, resulta importante continuar estudiando la respuesta inmune innata. Evaluar el balance de citoquinas y las vías de señalización asociadas a receptores nicotínicos en trofoblastos expuestos a Neo, son un aspecto sumamente importante para esclarecer el impacto de estos xenobióticos sobre la placenta y el desarrollo del embarazo.

7. Conclusión

La exposición de trofoblastos a xenobióticos como plaguicidas OF y Neo, entre otros, puede resultar en muerte celular, alteración en los niveles de especies reactivas, disminución en la capacidad antioxidante. Incluso pueden impactar en la capacidad de responder frente a daños que pueden alterar la homeostasis y el correcto funcionamiento de la placenta, como lo es el efecto sobre la respuesta inmune innata. Los principales hallazgos de esta tesis se resumen en la Figura 44.

Los resultados hallados en este trabajo indican que el organofosforado clorpirifos tiene la capacidad de impactar sobre la respuesta inmune innata de trofoblastos humanos, además de impactar sobre el blanco clásico de acción (la enzima acetilcolinesterasa). Se hallaron niveles basales de la actividad AChE en trofoblastos HTR-8/SVneo, la cual fue inhibida en presencia de clorpirifos dando cuenta la biotransformación a su metabolito oxón. El impacto de clorpirifos, o bien su metabolito oxón, se vio reflejado en el aumento en los niveles de transcripción de receptores vinculados a la inmunidad innata, como los TLR, en condiciones en las que clorpirifos inhibió la enzima. Esto daría cuenta de que la modulación de TLR estaría en parte dada por la bioactivación de clorpirifos. Asimismo, se demostró que clorpirifos induce aumentos en citoquinas proinflamatorias como IL-6 y que esto fue acompañado de aumento de citoquinas antiinflamatorias como TGF- β , probablemente como respuesta para atenuar el posible escenario inflamatorio resultante.

Por otro lado, este trabajo claramente demuestra que el neonicotinoide acetamiprid y la formulación comercial estudiada son tóxicos para trofoblastos humanos del primer y tercer trimestre de gestación (HTR-8/SVneo y JEG-3). Además, la formulación comercial resultó en ser más tóxica que el principio activo. Los efectos dañinos generados por Neo en trofoblastos del primer trimestre son particularmente importantes ya que el éxito de un embarazo dependerá del correcto desarrollo de la placenta y el feto en este periodo.

Es importante reconocer que este estudio aborda el estudio de toxicidad de OF y Neo en modelos *in vitro* de trofoblastos humanos, por ello no deben dejarse de lado las diferencias existentes entre los cultivos celulares y la complejidad de un órgano

u organismo. En un escenario *in vivo* el compuesto parental coexiste con sus metabolitos y que la toxicidad de clorpirifos o acetamiprid podría estar mediada por estos, por el insecticida parental, o por ambos. Sumado a esto, sería relevante estudiar los efectos *in vitro* inducidos por concentraciones más bajas o incluso durante exposiciones repetidas y prolongadas, ya que el patrón de efectos podría ser diferente.

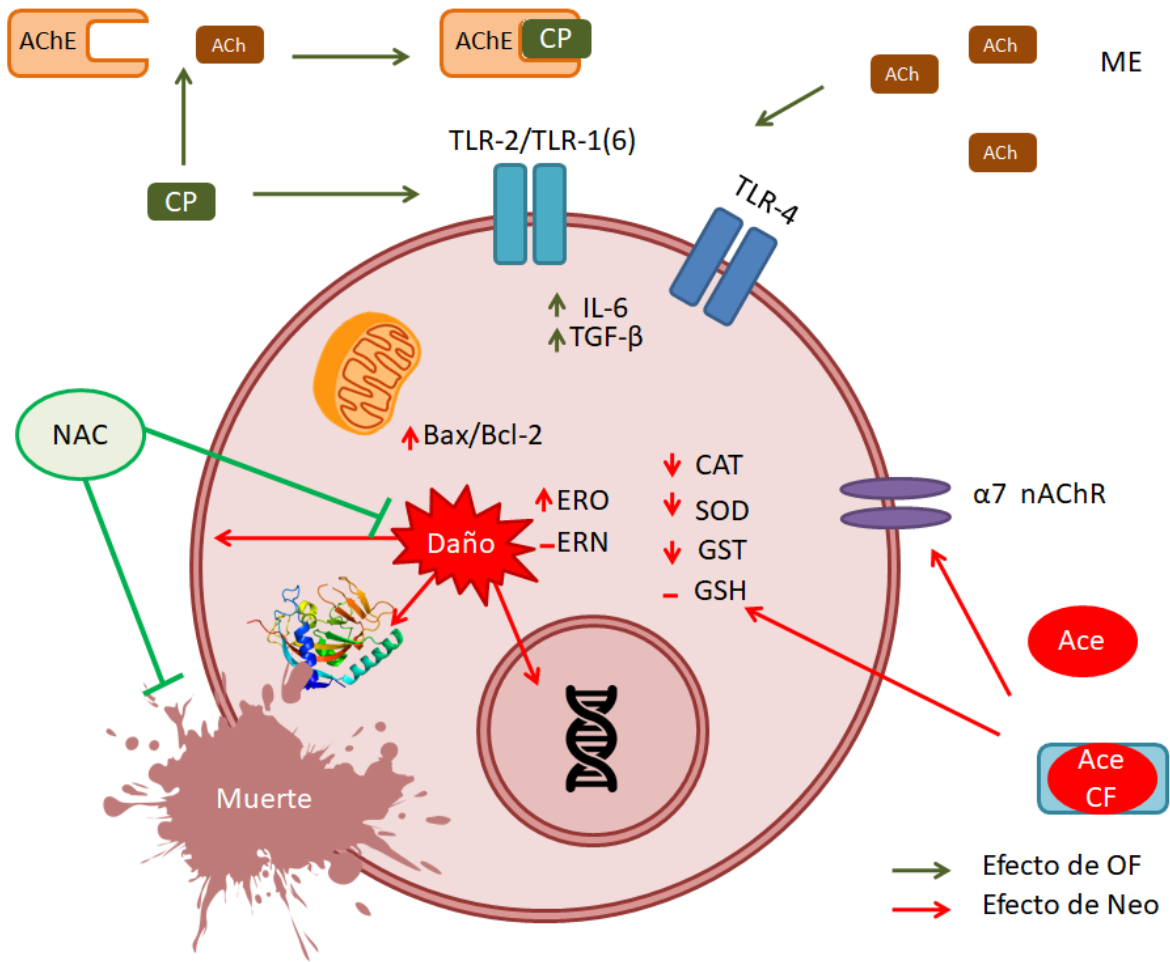


Figura 44: Efectos de los insecticidas organofosforados y neonicotinoides sobre trofoblastos humanos. AChE: acetilcolinesterasa, ACh: acetilcolina, CP: clorpirifos (luego de su bioactivación a CP-oxón, capaz de inhibir AChE), TLR: receptores tipo toll, nAChR: receptores nicotínicos de ACh, ERO: especies reactivas de oxígeno; ERN: especies reactivas de nitrógeno, Ace: acetamiprid, Ace CF: acetamiprid formulación comercial, CAT: catalasa, GST: glutatión S-transferasa, SOD: superóxido dismutasa, NAC: N-acetil l-cisteína, ME: medio extracelular.

8. Bibliografía

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2008). Sección I: Introducción al sistema inmunitario: Propiedades generales de las respuestas inmunitarias e inmunidad innata en: *Inmunología celular y molecular*; p 3-46. Sección IV: Mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria: Citocinas en: *Inmunología celular y molecular*. Elsevier España, Madrid 6ª Edición. p 267-301.

Abd-Elhakim, Y.M., Mohammed, H.H., Mohamed, W.A.M., (2018). Imidacloprid impacts on neuro behavioral performance, oxidative stress, and apoptotic events in the brain of adolescent and adult rats. *J. Agric. Food Chem.* 66, 13513–13524. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05793>.

Abrahams VM, Bole-aldó P, Kim YM, Chaiworapongsa T, Straszewski-Chavez SL, Romero R. (2004) Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by Toll-like receptors. *J Immunol*;173:4286e96.

Abrahams VM, Mor G. (2005). Toll-like receptors and their role in the trophoblast. *Placenta*. 2005 Aug;26(7):540-7. doi: 10.1016/j.placenta.2004.08.010. PMID: 15993703.

Abrahams VM. (2011) The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. *J Reprod Immunol*. 2011 Mar;88(2):112-7. doi: 10.1016/j.jri.2010.12.003. Epub 2011 Jan 31. PMID: 21277024.

Abu-Qare AW and Abou-Donia MB. (2001). Inhibition and recovery of maternal and fetal cholinesterase enzyme activity following a single cutaneous dose of methyl parathion and diazinon, alone and in combination, in pregnant rats. *J Appl Toxicol*. 2001 Jul-Aug;21(4):307-16. doi: 10.1002/jat.761. PMID: 11481665.

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). (2008). Uso de Clorpirifos. Recuperado el 12 de octubre de 2020. Disponible online en: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/BO/Disposicion_7146-2017.pdf. Recuperado 25 de octubre de 2017.

Agarwal A, Gupta S and Sharma RK. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 28

Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 3, 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>

Akira S, Takeda K, Kaisho T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675-680.

Aktar, W., Sengupta, D. and Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, (1994). *Molecular biology of the cell*. Garland, New York, London.

Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.*;89(1):73–120.

Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*; 42:1634–1650.

Alzbeta Stara, MP., Capillo G., Fabrello J., Sandova M., Albano M., Zuskova E., Velisek J., Matozzo V. y Faggio C., (2020). Acute effects of neonicotinoid insecticides on *Mytilus galloprovincialis*: A case study with the active compound thiacloprid and the commercial formulation calypso 480 SC, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 203:10980, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110980>

Andersson U, Tracey KJ (2012) Neural reflexes in inflammation and immunity. *J Exp Med* 209: 1057–1068.

Apaza Valencia, John. (2014). Desarrollo placentario temprano: aspectos fisiopatológicos. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 60(2), 131-140. Recuperado en 07 de septiembre de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322014000200006&lng=es&tlng=es

Apaza Valencia, John. (2014). Desarrollo placentario temprano: aspectos fisiopatológicos. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 60(2), 131-140. Recuperado en 07 de septiembre de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322014000200006&lng=es&tlng=es.

Aprioku, J. S., & Ogwo-Ude, E. M. (2018). Gestational Toxicity of Calabash Chalk (Nzu) in Wistar Rats. *International journal of applied & basic medical research*, 8(4), 249–252. https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR_412_17

Asghari, M.H., Moloudizargari, M., Bahadar, H., Abdollahi, M., (2017). A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 13, 545–554. <https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1214712>.

Assail 70WP SDS, Nippon Soda CO. LTD. Recuperado el 7 de octubre de 2020. Disponible online en https://www.enableinfotech.com/MSDS/MSDS_E_17.pdf

Auten RL y Davis JM., (2009). Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatric Research* 66(2):121-128. DOI: 0031-3998/09/6602-0121

Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas de los Ríos Limay, Neuquén y Río Negro (AIC), (2012). Monitoreo de agroquímicos en la cuenca. Unidad de Gestión de la Calidad del Agua. Recuperado el 18 de septiembre de 2020 Disponible en: <https://www.altec.com.ar/download/archivos/00000469.pdf?1600439871>

Babel'ova, J., Sefčíková, Z., Cikos, S., Spirková, A., Kovariková, V., Fabian, D., (2017). Exposure to neonicotinoid insecticides induces embryotoxicity in mice and rabbits. *Toxicology* 392, 71–80.

Bal, R., Erdogan, S., Theophilidis, G., Baydas, G., & Naziroglu, M. (2010). Assessing the effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the cholinergic synapses of the stellate cells of the mouse cochlear nucleus using whole-cell patch-clamp recording. *NeuroToxicology*, 31, 113–120.

Ballantyne B. and Marrs T.C. (1992). Overview of the biological and clinical aspects of organophosphates and carbamates. In: Ballantyne B, Marrs TC, eds. *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates*. Oxford: Butterworth Heinemann, 3–14.

Barañao RI., (2011). Inmunología del embarazo. *Investclín* 52(2): 175-194. Disponible el 20 de julio de 2020 en http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332011000200008&lng=es&nrm=iso.

Barry, R. C. et al. (2009). "Nanotechnology-Based Electrochemical Sensors for Biomonitoring Chemical Exposures." *Journal of exposure science & environmental epidemiology* 19(1): 1–18.

Bass C y Field L.M, (2018). Neonicotinoids. Quick guide. *Current Biology* 28: 761-783.

Beauchamp, C., Fridovich, I., (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 287, 276–287.

Beckmann J, Lips K, (2013). The Non-Neuronal Cholinergic System in Health and Disease. *Pharmacology*; 92:286-302. doi: 10.1159/000355835

Beijar EC, Mallard C, Powell TL. (2006). Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. *Placenta* 27: 322–326

Bérubé J, Bourdon C, Yao Y, Rousseau S. (2009). Distinct intracellular signaling pathways control the synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2, TLR3 or NOD1 activated human airway epithelial cells. *Cell Signal*; 21:448-456.

Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. (2003). How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol*; 74: 479-485.

Bevilacqua E., Zago Gomes S., Rodrigues Lorenzon A., Sandra Hoshida M. y Amarante-Paffaro A.M., (2012). NADPH oxidase as an important source of reactive oxygen species at the mouse maternal–fetal interface: putative biological roles. *Reproductive BioMedicine Online* 25: 31– 43.

Bhuiyan MB, Murad F, Fant ME (2006). The placental cholinergic system: localization to the cytotrophoblast and modulation of nitric oxide. *Cell Commun Signal* 4:4. doi: 10.1186/1478-811X-4-4

Bhuiyan, Md B., F. Murad, and M. E. Fant. (2006). The Placental Cholinergic System: Localization to the Cytotrophoblast and Modulation of Nitric Oxide. *Cell communication and signaling: CCS* 4: 4.

Bilban, M., Tauber, S., Haslinger, P., Pollheimer, J., Saleh, L., Pehamberger, H., Wagner, O., and Knofler, M. (2010). Trophoblast invasion: Assessment of cellular models using gene expressionsignatures. *Placenta* 31, 989–96

Billingham RE, Brent L, Medawar PB. (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*; 172(4379):603-606.

Biondi C, Pavan B, Lunghi L, Fiorini S, Vesce F. (2005). The role and modulation of the oxidative balance in pregnancy. *CurrPharm Des.*;11:2075-89.

Bird MD, Karavitis J, Kovacs EJ. (2008). Sex differences and estrogen modulation of the celular immune response after injury. *Cell Immunol*; 252(1-2):57-67.

Blanco-Castañeda R, Galaviz-Hernández C, Souto PCS, Lima VV, Giachini FR, Escudero C, Damiano AE, Barragán-Zúñiga LJ, Martínez-Aguilar G, Sosa-Macías M. (2020). The role of xenobiotic-metabolizing enzymes in the placenta: a growing research field. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2020 Mar;13(3):247-263. doi: 10.1080/17512433.2020.1733412. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32129110.

Board PG., (2007). The use of glutathione transferase-knockout mice as pharmacological and toxicologicalmodels. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*3(3):421-33. doi: 10.1517/17425255.3.3.421. PMID: 17539748.

Bodin, J., Stene, L.C., Nygaard, U.C., (2015). Can exposure to environmental chemicals increase the risk of diabetes type 1 development? *Biomed Res. Int.* 2015, 208947.

Borovikova, L.V., Ivanova S., Zhang M., Yang H., Botchkina G.I., Watkins L.R., Wang H., Abumrad N., Eaton J.W. y Tracey K.J., (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405(6785):458–462.

Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. (2005). Sex hormones and theimmune response in humans. *Hum ReprodUpdate*; 11(4): 411-423.

Bouzat, C., Lasala, M., Nielsen, B.E., Corradi, J., Esandi, M.D.C., (2018). Molecular function of $\alpha 7$ nicotinic receptors as drug targets. *J. Physiol. (Paris)* 15 (10), 1847–1861. <https://doi.org/10.1113/JP275101>. 596.

Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Bradman A., Whitaker D., Quirós L., Castorina R., Henn B. C., Nishioka M., Morgan J., Barr D. B., Harnly M., Brisbin J. A., Sheldon L. S., Mckone T. y Eskenazi B., (2011). Determinants of organophosphorous pesticide urinary metabolite levels in Young children living in anagricultural community. *Int. J Environ Res PublicHealth* 8(4): 1061-1083

Brady TC, Chang LY, Day BJ, Crapo JD. (1997). Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation. *Am J Physiol.*;273(5 Pt 1):L1002-6.

Bulgaroni V, Rivero-Osimani V, Dulgerian L, Cerbán F, Rivero V, Magnarelli G, Guiñazú N., (2013). Environmental pesticide exposure modulates cytokines, arginase and ornithine decarboxylase in human placenta. *Reprod Toxicol.*39:23-32.

Bulgaroni V., Rovedatti M.G., Sabino G. y Magnarelli G., (2012). Organophosphate pesticide environmental exposure: analysis of salivary cholinesterase and carboxylesterase activities in preschool children and their mothers. *Environ Monit Assess.* 184(5):3307-14.

Burke, A.P., Niibori, Y., Terayama, H., Ito, M., Pidgeon, C., Arsenault, J., Camarero, P.R., Cummins, C.L., Mateo, R., Sakabe, K., Hampson, D.R., (2018). Mammalian susceptibility to a neonicotinoid insecticide after fetal and early postnatal exposure. *Sci. Rep.* 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35129-5>.

Bustos, P.S., Deza-Ponzio, R., Páez, P.L., Albesa, I., Cabrera, J.L., Virgolini, M.B., Ortega, M.G., (2016). Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress in vitro and in vivo in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 48, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.11.004>.

Buszewski, B., Bukowska, M., Ligor, M. et al. (2019). A holistic study of neonicotinoids neuroactive insecticides—properties, applications, occurrence, and analysis. *Environ Sci Pollut Res* 26, 34723–34740 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06114-w>

Calamari, D. y Barg, U. (1993). Hazard assessment of agricultural chemicals by simple simulation models. En: *Prevention of Water Pollution by Agriculture and Related Activities*. Actas de la Consulta de Expertos de la FAO, Santiago, Chile, 20-23 de octubre de 1992. *Water Report* 1. FAO, Roma. págs. 207-22

Calderón-Segura, M.E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Calderón-Ezquerro, M., del C., Cortés-Eslava, J., García-Martínez, R., Flores-Ramírez, D., Rodríguez-Romero, M.I., Méndez-Pérez, P., Bañuelos-Ruiz, E., (2012). Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to neonicotinoid insecticides. *Toxicol. News. J. Toxicol.*, 11. <https://doi.org/10.1155/2012/612647>.

Cárdenas-Rodríguez N y Pedraza-Chaverri J, (2005). Especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante: aspectos básicos. *Profesores al día, Biomedicina. Educación Química* 17 (2): 164-173

Cárdenas-Rodríguez N, Chirino Y y Pedraza-Chaverri J, (2006). El óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno: aspectos básicos e importancia biológica. *Profesores al día, Biomedicina. Educación Química* 17 (4): 443-451

Carlson BM., (2014). Embriología humana y biología del desarrollo. Quinta edición. España, Elsevier. ISBN (original) 978-1-4557-2794-0

Carmichael SL., Yang W., Roberts E., Kegley SE., Padula AM., English PB., Lammer EJ. and Shaw GM., (2014). Residential agricultural pesticide exposures and risk of selected congenital heart defects among offspring in the San Joaquin Valley of California, *Environ. Res.*, 2014, 135, 133-138.

Caron-Beaudoin E, Viau R, Sanderson JT. (2018). Effects of neonicotinoid pesticides on promoter-specific aromatase (CYP19) expression in Hs578t breast cancer cells and the role of the VEGF Pathway. *EnvironHealthPerspect.*; 126:047014 10.1289/EHP2698

Carrizales L., Batres L., Ortiz M., Mejía J., Yañez L., García E., Reyes H. and Diaz Barriga F. (1999). Efectos en salud asociados con la exposición a residuos peligrosos. *Scientiae Naturae* 3, 5-28.

Casanueva E. Viteri F. (2003). Iron and Oxidative Stress in Pregnancy. *J Nutr.* 133:1700-08.

Casida J. & Quistad G. (2005). Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chemico-Biological Interactions*, 157-158: 277-283.

Castro, G. (2013). Mecanismos de Daño Celular Por Tóxicos. Metabolitos Reactivos. Interacciones Con Macromoléculas. Peroxidación de Lípidos. Estrés Oxidativo. Necrosis. Apoptosis. In *Curso a Distancia de Toxicología I: "Toxicocinética. Mecanismos de Toxicidad"*

Castro, J. A. (1985). Biotransformación de Sustancias Extrañas Al Organismo. Reacciones Y Enzimas Involucradas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 19(2): 201–13.

Çavaş, T., Çinkiliç, N., Vatan, Ö., Yılmaz, D., Coşkun, M., (2012). In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and γ H2AX foci assays. *Pestic. Biochem. Physiol.* 104, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.08.004>.

Cecchi A., Rovedatti M.G, Sabino G.A. Y Magnarelli G.G., (2012). Environmental exposure to organophosphate pesticides: assessment of endocrine disruption and hepatotoxicity in pregnant women. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80: 280-287.

Chaddha, V., S. Viero, B. Huppertz, and J. Kingdom. (2004). "Developmental Biology of the Placenta and the Origins of Placental Insufficiency." *Seminars in fetal & neonatal medicine* 9(5): 357–69.

Chakraborty, S. et al. (2009). Chronic Exposures to Cholinesterase-Inhibiting Pesticides Adversely Affect Respiratory Health of Agricultural Workers in India. *Journal of occupational health* 51(6): 488–97.

Chakroun, S., Ezzi, L., Grissa, I., Kerkeni, E., Neffati, F., (2016). Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environ. Sci. Pollut. Res* 25191–25199. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7650-9>.

Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF III, Petraglia F. (2009) Inflammation and pregnancy. *ReprodSci*; 16:206–215.

Chambers J.E., Carr R.L., Boone S. Y Chambers H.W., (2001). The metabolism of organophosphorus insecticides. *Handbook of Pesticide Toxicology*, Ed. II, Academic Press, USA 2 pp: 919–927.

Chaouat G. (2003). Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. *Clin Exp Immunol*; 131(3):393-395.

Chen CY, Cordeaux Y, Hill SJ, King JR, (2003). Modelling of signalling via G-protein coupled receptors: pathway-dependent agonist potency and efficacy. *Bull Math Biol* 2003; 65: 933-58.

Chen D., Zhan Y., Lv B., Liu Z., Han J., Li J., Zhao Y. y Wu Y. (2020). Dietary exposure to neonicotinoid insecticides and health risks in the Chinese general population through two consecutive total diet studies. *Environment international* 135. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105399>

Chen J., Qui M., Huang Z., Chen J., Zhou C., Han F., Qu Y., Wang S., Zhuang J y Li X., (2020). Nicotine suppresses the invasiveness of human trophoblast by downregulation of CXCL12 expresión through the alpha-7 subunit of the niconic acetylcholine receptor. *Reproductive Sciences* 27:916–924

Chiapella, G. et al. (2013). “The Organophosphate Chlorpyrifos Disturbs Redox Balance and Triggers Antioxidant Defense Mechanisms in JEG-3 Cells.” *Placenta* 34(9): 792–98.

Chie K., Hiroyuki I., Takashi N. y Gen-Ichiro S., (2009). ROS and innate immunity. *Anticancer Research* 29(3): 817-821.

Choi H.S.; Kim J.W.; Cha Y. y Kim K., (2006). A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *Journal of Immuno assay and Immuno chemistry*, 27(1): 31-44

Choudhury RH., Dunk CE., Lye SJ., Aplin JD., Harris LK. Y Jones R., (2017). Extravillous trophoblast and endothelial cell crosstalk mediates leukocyte infiltration to the early remodelin decidual spiral arteriole wall. *J Immunol.* 2017 May 15;198(10):4115-4128. doi: 10.4049/jimmunol.1601175

Chung DM, (1989). Neurotransmitter receptors and phosphoinositide turnover. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*; 29: 71-110.

Cichón L. y Garrido S., (2012). Implicancia en el manejo sanitario de frutales de pepita en el Alto Valle. INTA, Estación Experimental Alto Valle, 67: 8-15. Recuperado el 19 de septiembre 2020, disponible online en https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-manejo-sanitario_fd_67.pdf

Cichón L., Garrido S.A. and Araque L. (2015). Residuos y tolerancias de insecticidas para el control de plagas de frutales de pepita. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [online]. http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_residuos-y-tolerancias-de-insecticidas_actualizacion-2015_0.pdf 21/08/2018

Cichón L., Rossini M. y Garrido S., (2013). Guía para el diseño de programas fitosanitarios en manzanos – Temporada 2012-2013. INTA, EEA Alto Valle

Cichón, L., Araque, L., Garrido, S., Lago, J., (2017). Residuos Y Tolerancias De Insecticidas Para El Control De Plagas De Frutales De Pepita En El Alto Valle De Río Negro Y Neuquén - Actualización 2017.

Cimino, A.M., Boyles, A.L., Thayer, K.A., Perry, M.J., (2017). Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review. *Environ. Health Perspect.* 125, 155–162. <https://doi.org/10.1289/EHP515>

Cocca C., Ventura C., Nuñez M., Randi A., y Venturino A., (2015). El organofosforado clorpirifos como disruptor estrogénico y factor de riesgo para el cáncer de mama. *Acta Toxicol. Argent.* 23(3):142-152

Cole LA. (2010). Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol.*;8:102. doi: 10.1186/1477-7827-8-102.

Cole LA. (2011). hCG, the center piece of life and death. *Int J Endocrinol Metab.*;9(2):335-52.

Coles C. (1994). Critical Periods for Prenatal Alcohol Exposure: Evidence From Animal and Human Studies. *Alcohol health and research world*, 18(1), 22–29.

Colmenaro Salas LC., Levario Carrillo M., Torres Reyes A., Gonzalez Horta G. y Sánchez Ramírez B., (2009). Expresión de receptores colinérgicos muscarínicos en placenta humana a término. *Ginecol Obstet Mex* 2009;77(7):323-8. Recuperado 24 septiembre 2020 disponible en <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2009/gom097d.pdf>

Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P. A., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D., & Dell'Agli, M. (2017). HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of inflammation*, 2017, 7435621. <https://doi.org/10.1155/2017/7435621>

Comisión Europea – European Commission (2018a). Commission Implementing Regulation 113/2018. Recuperado el 12 de octubre de 2020, disponible online en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32018R0113>

Comisión Europea – European Commission, (2018b). Neonicotinoids: Current status of the neonicotinoids in the EU. Recuperado el 12 de octubre de 2020, disponible en: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/approval_renewal/neonicotinoids_en).

Comisión europea. (2006) La política comunitaria para un uso sostenible de los plaguicidas. Origen de la estrategia. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas; Disponible online 4 de junio 2020 https://ec.europa.eu/environment/archives/ppps/pdf/pesticides_es.pdf

Correia-Branco, A., Keating, E., Martel, F., (2018). Placental-related processes in a human first-trimester extravillous trophoblast cell line (HTR-8/SVneo cells) are affected by several xenobiotics. *Drug Chem. Toxicol.* <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1463240>.

Corría Ozorio J. y Cruz Manzano E., (2009). Balance entre las especies reactivas y los sistemas antioxidantes en la gestación normal. *Rev Cubana Obstet Ginecol* 35(2). Disponible online 20 de julio de 2020, en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2009000200005&lng=es&nrm=iso

Cortés-Iza, Sc Rodríguez, A, (2018). Oxidative stress and pesticide disease: a challenge for toxicology. *rev.fac.med.* [online]., vol.66, n.2 pp.261-267. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v66n2.60783>

Cortés-Gutiérrez E., Hernández-Garza F., García-Pérez J., Dávila-Rodríguez M., Aguado-Barrera M y Cerda-Flores R., (2012). Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. *J Biomed Biotechnol* 2012:1-7 doi: 10.1155/2012/385245

Cory, S., Huang, D.C., Adams, J.M., (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590–8607.

Cossi P.F., (2019). Efecto de la exposición subcrónica a concentraciones ambientales de contaminantes de relevancia para un gasterópodo nativo de agua dulce: *Biomphalariastraminea*. Tesis de doctorado, Química biológica, Universidad de Buenos Aires. Recuperado el 18 de septiembre de 2020, disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/80083/CONICET_Digital_Nro.f4158a6f-e48b-4ea2-81cc-8a973fd211cd_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Costa L.G., (2006) Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366(1- 2): 1-13.

Costa LG, Giordano G, Cuizzetti M y Vitalone A, (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience* 13, 1240-1249. Disponible el 8 de junio 2020 online en <https://www.bioscience.org/2008/v13/af/2758/fulltext.htm>

Costa, C., Silvani, V., Melchini, A., Catania, S., Heffron, J.J., (2009). Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat. Res.* 672, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.018>

Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52, 601-623.

Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., (2003a). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9, 169-176.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., (2003b). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329, 23-38.

Dani JA, Bertrand D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*;47:699–729.

Dasgupta, A., Klein, K., (2014). Methods for measuring oxidative stress in the laboratory, in: antioxidants in food, vitamins and supplements. Elsevier Inc 19–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405872-9.00002-1>.

David L. Eaton, Robert B. Daroff, Herman Autrup, James Bridges, Patricia Buffler, Lucio G. Costa, Joseph Coyle, Guy McKhann, William C. Mobley, Lynn Nadel, Diether Neubert, Rolf Schulte-Hermann & Peter S. Spencer (2008) Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment, *Critical Reviews in Toxicology*, 38:sup2, 1-125, DOI: 10.1080/10408440802272158

de Jonge WJ, Ulloa L. (2007). The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol.*;151(7):915-929. doi: 10.1038/sj.bjp.0707264

De la Fuente M. (2002). Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur J Clin Nutr* 56:S5-S8.

De La Torre Binimelis R., (1994). Determinación de la Actividad de Superóxido Dismutasa en Poblaciones Humanas Normales y Patológicas. Tesis doctoral. Madrid, España.

Dell'Arciprete, (2010) Mecanismos, cinética y toxicidad de insecticidas cloronicotinoides y sus productos de degradación con especies reactivas oxidantes de interés ambiental. Tesis doctoral, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

Dell'Arciprete, M. L., Soler, J. M., Santos-Juanes, L., Arques, A., Mártire, D. O., Furlong, J. P., and Gonzalez, M. C. (2012). Reactivity of neonicotinoid insecticides with carbonate radicals. *Water Research*, 46(11), 3479–3489.

Deng X., Nanduri B., Tan W., Cheng B., Fan R. y Pruett S.B., (2013). Sodium methyl dithiocarbamate exerts broad inhibition of cellular signaling and expresión of effector molecules of inflammation. *ToxicolSci.* 136(2):430-42.

Denzoin Vulcano LA, Soraci AL, Tapia MO., (2013). Homeostasis del glutatión. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2013; 47 (3): 529-39

Deyashi, I., Chakraborty, S.B., (2016). Pesticide induced oxidative stress and the role of antioxidant. *Harvest* 2, 1–14.

Di Prisco G, Iannaccone M, Ianniello F, Ferrara R, Caprio E, Pennacchio F, et al. (2017). The neonicotinoid insecticide clothianidin adversely affects immune signaling in a human cell line. *Sci Rep*; 7:13446 10.1038/s41598-017-13171-z

Dong X.S., Xu Y.X., Sun Y.Q., Wei-Liu, Jianq Z.H. y Lyu Z., (2013). Toll-like receptor 4 is involved in myocardial damage following paraquat poisoning in mice. *Toxicology* 4; 312:115-22.

Duhig K., Chappell L. y Shennan A., (2016). Oxidative stress in pregnancy and reproduction *Obstet Med Online First*, published on May 17, 2016 as doi:10.1177/1753495X16648495

Duran, A; Alvarez-Mon, M Y Valero, N, (2014). Papel de los receptores tipo toll (TLRs) y receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLRs) en las infecciones virales. *Invest. clín [online]*. 2014, vol.55, n.1 [citado 2020-06-30], pp. 61-81. Disponible en: <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332014000100008&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0535-5133

Duru S, Oria M, Arevalo S, Rodo C, Correa L, Vuletin F, Sanchez-Margallo F, Peiro JL. (2019). Comparative study of intra cisternal kaolin injection techniques to induce congenital hydrocephalus in fetal lamb. *Childs Nerv Syst.* 2019 May;35(5):843-849. doi: 10.1007/s00381-019-04096-1.

Duzguner V. y Erdogan S., (2010). Acuteoxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats. *Pest. Biochem. Phys.* 97:13–18.

Eaton, D. L. et al. (2008). Review of the Toxicology of Chlorpyrifos with an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. *Critical reviews in toxicology* 38 Suppl 2: 1–125.

Egeghy, P.P., Cohen Hubal, E.A., Tolve, N.S., Melnyk, L.J., Morgan, M.K., Fortmann, R.C. and Sheldon, L.S., (2011). Review of pesticide urinary biomarker measurements from selected US EPA children’s observational exposure studies. *International Journal of Environmental Research and PublicHealth*, 8, 1727–1754.

Eleršek, T., and M. Filipič. (2011). “Organophosphorus Pesticides – Mechanisms Of Their Toxicity.” In *Pesticides – The Impacts of Pesticides Exposure*, ed. Margarita Stoytcheva. IntechPublishers., 243–60. www.intechopen.com.

Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone. (1961). "A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity." *Biochemical Pharmacology* 7(2): 88–95.

Ellman, G.L., (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophysics* 82, 70–77.

Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.

Eskenazi B., Harley K., Bradman A., Weltzien E., Jewell N., Barr D., Furlong C. and Holland N. (2004). Association of in útero organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population. *Environmenta Health Perspectives*, 112:1116-1124.

Eskenazi, B., Marks, A.R., Bradman, A., Harley, K., Barr, D.B., and Johnson, C. (2007). Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in Young Mexican-American children. *Environmental Health Perspectives*, 115, 792–798.

Espinoza M.; Rivero Osimani V.; Sánchez V.; Rosenbaum E. & Guiñazú N. (2016). B-esterase determination and organophosphate insecticide inhibitory effects in JEG-3 trophoblasts. *Toxicology In Vitro*, 32: 190-197.

Espinoza, M. et al. (2016). "B-Esterase Determination and Organophosphate Insecticide Inhibitory Effects in JEG-3 Trophoblasts." *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 32: 190–97.

European Food Safety Authority (2013a). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid, *European Food Safety Authority Journal*, 11, 3068 [3055 pp].

European Food Safety Authority, (2013b). Bee Health: EU takes additional measures on pesticides to better protect Europe's bees. Recuperado el 12 de octubre de 2020. Disponible en: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-13-708_en.htm).

FAO (1996). Eliminación de Grandes Cantidades de Plaguicidas en Desuso en los Países en Desarrollo - Colección FAO: Eliminación de Plaguicidas. Disponible online en: <http://www.fao.org/3/W1604S/w1604s00.htm#Contents> (15 de mayo 2020)

Fattman CL, Enghild JJ, Crapo JD, Schaefer LM, Valnickova Z, Oury TD (2000): Purification and characterization of extracellular superoxide dismutase in mouse lung. *Biochem Biophys Res Commun.*;275(2):542-8.

Ferguson KK, McElrath TF, Chen YH, Loch-Carus R, Mukherjee B, Meeker JD. (2015). Repeated measures of urinary oxidative stress biomarkers during pregnancy and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 212: 208.e201–208.

Ferguson KK, McElrath TF, Chen YH, Mukherjee B, Meeker JD. (2014). Longitudinal profiling of inflammatory cytokines and C-reactive protein during uncomplicated and preterm pregnancy. *Am J Reprod Immunol*; 72:326–336.

Fernández-Cruz T., Álvarez-Silvares E., Domínguez-Vigo P., Simal-Gándara J., Martínez-Carballo E., (2020) Prenatal exposure to organic pollutants in northwestern Spain using non-invasive matrices (placenta and meconium), *Science of The Total Environment*, Volume 731, 2020, 138341, ISSN 0048-9697,

Fest S, Aldo P.B., Abraham W.M., Visintin I., Alvero A, Chen R., Chaves S.L., Romero R y Mor G., (2007). Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 57(1):55-66.

Filella X., Molina R. y Ballesta AM., (2002). Estructura y función de las citoquinas. *Med Integral* 2002;39(2):63-71

Firmal, P., Shah, V. K., & Chattopadhyay, S. (2020). Insight In to TLR4-Mediated Immuno modulation in Normal Pregnancy and Related Disorders. *Frontiers in immunology*, 11, 807. doi.org/10.3389/fimmu.2020.00807

Fisher, M., Arbuckle, T.E., Liang, C.L., LeBlanc, A., Gaudreau, E., Foster, W.G., Haines, D., Davis, K., Fraser, W.D., (2016). Concentrations of persistent organic pollutants in maternal and cordblood from the maternal-infant research on environmental chemicals (MIREC) cohort study. *Environ. Health* 15 (1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0143-y>.

Ford, K.A., Casida, J.E., (2006). Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 19 (11), 1549–1556. <https://doi.org/10.1021/tx0601859>.

Forman H., Zhang H. y Rinna A., (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspect. Med.* 30(1-2): 1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006.

Frank S, Kampfer H, Podda M, Kaufmann R, Pfeilschifter J. (2020). Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem J.*;346 Pt 3:719-28.

Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*; 7:1250-1257.

García, C; Heredia, C; Flores, P Y Parra, C, (2016). El uso de los agrotoxicos y su afectación al sistema inmune: un tema de interés actual. *Rev.Cs.Farm. y Bioq [online].*, vol.4, n.2 pp. 61-70. Disponible el 18 de junio de 2020 en: <http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652016000200006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2310-0265.

García-Gómez C., Gortáres-Moroyoqui P., y Droguí P., (2011). Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción Emerging contaminants: effects and removal treatments. *Revista Química Viva* - 10(2): 96-105

Garrido A., (2007). El peróxido de hidrógeno como mediador de procesos de contracción-relajación. Tesis doctoral. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá.

Gasmi, S., Kebieche, M., Rouabhi, R., Touahria, C., Lahouel, A., Lakroun, Z., Henine, S., Soulimani, R., I (2017). Alteration of membrane integrity and respiratory function of brain mitochondria in therats chronically exposed to a low doce of acetamiprid. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 22258–22264. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9901-9>.

Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga IS, Kovacs A, Kovacs L, et al. (2002). Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 103:136–9.

Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. (2006). Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* celular states. *J Immunol*; 176:3717-3724.

Gohner C., Svensson-Arvelund J., Pfarrer C., Hager J., Faas M., Ermerudh J., Cline JM., Dizon D., Buse E. y Marker UR., (2014). The placenta in toxicology. Part IV: battery of toxicological test systems basedon human placenta. *Toxicologic Pathology* 42(2):345-51 doi: 10.1177/0192623313482206

Gomes A., Fernandes E. y Lima J.F.C.J., (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 65: 45-80.

Gomez DS., (2015). Efecto de los plaguicidas organofosforados clorpirifos y metilazinfos en la inducción de estrés oxidativo en trofoblastos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud, Universidad Nacional del Comahue, Argentina.

Gomez-Lopez N, Guilbert LJ, Olson DM. (2010). Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *J LeukocBiol*; 88(4):625-633.

Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. (2002). Intrauterine infection and prematurity. *MentRetard Dev Disabil Res Rev*; 8:3–13. 18.

Gotti C, Zoli M, Clementi F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *TrendsPharmacol Sci.*;27(9):482–91.

Grada A., Otero-Vinas M., Prieto-Castillo F., Obagi Z. y Falanga V., (2017). Research techniques made simple: análisis of collective cell migration using the wound healing assay. *Journal of Investigative Dermatology* 137(2): 11-16 <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>

Graham CH., Hawley TS, Hawley RG. MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, y Lala PK, (1993). Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cell with extended lifespan. *Exp Cell Res* 206(2):204-211. DOI: 10.1006/excr.1993.1139

Green, T., Toghill, A., Lee, R., Waechter, F., Weber, E., Pepper, R., Noakes, J., Robinson, M., (2005). Thiamethoxam Induced Mouse Liver Tumors and Their Relevance to Humans Part 2: Species Differences in Response. *Toxicol. Sci.* 86, 48–55. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi125>.

Gryszczynska, B., Formanowicz, D., Budzyn, M., Wanic-Kossowska, M., Pawliczak, E., Formanowicz, P., Majewski, M., Strzyzewski, K.W., Kazprzak, M., Iskra, M., (2017). Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. *Biomed Res. Int.* 1–9.

Guicciardi, M.E., Malhi, H., Mott, J.L., Gores, G.J., (2013). Apoptosis and necrosis in the liver. *Compr. Physiol.* 2013 (3), 977–1010 doi: 10.1002/cphy.c120020. April (2).

Guiñazú N., Rena V., Genti-Raimondi S., Rivero V. y Magnarelli G., (2012). Effects of the organophosphate insecticides phosmet and chlorpyrifos on trophoblast JEG-3 cell death, proliferation and inflammatory molecule production. *Toxicol In Vitro.* 26 (3):406-413

Gunderson, M., Nguyen, B., Cervantes Reyes, J., Holden, L.L., French, J., Smith, B., Linerberger, C., (2018). Response of phase I and II detoxification enzymes, glutathione, Metallothionein and acetylcholine esterase to Mercury and dimethoate in signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Chemosphere* 208, 749–756.

Gurugubelli Krishna, R., VishnuBhat, B., (2018). Molecular mechanisms of intrauterine growth restriction. *J. Matern. -Fetal Neonat. Med.* 31, 2634–2640.

Gustavo Sánchez-Chávez y Rocío Salceda, (2008). Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa. *Funciones de las colinesterasas.* REB 27(2): 44-51. Disponible online 8 de junio 2020 online en: http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2008/02/e_1erArticulo.pdf

Hajiasgharzadeh, K., Sadigh-Eteghad, S., Mansoori, B., Mokhtarzadeh, A., Shanebandi, D., Doustvandi, M.A., Asadzadeh, Z., Baradaran, B., (2019). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in lung inflammation and carcinogenesis: Friends or foes? *J. Cell. Physiol.* <https://doi.org/10.1002/jcp.28220>.

Halliwell, B. and Gutteridge, J., (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Fifth Edition. Oxford Science Publications, United States of America. ISBN 978-0-19-871747-8 (hbk).

Hancock, D. B. et al. (2008). Pesticide Exposure and Risk of Parkinson's Disease: A Family-Based Case-Control Study. *BMC neurology* 8: 6.

Harada KH, Tanaka K, Sakamoto H, Imanaka M, Niisoe T, et al. (2016) Biological Monitoring of Human Exposure to Neonicotinoids Using Urine Samples, and Neonicotinoid Excretio

nKinetics. PLOS ONE 11(1): e0146335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146335>

Hartwig A., (2000). Recent advances in metal carcinogenicity. *Pure ApplChem* 72:1007–1014.

Hassan I., Kumar AM., Park HR., Lash LH., Loch-Carusio R.,(2016). Reactive Oxygen Stimulation of Interleukin-6 Release in the Human Trophoblast Cell Line HTR-8/SVneo by the Trichlorethylene Metabolite S-(1,2-Dichloro)-L-Cysteine. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (2016) 95(3):66, 1–11 DOI 10.1095/biolreprod.116.139261

Hayden, K. M. et al. (2010). Occupational Exposure to Pesticides Increases the Risk of Incident AD: The Cache County Study. *Neurology* 74(19): 1524–30.

Heinrich JN, Butera JA, Carrick T, Kramer A, Kowal D, Lock T, et al. (2009). Pharmacological comparison of muscarinic ligands: historical versus more recent muscarinic M1-preferring receptor agonists. *Eur J Pharmacol.*;605(1-3):53–6.

Hélène Serra, Martin Scholze, RolfAltenburger, Wibke Busch, Hélène Budzinski, François Brion, Selim Aït-Aïssa, (2019). Combine defects of environmental xeno-estrogens within multi-component mixtures: Comparison of in vitro human- and zebrafish-based estrogenicity bioassays, *Chemosphere*, Volume 227, 2019, Pages 334-344, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.060>.

Henderson CJ, Wolf CR., (2005). Disruption of the glutathione transferase pi class genes. *Methods Enzymol.* 2005; 401:116-35. doi: 10.1016/S0076-6879(05)01007-4. PMID: 16399382.

Hendriks, C., Gibson, H. S., Trett, A., Python, A., Weiss, D. J., Vrieling, A., Coleman, M., Gething, P. W., Hancock, P. A., & Moyes, C. L. (2019). Mapping Geospatial Processes Affecting the Environmental Fate of Agricultural Pesticides in Africa. *International journal of environmental research and public health*, 16(19), 3523. <https://doi.org/10.3390/ijerph16193523>

Hendson L, Russell L, Robertson CM, Liang Y, Chen Y, Abdalla A, Lacaze-Masmonteil T. (2011) Neonatal and neurodevelopmental outcomes of very low birth weight infants with histologic chorioamnionitis. *J Pediatr*; 158:397–402.

Hernández-Fonseca K., Cárdenas-Rodríguez N., Pedraza-Chaverri J. y Massieu, L. (2008), Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, 86: 1768-1780. doi:10.1002/jnr.21634

Herrero J., (2010). ABC de los <<Toll-like receptors>>: relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. *Revisión. Semin FundEspReumatol.* 11(4):135-143.

Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR et al. (2002). Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology* 107: 145–151

Hsu, S.S., Jan, C.R., Liang, W.Z., (2019). Uncovering malathion (an organophosphate insecticide) action on Ca²⁺ signal transduction and investigating the effects of BAPTA-AM (a cell-permeant Ca²⁺ chelator) on protective responses in glial cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 157, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.015>.

Huang, H., and Leung, L. K. (2009). Bisphenol A downregulates CYP19 transcription in JEG-3 cells. *Toxicol. Lett.* 189, 248–252

Huerga, M. and San Juan, S., (2004). Informe: El control de plagas en la agricultura argentina. Estudio sectorial agrícola-rural. Banco mundial/Centro de inversiones FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Argentina.

I. Gutiérrez-Cañas, Y. Juarranz, B. Santiago, A. Arranz, C. Martínez, M. Galindo, M. Payá, R. P. Gomariz, J. L. Pablos, (2006). VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts, *Rheumatology*, 45(5):527–532, <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei219>

Ichikawa G., Kuribayashi R., Ikenaka Y., Ichise T., Nakayama S. M., Ishizuka M., Taira K., Fujioka K, Sairenchi T. and Kobashi G., (2019) LC-ESI/MS/MS análisis of neonicotinoids in urine of very low birth weight infants at birth, *PLoS One*, 2019, 14, e0219208

Iglesias M, Guzmán R, Martínez O, Restrepo JF, Iglesias A. (2002). Inmunología de la reproducción. *Acta Med Colomb* 2002;27(3):170-180.

Imosemi, IO., (2013). The Role of Antioxidants in Cerebellar Development: A Review of Literature. *Int. J. Morphol.* [online]. 2013, vol.31, n.1 [citado 2020-10-10], pp.203-210. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022013000100034&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0717-9502. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022013000100034>

Inta (2014). Aplicación Eficiente de Fitosanitarios. Plaguicidas químicos, composición y formulaciones, etiquetado, clasificación toxicológica, residuos y métodos de aplicación. Capítulo 2. Recuperado el 12 de octubre de 2020, disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/aplicacion-eficiente-de-fitosanitarios.-plaguicidas-quimicos-composicion-y-formulaciones-etiquetado-clasificacion-toxicologica-residuos-y-metodos-de-aplicacion>

Jaacks I., Diao N., Calafat A., Ospina M., Mazumdar M., Hasan M., Wright R., Quamruzzaman Q., Christiani D., (2019). Association of prenatal pesticide exposures with adverse pregnancy outcomes and stunting in rural Bangladesh, *Environment International*, Volume 133, Part B, 2019, 105243, ISSN 0160-4120,

- Jaffe R. (1998). First trimestre utero-placental circulation: maternal-fetal interaction. *J Perinat Med.*26:168-74.
- Janeway J, Medzhitov R. (2002). Innate immune recognition. *AnnuRevImmunol* 20: 197-216.
- Jansson L, Holmdahl R. (1998). Estrogen-mediated immuno suppression in autoimmune diseases. *Inflamm Res*; 47(7):290-301.
- Jokanovic M, (2018). Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and posible association with neurodegenerative disease in man: A review. *Toxicology* 410.:125-131
- Kagawa N y Nagao T., (2018). Neurodevelopmental toxicity in the mouse neocórtex following prenatal exposure to acetamprid. *J ApplToxicol* 38(12): 1521-1528 doi: 10.1002/jat.3692.
- Kamel F. and Hoppin J.A. (2004). Association of pesticide exposure with neurologicdys function and disease. *EnvironmentalHealthPerspectives*, 112:950–958. Prendergast
- Kammerer U, von Wolff M, (2004). Markert UR. Immunologyof human endometrium. *Immuno biology*; 209(7):569-574.
- Kapoor U., Srivastava M.K. ySrivastava L.P., (2011). Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *FoodChemToxicol.* 49(12):3086-9.
- Kato Y, Braunstein GD. (1990). Purified first and third trimester placental trophoblasts differ in in vitro hormone secretion. *J Clin EndocrinolMetab.* 1990 Apr;70(4):1187-92. doi: 10.1210/jcem-70-4-1187. PMID: 2318939.4
- Kawahata I, Yamakuni T. (2018). Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, facilitates tyrosine hydroxylase transcription and phenyl etanol amine N-methyltransferase mRNA expresión to enhance catecholamine synthesis and its nicotine-evoked elevation in PC12D cells. *Toxicology*; 394:84–92. 10.1016/j.tox.2017.12.004
- Kawashima K and Fujii T, (2008). Basic and clínical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 106, pp. 167–173.
- Kawashima K., Fujii T., Moriwaki Y. y Misawa H., (2012). Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *LifeSci.* 91(21-22):1027-1032.
- Kehrer, J. P. (2015). Free Radicals and Reactive OxygenSpecies. Reference Module in BiomedicalResearch. Elsevier Inc.

Keil AP, Daniels JL, Hertz-Picciotto I. (2014). Autism spectrum disorder, flea and tick medication, and adjustments for exposure misclassification: the CHARGE (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *Environ Health*; 13:3–10

Khong TY, Liddell HS, Robertson WB. (1987). Defective haemochorial placentation as a cause of miscarriage: a preliminary study. *Br J Obstet Gynaecol.*;94:649–55.

Kim TH, Kim SJ, Lee SM. (2014). Stimulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor protects against sepsis by inhibiting Toll-like receptor via phosphoinositide 3-kinase activation. *J Infect Dis.* 2014 May 15;209(10):1668-77. doi: 10.1093/infdis/jit669. Epub 2013 Dec 1. Erratum in: *J Infect Dis.* 2015 Mar 1;211(5):851. PMID: 24298024.

Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., Kawano, H., (2012). Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032432>.

Kocaman, A.Y., Topaktas, M., (2007). In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 48, 483–490. <https://doi.org/10.1002/em>.

Koga K., Aldo PM y Mor G. (2009). Toll-like receptors and pregnancy: Trophoblast as modulators of the immune response. *J. Obstet. Gynaecol Res* 35(2): 191-202 doi:10.1111/j.1447-0756.2008.00963.x

Koga K., y Mor G., (2010). Toll-like Receptors at the Maternal-Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Complications. *Am J Reprod Immunol.* 2010 Jun;63(6):587-600. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00848.x.

Komine-Aizawa, S., Hirohata, N., Aizawa, S., Abiko, Y., Hayakawa, S., (2015). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide inhibits trophoblast invasion in the presence of nicotine. *Placenta* 36, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.10.015>.

Kong, D., Zhang, J., Hou, X., Zhang, S., Tan, J., Chen, Y., Yang, W., Zeng, J., Han, Y., Liu, X., Xu, D., Cai, R., (2017). Acetamiprid inhibits testosterone synthesis by affecting the mitochondrial function and cytoplasmic adenosine triphosphate production in rat Leydig cells. *Biol. Reprod.* 96, 254–265. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.139550>.

Kono, Y., and Fridovich, I. (1982). Superoxide Radical Inhibits Catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5751–5754.

Kwon J.Y., Kim Y.H., Kim S.H., Kang M.H., Maeng Y.S., Lee K.Y. y Park Y.W., (2007). Difference in the expression of alpha 7 nicotinic receptors in the placenta in normal versus severe preeclampsia pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007 132(1):35-9.

Lappas M, Permezel M, Rice GE. (2003). N-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappa B deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1723–1729.

LaRocca, J., Binder, A.M., McElrath, T.F., Michels, K.B., (2016). First-Trimester Urine Concentrations of Phthalate Metabolites and Phenols and Placenta miRNA Expression in a Cohort of U.S. Women. *Environ. Health Perspect* 124, 380–387.

Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. (2005). Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol Reprod.*;73:374–81.

Lassiter, T.; Barone, S.; Moser, C. and Padilla, S. (1999). "Gestational Exposure to Chlorpyrifos: Dose Response Profiles for Cholinesterase and Carboxylesterase Activity". *Toxicological Science*, 52, 92-100

Lee J.E., Park J.H., Shin I.C. and Koh H.C.. (2012). Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263:148e62.

Leemans, M., Couderq, S., Demeneix, B., & Fini, J. B. (2019). Pesticides With Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. *Frontiers in endocrinology*, 10, 743. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00743>

Li J., Mathieu S.L., Harris R., Ji J., Anderson D.J., Malysz J., Bunnelle W.H., Waring J.F., Marsh K.C., Murtaza A., Olson L.M. y Gopalakrishnan M.I., (2011). Role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in regulating tumor necrosis factor- α (TNF- α) as revealed by subtype selective agonists. *J Neuroimmunol* 239(1-2):37-43

Li Q., (2007). New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immuno toxicity. *J Nippon Med Sch* 74 (2): 92-105.

Lin PC, Lin HJ., Liao YY, Guo HR and Chen KT (2013), Acute Poisoning with Neonicotinoid Insecticides: A Case Report and literature Review, *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 2013, 112, 282-286

Lips, K.S., Brüggmann, D., Pfeil, U., Vollerthun, R., Grando, S.A., Kummer, W., (2005). *Placenta* 26 (10), 735–746.

Loewy R. M., Monza L. B., Kirs V. E. y Savini M., (2011). Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina, *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 46 (8): 662-670.

Londoño-Velasco, E., Martínez-Perafán, F., Carvajal, S., García-Vallejo, F., & Hoyos-Giraldo, L. S. (2019). Evaluation of oxidative and methylating DNA damage in painters occupationally exposed to organic solvents and paints. Evaluación del daño oxidativo y por metilación del ADN de pintores expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos y pinturas. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 39(3), 464–477. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4289>

Lotti M. (1995) Cholinesterase Inhibition: Complexities in Interpretation. *Clinical Chemistry*, 41:1814-8.

Lukaszewicz-Hussain A., (2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short Review. *Pesticide Biochem and Physiol* 98: 145-150

M. Henry, M. Beguin, F. Requier, O. Rollin, J.-F. Odoux, P. Aupinel, J. Aptel, S. Tchamitchian and A. Decourtye, (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honeybees, *Science*, 336, 348-350.

Mac Loughlin, T., Peluso, L., Marino, D. (2017). "Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina". *Science Total Envi* .598 , 572-580.

Mac Loughlin, T., Peluso, M., Etchegoyen, M., Alonso, L., de Castro, M., Percudani, M. (2018). "Pesticides residues in fruits and vegetables of the Argentine domestic market: occurrence and quality". *Food Control*. 93 , 129-138. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.041>

Macchi, P., Loewy, R.M., Lares, B. et al. (2018). The impact of pesticides on the macroinvertebrate community in the water channels of the Río Negro and Neuquén Valley, North Patagonia (Argentina). *EnvironSciPollut Res* 25, 10668–10678 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1330-x>

Magnarelli G y Guiñazú N., (2012). Placental Toxicology of Pesticides, Recent Advances on The Human Placenta. Dr. Jing Zheng (Ed.), ISBN: 978-953-51-0194-9, InTech

Magnarelli G.G., Guiñazú N. Y Rovedatti M.G., (2014). Plaguicidas en la vida intrauterina: mecanismos toxicológicos involucrados en los efectos a corto y largo plazo. *Ciencia e investigación* 64 (5): 23-38.

Magnarelli, G. (2015). Exposición ambiental a plaguicidas: biomarcadores en matrices de la tríada madre-placenta-feto. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(1), 39–53.

Maienfish, P., Angst, M., Brandl, F., Fischer, W., Hofer, D., Kayser, H., Kobel, W., Rindlisbacher, A., Senn, R., Steinemann, A., Widmer, H., (2001). Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest Manag. Sci.* 57, 906–913. <https://doi.org/10.1002/ps.365>.

Maisanaba S, Pichardo S, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Cameán AM, Jos A. (2015). Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: a review. *Environ Res.* 2015 Apr; 138:233-54. doi: 10.1016/j.envres.2014.12.024. Epub 2015 Feb 28. PMID: 25732897.

Makris A, Xu B, Yu B, Thornton C, Hennessy A. (2006). Placental deficiency of interleukin-10 (IL-10) in preeclampsia and its relationship to an IL10 promoter polymorphism. *Placenta.* 2006 Apr-May;27(4-5):445-51. doi: 10.1016/j.placenta.2005.05.003. Epub 2005 Jul 18. PMID: 16026832.

Malmqvist, E., Liew, Z., Källén, K., Rignell-Hydbom, A., Rittner, R., Rylander, L., Ritz, B., (2017). *Environ. Res.* 152, 73–80.

Maltepe E. y Fisher SJ., (2015). Placenta: the forgotten organ. *AnnuRev Cell Dev Biol.* 31:523-52. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125620.

Many A, Westerhausen-Larson A, Kanbour-Shakir A, Roberts JM. (1996). Xanthine oxidase/dehydrogenase is present in human placenta. *Placenta.*;17:361-5.

Margaritopoulos, G. A., Antoniou, K. M., Karagiannis, K., Samara, K. D., Lasithiotaki, I., Vassalou, E., Lymbouridou, R., Koutala, H., & Sifakas, N. M. (2010). Investigation of Toll-like receptors in the pathogenesis of fibrotic and granulomatous disorders: a bronchoalveolar lavage study. *Fibrogenesis&tissuerepair*, 3, 20. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-3-20>

María Guadalupe Rico-Rosillo, Gloria Bertha Vega-Robledo, (2012). Mecanismos inmunológicos involucrados en el embarazo. *Ginecol Obstet Mex* 2012;80(5):332-340. Recuperado el 5 de octubre de 2020. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2012/gom125e.pdf>

Marín Loaiza JC, Valencia Islas NM y Rincón Velandia J. Unidad 9: Taller de principios químicos de la biotransformación de fármacos, Farmacia Química. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Disponible online 4 de junio 2020 en <http://red.unal.edu.co/cursos/ciencias/2015657/u9/html/creditos.html>

Marklund S L. (1992) Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J Biol Chem.*;267(10):6696-701.

Maroni M. and Fait A. (1993). Health effects in man from long-term exposure to pesticides. *Toxicology*; 78:1-17.

Martínez Pulido P., (2015). Rol de los receptores muscarínicos en la tumorigénesis mamaria. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Matsubara, K., Higaki, T., Matsubara, Y., Nawa, A., (2015). Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 4600–4614.

Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, Koyasu S, Matsumoto K, Takeda K, Ichijo H, (2005). ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* 6: 587-592

Mayhoub, F., Berton, T., Bach, V., Tack, K., Deguines, C., Floch-Barneaud, A., Desmots, S., Stéphan-Blanchard, E., & Chardon, K. (2014). Self-reported parental exposure to pesticide during pregnancy and birth outcomes: the MeCo Expo cohort study. *PloSone*, 9(6), e99090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099090>

McDermot AM, Role LW, Siegelbaum SA. (1999). Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *AnnuRevNeurosci*; 22: 443-85.

McMurray RW, Suwannaroj S, Ndebele K, Jenkins JK. (2001). Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. *Pathobiology*; 69(1):44-58.

Medawar PB. (1953). Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. 1953; 7:320. *Symp Soc Exp Biol*; 7:320-338.

Medina-Buelvas D, Estrada-Muñiz E, Flores-Valadez M, Vega L. (2019). Genotoxic and immunotoxic effects of the organophosphate metabolite diethyldithiophosphate (DEDTP) in Vivo. *Toxicol Appl Pharmacol*. 366:96-103. doi:10.1016/j.taap.2019.01.023

Mehta, S.K., Gowder, S.J.T., (2015). Members of antioxidant machinery and their functions. In: Gowder, S.J.T. (Ed.), *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. Intech Open, pp. 61–85. <https://doi.org/10.5772/59293>.

Mellor AL, Munn DH. (2000). Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annu Rev Immunol*; 18:367-391.

Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, G.-E., (2014). Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/179691>.

Mier A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky S, Kaiseman I, Ahdut R, Demircoren S, Rahamimoff R. (1999). Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev*; 79: 1019-88.

Mnatsakanyan N, Nishtala SN, Pandhare A, Fiori MC, Goyal R, Pauwels JE, et al. (2015). Functional Chimeras of GLIC Obtained by Adding the Intracellular Domain of Anion- and Cation-Conducting Cys-Loop Receptors. *Biochemistry*. 2015;54(16):2670–82.

Mora ASÁ, Zeledón AAS, Vargas RT. (2019) Oxidative stress and antioxidants: effects on pregnancy. *Revista Médica Sinergia*.;4(05):89-100

Morales Ovalles Y, de Contreras LM, Di Bernardo Navas ML, (2014). Neurotoxicity of pesticides as endocrine disruptors agents: A review. *INHRR* [online]., vol.45, n.2 pp. 96-119. Disponible el 18 de junio de 2020 en: <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772014000200007&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0798-0477.

Morales-Prieto, D. M., Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., Schneider, U., Herrmann, J., Gruhn, B., and Markert, U. R. (2012). MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta* 33, 725–34

Mosmann, T., (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63

Mostafalou, S., and Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157–177.

Moura RA, Quaresma C, Vieira AR, Gonçalves MJ, Polido-Pereira J, Romão VC, et al. (2017) B-cell phenotype and IgD-CD27- memory B cells are affected by TNF-inhibitors and tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis. *PLoS ONE* 12(9): e0182927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182927>

Mujica AO, Hankeln T, Schimidt ER, (2001). A novel serine/threonine kinase gene, STK33, on human chromosome 11P15.3*1. *Gene*; 280: 175-81.

Mulla M.J., SerkallemTadesse K.M., Stanwood N.L., Gariepy A., Norwitz E.R. y Abrahams E.R., (2013). Cutting-edgereport: TLR10 plays a role in mediating bacterial peptidogly can induced trophoblast apoptosis. *Am J Reprod Immunol* 69:449-453.

Muñiz J.F., McCauley L., Scherer J., Lasarev M., Koshy M., Kow Y.W., Nazar Stewart V. and Kisby G.E. (2008) Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilotstudy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 227: 97–107.

Muñiz J.F., McCauley L., Scherer J., Lasarev M., Koshy M., Kow Y.W., Nazar Stewart V. and Kisby G.E. (2008) Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilotstudy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 227: 97–107.

Muñoz-Quezada MT. Y Lucero BA., (2019). Bioética y justicia ambiental: el caso de presencia de plaguicidas en escolares de comunidades rurales. *Acta bioeth.* [online]. 2019, vol.25, n.2 [citado 2020-09-08], pp.161-170. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-569X2019000200161&lng=es&nrm=iso. ISSN 1726-569X. <http://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2019000200161>.

Murata M, Fukushima K, Takao T, Seki H, Takeda S, Wake N., (2013). Oxidative stress produced by xanthine oxidase induces apoptosis in human extravillous trophoblast cells. *J Reprod Dev.*;59(1):7-13. doi: 10.1262/jrd.2012-053. Epub 2012 Sep 14. PMID: 22986926; PMCID: PMC3943235.

Naeher, L., Tulse, N., Eggehy, P., Barr, D., Adetona, O., Fortmann, R., Needham, L., Bozeman, E., Hilliard, A., Sheldon, L. (2010). "Organophosphorus and pyrethroid insecticide urinary metabolite concentrations in Young children living in a southeastern UnitedStatecity". *Sci Total Environ.* (408), 1145-1153.

Nakamura Y, Kimura S, Takada N, Takemura M, Iwamoto M, Hisaoka-Nakashima K, Nakata Y, Morioka N, (2020). Stimulation of toll-like receptor 4 downregulates the expression of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors via histone deacetylase in rodent microglia. *Neurochem Int.* 2020 Sep;138:104751. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104751. Epub 2020 May 13. PMID: 32413437

Nakatsuka M, Asagiri K, Noguchi S, Habara T, Kudo T. (2000). Nafamostatmesilate, a serine protease inhibitor, suppresses lipopolysaccharide induced nitric oxide synthesis and apoptosis in cultured human trophoblasts. *LifeSci*2000;67:1243e50.

Narayanan, K. B., Ali, M., Barclay, B. J., Cheng, Q. S., D'Abronzio, L., Dornetshuber-Fleiss, R., Ghosh, P. M., GonzalezGuzman, M. J., Lee, T. J., Leung, P. S., Li, L., Luanpitpong, S., Ratovitski, E., Rojanasakul, Y., Romano, M. F., Romano, S., Sinha, R. K., Yedjou, C., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., ... Park, H. H. (2015). Disruptive environmental chemicals and celular mechanisms that confer resistance to cell death. *Carcinogenesis*, 36 Suppl 1(Suppl 1), S89–S110. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv032>

Nashmi R, Lester HA. (2006). CNS localization of neuronal nicotinic receptors. *J Mol Neurosci.*;30(1- 2):181–4.

National Library of Medicine- PubChem. Compound Summary: Acetamidrid. Recuperado el 2 de junio de 2020. Disponible online en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetamidrid#section=LC-MS>

Niocel, M., Appourchaux, R., Nguyen, X., Delpuch, M., (2019). The DNA damage induced by the cytosinedeaminase APOBEC3A leads to the production of ROS. *Sci. Rep.* 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40941-8>.

Nistor N., Frasinariu O. y Streanga V., (2017). Acute Poisoning with neonicotinoid insecticide. Chapter 6 in *Poisoning – From Specific Toxic Agents to Novel Rapid and Simplified Techniques for Analysis*. Edited by Ntambwe Malangu. DOI: 10.5772/intechopen.72004

Nouira S., Fekri A., Souheil E., Rafik B. Y Slah B., (1994). Prognostic value of serum cholinesterase in organophosphate poisoning. *Chest* 106 (6): 1811-1814.

O'Neill LA. (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol*; 18:3-9.

OMS (2019). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guideline to clasification. ISBN 978-92-4-000566-2, recuperado el 12 de octubre de 2020, disponible online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332193/9789240005662-eng.pdf?ua=1>

Orellana, M., and V. Guajardo. (2004). “*Cytochrome P450 Activity and Its Alteration in Different Diseases.” *Revista médica de Chile* 132(1): 85–94.

Organización Mundial de la Salud (2003). Informe sobre la salud en el mundo. Disponible 4 de junio 2020 online: http://www.who.int/whr/2003/en/whr03_es.pdf

Orrenius, S. (2004). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology Letters*, 149, 19-23.

Ortega Freyre EG., Carrera Garcia MA., Delgadillo Guzmán D., Intriago Ortega MP., Lares Bayona EF. Y Quintanar Escorza MA. (2016). Asociación de la exposición ocupacional a plaguicidas organofosforados con el daño oxidativo y actividad de acetilcolinesterasa. *Rev. Toxicol.* 33:3943

Ostrea E. M. Jr., Bielawski D. M., Posecion N. C. Jr., Corrion M., Villanueva-Uy E., Bernardo R. C., Jin Y., Janisse J. J. y Ager J. E., (2009). Combined análisis of prenatal (maternal hair and blood) and neonatal (infant hair, cordblood and meconium) matrices to detect exposure to environmental pesticides. *Environ Res.* 109 (1):116-22.

Ouyang YQ, Li SJ, Zhang Q, Cai HB, Chen HP. (2009). Interactions between inflammatory and oxidative stress in preeclampsia. *HypertensPregnancy*; 28:56–62.

Palacios Nava M.E., Paz Román P., Hernández-Robles S. Y Mendoza Alvarado L., (1999). Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Salud Pública Mex* 41 (1): 55-61.

Pang S, Lin Z, Zhang W, Mishra S, Bhatt P, Chen S. (2020). Insights In to the Microbial Degradation and Biochemical Mechanisms of Neonicotinoids. *Front Microbiol.* 2020;11:868. Published 2020 May 19. doi:10.3389/fmicb.2020.00868

Paparini, D., Gori, S., Grasso, E., Scordo, W., Calo, G., Pérez Leirós, C., Ramhorst, R. and Salamone, G. (2015), Acetylcholine contributes to control the physiological inflammatory response during the peri-implantation period. *Acta Physiol*, 214: 237-247. doi:10.1111/apha.12494

Paredes Salido, F., y Roca Fernandez, J. J., (2002). Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Bioquímica*, 21(7), 96–100.

Park HR., Kamau PW. y Loch-Carusó R., (2014). Nominated diphenyl ether induced inflammatory cytokine reléase from human extravillous trophoblasts in vitro. *Toxicology and AppliedPharmacology* 274 (2014) 283–292

Patterson EC, Staszak DJ., (2020). Effects of geophagia (kaolin ingestion) on the maternal blood and embryonic development in thepregnantrat. *J Nutr.* 1977 Nov;107(11):2020-5. doi: 10.1093/jn/107.11.2020. PMID: 561832

Paules, C., Dantas, A.P., Miranda, J., Crovetto, F., Eixarch, E., Rodriguez-Sureda, V., Dominguez, C., Casu, G., Rovira, C., Nadal, A., Crispi, F., Gratacos, E., (2019). Premature placental aging in term small-for-gestational-age and fetal-growth-restricted fetuses. *UltrasoundObstetGynecol* 53, 615–622.

Pei-Chen L., Hung-Jung L., Yu-Ying L., How-Ran G. y Kuo-Tai C., (2013). Acute Poisoning with Neonicotinoid Insecticides: A Case Report and Literature Review. *Basic &Clinical Pharmacol &Toxicol.*, 112, 282–286.

Pelkonen, O., K. Vähäkangas, and R. C. Gupta. (2006). "Placental Toxicity of Organophosphate and Carbamate Pesticides." In *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*, Elsevier, 463–79.

Peña A, C.E.; Carter D.E. y Ayala-Fierro F., (2001). *Toxicología Ambiental: evaluación de riesgos y restauración ambiental*. Universidad de Arizona.

Philips, E.M., Trasande, L., Kahn, L.G., Gaillard, R., Steegers, E.A.P., Jaddoe, V.W.V., (2019). Early pregnancy bisphenol and phthalate metabolite levels, maternal hemodynamics and gestational hypertensive disorders. *Hum. Reprod.* 34, 365–373.

Phua DH, Lin CC, Wu M-L, Deng J-F, Yang C-C (2009). Neonicotinoid insecticides: an emerging cause of acute pesticide poisoning. *Clin Toxicol Phila Pa.*; 47(4): 336-341.

Pidoux G, Gerbaud P, Guibourdenche J, Thérond P, Ferreira F, Simasotchi C, et al. (2015) Formaldehyde Crosses the Human Placenta and Affects Human Trophoblast Differentiation and Hormonal Functions. *PLoS ONE* 10(7): e0133506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133506>

Pimentel D, (1989). *Effects of pesticides on the environment*. 10th Int. Congress on Plant Protection, Crydon, UK. (2): 685-691

Plessinger MA, Woods JR Jr, and Miller RK. (2000). Pretreatment of human amnion-chorion with vitamins C and E prevents hypochlorous acid-induced damage. *Am J Obstet Gynecol* 183: 979-985 DOI: 10.1067/mob.2000.106676

Pluth, J. M., J. A. Nicklas, J. P. O'Neill, and R. J. Albertini. 1996. "Increased Frequency of Specific Genomic Deletions Resulting from in Vitro Malathion Exposure." *Cancer research* 56(10): 2393–99.

Poston L, Raijmakers M. (2004). Trophoblast, Oxidative Stress, Antioxidants and Pregnancy Outcome—A Review. *Placenta*.;25:72-8.

Pudney, J., He, X., Masheeb, Z., Kindelberger, D. W., Kuohung, W., & Ingalls, R. R. (2016). Differential expression of toll-like receptors in the human placenta across early gestation. *Placenta*, 46, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.07.005>

Qanungo S, Mukherjea M. (2000). Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol Cell Biochem.*;215:11-9.

Querejeta G.A.; Ramos L.M.; Flores A.P.; Highes E.A.; Zalts A. y Montserrat J.M., (2012). Environmental pesticide distribution in horticultural and floricultural periurban production units. *Chemosphere* 87: 566-572.

Queyrel W, Habets F, Blanchoud H, Ripoche D, Launay M. (2016). Pesticide fate modeling in soils with the crop model STICS: Feasibility for assessment of agricultural practices. *Sci Total Environ.* 2016;542(Pt A):787-802. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.10.066

Quintana MM., (2017). Estudio comparativo de marcadores de estrés oxidativo, capacidad antioxidante y funcionalidad de elementos formes de sangre de cordón umbilical en la exposición a plaguicidas. Tesis doctoral. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue.

Quintana MM., Vera B., Magnarelli G., Guiñazú N., y Rovedatti MG., (2017). Neonatal, placental and umbilical cord blood parameters in pregnant women residing in áreas with intensive pesticide application. *EnvironSciPollut Res* 24(25): 20736-20746 doi: 10.1007/s11356-017-9642-9.

Quirós-Alcalá L., Bradman A., Smith K., Weerasakera G., Odetokun M., Boyd Bar D., Nishioka M., Castorina R., Hubbard A., Nicas M., Hammond K., Mckone T. y Eskenazi B., (2012). Organophosphorous pesticide breakdown products in house dust and children's urine. *J Expo Sci and EnvironEpidemiol.* 22: 559-568.

Raghupathy R, Al Mutawa E, Al Azemi M, Makhseed M, Azizieh F, Szekeres-Bartho J. (2009). Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *J ReprodImmuno*; 80(1-2):91-99.

Ramírez- García M.A., Márquez-González H., Barranco-Lampón G. y López-Aguilar E., (2014). Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *El Residente* 9(3): 84-94.

Ranjbar A., Solhib H., Mashayekhib F. J., Susanabdib A., Rezaiee A. Y Abdollahid M., (2005). Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20: 88–91.

Rastogi, R.P., Singh, S.P., Häder, D., Sinha, R.P., (2010). Biochemical and Biophysical Research Communications Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant sensing probe 2, 7 -dichlorodihydrofluoresceindiacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 603–607. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.006>

Rauh, V. a, Perera, F. P., Horton, M. K., Whyatt, R. M., Bansal, R., Hao, X., and Peterson, B. S. (2012). Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), 7871–6.

Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ., (2004) Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.* 114(6):744-54. doi: 10.1172/JCI22991. PMID: 15372095; PMCID: PMC516273.

Ren X-Q, Cheng S-B, Treuil MW, Mukherjee J, Rao J, Braunewell KH, et al. (2005). Structural determinants of alpha4beta2 nicotinicacetylcholine receptor trafficking. *J Neurosci.*;25(28):6676–86.

Renaud, M., Akeju, T., Natal-da-luz, T., Leston, S., Ramos, F., (2018). Effects of the neonicotinoids acetamiprid and thiacloprid in their comercial formulations on soil fauna. *Chemosphere* 194, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.102>.

Res. 456/2009. Ministerio de Salud de la República Argentina. Recuperado el 12 de octubre de 2020. Disponible en <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/155000-159999/158790/norma.htm>

Rindsjo E, Holmlund U, Sverremark-Ekstrom E, Papadogiannakis N, Scheynius A. (2007). Toll-like receptor-2 expression in normal and pathologic human placenta. *Hum Pathol*; 38: 468–473

Rita Machaalani, Emma Ghazavi, Rona Victoria David, Tina Hinton, Angela Makris&Annemarie Hennessy (2015). Nicotinicacetylcholine receptors (nAChR) are increased in thepre-eclamptic placenta, *Hypertension in Pregnancy*, 34:2, 227-240, DOI: 10.3109/10641955.2015.1009545

Rivero Osimani, V.L., Valdez, S.R., Guiñazú, N., Magnarelli, G., (2016). Alteration of syncytiotrophoblast mitochondria function and endotelial nitric oxide synthase expression in the placenta of rural residents. *Reprod. Toxicol.* 61, 47–57. [tps://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.02.018](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.02.018).

Rivero-Osimani V., (2016). Impacto de plaguicidas organofosforados en marcadores de daño oxidativo y función mitocondrial del trofoblasto. Tesis doctoral. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue.

Roberts, T.R., Hutson, D.H. (Eds.), (1999). *Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2, Insecticides and Fungicides*. Cambridge University Press, Cambridge.

Rodríguez-Cortés YM, Mendieta-Serón H., (2014). La placenta como órgano endocrino compartido y su acción en el embarazo normoevolutivo. *Medicina e Investigación.* ;2(1):28-34.

Roth I, Fisher SJ. (1999). IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Dev Biol.* 1999;205:194–204.

Sabroe I, Parker LC, Dower SK, Whyte MK. (2008). The role of TLR activation in inflammation. *J Pathol*;214:126-135

Sadis C, Detienne S, Vokaer B, Charbonnier LM, Lemaître P, et al. (2013) The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway Delays TLR-Induced Skin Allograft Rejection in Mice: Cholinergic Pathway Modulates Alloreactivity. *PLOS ONE* 8(11): e79984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079984>

Sagiv, S., Harris, M., Gunier, R., Kogut, K., Harley, K., Deardorff, J., Bradman, A., Holland, N., Eskenazi, B. (2018). "Prenatal organophosphate pesticide exposure and traits related to autism spectrum disorders in a population living in proximity to agriculture". *Environ Health Perspect.* (126), 1-9

Sánchez Capel A. (2012). Exposición fetal a drogas de abuso durante el primer trimestre de gestación. Facultad de Biología Universidad de Murcia. Disponible en <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/92562/TASC.pdf?sequence=1> 7 sep 2020

Sánchez Capel A. 2012. Exposición fetal a drogas de abuso durante el primer trimestre de gestación. Facultad de Biología Universidad de Murcia. Disponible en <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/92562/TASC.pdf?sequence=1> 7 sep 2020

Sánchez VG, Gutiérrez CA, Gomez DS, Loewy M Y Guiñazú N., (2019). Pesticide Residues Monitoring In Underground Drinking Water, Neuquén Province, Northern Patagonia, Argentina. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 35 (3) 641-649, 2019 DOI: 10.20937/RICA.2019.35.03.10

Sánchez, V. G., Gutiérrez, C. A., Gomez, D. S., Loewy, M., and Guiñazú, N. (2016). Residuos de plaguicidas organofosforados y carbamatos en aguas subterráneas de bebida en las zonas rurales de Plottier y Senillosa, Patagonia Norte, Argentina. *Acta Toxicológica Argentina*, 24, 5–14.

Sánchez-Valle V y Méndez-Sánchez N, (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *RevInvestMed Sur Mex* 20(3): 161:168.

Sanghi, Rashmi, M K K Pillai, T R Jayalekshmi, and A Nair. (2003). "Organochlorine and Organophosphorus Pesticide Residues in Breast Milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India." *Human & experimental toxicology* 22(2): 73–76.

Sano, K., Isobe, T., Yang, J., Yoshikane, M., and Menard, C. (2016). In utero and Lactational Exposure to Acetaminophen Induces Abnormalities in Socio-Sexual and Anxiety-Related Behaviors of Male Mice, *Frontiers in Neuroscience*, 10:2281–12.

Sastry BV., (1997). Human Placental Cholinergic System. *Biochem Pharmacol* 53(11):1577-86. doi: 10.1016/s0006-2952(97)00017-8.

Saulsbury, M. D., Heyliger, S. O., Wang, K., & Round, D. (2008). Characterization of chlorpyrifos-induced apoptosis in placental cells. *Toxicology*, 244(2-3), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.10.020>

Schliebs R, Arendt T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res.*;221(2):555–63.

Schoots MH., Gordijn SJ., Scherjon SA., Van Goor H y Hillebrands JL., (2018). Oxidative stress in placental pathology, *Placenta*, Volume 69, 2018, Pages 153-161, ISSN 0143-4004, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.03.003>.

Schraufstatter IU, DiScipio RG, Khaldoyanidi SK. (2009). Alpha 7 subunit of nAChR regulates migration of human mesenchymal stem cells. *Journal of Stem Cells.*;4:203–15.

Scott JD, Soderling TR, (1992). Serine/threonine protein kinases. *Curr Opin Neurobiol*; 2: 289-95.

SENASA (1999). Resolución 350/1999 Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Sanidad vegetal. Recuperado el 12 de octubre de 2020. Disponible online en: <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-350-1999-sagpya-secretaria-de-agricultura-ganaderia-pesca-y-alimentos>

SENASA, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, República Argentina, 2020. Registro Nacional de Terapéutica Vegetal – Formulados. Recuperado el 7 de octubre de 2020. Disponible online en <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/productosveterinarios-fitosanitarios-y-fertilizantes/registro-nacional-de-terapeutica-vegetal>

Şenyildiz M, Kilinc A, Ozden S. (2018). Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. *Toxicol Ind Health*. 2018 Jun;34(6):375-383. doi: 10.1177/0748233718762609..

Sharma, R. Yang, Y. Sharma, A., Awasthi, S. Awasthi, YC., (2004). Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis, *Antiox. Redox Signal.*, 6, (2), 289-291,

Sharp D.S., Eskenazi B., Harrison .R, Callas P. and Smith A.H. (1986). Delayed health hazards of pesticide exposure. *AnnualReviewofPublicHealth*;7:441-71

Sharp, A.N., Heazell, A.E., Crocker, I.P., Mor, G., (2010). Placental apoptosis in health and disease. *Am. J. Reprod. Immunol.* 64, 159–169.

Sheets L. P.; Li A. A; Minnema D. J.; Collier R. H.; Creek M. R.; Peffer R.C. (2016). A critical review of neonicotinoid insecticides for developmental neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 46, No. 2, 153–190

Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, et al. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *EnvironSciPollut Res Int.*; 22(1): 5-34

Simoniello, M.F., Kleinsorge, E.C., Scagnetti, J.A., Grigolato, R.A., Paonessa, A.M., Carballo, M.A., (2010). Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population. *Biomarkers* 15, 52–60. <https://doi.org/10.3109/13547500903276378>.

Singh AK, Parashar A, Singh AK, Singh R. (2013). Pre-natal/juvenile chlorpyrifos exposure associated with immunotoxicity in adulthood in Swiss albino mice. *J Immunotoxicol.* 2013 Apr-Jun;10(2):141-9. doi: 10.3109/1547691X.2012.700653. Epub 2012 Oct 19. PMID: 23078415.

Slotkin, T.A. (2004). Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 198:132–151.

Spagnoletti, A., Paulesu, L., Mannelli, C., Ermini, L., Romagnoli, R., Cintorino, M., and Ietta, F. (2015). Low concentrations of Bisphenol A and para-Nonyl phenol affect extravillous pathway of human trophoblast cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 412, 56–64

Spalding TA, Burstein ES. (2006). Constitutive activity of muscarinic acetylcholine receptors. *J Recept Signal Transduct Res.*;26(1-2):61–85

Steinberg ML, Robins JC. (2016). Cellular Models of Trophoblast Differentiation. *Semin Reprod Med.* 2016 Jan;34(1):50-6. doi: 10.1055/s-0035-1570026. Epub 2016 Jan 11. PMID: 26752716.

Strakovsky R., Schantz S., (2018). Using Experimental Models to Assess Effects of Bisphenol A (BPA) and Phthalates on the Placenta: Challenges and Perspectives, *Toxicological Sciences*, Volume 166, Issue 2, December 2018, Pages 250–268, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy22>

Stralin P, Marklund SL. (2001) Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*;281(4):H1621-9.

Sugeng, A.J., Beamer P.I., Lut, E.A., and Rosales, C.B. (2014). Hazard-Ranking of Agricultural Pesticides for Chronic Health Effects in Yuma County, Arizona. NIH Public Access. *Science of the Total Environment*, 1(5020), 35–41.

Suman P, Gupta SK. (2012). Comparative analysis of the invasion-associated genes expression pattern in first trimester trophoblastic (HTR-8/SVneo) and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Placenta.* 2012 Oct;33(10):874-7. doi:10.1016/j.placenta.2012.06.017. Epub 2012 Jul 15. PMID: 22800585.

Summit Agro Argentina SA—Tecnología japonesa líder, 2020. Assail 70WP – Manual técnico. Recuperado el 7 de octubre de 2020. Disponible online en <https://www.summitagro.com.ar/producto.php?id=1>

Svinarich DM, Bitonti OM, Araneda H, Romero R, Gonik B. (1996) Induction and posttranslational expression of G-CSF and RANTES in a first trimester trophoblast cell line by lipopolysaccharide. *Am J Reprod Immunol*;36:256e9.

Székács, A., Darvas, B., (2012). Forty years with glyphosate. In: Hasaneen, M.N.A.E.-G. (Ed.), *Herbicides- Properties, Synthesis, and Control of Weeds*. IntechOpen, pp. 247–284 <https://doi.org/DOI:10.5772/32491>.

Taira, K., (2014). Human neonicotinoids exposure in Japan. *Jpn J Clin Eco* 23, 14–24.

Takbiri Osgoei L, Parivar K, Ebrahimi M, Mortaz E. (2018). Nicotine Modulates the Release of Inflammatory Cytokines and Expression of TLR2, TLR4 of Cord Blood Mononuclear Cells. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2018 Aug 12;17(4):372-378. doi: 10.18502/ijaai.v17i4.96. PMID: 30537800

Takeda K, Akira S, (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1-14.

Takeshi Fujii, Masato Mashimo, Yasuhiro Moriwaki, Hidemi Misawa, Shiro Ono, Kazuhide Horiguchi, Koichiro Kawashima, (2017). Physiological functions of the cholinergic system in immune cells, *Journal of Pharmacological Sciences*, Volume 134, Issue 1, 2017, Pages 1-21, <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.002>.

Tamura T, Olin KL, Goldenberg RL, Johnson KE, DuBard MB, Keen CL. (2001). Plasma extracellular superoxide dismutase activity in healthy pregnant women is not influenced by zinc supplementation. *Biol Trace Elem Res.*;80:107-14.

Tångerås L.H, Stodle G.S., Olsen G.D., Leknes A.H., Gundersen A.S., Skei B., Vikdal A.J., Ryan L., Steinkjer B., Myklebost M.F., Langaas M., Austquien R. y Iversen A.C., (2014). Functional Toll-like receptors in primary first-trimester trophoblasts. *J Reprod Immunol.* 106:89-99.

Taylor CW, (1990). The role of G proteins in transmembrane signaling, *Biochem J*; 272: 1-13.

Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*; 23:901-944

Terry, A. V. (2012). Functional Consequences of Repeated Organophosphate Exposure: Potential Non-Cholinergic Mechanisms. *Pharmacology & therapeutics* 134(3): 355–65.

Thaxton, J. E., & Sharma, S. (2010). Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 63(6), 482–491. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00810.x>

Thompson, D. A., Lehmler, H.-J., Kolpin, D., Hladik, M. L., Vargo, J., Schilling, K., Field, R. W. (2020). A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity and implications for human health.

Thongphasuk J, Oberley LW, Oberley TD. (1999). Induction of superoxide dismutase and cytotoxicity by manganese in human breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys.*;365(2):317-27.

Tice, R.; Agurel, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J. and Sasaki, Y.(2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206-221.

Toche P., (2012). Panoramic visión of the immune system. *Revista Médica Clínica Las Condes* 23(4):446-447 [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70335-8)

Tomizawa, M., Casida, J.E., (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotini receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339–364.

Toranzo J. (2016). Producción mundial de manzanas y peras. Programa Nacional Frutales. Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Allen, Río Negro, Argentina, 39 pp.

Townsend, D.M., Tew, K.D., (2003). The role of glutathione- S -transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7369–7375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>.

Treinin, M., Papke, R.L., Nizri, E., Ben-David, Y., Mizrachi, T., Brenner, T., (2017). Role of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and RIC-3 in the Cholinergic Anti-inflammatory pathway. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 17 (2), 90–99.

Tsuneki H, Klink R, Léna C, Korn H, Changeux JP. (2000). Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur J Neurosci.*;12:2475–2485

Tunc O., Thompson J. Y Tremellen K., (2010). Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress. *International Journal of Andrology* 33, 13–21.

Turrens, J.F., Alexandre A, and Lehninger AL (1985) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 237: 408–414.

Uotila J, Tuimala R, Aarnio T, Pyykko K, Ahotupa M. (1991). Lipid peroxidation products, selenium-dependent glutathione peroxidase and vitamin E in normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*;42:95-100.

US EPA (2012). Label review manual. Chapter 5: Ingredient statement. Recuperado el 12 de octubre de 2020. Disponible online en: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-10/documents/chap-05-may-2012.pdf>

US EPA (2015a). Interactive Chemical Safety for Sustainability (iCSS) Dashboard. Washington (DC): United States Environmental Protection Agency. Available from: <http://actor.epa.gov/dashboard/>. Recuperado el 25 de octubre de 2017..

US EPA (2015b). Toxicity Reference Database (ToxRef DB). Computational Toxicology Research Program, United States Environmental Protection Agency. Available from Tox Ref DB: <http://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-forecaster-toxcastm-data>. Recuperado el 25 de octubre de 2017

US EPA (2019), Product Cancellation Order for Certain Pesticide Registrations, Fed.Regist., May 20, 2019.

Vadillo Pérez I, Jiménez Gavilán P, Aranda JI, Denguir Bujanow F, Luque Espinar Ja Y Benavente Herrera J., (2018). Resencia Y Distribución De Contaminantes Emergentes En Cuatro Cuencas Antropizadas Del Sur De La Península Ibérica. En: Agua Subterránea, Medio Ambiente, Salud y Patrimonio Publisher: Asociación Internacional de Hidrogeólogos-Grupo Español. Disponible el 22 de julio 2020 en: https://www.researchgate.net/publication/328987827_Presencia_y_distribucion_de_conta

minantes_emergentes_en_cuatro_cuencas_antropizadas_del_Sur_de_la_Penisula_Iberica

Vaknine S, Soreq H. (2020) Central and peripheral anti-inflammatory effects of acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacology*. 2020 May 15;168:108020. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108020. Epub 2020 Feb 25. PMID: 32143069

Valcke, M., Samuel, O., Bouchard, M., Dumas, P., Belleville, D., Tremblay, C. (2006). "Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides in children living in peri-urban areas of the Province of Quebec, Canada". *IntArchOccupEnvironHealth*. (79), 568-577.

Van Wendel, B., Mora, A., Lindh, C., Hernández-Bonilla, D., Córdoba, L., Wesseling, C., Hoppin, J., Mergler, D. (2016). "Pesticide exposure and neurodevelopment in children aged 6-9 years from Talamanca, Costa Rica". *Cortex*. (85), 137-150.

Velazquez-Flores MA, Salceda R. (2011). Cys-loop ligand-gated ion channels modulation by protein kinases A and C. *Rev Neurol*;52(3):173–81. 5.

Ventura C, Nieto MR, Bourguignon N, et al. (2016). Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 156:1-9. doi:10.1016/j.jsmb.2015.10.010

Vera, B., S. Santa Cruz, and G. Magnarelli. (2012). Plasma Cholinesterase and Carboxylesterase Activities and Nuclear and Mitochondrial Lipid Composition of Human Placenta Associated with Maternal Exposure to Pesticides." *Reproductive Toxicology* 34: 402–7.

Viada Pupo E., Gomez Robles L. y Campana Marrero IR, (2017). Estrés oxidativo. *ccm [online]*. 2017, vol.21(1): 171-186. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000100014&lng=es&nrm=iso. ISSN 1560-4381.

Villaamil-Lepori E.C., Bovi-Mitre G. and Nassetta M. (2013). Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. *Rev. Int. Contam. Ambie*. 29, 25-43.

Virginia, A., Claudia, A., Soledad, B.P., Gabriela, O., Jorge, E.A., Albesa, I., (2013). Nitrosylation: an adverse factor in uremic hemolytic syndrome. Antitoxin effect of *Ziziphus mistol griseb*. *FoodChem. Toxicol*. 56, 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.036>.

Vizcaino E., Grimalt J.O., Fernández-Somoano A. y Tardon A., (2014). Transport of persistent organic pollutants across the human placenta. *EnvironInt*. 65: 107-15

Vota, D., Paparini, D., Hauk, V. et al. (2016). Vasoactive Intestinal Peptide modulates trophoblast-derived cell line function and interaction with phagocytic cells through autocrine pathways. *SciRep* 6, 26364 <https://doi.org/10.1038/srep26364>

Vota, D., Papparini, D., Hauk, V. et al. Vasoactive Intestinal Peptide modulates trophoblast-derived cell line function and interaction with phagocytic cells through autocrine pathways. *SciRep* 6, 26364 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep26364>

Vrachnis N, Vitoratos N, Iliodromiti Z, Sifakis S, Deligeoroglou E, Creatsas G. (2010) Intrauterine inflammation and preterm delivery. *Ann N Y Acad Sci*; 1205:118–122.

Wang H, Yu M., Ochani M., Amella C.A., Tanovic M., Susarla S., Li J.H., Wang H, Yang H., Ulloa L., Al-Abed Y., Czura C.J., y Tracey K.J., (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421(6921):384-388.

Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, et al. (2004) Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *NatMed* 10: 1216–1221

Wang H. Y Joseph J.A., (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay in microplate reader. *Free Radical Biology & Medicine* 27: 612-616.

Wang X, Anadon A, Wu Q, Qiao F, Martinez-Larranaga MR, Yuan Z, et al. (2018). Mechanism of neonicotinoid toxicity: impact on oxidative stress and metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2018;58:471–507. [10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429](https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429)

Wang, A., Padula, A., Sirota, M., Woodruff, T.J., (2016). Environmental influences on reproductive health: the importance of chemical exposures. *Fertil. Steril.* 106 (4), 905–929. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1076>.

Wang, J., Li, M., Zhang, W., Gu, A., Dong, J., Li, J., & Shan, A. (2018). Protective effect of N-Acetylcysteine against oxidative stress induced by Zearalenone via mitochondrial apoptosis pathway in SIEC02 cells. *Toxins*, 10(10), 407. <https://doi.org/10.3390/toxins10100407>

Wang, Y., and S. Zhao. (2010). “Vascular Biology of the Placenta.” Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).

Wessler I and Kirkpatrick CJ, (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology*, vol. 154, pp. 1558–1571.

Wessler I, Kirkpatrick CJ and Racké K, (1998). Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: Expression and function in humans. *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 77. pp. 59–79.

Wessler I, Michel-Schmidt R, Brochhausen C, Kirkpatrick CJ (2012) Subcellular distribution of choline acetyltransferase by immunogold electron microscopy in non-neuronal cells: placenta, airways and murine embryonic stem cells. *LifeSci* 91:977–80. doi: [10.1016/j.lfs.2012.05.012](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.05.012)

Wessler I., Reinheimer T., Kilbinger H., Bittinger F., Kirkpatrick C.J., Saloga J. y Knop J., (2003). Increase in acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis. *LifeSci.* 72:2169–2172

- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. (1988) Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med*; 319(4):189-194.
- Win-Shwe T., Nakajima D. y Fujimaki H., (2012). Involvement of TLR4 in diazinon-induced neurotoxicity in mice. *J UOEH* 34(1):1-13.
- Wonnacott S. (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *TINS*; 20-2, 92-8.
- Wu LG, Saggau P. (1997). Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci*; 20: 204-12.
- Wu, F, Tian, Lin, Y, Xu, W. (2016). Oxidative stress: placenta function and dysfunction. *Am J Reprod Immunol* 76: 258– 271. doi: 10.1111/aji.12454
- Wu, F., Tian, F. J., & Lin, Y. (2015). Oxidative Stress in Placenta: Health and Diseases. *BioMed Research International*, 2015, 293271. <https://doi.org/10.1155/2015/293271>
- Ximmerman AL. Cyclic nucleotide-gated channels, (1995). *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 296-303.
- Yakel JL. (2010). Gating of nicotinic ACh receptors: latest insights into ligand binding and function. *J Physiol.*; 588(Pt 4):597–602.
- Yang W., Carmichael S. L., Roberts E. M., Kegley S. E., Padula A. M, English P. B. and Shaw G. M., (2014). Residential Agricultural Pesticide Exposures and Risk of Neural Tube Defects and Orofacial Clefts among Offspring in the San Joaquin Valley of California, *Am. J. Epidemiol.*, 2014, 179, 740-748
- Yang, Y., Parsons, K.K., Chi, L., Malakauskas, S.M., Le, T.H., (2009). Glutathione S-transferase- μ 1 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and oxidative stress. *Hypertension* 54, 1360–1368. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.139428>.
- Yoo HY, Chang MS, Rho HM. (1999) The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem*. 20;274(34):23887-92
- Zamudio, S., Kovalenko, O., Vanderlelie, J., Illsley, N.P., Heller, D., Belliappa, S. and Perkins, A. (2007). Chronic hypoxia in vivo reduces placental oxidative stress. *Placenta*, 28, 846-853.
- Zappa N., (2014). Exposición a plaguicidas organofosforados: modulación de la expresión de receptores Tipo Toll. Tesis de grado. Universidad Nacional del Comahue.
- Zhang J., Lan W., Qiao H., Jiang A., Mulchandani W., Chen W., (2004). Bioremediation of organophosphorus pesticide by surface-expressed carboxyl esterases from mosquito on *Escherichia coli*. *Biotechnol*. 20: 1567-1571"

Zimmerman H, (1993). Synaptic transmission, cellular and molecular basis. Thieme& Oxford, Stuttgart& New York.

Żukowski P., Maciejczyk M., Matczuk J., Kurek K., Waszkiel D., Żendzian-Piotrowska M. y Zalewska A., (2018). Effect of N-Acetylcysteine on Antioxidant Defense, Oxidative Modification, and Salivary Gland Function in a Rat Model of Insulin Resistance, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, Article ID 6581970, 11 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6581970>

9. Trabajo de respaldo



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

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

Trophoblast toxicity of the neonicotinoid insecticide acetamiprid and an acetamiprid-based formulation

Sebastian Diego Gomez^{a,b}, Pamela Soledad Bustos^{b,c}, Victoria Guadalupe Sánchez^{b,d},
María Gabriela Ortega^{c,e}, Natalia Guñazú^{a,b,*}

^a Departamento de Ciencias del Ambiente, Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud, Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400, Neuquén, 8300, Argentina

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

^c Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Haya de la Torre y Medina Allende, Córdoba, 5000, Argentina

^d Departamento de Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400, Neuquén, 8300, Argentina

^e Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sarsfield 1611, Córdoba, 5000, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Pesticide
Trophoblast
Oxidative stress
Cell death

ABSTRACT

The neonicotinoid (Neo) insecticide family is a relatively new class of pesticides of growing use. There is an increasing concern that human exposure to environmental pollutants *in utero* may be associated with diseases in adulthood. A functional placenta and trophoblasts are a requisite for a healthy pregnancy. The aim of this study was to investigate whether the Neo Acetamiprid (Ace) and one of its commercial formulations (Ace CF) display toxic features to a human first trimester trophoblast cell line. HTR-8/SVneo cells were cultured in the presence of Ace or Ace CF (0.1–100 μ M) for 4 and 24 h, and changes in cell viability, reactive oxygen species, antioxidant system and macromolecule damage levels were evaluated.

Ace and Ace CF are cytotoxic for HTR-8/SVneo trophoblasts. Cell viability loss and oxidative imbalance were triggered by Ace and Ace CF treatments. Impact in the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione S-transferase activities were observed after 24 h exposure to Ace CF. Moreover, Ace CF caused oxidative damage in proteins, lipids and DNA, whereas Ace only damaged proteins. To test oxidative stress as a toxicity mechanism, cells were pre-incubated with the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC), prior Neo treatment. NAC protected trophoblasts from cell death and prevented oxidative damage.

Results demonstrate that Ace (as active principle or CF) is cytotoxic for human trophoblasts, and oxidative stress is a toxicity mechanism. Ace CF exhibited a more toxic effect than the active principle, in an identical exposure scenario.

1. Introduction

Pesticides are substances designed to kill, repel, or control plants, insects and animals that are considered to be pests, and impact negatively on agricultural productivity among other unwanted consequences. The neonicotinoid (Neo) insecticide family is a relatively new class of pesticide structurally similar to nicotine, developed to replace organophosphate and carbamate insecticides (Abreu-Villaça

and Levin, 2017). Neo were thought to have limited toxicity for humans due to their high specificity toward insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChR). However, an *in vitro* study demonstrated that Neo stimulate neurons through nAChR similarly to nicotine (Kimura-Kuroda et al., 2012), and *in vivo* murine models reported Neo neurobehavioral effects (Hirano et al., 2015; Sano et al., 2016; Tanaka, 2012). The European Food Safety Authority (EFSA) evaluated the potential developmental and neurological toxicities of the Neo acetamiprid (Ace) and

Abbreviations: Ace, acetamiprid; Ace CF, acetamiprid commercial formulation; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; NBT, nitroblue tetrazolium; DCFH-DA, dichlorofluorescein diacetate; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GST, glutathione S-transferase; AOPP, advanced oxidative protein products; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; NAC, N-acetyl-L-cysteine; PBS, phosphate-buffered saline; RIPA, radioimmunoprecipitation assay buffer

* Corresponding author at: Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400, Neuquén, 8300, Argentina.

E-mail address: natanien@hotmail.com (N. Guñazú).

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152363>

Received 11 September 2019; Received in revised form 11 December 2019; Accepted 5 January 2020

Available online 11 January 2020

0300-483X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

imidacloprid in December 2013 (European Food Safety Authority, 2013), and in 2018 restricted the use of some Neo (European Food Safety Authority, 2018). In the period from 2005 to 2014 it has been demonstrated an increased detection of Neo residues in fruits (Lozowicka et al., 2016), which denoted the growing use of this insecticide family for agricultural purposes. The United States Department of Agriculture, 2014 in the 2014 pesticide monitoring report found Neo in 12 of 19 samples derived from different fruits and vegetables (Gimino et al., 2017). Additionally, depending upon the application approach and the crop type, approximately 1.6%–28% of the applied Neo insecticide will be taken up by the amended crop (Sur and Tork, 2003), while the rest will be found in other environmental compartments, such as soil or water, or will have been dissipated (Anderson et al., 2015). Neo have been tested in central Wisconsin (USA) groundwater and 78% of all wells tested positive at least once (Bradford et al., 2018). In addition, Neo have been found in non-target plants and vertebrates prey, and foods common to the U.S. American diet, including wild and aqua cultured marine species (Cimino et al., 2017).

There is an increasing concern that human exposure to environmental chemicals in early life (i.e., *in utero* development and/or infancy) may be associated with chronic metabolic disease in adulthood (De Long and Holloway, 2017). Taking into consideration that the placenta barrier allows the transference to the fetus of several xenobiotics (Fisher et al., 2016; Wang et al., 2016), that Ace is found in brain after intake (Ford and Casida, 2006), and its metabolites are found in human neonate urine at postnatal day 2 (Ichikawa et al., 2009), it is suspected that Neo can pass through the placental barrier (Taira, 2014). Intrauterine environment is regarded as the first chemical exposure scenario in life, since some chemicals can be absorbed from the placenta to the fetus. One toxicity mechanism of growing attention among pesticides is the induction of oxidative imbalance, which has also been proposed as the underlying mechanism of several toxic alterations induced by Neo. Oxidative imbalance was determined as a deleterious effect of Ace leading to cytogenotoxicity in bacteria and plants (Ford et al., 2011; Yao et al., 2006), and in rat neurotoxicity (Dhouib et al., 2017). Abou-Donia et al. (2008) and Sano et al. (2016) reported that murine exposure to the Neo imidacloprid and Ace in uterus induces neurobehavioral and behavioural abnormalities, respectively. Recently, Burke et al. (2018) have postulated that imidacloprid can be transferred from the mother to the pups; and that exposure of mouse pups likely occurred through the fetal blood circulation and *via* mother's milk. In order to reach fetal blood chemicals must go through the placenta. It has been widely accepted that a healthy placenta is a prerequisite for a healthy pregnancy. The placenta fulfills several physiological functions such as fetal nutrition, gas exchange, protein and hormone synthesis, among others (Gude et al., 2004), and placental trophoblasts are key players throughout these processes. Human trophoblast cell lines have been extensively used for investigating the *in vitro* effects of xenobiotics in the placenta (Guiñazú et al., 2012; Dominguez-López et al., 2014; Mannelli et al., 2015).

Taking into consideration that Ace is a Neo commonly used in a wide range of crops against insect pests (Çavaş et al., 2012; Jeschke et al., 2011), and that little is known about its toxicity to mammalian *in vitro* systems, the aim of this work was to evaluate Ace effects on the HTR-8/SVneo human trophoblast cell line. In addition, since pesticides are used throughout the world as mixtures called formulations (Mesnage et al., 2014), cellular effects were also evaluated with one Ace commercial formulation (Ace CF). Cell viability changes and reactive oxygen and nitrogen species production as well as antioxidant cell status were determined. Cell death mechanism and lipid, protein and DNA damage were also analyzed in the presence of both insecticide presentations.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), N-acetyl-L-cysteine (NAC), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), nitrobluetetrazolium (NBT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), Griess reagent, riboflavin, methionine, 1,1,3,3, tetraethoxypropane (TEP), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 5,5 -dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), sodium dodecyl sulphate (SDS) and L-glutathione reduced (GSH) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-Bax, anti-Bcl-2 and anti- β -actin rabbit polyclonal antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Texas, USA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody was from Sigma Aldrich.

The neonicotinoid acetamiprid (Ace) was of standard analytical grade according to the supplier (AccuStandard Inc, New Haven, USA). The commercial formulation (Ace CF) used, Assail® (SUMMIT AGRO), contained acetamiprid 70% as active principle, and 30% of other ingredients (gently donated by Dr. Liliana Cichón, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina).

2.2. Cell culture and insecticide treatment

HTR-8/SVneo cell line was gently donated by Dr. Alicia Damiano (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires). Cells were grown in RPMI-1640 medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) (NATOCOR, Córdoba, Argentina), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), at 37 °C in 5% CO₂. Cells were plated at 1×10^6 cells per 100 mm petri dish and incubated under standard cell culture conditions until achieving an 80–90% confluence. Cells were trypsinized with 0.1% trypsin/EDTA (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) in PBS pH 7.4, washed twice (PBS pH 7.4) and plated. For insecticide treatments, the concentrations (Ace and Ace CF) assayed were 0.1, 1, 10 and 100 μ M. The insecticides were dissolved in DMSO and freshly prepared prior to use. Control cells contained equal quantities of DMSO (0.02 %). The concentration range selected for the experimental design was in accord with the field concentration used of Ace, 5 g/hl (approximately 157 μ M) (Cichón et al., 2017), for both treatments. The literature reported acute blood concentrations of Ace 10.7, 26.8 and 94.7 μ M (Imamura et al., 2010; Todani et al., 2008). The concentrations chosen were also in the range of other *in vitro* studies assaying Ace, which ranged from 179 μ M (Kocaman and Topaktas, 2007) to low dose of 1 μ M (Kimura-Kuroda et al., 2016).

2.3. Cell viability

Cells were treated with the insecticide alone, or pre-incubated with 2 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC) for 2 h and then Ace or Ace CF were added to the cell cultures for 4 and 24 h. Incubation times were chosen in order to determine whether a short exposure time was able to induce cell alterations, as soon as in 4 and 24 h. Cellular models to evaluate pesticide and other xenobiotic toxicity usually perform studies in short time periods as the utilized here (He et al., 2015; Hirano et al., 2019). Cell viability was tested by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann, 1983). Briefly, 1×10^4 cells/ml were cultured in 96-well plates and treated with Ace or Ace CF 0.1, 1, 10 and 100 μ M, for 4 and 24 h at 37 °C. After exposure to insecticides, cells were incubated for 2 h at 37 °C with MTT 0.5 mg/ml. Then 150 μ l DMSO was added to the cells and gently shaken for 30 min. Absorbance was recorded at 570 nm (Thermo Max microplate reader) and results were expressed as percentage of control values.

2.4. Western blot analysis

HTR-8/SVneo cells 2×10^5 cells/ml were cultured in 6-well plate and treated with Ace or Ace CF (0.1, 1, 10, 100 μM) during 24 h. Then, cell homogenates were obtained in RIPA buffer (1 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate, 9 % SDS, 5 % 1,4-dithiothreitol –DTT-, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μg phenylmethanesulfonyl fluoride -PMSF- and 30 μg aprotinin). Equal amount of protein (50 μg) was diluted in SDS sample buffer (Tris –HCl 0.5 M pH 6.8, glycerol, 10 % SDS, bromophenol blue), boiled at 100 °C for 1 min, and loaded onto a 12 % SDS-PAGE gel and run at 150 V for 1 h. After migration, proteins were electro-transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) at 100 V for 1.5 h. The membrane was blocked with Tris buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, and pH 7.4) containing 0.05 % Tween 20 and 5 % non-fat dry milk. Then, washed and incubated overnight with the following primary antibodies: anti-Bax (1:1000), anti-Bcl-2 (1:1000), or anti- β -actin (1:5000), this later was used as loading control. After washing, the blots were incubated with the peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit antibody (1:10000) for 1 h at room temperature. Protein antibody complexes were visualized by an enhanced chemiluminescence detection system. The band density was evaluated using Gel-Pro Analyzer 3.2, and densities were normalized to the values of β -actin per sample. Results were expressed as arbitrary units.

2.5. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

HTR-8/SVneo cells 2×10^5 cells/ml were cultured in 6-well plate and treated with Ace or Ace CF (0.1, 1, 10, 100 μM) during 24 h. Total RNA was extracted from each sample using TRIzol® reagent (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). cDNA was synthesized using the Strascript reverse transcriptase kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions.

Nicotinic acetylcholine receptor subunit $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) mRNA expression was measured using a qPCR assay conducted on the Mastercycler® epRealplex (Eppendorf). Briefly, 5 μl cDNA of a dilution (1:25) from samples were amplified in 15 μl final volume containing IQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), forward and reverse primers and DEPC water. Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide (YWHAZ) gene was used as the internal control, in order to normalize $\alpha 7$ nAChR. The forward and reverse primer sequences were as follows: $\alpha 7$ nAChR (5' to 3') F: GTACGCTGGITTC CCTTTGA, R: CCACTAGTCCCATCTC, amplification size 139 bp, accession number NM_000746.4 (Machaalani et al., 2014); YWHAZ (5' to 3') F: CCTGCATGAAGTCTGTAAGTCTG, R: TTGAGACGACCCCTCCA AGATG, amplification size 120 bp, accession number EF094937.1 (Choudhury et al., 2017). Primers efficiencies reached 100 %. PCR program consisted in an initial denaturation at 95 °C for 10 min; followed by 40 cycles of amplification (95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s). Melting curve analysis was performed. All PCR reactions were run in triplicates and non-template controls were included. PCR products were confirmed by electrophoresis in 2 % agarose gel, stained with GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA). Relative gene expressions were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method for relative quantification.

2.6. Reactive oxygen and nitrogen species analysis

Reactive oxygen species (ROS) production, in HTR-8/SVneo cells, was determined either by colorimetric nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay (Choi et al., 2007) and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent assay (Yang et al., 2009). Briefly, 1×10^4 cells/ml were cultured in 96-well plates and treated with Ace and Ace CF 0.1, 1, 10 and 100 μM , for 4 and 24 h at 37 °C. Then, culture medium was removed, and NBT solution (0.01 %) containing PMA (0.125 μM),

was added and incubated for 45 min at 37 °C. Then, the cells were lysed with 250 μl of lysis solution (115 μl KOH 2 N and 135 μl DMSO), and formazan crystals were solubilized by 10 min incubation with gentle shaking. Absorbance was recorded at 630 nm (Rayto TR 2100C microplate reader). The results were expressed as percentages compared to control.

For DCFH-DA assay, 1×10^4 cells/ml were plated in opaque 96-well plate and treated with Ace or Ace CF 0.1, 1, 10 and 100 μM , for 4 and 24 h at 37 °C. DCFH-DA (25 μM) was added to each well and incubated for 30 min, prior Neo treatment. Fluorescence was measured at λ excitation 485 nm and λ emission 535 nm (Hitachi H700). Results were expressed as relative fluorescence units (RFU) percentages of control values.

Nitric oxide concentration was evaluated indirectly by assaying nitrite concentration in culture supernatants, with the Griess reaction (Guinazú et al., 2012). Briefly, 1×10^4 cells/ml were cultured in 96-well plates and treated with Ace and Ace CF 0.1, 1, 10 and 100 μM , for 4 and 24 h at 37 °C. Culture supernatant (100 μl) was mixed with 100 μl Griess solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 30 min incubation absorbance was measured at 540 nm (ThermoMax, Molecular Devices), and nitrite concentration was calculated using a standard curve of sodium nitrite (μM).

2.7. Evaluation of antioxidant cellular defenses

Superoxide dismutase (SOD) activity was indirectly determined through NBT reduction according to Bustos et al. (2016). Superoxide anion reduces NBT to blue formazan which can be spectrophotometrically monitored. In this sense, a lower NBT reduction represents higher SOD activity. Briefly, 1×10^4 cells/ml were cultured in sterile 96-well plate and treated with Ace or Ace CF (0.1, 1, 10, 100 μM) for 4 and 24 h. After exposure, 175 μl of reaction mixture (riboflavin 2 μM , methionine 13 mM, ethylenedinitrilo tetraacetic acid –EDTA- 100 nM and NBT 75 μM) was added to each well. Plates were exposed to 20 W fluorescent lamp for 15 min; absorbance at 560 nm was then recorded. Results were expressed as SOD units. According to Beauchamp and Fridovich (1971), a SOD unit is defined as the enzyme equivalent to reduce 50 percent of NBT reduction.

Catalase (CAT) activity was determined by recording the continuous decrease in absorbance at 240 nm, as described previously (Rivero Osimani et al., 2016). Briefly, 2×10^5 cells/ml were cultured in 6-well plates and treated with Ace or Ace CF (0.1, 1, 10, 100 μM) for 4 and 24 h. Cells were then lysed in Na_2HPO_4 50 mM, 0.1 % Triton X-100. Activity reaction was performed in 500 μl Na_2HPO_4 50 mM, H_2O_2 81.5 mM, pH 7.0, after the addition of 10 μg protein per sample at 37 °C. Baseline absorbance remained constant and controlled to be 1000 absorption units. CAT activity was expressed as units per ml, using a molar extinction coefficient of $40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Protein content was quantified by the Bradford (1976) method.

Glutathione S-transferase (GST) activity was determined spectrophotometrically at 340 nm according to Rivero Osimani et al., 2016. 2×10^5 cells/ml were cultured in 6-well plates and treated with Ace or Ace CF (0.1, 1, 10, 100 μM) for 4 and 24 h. Cell lysates were obtained in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5) containing CDNB 50 mM dissolved in acetonitrile, and 50 mM glutathione in a final volume of 1 ml. The activity was expressed as unit of GST. A unit of GST was defined as the enzyme equivalent to produce CDNB conjugate (nmol/min x mg protein) using the extinction coefficient ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Protein content was quantified by the Bradford (1976) method.

GSH content was determined by the colorimetric Ellman, 1959 method, based on color development after DTNB interaction with the GSH sulfhydryl group. 2×10^5 cells/ml were cultured in 6-well plates and treated with Ace or Ace CF (0.1, 1, 10, 100 μM) for 4 and 24 h. Cells lysates were obtained in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5). Protein content was quantified by the Bradford (1976) method. Then, 250 μl of lysates were treated with trichloroacetic acid (10 %) and

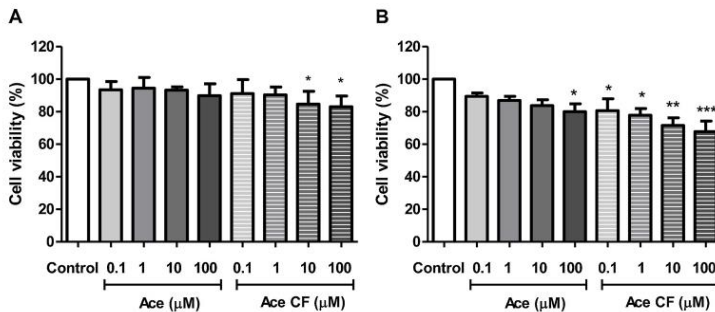


Fig. 1. HTR-8/SVneo trophoblast cell viability. The effect of the neonicotinoid acetaminophen (Ace) and its commercial formulation (Ace CF) (0.1–100 μM) in trophoblast cell viability was determined by the MTT assay after 4 (A) and 24 (B) h exposure to the insecticide. Cell viability is expressed as mean ± SD of three independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 statistical differences compared to controls.

centrifuged for 10 min at 10,000 \times g at 4 °C. Reaction was initiated by the addition of Ellman's reagent (potassium phosphate buffer 0.25 M, 1.5 mM DTNB). For quantification a calibration GSH standard curve was performed. The measurements were carried out at 412 nm (UV/vis 16,030 Shimadzu Spectrophotometer). The results were expressed as percentages of GSH content compared to control values.

2.8. Evaluation of biomarkers of oxidative damage

Protein oxidation was determined by the Advanced Protein Oxidation Products (AOPP) technique, as previously described (Virginia et al., 2013). 3×10^5 cells/ml were cultured in 12-well plates and treated with Ace or Ace CF (0.1, 1, 10, 100 μM) for 4 and 24 h at 37 °C or pre-incubated with NAC (2 mM) for 2 h before the Neo treatments. Cell homogenates were obtained in PBS. Homogenates (150 μl) were mixed with acetic acid 10 % (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) and 1.16 M potassium iodide. Absorbance was recorded at 340 nm. For chloramine quantification a chloramine T (Cicarelli, San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) standard curve was used. Results were expressed as μmol chloramine/mg protein. Protein content was determined by the Bradford (1976) method.

Lipid peroxidation was determined with the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, according to Bustos et al. (2016). Briefly, 3×10^5 cells/ml were cultured in 12-well plates and treated with Ace or Ace CF (0.1, 1, 10, 100 μM) for 4 and 24 h or pre-incubated with NAC (2 mM) for 2 h prior Neo treatment. Cells homogenates were obtained in 250 μl PBS pH 7.4. 200 μl cell homogenate were mixed with thiobarbituric acid (TBA) - chlorhydric acid (HCl) - trichloroacetic acid (TCA) reaction mixture (0.5 %, 0.25 N, 15 %, respectively) and heated at 95 °C for 45 min. Then, in order to extract lipid peroxidation products *n*-butanol:pyridine (350 μl, 15:1 respectively) was incorporated. Samples were centrifuged at 1,000 \times g for 5 min. Organic phase absorbance was measured at 540 nm. Calibration curve was performed with 1,1,3,3, tetraethoxypropane (TEP) (0.1–100 nM). Protein content was quantified by the Bradford (1976) method. Results were expressed as nmol MDA/mg protein. MDA is proportionally formed from TEP, as a result of lipid peroxidation.

DNA damage was determined by the alkaline comet assay as previously described by Simoniello et al. (2010). 2×10^5 cells were cultured in 12-well plate and treated with Ace or Ace CF (0.1, 1, 10, 100 μM) for 4 and 24 h. Cell samples were obtained in PBS pH 7.4. Then samples were embedded in 1 % low melting point agarose and putted on a slide. Slides were placed in cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH 10.0–10.5) containing freshly added 1 % (v/v) Triton X-100 and 10 % (v/v) DMSO. The slides were incubated in alkaline buffer solution (10 N NaOH and 200 mM Na₂EDTA; pH > 10) in darkness for 20 min. DNA electrophoresis was performed for 20 min at 25 V (0.90 V/cm) and 300 mA. After electrophoresis, the alkaline solution was neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5) at room temperature,

and the slides were fixed with ethanol and stained with ethidium bromide (20 μg/ml). For microscopic analysis, slides were randomized, coded, and blind scored. Then, 100 cell images of three replicate slides were randomly selected and observed at X 20, using the epifluorescence Nikon® Eclipse 80i microscope with an excitation filter of 515–560 nm and a barrier filter of 590 nm coupled with a digital camera. Comets were analyzed visually on a scale of I–IV (categories depending on the DNA damage level). The four categories were established according to the total comet length: I (< 20 μm), II (20–40 μm), III (40–80 μm), and IV (> 80 μm). Results were expressed as Genotoxic Damage Index and calculated by means of the following formula: Genotoxic Damage Index = cell number category I + 2 \times cell number category II + 3 \times cell number category III + 4 \times cell number category IV. Results were expressed as mean values of Genotoxic Damage Index.

2.9. Statistical analysis

All data were obtained from at least two biological replicates and results were shown as the mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was conducted with GraphPad Prism v5. Analysis of variance and Dunnett's post-hoc test was carried out, and a *p* < 0.05 value was considered for statistical significances.

3. Results

3.1. Effect of neonicotinoid on cell viability

Changes in HTR-8/SVneo cell viability were analyzed after the exposure to 0.1, 1, 10 and 100 μM acetaminophen (Ace) or to the commercial formulation (Ace CF), which contained Ace at the same concentration range. Cell viability was differentially modulated by Ace and Ace CF. After 4 h exposure to Ace non-significant changes were observed in cell viability, while Ace CF significantly decreased cell viability at 10 and 100 μM (Fig. 1A). A similar trend was observed after 24 h exposure. The highest Ace concentration significantly decreased cell viability, while Ace CF significantly decreased cell viability at all concentrations assayed (Fig. 1B).

3.2. Cell death pathway triggered by neonicotinoid

In order to determine whether apoptosis related proteins Bax and Bcl-2 were modified by Neo treatments, protein expression levels were analyzed by western blot in HTR-8/SVneo trophoblast after treatment with Ace or Ace CF (0.1, 1, 10, 100 μM). Ace and Ace CF significantly altered Bax/Bcl-2 ratio. Ace increased Bax/Bcl-2 ratio at 1, 10 and 100 μM (Fig. 2A), whereas a Bax/Bcl-2 augmented ratio was observed at all Ace CF concentrations assayed (Fig. 2B).

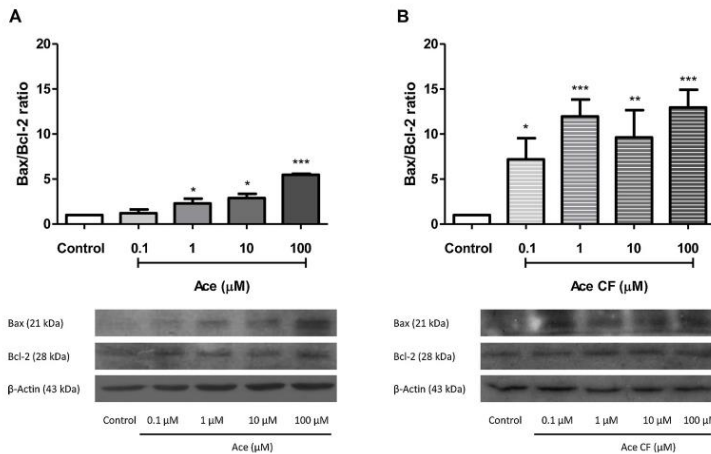


Fig. 2. Bax and Bcl-2 protein expression. The expression of Bax and Bcl-2 were assessed in HTR-8/SVneotrophoblast after 24 h incubation with the neonicotinoida cetamiprid (Ace) and its commercial formulation (Ace CF) (0.1–100 μM), by western blot (A and B, respectively). Band relative intensity was estimated by standardization with β-actin, by densitometry analysis with Gel Pro3 Analyzer, 3.2 program. Results are expressed as mean ± SD. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 statistical differences compared to controls.

3.3. Effect of neonicotinoid on a nicotinic acetylcholine receptor

Nicotinic acetylcholine receptor subunit $\alpha 7$ transcript expression was assayed after the exposure of HTR-8/SVneo to Ace or Ace CF (0.1, 1, 10 and 100 μM), for 24 h. Non-significant differences were detected (Fig. 3).

3.4. Effect of neonicotinoid on reactive species levels

Superoxide anion levels were analyzed by NBT reduction technique. Cell incubation for 4 or 24 h with Ace induced non-significant changes, while 10 and 100 μM Ace CF significantly increased superoxide anion production (Fig. 4A and 4B).

A higher range of ROS were also determined with DCFH-DA reagent. After 4 h exposure with Neo treatments, only 10 and 100 μM Ace CF increased ROS production whereas a prolonged incubation of 24 h significantly augmented ROS levels in Ace 10 and 100 μM conditions and all concentrations of Ace CF assayed (Table 1). No changes in nitric oxide levels in culture supernatants were observed in HTR-8/SVneo

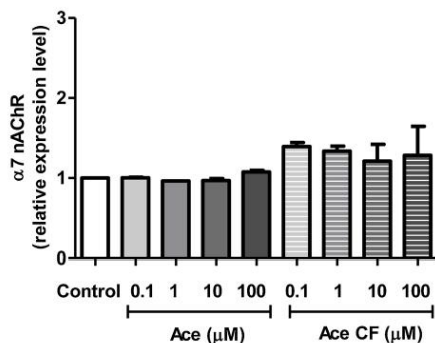


Fig. 3. Relative expression of $\alpha 7$ nAChR in HTR-8/SVneo trophoblast cells. The effect of the neonicotinoid acetamiprid (Ace) and its commercial formulation (Ace CF) (0.1–100 μM) in $\alpha 7$ nAChR transcript level was determined by real time RT-PCR after 24 h exposure to the insecticide. mRNA expression was expressed as fold change compared to control (mean ± SD) of two independent experiments.

cells after Ace or Ace CF exposure for 4 and 24 h (data not shown).

3.5. Effect of neonicotinoid on endogenous antioxidant defenses

Oxidative imbalance can result as a consequence of an increase in reactive species, a decrease in scavenger molecules and antioxidant enzymes, or a combination of both. The redox homeostasis was evaluated by the determination of the antioxidant molecule glutathione (GSH) content and the activities of glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), enzymes relevant for redox defense.

The levels of GSH showed non-significant changes at all the conditions studied (Fig. 5A and 5B). GST activity analysis indicated that Ace was not able to modify GST activity after 4 h and 24 h incubation. In contrast, after 24 h incubation Ace CF 1, 10, 100 μM significantly diminished GST activity (Fig. 5C and 5D).

CAT enzyme analysis indicated that activity decreased after 4 h incubation with the highest Ace concentration, and after 24 h incubation with 10 and 100 μM Ace. In contrast, Ace CF significantly decreased CAT activity at 10 and 100 μM after 4 h incubation and at 1, 10 and 100 μM after 24 h incubation (Fig. 5E and 5F).

SOD activity analysis indicated that Ace did not significantly modify SOD activity after 4 h and 24 h exposure. In contrast 10 and 100 μM Ace CF decreased SOD activity after 4 h and 24 h exposure (Fig. 5G and 5H).

3.6. Biomacromolecule damage induced by neonicotinoid

In order to determine whether oxidative imbalance induced by Ace and Ace CF impacted in cellular macromolecules, advanced oxidation protein products (AOPP), lipid peroxidation (TBARS), and DNA damage (comet assay) were determined in the cells treated with the Neo insecticide.

Cell incubation for 4 h with Ace induced non-significant changes in AOPP, while 10 and 100 μM of Ace CF significantly increased protein oxidation in trophoblast cells (Fig. 6A). A prolonged incubation of 24 h, significantly augmented AOPP levels in 100 μM Ace, and in all the Ace CF concentrations assayed (Fig. 6B).

Similarly, cell exposure to Ace for 4 and 24 h induced non-significant increases in MDA levels cells, while cell exposure to Ace CF for 4 h significantly increased MDA levels at 10 and 100 μM. After 24 h cell exposure to Ace CF, 1, 10 and 100 μM significantly increased MDA

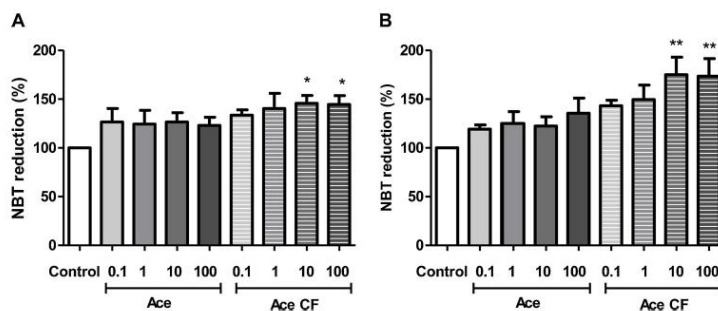


Fig. 4. Reactive oxygen species levels in HTR-8/SVneo trophoblast cells. The effect of the neonicotinoid acetamiprid (Ace) and its commercial formulation (Ace CF) (0.1–100 μM) in reactive oxygen species production was determined by the nitroblue tetrazolium (NBT) assay after 4 (A) and 24 (B) h exposure to the insecticide. NBT reduction was expressed as percentages (mean ± SD) of three independent experiments. *p < 0.05, **p < 0.01, statistical differences compared to control.

levels (Fig. 6C and 6D).

To investigate possible DNA damage, cells from all exposure conditions were processed by the alkaline comet assay. Genotoxic damage index was significantly higher in Ace CF 0.1, 1, 10, and 100 μM concentrations after 4 and 24 h exposure. Treatment with Ace induced non-significant DNA damage (Fig. 7A and 7B). Representative pictures of cells after 24 h exposition showed an increased in comets category IV (Fig. 7C).

3.7. Effect of N-acetyl-L-cysteine on neonicotinoid induced cell damage

To study whether oxidative imbalance was associated with cell damage induced by Neo treatments, cells were pre-treated with the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) (2 mM). Results demonstrated that NAC pre-treatment for 2 h, significantly prevented cell viability decrease and protein oxidation (AOPP) compared to cells treated with 100 μM Ace alone (Table 2). TBARS and genetic damage were not determined in the NAC condition, since Ace alone induced non-significant changes in these both cellular parameters.

On the other hand, NAC pre-treatment avoided cell viability loss and DNA damage compared to cells treated with Ace CF alone, at all the concentrations tested. For protein (AOPP) and lipid (TBARS) oxidation levels, NAC pre-treatment was not able to reverse pesticide damage to the control values (Table 2). A partial significant reduction in TBARS levels was observed in the condition Ace CF 100 μM + NAC vs Ace CF 100 μM.

4. Discussion

The Neo insecticides display low environmental persistence and low toxicity to mammals, however studies discuss animal and human detrimental effects (Calderón-Segura et al., 2012; Cimino et al., 2017; Green et al., 2005; Kocaman and Topaktas, 2007; Maiefisch et al., 2001; Wang et al., 2017). In this sense, it has been reported the toxic effects of Ace in different cell lines such as HepG2 (Şenyıldız et al.,

2018), SH-SY5Y (Şenyıldız et al., 2018), Caco-2 (Çavaş et al., 2012), and in primary cell culture of peripheral blood lymphocytes (Kocaman and Topaktas, 2007). Recently, it has been demonstrated that embryonic cells are sensitive to Neo toxicity, being in higher deleterious order of thiacloprid > acetamiprid, thiomethoxam > clothianidin (Babel'ova et al., 2017). Moreover, a transient exposure to a Neo over the early developmental period induced long-lasting changes in behaviour and brain function in mice (Burke et al., 2018). Results obtained in the present research demonstrate that Ace (10 and 100 μM), is cytotoxic to a human trophoblast cell line after 24 h incubation. In contrast, the commercial formulation Ace CF produced higher detrimental effects on cell viability at all the times and with most concentrations analyzed. Necrosis, apoptosis and autophagy, are death mechanisms that can be triggered by environmental pollutants. The Bcl-2 family, as the pro-apoptotic protein Bax and the anti-apoptotic protein Bcl-2, is important in the mitochondrial apoptotic pathway (Elmore, 2007). Bax and Bcl-2 have been shown to be regulated by insecticides (Hsu et al., 2019). Recently Abd-Elhakim et al. (2018) demonstrated that exposure to the Neo imidacloprid augments Bax positive cells and low Bcl-2 expression, in rats. Results presented here demonstrate that Ace CF treatment for 24 h increased Bax/Bcl-2 ratio, promoting cell apoptosis. The intrinsic pathway of apoptosis can be triggered by a variety of intracellular stress inducers, including DNA damage, oxidative stress, UV and γ-irradiation, toxins, growth factor deprivation, and endoplasmic reticulum (ER) stress (Cory et al., 2003; Guicciardi et al., 2013). Oxidative stress and DNA and protein damage were determined after cell exposure to Ace CF, and probably participate as apoptosis inducers in this model. Nonetheless other cell death pathway not studied here cannot be ruled out.

It has been demonstrated α7 nAChR mediates some of acetamiprid effects in brain (Kimura-kuroda 2012), and it is expressed in the placenta (Lips et al., 2005) and in HTR-8/SVneo (Komine-Aizawa et al., 2015). α7 nAChR has been postulated to be involved in the modulation of the inflammatory response in non-neuronal systems (Hajiasgharzadeh et al., 2019; Bouzat et al., 2018; Treinin et al., 2017),

Table 1

Reactive oxygen species production in HTR-8/SVneo trophoblasts after exposure to the neonicotinoid acetamiprid (Ace) and its commercial formulation (Ace CF) for 4 and 24 h.

	4 h		24 h	
	Ace	Ace CF	Ace	Ace CF
Control	100.00 ± 16.08		100.00 ± 5.43	
0.1 μM	102.09 ± 6.14	118.61 ± 13.96	95.34 ± 0.98	131.71 ± 5.36***
1 μM	104.88 ± 7.72	125.98 ± 16.41	109.23 ± 10.66	145.93 ± 5.76***
10 μM	106.87 ± 4.43	130.28 ± 15.50*	115.06 ± 7.64*	170.46 ± 1.89***
100 μM	110.52 ± 4.37	141.66 ± 28.78**	115.45 ± 2.45*	180.82 ± 6.81***

Data is expressed as relative fluorescence units percentages (mean ± SD) of three independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001 statistical differences compared to control group.

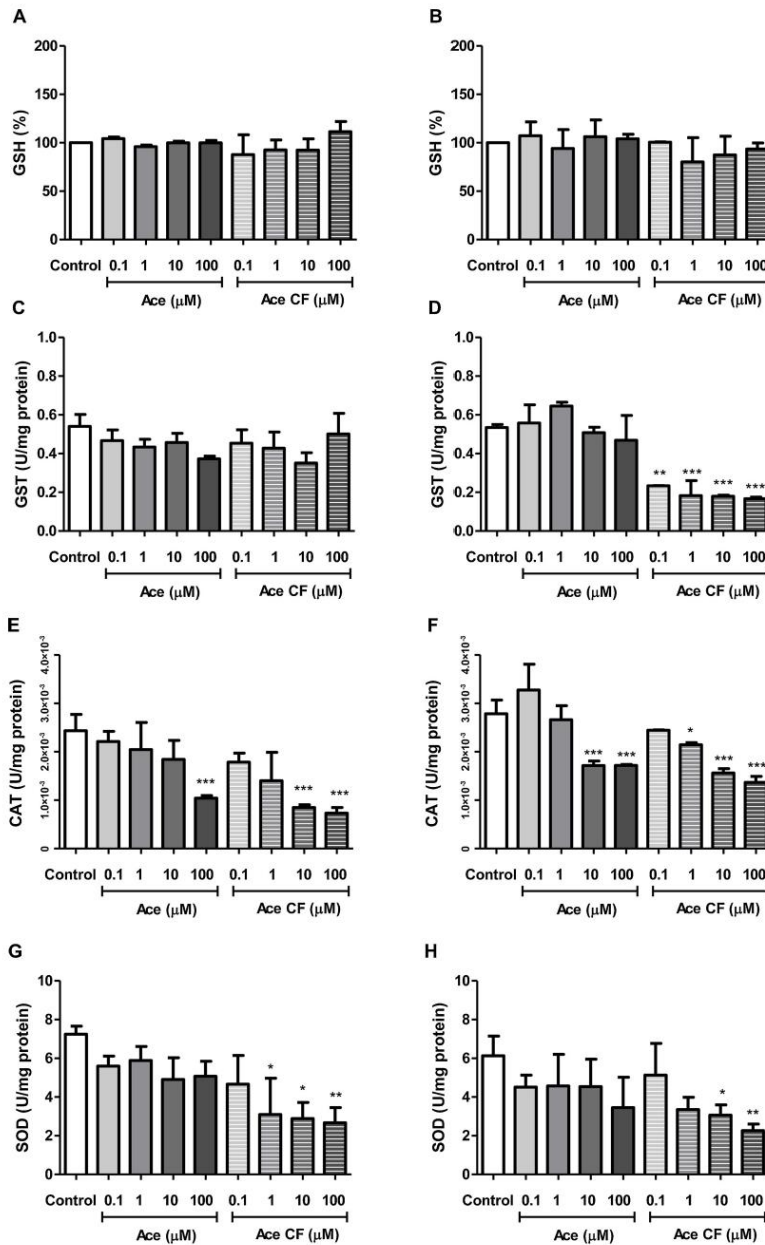


Fig. 5. Antioxidant defense system in HTR-8/SVneo trophoblasts. Glutathione (GSH) content, glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) enzyme activities were determined after cell exposure to acetaminophen (Ace) and its commercial formulation (Ace CF). GSH content expressed as percentages compared to control cells was determined after 4 (A) and 24 h (B) incubations. GST activity expressed as U/mg protein was determined after 4 (C) and 24 h (D). CAT activity expressed as U/mg protein, was determined after 4 (E) and 24 h (F) incubations. SOD activity expressed as U/mg protein was determined after 4 (G) and 24 h (H) incubations. Graphs show mean values \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ statistical differences compared to control.

and considering the inflammatory scenario observed after exposure to Neo, $\alpha 7$ nAChR mRNA expression levels were analyzed, Results presented here indicate that neither Ace nor Ace CF altered $\alpha 7$ nAChR mRNA expression levels; however more studies are needed to unravel

whether $\alpha 7$ nAChR triggering mediates the effects observed in HTR-8/SVneo cells. Moreover other nicotinic receptor not analyzed here can't be ruled out, and more studies are needed.

Toxic detrimental effects derived from xenobiotic exposure,

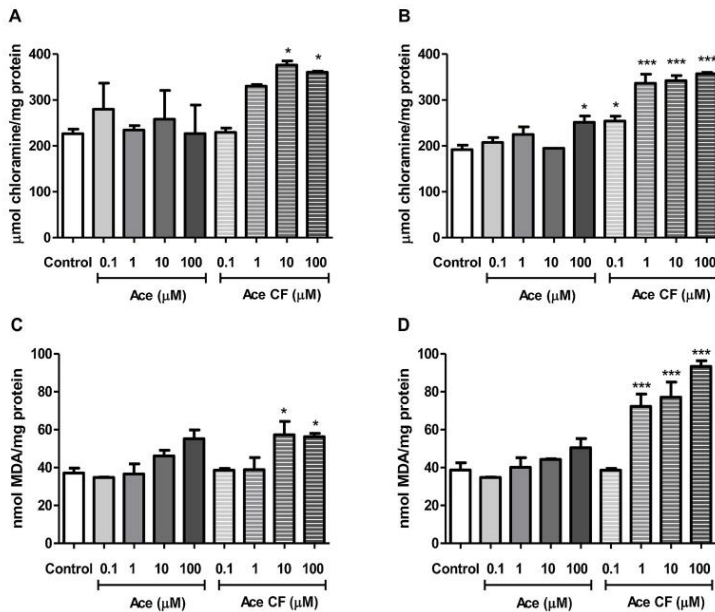


Fig. 6. Oxidative damage of biomolecules in HTR-8/SVneo trophoblast. Protein oxidation products and thiobarbituric acid reactive substances were determined after cell exposure to acetamiprid (Ace) and its commercial formulation (Ace CF). Advanced protein oxidation products expressed as μmol chloramine/mg protein, were determined after 4 (A) and 24 h (B) insecticide incubations. Thiobarbituric acid reactive substances expressed as nmol MDA/mg protein, were determined after 4 (C) and 24 h (D) insecticide incubations. Graphs show mean values \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ statistical differences compared to controls.

including pesticides, have been linked to oxidative imbalance induction in human and animal models (Asghari et al., 2017; Wang et al., 2017). The results obtained here clearly show that both Ace and Ace CF triggered ROS production in trophoblasts. Superoxide anion production was determined by NBT reduction, and a wider range of reactive species were determined by DCFH-DA (Niocel et al., 2019; Rastogi et al., 2010). Increase in superoxide anion was observed after 4 and 24 h incubation with 10 and 100 μM Ace CF. Interestingly, an increase in reactive species was determined after 24 h incubation with acetamiprid presentations: the active principle and the commercial formulation. This is the first report in the literature indicating that Ace and Ace CF increase ROS production in HTR-8/SVneo trophoblasts. It has been stated that oxidative stress plays an important role in placental function and regulation (Sharp et al., 2010). High levels of reactive oxygen species in early pregnancy contributes to preeclampsia pathogenesis (Matsubara et al., 2015), intrauterine growth restriction (Gurugubelli Krishna and Vishnu Bhat, 2018) and preterm birth (Paules et al., 2019). Exposure to environmental factors such as pollutants and xenobiotics, among others, have been linked to increased ROS-related effects and pregnancy complications (Bodin et al., 2015; Philips et al., 2019; LaRocca et al., 2016; Malmqvist et al., 2017; Correia-Branco et al., 2018). Furthermore, it is suggested that neonicotinoids may have detrimental effects during pregnancy, Babel'ova et al., 2017, concluded that neonicotinoids and their commercial products in the environment of pre-implantation embryos can negatively influence their development and quality, as shown by decreased cell proliferation and increased apoptosis incidence in the blastocysts obtained. Neonicotinoid-induced changes during the preimplantation period of development could be considered as a potential risk factor in mammalian reproduction (Babel'ova et al., 2017).

Changes in the oxidative balance, such as an increase in reactive species, a decrease in the radical scavenging systems or both, may alter cellular integrity. Antioxidant cellular systems consist of non-enzymatic antioxidants such as GSH and enzymatic antioxidants such as SOD, CAT, GST, among others, which collectively reduce the oxidative state

(Mehta and Gowder, 2015). Our report indicates that Ace significantly increases ROS and decreases the antioxidant enzyme CAT activity, mainly after 24 h exposure to the higher concentrations. The commercial formulation tested also induced redox imbalance, showing a higher and earlier response at lower concentrations than the active principle alone and also altered another antioxidant defense component as SOD. Chakroun et al. (2016), reported that rat liver SOD and CAT activities decreased after sub chronic exposure to Ace. Other authors have reported that Ace administration to Wistar rats decreased CAT and increased SOD activities in the brain (Gasmi et al., 2017). Differences in the experimental models may be the reason for the differences in enzyme activity found in this work. Nonetheless, ROS increase and oxidative stress is a hallmark of Ace toxic alteration in most experimental models, included the one presented here (Chakroun et al., 2016; Gasmi et al., 2017; Kong et al., 2017; Wang et al., 2017).

Glutathione S-transferase (GST), a family of phase II detoxification enzymes, protects cellular macromolecules from the attack of reactive electrophiles. Specifically, GSTs catalyze the conjugation of GSH to a wide variety of endogenous and exogenous electrophilic compounds (Townsend and Tew, 2003). GST system performs the detoxification not only of drugs and chemical agents but also some reactive internal biomolecules (Deyashi and Chakraborty, 2016). Our results indicate that GST activity displayed a significant decrease after Ace CF treatment for 24 h. In contrast, neither Ace nor Ace CF changed GSH content. Similar results have been reported in studies about exposure to toxic agents and pesticides (Gundersen et al., 2018).

The oxidative modification of proteins, as a result of oxidative stress, is an irreversible process, advanced oxidation protein products (AOPP) are well-known biomarkers of the oxidative modification of proteins (Gryszczynska et al., 2017). The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, measures the concentration of malondialdehyde that is produced due to degradation of unstable lipid peroxides (Dasgupta and Klein, 2014). The comet assay is the method of choice for measuring DNA damage in human cells, and is a sensitive assay for genotoxicity detection caused by insecticides, including Neo

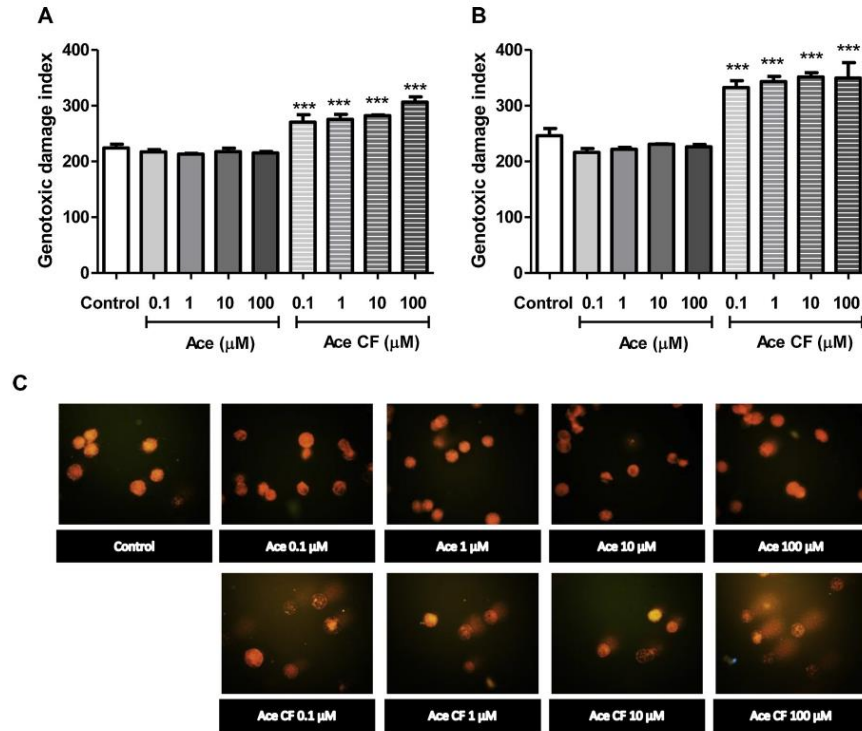


Fig. 7. DNA damage in HTR-8/SVneo trophoblasts. Cells were incubated with acetamidrid (Ace) and its commercial formulation (Ace CF) and genotoxic damage index was determined by comet alkaline assay after 4 (A) and 24 h (B) insecticide incubations. Graphs show mean \pm SD. ***p < 0.001 statistical differences compared to control. (C) Representative fluorescence microscopy images of comets in HTR-8/SVneo trophoblast cells after insecticide incubation for 24 h.

(Calderón-Segura et al., 2012; Kocaman and Topaktas, 2007; Quintana et al., 2017). Results presented here, indicate that Ace only induced protein oxidation after 24 h exposure to the highest concentration assayed. In contrast, Ace CF markedly altered protein oxidation, lipid peroxidation and DNA damage. Neo have been linked to genotoxic damage (Costa et al., 2009), indeed 500 μ M Ace incubation for 24 h induced DNA damage in SH-SY5Y cells (Şenyıldız et al., 2018). Here the highest Ace concentration assayed (100 μ M) did not induce genotoxic

damage, whilst all concentrations assayed of the commercial formulation induced a significant change in at least two markers of oxidative cellular damage.

To test whether oxidative stress was involved in trophoblast toxicity, cells were pre-incubated with the recognized antioxidant NAC. Cell death, and biomolecule damage was prevented by antioxidant pre-treatment, clearly indicating that oxidative stress is at least one mechanism involved in Ace toxicity in HTR-8/SVneotrophoblasts.

Table 2
Pre-treatment with the antioxidant N-acetyl l-cysteine prevents cellular damage induced by exposure to acetamidrid (Ace) and acetamidrid commercial formulation (Ace CF) for 24 h.

	Cell viability (%)	AOPP (μ mol chloramine/mg protein)		TBARS (nmol MDA/mg protein)		DNA damage (Genotoxic damage index)	
		NAC (2 mM)		NAC (2 mM)		NAC (2 mM)	
Control	100.00 \pm 9.47	100.00 \pm 6.05	197.59 \pm 36.13	205.61 \pm 39.03	35.74 \pm 0.95	38.35 \pm 7.84	253.00 \pm 2.83
Ace (μ M)	0.1	94.66 \pm 13.55	107.20 \pm 13.37	180.30 \pm 29.77	174.63 \pm 11.39	34.77 \pm 0.29	ND
	1	92.82 \pm 11.68	94.66 \pm 8.67	209.78 \pm 2.58	193.48 \pm 28.34	40.14 \pm 7.17	ND
	10	81.46 \pm 6.32**	102.00 \pm 7.57 ^a	195.09 \pm 8.39	218.47 \pm 10.43	44.28 \pm 0.58	ND
	100	79.26 \pm 5.04**	98.66 \pm 6.15 ^a	265.19 \pm 0.86*	171.06 \pm 6.68 ^b	50.48 \pm 8.27	ND
Ace CF (μ M)	0.1	62.42 \pm 10.14***	99.36 \pm 10.42 ^b	315.83 \pm 71.82*	262.80 \pm 40.33	38.63 \pm 1.58	49.27 \pm 2.68
	1	70.53 \pm 5.78***	98.20 \pm 7.29 ^b	340.71 \pm 48.63**	264.60 \pm 26.56	72.72 \pm 9.22***	67.52 \pm 13.47
	10	67.60 \pm 16.48***	99.55 \pm 7.21 ^b	304.57 \pm 46.06*	282.90 \pm 22.56	77.15 \pm 11.28***	61.62 \pm 0.29
	100	56.92 \pm 15.84***	98.12 \pm 5.31 ^b	339.04 \pm 20.99**	294.40 \pm 16.10	93.35 \pm 5.19***	62.27 \pm 4.61 ^b

Results are expressed as mean \pm SD. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 statistical differences compared to control treatment. ^ap < 0.05 and ^bp < 0.01 statistical differences between pesticide vs pesticide + NAC. ND: not determined.

Human exposure to pesticides is a complex scenario, though it is recognized that human beings are exposed to the commercial formulation rather than the active principle alone (Mesnage et al., 2014). Calderón-Segura et al., 2012, reported that exposure to the Neo commercial formulations Jade (imidacloprid), Gaucho (imidacloprid), Calypso (thiacloprid), and Poncho (clothianidin) significantly decreased cell viability and increased DNA damage in human lymphocytes. Ace is a Neo compound widely used in agriculture, which was initially commercialized in Japan by Nippon Soda in 1995. Ace is marketed under several commercial formulations such as Mospilan®, Epik®, Assail® and Chipco™ (Renaud et al., 2018). Results presented here, are in line with a previous report of Mesnage et al. (2014), demonstrating that the commercial formulation of pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. Insecticide formulations are declared as a percentage of active principle and a percentage of other ingredients. For the commercial formulation utilized in this work some trademarks specify silica gel 7.1–7.9 % and 5–15 % kaolin clay. The other ingredients may help to increase the insecticide solubility, stability, insect penetration, and to protect it from degradation (Székács and Darvas, 2012).

The limitations of this study were the possible differences between cell culture and the complexity of a whole organism. In an *in vivo* scenario the parent compound coexists with the metabolites and acetamiprid toxicity may be mediated by the metabolites, by the parent compound, or by both. In addition, it would be relevant to study the *in vitro* effects induced by lower concentrations after repeated/prolonged exposure as the effect pattern may be different.

5. Conclusions

This work clearly demonstrates for the first time that the Neo acetamiprid and the commercial formulation studied are toxic to the HTR-8/SVneo trophoblasts, and that the commercial formulation is more toxic than the active principle. The harmful effects generated by Neo in first-trimester placenta cells are particularly important, since the first trimester of pregnancy is crucial for placental and fetal developments.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Argentina (PIP 2013 0707), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), through Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica, Argentina (FONCyT, 2017. PICT N°0914) and Universidad Nacional del Comahue, Argentina (04/U022).

References

- Abd-Elhakim, Y.M., Mohammed, H.H., Mohamed, W.A.M., 2018. Imidacloprid impacts on neurobehavioral performance, oxidative stress, and apoptotic events in the brain of adolescent and adult rats. *J. Agric. Food Chem.* 66, 13513–13524. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05793>.
- Abou-Donia, M.B., Goldstein, L.B., Bullman, S., Tu, T., Khan, W.A., Dechkovskaia, A.M., Abdel-Rahman, A.A., 2008. Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following *in utero* exposure. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 71, 119–130. <https://doi.org/10.1080/15287390701613140>.
- Abreu-Villaça, Y., Levin, E.D., 2017. Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. *Environ. Int.* 99, 55–77. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.019>.
- Anderson, J.C., Dubetz, C., Palace, V.P., 2015. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Sci. Total Environ.* 505, 409–422. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.090>.
- Asghari, M.H., Moloudizargari, M., Bahadar, H., Abdollahi, M., 2017. A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 13, 545–554. <https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1214712>.
- Babel'ova, J., Sečtková, Z., Cikos, S., Spírková, A., Kovariková, V., Fabian, D., 2017. Exposure to neonicotinoid insecticides induces embryotoxicity in mice and rabbits. *Toxicology* 392, 71–80.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 287, 276–287.
- Bodin, J., Stene, L.C., Nygaard, U.C., 2015. Can exposure to environmental chemicals increase the risk of diabetes type 1 development? *Biomed Res. Int.* 2015, 208947.
- Bouzat, C., Lasala, M., Nielsen, B.E., Corradi, J., Esandi, M.D.C., 2018. Molecular function of $\alpha 7$ nicotinic receptors as drug targets. *J. Physiol. (Paris)* 15 (10), 1847–1861. <https://doi.org/10.1113/jp275101>.
- Bradford, B.Z., Huseeth, A.S., Groves, R.L., 2018. Widespread detections of neonicotinoid contaminants in central Wisconsin groundwater. *PLoS One* 13, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201753>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Burke, A.P., Niibori, Y., Terayama, H., Ito, M., Pidgeon, C., Arseneault, J., Camarero, P.R., Cummins, C.L., Mateo, R., Sakabe, K., Hampson, D.R., 2018. Mammalian susceptibility to a neonicotinoid insecticide after fetal and early postnatal exposure. *Sci. Rep.* 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35129-5>.
- Bustos, P.S., Deza-Ponzio, R., Páez, P.L., Albesa, I., Cabrera, J.L., Virgolini, M.B., Ortega, M.G., 2016. Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress *in vitro* and *in vivo* in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 48, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.11.004>.
- Calderón-Segura, M.E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Calderón-Ezquerro, M., del, C., Cortés-Eslava, J., García-Martínez, R., Flores-Ramírez, D., Rodríguez-Romero, M.I., Méndez-Pérez, P., Bañuelos-Ruiz, E., 2012. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to neonicotinoid insecticides. *News J. Toxicol.* 2012, 11. <https://doi.org/10.1155/2012/612647>.
- Çavaş, T., Çinkilic, N., Vatan, Ö., Yılmaz, D., Coşkun, M., 2012. *In vitro* genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and γ H2AX foci assays. *Pestic. Biochem. Physiol.* 104, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.08.004>.
- Chakroun, S., Ezz, L., Grissa, I., Kerkeni, E., Neffati, F., 2016. Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25191–25199. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7650-9>.
- Choi, H.S., Kim, J.W., Cha, Y.N., Kim, C., 2007. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells: a quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J. Immunol. Immunochem. ISSN* 27, 31–44. <https://doi.org/10.1080/15321810500403722>.
- Choudhury, R.H., Dunk, C.E., Lye, S.J., Aplin, J.D., Harris, L.K., Jones, R.L., 2017. Extravillous trophoblast and endothelial cell crossstalk mediates leukocyte infiltration to the early remodeling decidual spiral arteriole wall. *J. Immunol.* 198, 4115–4128. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601175>.
- Cichón, L., Araque, L., Garrido, S., Lago, J., 2017. Residuos Y Tolerancias De Insecticidas Para El Control De Plagas De Frutales De Pepita En El Alto Valle De Río Negro Y Neuquén - Actualización 2017.
- Cimino, A.M., Boyles, A.L., Thayer, K.A., Perry, M.J., 2017. Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review. *Environ. Health Perspect.* 125, 155–162. <https://doi.org/10.1289/EHP515>.
- Correia-Branco, A., Keating, E., Martel, F., 2018. Placentation-related processes in a human first-trimester extravillous trophoblast cell line (HTR-8/SVneo cells) are affected by several xenobiotics. *Drug Chem. Toxicol.* <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1463240>.
- Costa, C., Silvari, V., Melchini, A., Catania, S., Heffron, J.J., 2009. Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat. Res.* 672, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.018>.
- Cory, S., Huang, D.C., Adams, J.M., 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590–8607.
- Dasgupta, A., Klein, K., 2014. Methods for measuring oxidative stress in the laboratory, in: antioxidants in food, vitamins and supplements. Elsevier Inc 19–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405872-9.00002-1>.
- De Long, N.E., Holloway, A.C., 2017. Early-life chemical exposures and risk of metabolic syndrome. *Diabetes. Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 10, 101–109. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S95296>.
- DeYashi, I., Chakraborty, S.B., 2016. Pesticide induced oxidative stress and the role of antioxidant. *Harvest* 2, 1–14.
- Dhouib, I.B., Annabi, A., Doghri, R., Rejeb, I., Dallagi, Y., Bdiri, Y., Lasram, M.M., Elgaied, A., Marrakchi, R., Fazaa, S., Gati, A., 2017. Neuroprotective effects of curcumin against acetamiprid-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: biochemical, histological, and behavioral changes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 27515–27524. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0331-5>.
- Dominguez-López, P., Diaz-Cueto, L., Olivares, A., Ulloa-Aguirre, A., Arechavaleta-Velasco, F., 2014. Thymol and carvacrol prevent cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 28, 246–255. <https://doi.org/10.1002/jbt>.

- population. *Biomarkers* 15, 52–60. <https://doi.org/10.3109/13547500903276378>.
- Sur, R., Tork, A.S., 2003. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bull. Insectology* 56, 35–40.
- Székács, A., Darvas, B., 2012. Forty years with glyphosate. In: Hasaneen, M.N.A.E.-G. (Ed.), *Herbicides- Properties, Synthesis, and Control of Weeds*. IntechOpen, pp. 247–284 <https://doi.org/DOI:10.5772/32491>.
- Taira, K., 2014. Human neonicotinoids exposure in Japan. *Jpn J Clin Eco* 23, 14–24.
- Tanaka, T., 2012. Reproductive and neurobehavioral effects of clothianidin administered to mice in the diet. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* 95, 151–159. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20349>.
- Todani, M., Kaneko, T., Hayashida, H., Kaneda, K., Tsuruta, R., Kasaoka, S., Maekawa, T., 2008. Acute poisoning with neonicotinoid insecticide acetamiprid. *Chudoku Kenkyu* 21 (4), 387–390.
- Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. The role of glutathione- S -transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7369–7375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>.
- Treinin, M., Papke, R.L., Nizri, E., Ben-David, Y., Mizrahi, T., Brenner, T., 2017. Role of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and RIC-3 in the CholinergicAnti-inflammatory pathway. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 17 (2), 90–99.
- United States Department of Agriculture, 2014. Pesticide Dat Program. Annual Summary. Calendar Year 2013. .
- Virginia, A., Claudia, A., Soledad, B.P., Gabriela, O., Jorge, E.A., Albesa, I., 2013. Nitrosylation: an adverse factor in uremic hemolytic syndrome. Antitoxin effect of *Ziziphus mistol griseb*. *Food Chem. Toxicol.* 56, 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.036>.
- Wang, A., Padula, A., Sirota, M., Woodruff, T.J., 2016. Environmental influences on reproductive health: the importance of chemical exposures. *Fertil. Steril.* 106 (4), 905–929. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1076>.
- Wang, X., Anadón, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M.-R., Yuan, Z., Martínez, M.-A., 2017. Mechanism of neonicotinoid toxicity: impact on oxidative stress and metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 58, 471–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429>.
- Yang, Y., Parsons, K.K., Chi, L., Malakauskas, S.M., Le, T.H., 2009. Glutathione S-transferase- $\mu 1$ regulates vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and oxidative stress. *Hypertension* 54, 1360–1368. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.139428>.
- Yao, X.-H., Min, H., Lv, Z.-M., 2006. Response of superoxide dismutase, catalase, and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. *Biomed. Environ. Sci.* 19, 309–314.