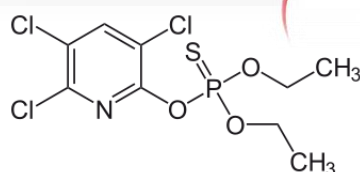
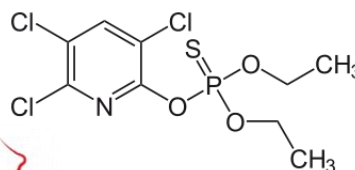




**Facultad de Ciencias
del Ambiente y la Salud**
Universidad Nacional del Comahue

“Caracterización de Isoformas de la Enzima B-Esterasa Carboxilesterasa, en Explantos de Placenta Expuestos a Clorpirifos y a una de sus Formulaciones Comerciales”



TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN
SANEAMIENTO Y PROTECCIÓN AMBIENTAL

Neuquén, 2018

Eliana Daniela Lopez Venditti

Universidad Nacional del Comahue
Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud

Alumna: Eliana Daniela Lopez Venditti

Legajo N°: 127.886

Directora: Dra. Natalia Guiñazú

Co-directora: Mg. Berta Vera

Fecha de aprobación del plan de Tesis: 12 de junio de 2017

Fecha de finalización de la Tesis: 14 de febrero de 2018

AGRADECIMIENTOS

- A mi Directora Natalia Guiñazú por recibirme en su espacio de trabajo y permitirme realizar esta Tesis bajo su tutoría. Gracias por la ayuda, dedicación, confianza y paciencia brindada durante todo mi aprendizaje.

- A mi Co-directora Berta Vera, por transmitirme los conocimientos necesarios para realizar esta Tesis de grado. Gracias por la dedicación y paciencia al enseñarme las técnicas de laboratorio y por la confianza.

- A mis compañeros del LIBIQUIMA del grupo “humanos” y “resistencia”, a Seba, Vicky, Maru, Laura, Jose y Betsy, por ayudarme y compartir sus conocimientos de las prácticas de laboratorio. Gracias por las anécdotas compartidas, los mates y las risas.

- A mi mamá Lili y a mi papá Jorge, por apoyarme siempre en cada una de las etapas de mi vida, por darme una mano cuando tropecé y por todo el esfuerzo que hicieron para que yo esté finalizando mi carrera.

- A mi hermana Meli, por su compañía, sus mates, cantos y locuras de siempre. Gracias por estar.

- A mi compañero de vida Piuqué, por su apoyo y amor incondicional en todo momento. Gracias por tanto cariño y por sostenerme y animarme cuando no tenía más fuerzas.

- A mis amigos, por estar presentes siempre en los buenos y en los malos momentos.

INDICE GENERAL

1. GLOSARIO.....	7
2. RESUMEN/ABSTRACT.....	9
3. INTRODUCCIÓN.....	11
4. OBJETIVOS	14
4.1. Objetivo General	14
4.2. Objetivos específicos	14
5. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	15
5.1. Plaguicidas.....	15
5.1.1. Definición	15
5.1.2. Clasificación.....	15
5.1.3. Dinámica y comportamiento de los plaguicidas en el ambiente.....	17
5.1.4. Exposición humana a plaguicidas y vías de entrada	19
5.1.5. Efectos de los plaguicidas.....	20
5.1.6. Metabolismo de plaguicidas	21
5.2. Plaguicidas Organofosforados (OFs)	22
5.2.1. Generalidades.....	22
5.2.2. Metabolismo de OFs	23
5.2.3. Blancos de acción de los OFs.....	24
5.2.3.1. Enzima Acetilcolinesterasa (AChE)	24
5.2.3.2. Enzima Carboxilesterasa (CES)	26
5.2.3.2.1. Isoformas de las CES.....	26
5.2.4. Clorpirifos y su formulado comercial Lorsban®	27
5.3. Placenta humana	29
5.3.1. Definición y función	29
5.3.2. Formación	29
5.3.3. Sistema colinérgico placentario humano	30
5.3.4. La placenta como biomarcador de la exposición a plaguicidas	31

5.3.4.1.	Explantos de placenta	31
5.4.	Antecedentes	32
5.4.1.	Estudios a nivel mundial sobre efectos de OFs	32
5.4.1.1.	Efectos de clorpirifos	32
5.4.2.	Efectos de OFs en la placenta humana. Estudios en el Alto Valle.....	34
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1.	Colección de muestras de placenta.....	38
6.1.1.	Obtención de explantos de placenta.	38
6.2.	Plaguicidas.....	38
6.3.	Cultivo de explantos de placenta.....	39
6.4.	Actividad de CES	39
6.5.	Geles no desnaturalizantes de poliacrilamida.....	42
6.6.	Determinación de proteínas	43
6.7.	Estudio de expresión de transcritos de CES.....	43
6.7.1.	Técnica de RT-PCR. Procedimiento.....	43
6.7.2.	Electroforesis en gel de agarosa 2%.	44
6.8.	Análisis estadístico.....	45
7.	RESULTADOS	46
7.1.	Actividad de la CES.....	46
7.1.1.	Incubación con CP	46
7.1.2.	Incubación con Lorsban®.....	47
7.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida	49
7.2.1.	Incubación con CP	49
7.2.2.	Incubación con Lorsban®.....	50
7.3.	Estudio de la expresión de transcritos de CES.....	50
7.3.1.	Incubación con CP	51
7.3.2.	Incubación con Lorsban®.....	51
8.	DISCUSIÓN	54

9. CONCLUSIONES FINALES	59
10. BIBLIOGRAFÍA	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Procesos que determinan la dinámica de plaguicidas en el ambiente. Fuente: Loewy, 2000.	18
Figura 2: Estructura química general de los plaguicidas organofosforados.	23
Figura 3: Principales vías metabólicas implicadas en la biotransformación de clorpirifos. La reacción (1) es una bioactivación, las otras son reacciones de detoxificación. CP: clorpirifos; CPO: clorpirifos oxón; TCPY: 3,5,6-tricloro-2-piridinol. Reacciones: (1) desulfuración oxidativa; (2) desarilación oxidativa; (3) hidrólisis mediada por PON1 (paraoxonasa 1). Fuente: Extraído y adaptado de Eaton et al., 2008.	24
Figura 4: Estructura química de clorpirifos O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato.	28
Figura 5: Imagen de la reacción del α -naftol con el colorante Fast Garnet.	41
Figura 6: Actividad de CES en explantos de placentas incubados durante 24 hs con distintas concentraciones de clorpirifos. Los resultados se expresan en nmoles/min x mg de proteína (n=6), media \pm ES (error estándar). ANOVA test de Dunnett p NS.	46
Figura 7: Actividad de CES en explantos de placentas incubados durante 48 hs con distintas concentraciones de clorpirifos. Los resultados se expresan en nmoles/min x mg de proteína (n=6), media \pm ES (error estándar). ANOVA test de Dunnett p NS.	47
Figura 8: Actividad de CES en explantos de placentas incubados durante 24 hs con distintas concentraciones de Lorsban®. Los resultados se expresan en nmoles/min x mg de proteína (n=6), media \pm ES (error estándar). ANOVA test de Dunnett * p < 0,05....	48
Figura 9: Actividad de CES en explantos de placentas incubados durante 48 hs con distintas concentraciones de Lorsban®. Los resultados se expresan en nmoles/min x mg de proteína (n=6), media \pm ES (error estándar). ANOVA test de Dunnett p NS.	48
Figura 10: Actividad de la enzima CES en explantos de placenta expuestos al plaguicida CP durante 24 hs.....	49
Figura 11: Actividad de la enzima CES en explantos de placenta expuestos al plaguicida Lorsban® durante 24 hs.	50
Figura 12: Expresión de la isoforma CES1 en explantos de placenta expuestos a CP y Lorsban® durante 48 hs.	52
Figura 13: Actividad de CES1 en electroforesis en gel de agarosa 2%. 1) DMSO; 2) 0,01 μ M; 3) 0,1 μ M; 4) 1 μ M; 5) 10 μ M; y 6) 100 μ M.....	52

Figura 14: Expresión de la isoforma CES2 en explantos de placentas expuestos a CP y Lorsban® durante 48 hs.53

Figura 15: Actividad de CES2 en electroforesis en gel de agarosa 2%. 1) DMSO; 2) 0,01 µM; 3) 0,1 µM; 4) 1 µM; 5) 10 µM; y 6) 100 µM.....53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad, expresada en DL₅₀ (mg/Kg). Fuente: Ramírez & Lacasaña, 2001.15

Tabla 2: Clasificación de los plaguicidas según su vida media. Fuente: Ramírez & Lacasaña, 2001.16

Tabla 3: Clasificación de los plaguicidas, según la familia química. Fuente: Ramírez & Lacasaña, 2001.16

Tabla 4: Características generales del plaguicida organofosforado clorpirifos.....27

Tabla 5: Dosis de aplicación según tipo de cultivo y plaga a combatir.....28

Tabla 6: Esquema de cargado de la placa de 24 pocillos con los explantos de placenta.....39

Tabla 7: Reactivos y cantidades necesarias para la preparación de la curva de calibración.40

Tabla 8: Esquema del cargado de la placa de 96 pocillos para medición de la actividad de CES. B=Buffer; T=Testigo (curva de calibración); M=Muestra (0; 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 µM).41

Tabla 9: Reactivos y cantidades necesarias para la preparación de los geles Stacking y Separating.42

Tabla 10: Reactivos y cantidades necesarias para la preparación de la solución de revelado.43

Tabla 11: Primers utilizados en la técnica PCR.44

1. GLOSARIO

Acetilcolina (ACh): Neurotransmisor.

Acetilcolinesterasa (AChE): Enzima de la familia de las colinesterasas que se encuentra en los tejidos nerviosos y los glóbulos rojos, cuya función principal es hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico. Ácido nucleico compuesto por dos cadenas polinucleotídicas que se disponen alrededor de un eje central formando una doble hélice, capaz de autoreplicarse y codificar la síntesis de ARN. Lugar donde está depositada la información genética.

ADNc: ADN copia o complementario. Es una molécula de ADN complementaria a una molécula de ARNm. Se genera por acción de la enzima transcriptasa reversa.

ARN: Ácido ribonucleico. Molécula lineal de hebra sencilla encargada de transferir la información genética del ADN para la síntesis de proteínas. Sus funciones son intermediar en la expresión génica y actuar de catalizador en la síntesis proteica.

Carboxilesterasa (CES): Enzima serina-dependiente de amplia especificidad de sustrato perteneciente a la familia de las B-esterasas. Se encuentra involucrada en la detoxificación de xenobióticos.

Clorpirifos (CP): Plaguicida organofosforado.

Explantos: Porción de tejido placentario.

Isoenzimas (o isoformas): Una de las distintas formas de la misma enzima. Las isoformas pueden diferir en su actividad biológica, propiedades regulatorias, expresión temporal y espacial, y localización intracelular.

JEG-3: Línea celular humana de trofoblastos JEG-3, procedente de American Type Cell Collection (ATCC).

Lorsban® (LB): Formulado comercial del plaguicida organofosforado clorpirifos. Marca registrada por la compañía Dow AgroSciences.

Organofosforados (OFs): Familia de plaguicidas en cuya estructura química se encuentra un átomo de fósforo unido a 4 átomos de oxígeno, o en algunas sustancias a 3 de oxígeno y uno de azufre.

Placenta: Órgano humano multifuncional que protege al feto en desarrollo durante el embarazo.

Plaguicida: Sustancia o mezclas de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar alguna plaga.

Trofoblastos: Células placentarias que revisten la parte externa del blastocito.

Xenobióticos: Sustancia extraña o ajena a las que proceden de la composición o metabolismo de los organismos vivos.

2. RESUMEN/ABSTRACT

Las mujeres embarazadas residentes en zonas rurales del Alto Valle de Río Negro y Neuquén se encuentran ambientalmente expuestas a plaguicidas de uso agropecuario. Considerando que la placenta es un órgano impactado por estos tóxicos, se estudió la respuesta placentaria a la exposición a xenobióticos utilizando explantos de placenta. Los mismos provienen de placentas a término y representan un escenario más cercano al que ocurre en la exposición *in vivo* de las mujeres.

En este trabajo de Tesis se decidió investigar si en los explantos de placenta se altera la actividad de la enzima carboxilesterasa (CES), blanco secundario de toxicidad de los organofosforados (OFs), cuando se exponen *in vitro* a clorpirifos (CP) y su formulado comercial Lorsban® (LB). Como en la placenta se han identificado la presencia de las isoformas humanas CES1, CES2 y CES3, en el presente trabajo también se abordó la caracterización y el estudio de estos transcritos mediante la técnica RT-PCR.

Los resultados demuestran que la actividad y expresión de CES en explantos de placenta se ve afectada por la exposición al OF CP, principalmente por su formulado comercial LB. Mediante la utilización de geles no desnaturalizantes de poliacrilamida, se observó que LB inhibe la actividad de CES prácticamente a todas las concentraciones ensayadas a 24 hs de exposición. En contraste, a 48 hs de exposición, se observa muy poca actividad enzimática, por esta técnica, tanto en los controles como en los tratamientos. Por otra parte, se determinó que tanto CP como LB modulan la transcripción de CES1 a altas concentraciones a 48 hs de exposición. En el análisis de la expresión de CES2 no se observaron cambios. Por último, en el estudio no se encontró expresión de CES3.

La disminución de la actividad de CES en los explantos supone que estos compuestos llegan y se bioactivan en la placenta, lo que produciría una afección en el normal desarrollo del embarazo. Por otro lado, la modulación de CES1 indicaría que estos compuestos además de inhibir farmacológicamente estas enzimas, son capaces de inducir su transcripción génica.

PALABRAS CLAVE: plaguicidas organofosforados, clorpirifos, formulado comercial, explantos, placenta, carboxilesterasa.

It has been demonstrated that pregnant women residing in rural areas of the Alto Valle of Rio Negro and Neuquen are environmentally exposed to agricultural pesticides. Considering that the placenta is an organ impacted by these toxics, the placental response to exposure to xenobiotics was studied using placenta explants, which come from placentas at term and represent a scenario closer to what occurs in the *in vivo* exposure of the women.

In this Thesis work, it was decided to investigate whether the placenta explants alter the activity of the carboxylesterase enzyme (CES), a secondary target of organophosphorus (OFs) toxicity, when exposed *in vitro* to chlorpyrifos (CP) and its commercial formulation Lorsban® (LB). Since the presences of the human isoforms CES1, CES2 and CES3 have been identified in the placenta, the characterization and study of these transcripts by the RT-PCR technique.

The results show that the activity and expression of CES in explanations of placenta were affected by exposure to CP, mainly due to its commercial formula LB. By using non-denaturing polyacrylamide gels, it was observed that LB inhibited the CES activity practically to the difficulties tested at 24 hs of exposure. In contrast, after 48 hours of exposure, very little enzymatic activity is observed, by this technique, both in the controls and in the treatments. On the other hand, it was determined that both CP and LB modulate the transcription of CES1 at high concentrations at 48 hs of exposure. In the analysis of CES2 expression, no changes were observed. Finally, in the study no expression of CES3 was found.

The decrease in the activity of CES in the explants supposes that these compounds arrive and bioactivate in the placenta, which would produce a condition in the normal development of pregnancy. On the other hand, the modulation of CES1 would indicate that these compounds, in addition to pharmacologically inhibiting these enzymes, are capable of inducing their gene transcription.

KEYWORDS: organophosphate pesticides, chlorpyrifos, commercial formula, explant, placenta, carboxylesterase.

3. INTRODUCCIÓN

En Argentina, los insecticidas organofosforados (OFs) constituyen un grupo de plaguicidas ampliamente utilizado en las actividades agrícolas. En la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, principal zona productora de frutas de pepita del país, los OFs: clorpirifos (CP) y fosmet son los principios activos más utilizados para combatir la carpocapsa (*Cydia pomonella*), principal plaga de peras y manzanas en la actualidad. En esta zona el uso intensivo de estos compuestos sumado a las condiciones climáticas y la ubicación geográfica de las comunidades rurales, favorecen la exposición de la población residente en las áreas aledañas a las zonas de cultivo. Se suman además diferentes conductas de riesgo como el uso de los canales de riego para recreación durante el verano y el consumo de frutas producidas en las chacras sin respetar los tiempos de carencia (Bulgaroni, 2008).

Antecedentes en mujeres embarazadas residentes en esta zona rural, determinaron que durante el período de aplicación intensiva de plaguicidas (meses septiembre a febrero), se encuentran expuestas a estos químicos (Vera, Santa Cruz & Magnarelli, 2012; Bulgaroni et al., 2012, 2013) y que la placenta es un órgano impactado por estos tóxicos ambientales.

Se sabe que los OFs cuando se bioactivan generan el metabolito oxón que actúa como un potente inhibidor de B-esterasas, tales como acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa y carboxilesterasa (CES). La inhibición de AChE produce la acumulación del neurotransmisor acetilcolina, lo que genera una hiper estimulación nerviosa. En cuanto a la inhibición de CES, la misma se encuentra menos estudiada y, por tanto, estas enzimas representan otros blancos de toxicidad interesantes (Casida & Quistad, 2005; Espinoza et al., 2016).

Las CES participan de la biotransformación de una variedad de sustancias con grupo éster carboxílico, como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, fármacos antitumorales y narcóticos (Imai, 2006). Además de metabolizar lípidos, hormonas lipídicas y otros compuestos endógenos. En la placenta se ha identificado la presencia de las isoformas humanas CES1, CES2 y CES3 (Yan, Matoney & Yang, 1999).

Es sabido que la placenta es un órgano que protege al feto en desarrollo durante el embarazo. Las funciones de la misma incluyen, entre otras, la transferencia de nutrientes de la madre al feto y la secreción de los residuos del feto a la madre, actuando como una barrera para el feto frente a patógenos ambientales. Este órgano contiene células denominadas trofoblastos, que según la etapa de maduración celular se diferencian en citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos (Regnault et al., 2002; Langman et al., 2009).

Se reconoce que el hígado es el órgano más importante en el metabolismo de drogas y xenobióticos, y si bien el metabolismo de la placenta está más restringido que el hepático, las enzimas presentes en este órgano también son capaces de metabolizar drogas y xenobióticos, por lo que la placenta cumple una función protectora respecto de los xenobióticos a los cuales está expuesta la madre y que llegan hasta el feto (Rama Sastry, 1999; Benirschke, Kaufmann & Baergen, 2006).

Las mujeres embarazadas generalmente están expuestas a una variedad de xenobióticos tan diversos como la variedad de trabajos, estilos de vida y químicos ambientales en el lugar de residencia, todos con dosis muy variables, a esto se suma también un número de productos farmacéuticos. En este sentido, la existencia de interacciones complejas entre distintas sustancias químicas y la placenta durante la gestación son probables (Pavek & Smutny, 2014). Estudios que indaguen sobre modificaciones en la expresión/actividad de enzimas metabólicas inducidas por los xenobióticos ambientales, son necesarios para determinar posibles modificaciones en la respuesta fisiológica de la placenta hacia los compuestos a los cuales la madre embarazada se encuentra expuesta con posibles consecuencias no deseadas sobre su embarazo. Por tanto, la placenta es considerada un biomarcador clave para monitorear la exposición a plaguicidas en etapa prenatal, ya que representa la integración de 9 meses de exposición, y algunos xenobióticos se pueden encontrar acumulados en este órgano (Prouillac & Lecoeur, 2010).

Recientemente, Espinoza et al. (2016) reportaron que la línea celular humana de trofoblastos JEG-3 expresan CES1 y CES2, las cuales son inhibidas en diferente magnitud y con una cinética particular según el OFs al que se encuentren expuestas. Otro modelo de estudio de la respuesta placentaria a los contaminantes son los explantos de placenta humana, los mismos se han utilizado para estudiar muchas

facetas de la interface materno-fetal. Las características morfológicas y funcionales de los cultivos de explantos son comparables tanto a la situación que se desarrolla en el útero *in vivo*, así como con los cultivos primarios de células de trofoblasto aisladas (Miller et al., 2005).

Considerando todo lo anterior, en el presente trabajo se abordará el estudio del efecto del OFs clorpirifos y su formulado comercial Lorsban® sobre la actividad y expresión de isoformas de CES en explantos de placentas de una población urbana no expuesta a plaguicidas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Estudiar el efecto del plaguicida organofosforado clorpirifos y su formulado comercial Lorsban® sobre la actividad y expresión de isoformas de carboxilesterasa en explantos de placenta humana *in vitro*.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar la actividad de CES en los cultivos de explantos de placenta expuestos a clorpirifos y a su formulado comercial Lorsban®.
- Estudiar la expresión de los transcritos para CES 1, 2 y 3 en explantos de placenta e indagar el efecto de clorpirifos y de su formulado comercial Lorsban®, sobre la expresión.

5. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

5.1. Plaguicidas

5.1.1. Definición

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2003) el término plaguicida abarca a toda sustancia o mezclas de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar alguna plaga. Se entiende por plaga a cualquier organismo que interfiera con la conveniencia o bienestar del hombre u otra especie de su interés (Anguiano, 2011).

Los plaguicidas se comercializan como formulaciones técnicas que incluyen un principio activo, ingredientes inertes e impurezas (Ramírez & Lacasaña, 2001). El papel de estos últimos es aumentar la solubilidad del principio activo y protegerlo de la degradación, aumentando su vida media, ayudando a la penetración celular y, de este modo, mejorando su actividad biológica (Marutani & Edirveerasingam, 2006). Por otro lado, pueden agregar su propia toxicidad (Mesnage, Bernay & Seralini, 2013).

5.1.2. Clasificación

Los plaguicidas pueden clasificarse en función a ciertas características principales como la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y la plaga a la cual se destina.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los plaguicidas se clasifican por su peligrosidad o toxicidad aguda, definida como la capacidad de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto. La toxicidad es medida a través de la dosis letal media (DL_{50}) o concentración letal media (CL_{50}) (ver Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad, expresada en DL_{50} (mg/Kg). Fuente: Ramírez & Lacasaña, 2001.

Clase	Toxicidad	Ejemplos
Clase IA	Extremadamente peligrosos	Paratión, dieldrín
Clase IB	Altamente peligrosos	Eldrín, diclorvos
Clase II	Moderadamente peligrosos	DDT, clordano, clorpirifos
Clase III	Ligeramente peligrosos	Malatión

Por otro lado, según su vida media, los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (ver Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación de los plaguicidas según su vida media. Fuente: Ramírez & Lacasaña, 2001.

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

Como se muestra en la Tabla 3, los plaguicidas se clasifican en diversas familias de acuerdo a su estructura química, entre los que se encuentran compuestos orgánicos e inorgánicos.

Tabla 3: Clasificación de los plaguicidas, según la familia química. Fuente: Ramírez & Lacasaña, 2001.

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

Por otro lado, según la plaga a la que atacan, los plaguicidas pueden clasificarse en acaricidas (ácaros), herbicidas (malezas), insecticidas (insectos), rodenticidas (roedores), alguicidas (algas), fungicidas (hongos), entre otros.

5.1.3. Dinámica y comportamiento de los plaguicidas en el ambiente

Los plaguicidas son los contaminantes antropogénicos que se detectan con mayor frecuencia en ambientes naturales (Konstantinou, Hela & Albanis, 2006; Loewy et al., 2011). La principal fuente de contaminación es el residuo que resulta de la aplicación de estos químicos en el control de las plagas agrícolas y, en menor extensión, en el control de vectores involucrados en la salud humana y veterinaria (Anguiano et al., 2015).

Cuando un plaguicida es liberado al ambiente, aproximadamente el 47% del producto se deposita en suelos y aguas colindantes o se dispersa en la atmósfera. Esto depende de las condiciones climáticas (lluvia, intensidad y dirección del viento, etc.), de las características geológicas (como el tipo de suelo y la presencia de corrientes de agua), de la técnica de aplicación (aérea, terrestre, etc.), y de otros factores como el formulado y la presentación del producto (líquido, polvo, gel, gas, etc.) (Ramírez & Lacasaña, 2001).

La dinámica de los plaguicidas en el ambiente (ver Figura 1) se encuentra determinada por procesos de transformación, a través de distintas reacciones, y su transporte a sitios alejados de donde se aplicó. Las reacciones que puede sufrir un plaguicida son variadas entre las cuales se mencionan: fotólisis, oxidación–reducción, hidrólisis, ruptura y reorganización de enlaces, o biodegradación por microorganismos. Estas reacciones involucran la actividad enzimática de los microorganismos, la luz ultravioleta y el pH del medio (Lu et al., 2006; Van der Linden et al., 2009). Así, la persistencia de estas sustancias en el ambiente, y su ecotoxicidad, se encuentran relacionadas con la eficiencia en los procesos de transformación.

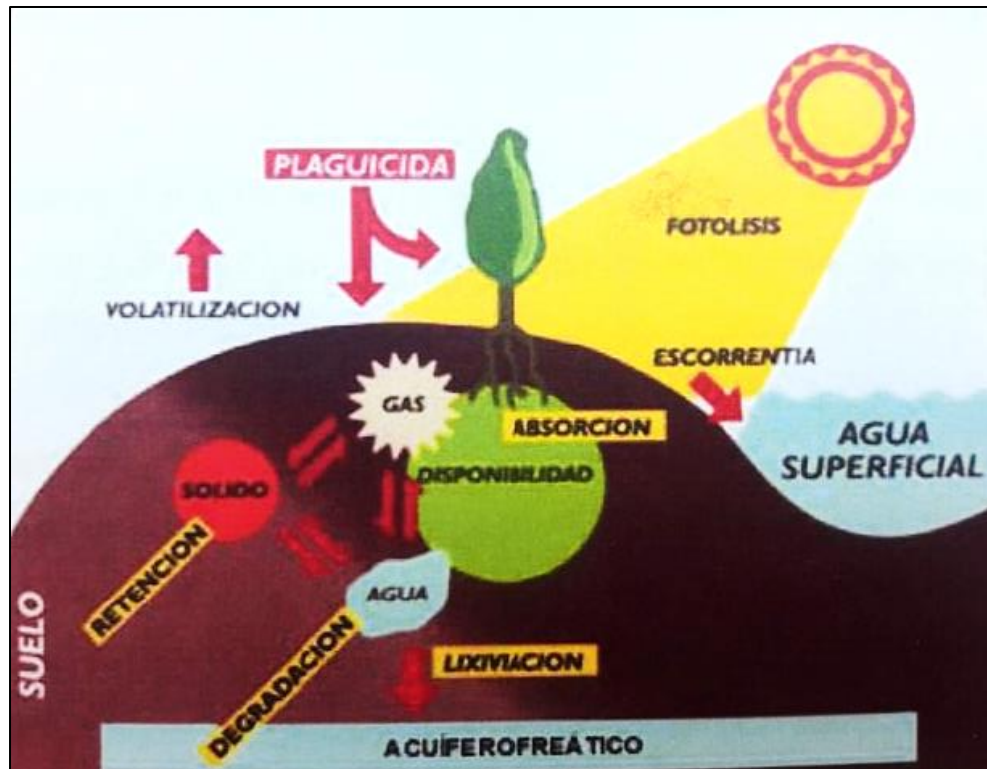


Figura 1: Procesos que determinan la dinámica de plaguicidas en el ambiente. Fuente: Loewy, 2000.

El transporte de los plaguicidas depende de factores climáticos como la temperatura ambiente, el régimen de lluvias y de vientos. Cuando la temperatura ambiente es elevada se favorece la volatilización de las sustancias y la actividad bacteriana se incrementa, aumentando la inactivación de los compuestos. La lluvia puede mover al plaguicida en superficie, como escorrentía superficial, o verticalmente a través del perfil del suelo, infiltrándose en el subsuelo y llegando incluso al agua subterránea, si el plaguicida es lo suficientemente persistente. Existen varios factores que condicionan que el plaguicida sea transportado por escorrentía superficial o que se infiltre en el subsuelo. En primer lugar la capacidad del compuesto para moverse, que depende del modo de aplicación del plaguicida y de su solubilidad. En segundo lugar la cantidad de plaguicida disponible para el transporte, definido por procesos intermedios tales como la persistencia del compuesto en el sistema suelo-agua (degradación), la interacción del compuesto con las partículas minerales y orgánicas del suelo (adsorción) y la asimilación por las plantas o por los microorganismos (absorción). Por otro lado, el régimen de vientos y la velocidad actúan favoreciendo a la volatilización de la sustancia y aumentando su dispersión en el ambiente (López Geta et al., 1992).

Loewy et al. (2011) estudiaron la dispersión de los plaguicidas en el Alto Valle y encontraron principalmente residuos de clorpirifos (CP), metilazinfos (MA) y carbaril tanto en agua superficial y subsuperficial como en suelo, lo que sugiere que existe un proceso de migración de estas sustancias a sitios alejados al de aplicación. Por otro lado, aunque se comprobó que hay una importante sorción del suelo de CP y MA, ambos fueron detectados en aguas subterráneas poco profundas. Se cree que ello es debido, entre otras causas, al uso prolongado de estos plaguicidas y al sistema de riego por inundación, lo que podría provocar que plaguicidas considerados “no móviles”, como CP, se conviertan en un problema para la calidad del agua subterránea. Esta movilidad del contaminante en el ambiente, favorece que especies no blanco puedan ser afectadas, entre ellas el ser humano.

5.1.4. Exposición humana a plaguicidas y vías de entrada

Existen dos tipos de exposición por las cuales el ser humano entra en contacto con estos compuestos:

- *Directa*: tiene lugar cuando el individuo está en contacto directo y reconoce la fuente de contaminación o bien la misma es identificable por terceros. Afecta al personal que interviene en los procesos de fabricación, mezcla, carga y aplicación de plaguicidas, en cosechas y manipulación de cultivos (exposición laboral); a los individuos que ingieren plaguicidas en forma accidental o bien a los que hacen uso intencional de los mismos con fines homicidas o suicidas (Magnarelli, Rovedatti & Pechen D’Angelo, 2011).
- *Indirecta*: el individuo desconoce la presencia del contaminante. Se produce a través de residuos en alimentos, aguas, suelos y aire afectando, en general, a un segmento mayor de la población (Magnarelli, Rovedatti & Pechen D’Angelo, 2011).

La mayor diferencia entre los dos tipos de exposiciones es la dosis. En la directa pueden estar involucradas dosis altas y bajas, en cambio en la indirecta solo dosis bajas. Esta última genera efectos crónicos, a diferencia de la directa que puede producir efectos agudos y crónicos (Matsumura et al., 1984).

Una población (o individuo) está expuesta a un xenobiótico cuando el mismo se encuentra en la vecindad inmediata a una vía de ingreso o vía de exposición

(Magnarelli, Rovedatti & Pechen D´Angelo, 2011). Esto significa que la población, para estar expuesta, tiene que tener contacto con el contaminante, el cual va a ingresar al organismo por distintas vías. Se reconocen cuatro vías principales de entrada:

- 1) *Oral (ingestión)*: El plaguicida ingresa en forma accidental o premeditada a la boca y de allí al estómago. Los síntomas de envenenamiento pueden aparecer de inmediato o en unas horas. Es la vía de ingreso más común en la población en general a través del consumo de alimento o aguas contaminadas.
- 2) *Dérmica*: El plaguicida entra en contacto con la piel y penetra el estrato córneo por difusión pasiva. Las zonas más vulnerables del cuerpo son los genitales, el cuero cabelludo, las axilas, el canal auditivo y heridas, en estos la entrada es más rápida y existe mayor peligro de intoxicación. Es la principal vía de ingreso en la exposición laboral.
- 3) *Respiratoria (inhalatoria)*: Las partículas ingresan por la nariz o boca hacia los pulmones, ocurre cuando se está expuesto a vapores o pulverizaciones. Constituye la segunda vía importante de ingreso en la exposición laboral.
- 4) *Ocular*: Los plaguicidas en forma de aerosoles pueden ingresar a través de las mucosas de los ojos cuando no se utilizan antiparras o gafas adecuadas durante su manipulación.

Otra vía de entrada que puede mencionarse es la *intrauterina*. La exposición a plaguicidas a través de la misma es de tipo indirecta y se constituye como el primer contacto con estos contaminantes tanto en el período embrionario como en el fetal (Eskenazi et al., 2004).

5.1.5. Efectos de los plaguicidas

Los efectos de los plaguicidas en la salud humana dependen de numerosos factores tales como el tipo de plaguicida y su toxicidad, la dosis de exposición, la vía de entrada, la duración y las circunstancias de exposición (Beltramino et al., 2008). Los efectos pueden ser agudos y crónicos.

- *Efectos agudos*: se producen por la exposición a altas concentraciones de contaminantes en un intervalo de tiempo corto y puede llevar incluso a la muerte (Montoro et al., 2009). Se asocian con anomalías en la función

hepática, la piel y el sistema nervioso, provocando náuseas, vómitos y mareos. Las intoxicaciones agudas son el efecto más visible en la salud e indicadores de riesgo (Wesseling et al., 2003).

- *Efectos crónicos*: se producen por exposiciones repetidas y a baja concentración de plaguicidas que pueden producir síntomas o signos que aparecen después de un largo tiempo de contacto, inclusive años, lo que dificulta su detección y registro (Montoro et al., 2009). Existen registros de casos en que las personas que trabajan con estos compuestos o que viven en zonas rurales tienen mayor riesgo de sufrir cáncer de piel, de pulmón, de pene, de cérvix, leucemia, malformaciones congénitas, necrosis de hígado y neuropatías periféricas (Wesseling et al., 2003).

5.1.6. Metabolismo de plaguicidas

El metabolismo de xenobióticos ocurre principalmente en el hígado, y en menor grado en intestino, riñones, pulmones, placenta, sangre, etc. El metabolismo enzimático ocurre en dos fases.

- *Fase I*: Las reacciones de fase I incluyen monooxigenaciones, oxidaciones, reducciones, hidrólisis e hidratación de epóxidos; excepto por las reducciones, todas estas reacciones consisten en la introducción de un grupo polar a la molécula. La gran mayoría de los compuestos que se metabolizan en la fase I son procesados por las monooxigenasas del citocromo P450 microsomales (CYPs) (Hakkola et al., 1996a; 1996b).
- *Fase II*: Las enzimas que participan en las reacciones de fase II, juegan un papel importante en la biotransformación de compuestos endógenos y xenobióticos en formas más fácilmente excretables. Estas reacciones, también llamadas reacciones de conjugación, son catalizadas principalmente por transferasas. Se incluyen: a) glucoronidación, catalizada por la enzima UDP-glucuronosiltransferasa; b) sulfatación, catalizada por sulfotransferasas; c) aminoacidación; d) glutatiónización, catalizada por glutatión-S-transferasas; e) metilación, catalizada por metiltransferasas (principalmente tiopurina-S-metiltransferasa y catecol-O-metiltransferasa); y f) acetilación, catalizada,

entre otras, por N-acetiltransferasas (Jancova, Anzenbacher & Anzenbacherova, 2010).

5.2. Plaguicidas Organofosforados (OFs)

Los plaguicidas OFs fueron sintetizados durante la Segunda Guerra Mundial como agentes químicos de guerra, entre los cuales se encuentran el sarín, tabun y soman. Estos compuestos son “oxones”, y tienen la capacidad de ser neurotóxicos sin tener que ser metabolizados previamente con una DL_{50} cercana a los $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso, cuando son inyectados a monos. Por ejemplo el Tabun en el caso de ser inhalado, una dosis de $150 \text{ mg}/\text{m}^3$ produce la muerte (“Tabun”, n.d.).

5.2.1. Generalidades

Los OFs constituyen un grupo de compuestos con una estructura química en común y son utilizados extensivamente para el control de plagas en la agricultura y los hogares.

Según Quagliano (2009) estos compuestos tienen baja/moderada persistencia en el medio ambiente, el cual se traduce en días (baja) o semanas (moderada); se hidrolizan a pH alto o bajo y también son degradados por la luz del sol. Son compuestos generalmente apolares, poco solubles en agua y muy solubles en disolventes orgánicos, es decir liposolubles.

El ciclo de vida de estos compuestos comienza en la fabricación llegando hasta su uso final en las cosechas. Cuando se utilizan estos productos vencidos, existe el riesgo de introducir impurezas mucho más tóxicas que el pesticida en origen, como por ejemplo los llamados derivados “oxón”, que es el metabolito bioactivado causante de la neurotoxicidad. Sumado a esto, luego del uso, los envases en los cuales se comercializan deben ser destruidos o bien sometidos a un proceso de triple lavado a fin de evitar intoxicaciones por el reciclado de los mismos (Quagliano, 2009).

La estructura general de estos compuestos se presenta en la Figura 2.

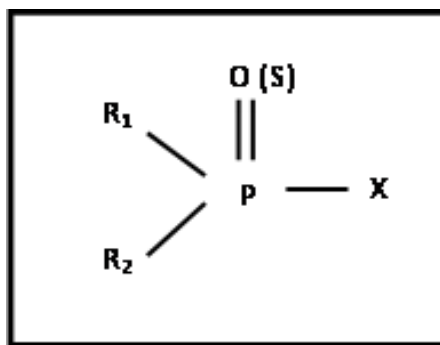


Figura 2: Estructura química general de los plaguicidas organofosforados.

R1 y R2 son radicales alquilo, generalmente metilo o etilo. El grupo X es característico de cada especie química, siendo frecuentemente un radical arilo, y suele contribuir de forma importante a sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Dicho grupo es el llamado “grupo saliente”, que es liberado cuando el OF fosforila a la acetilcolinesterasa (AChE), y es el más sensible a la hidrólisis (Anguiano, 2011). El doble enlace al átomo de fósforo puede ser de oxígeno o de azufre.

5.2.2. Metabolismo de OFs

La reacción química más común de los OFs es la hidrólisis dado que son esteres fosforados, la cual es catalizada por agua y A-esterasas (hidrolasas dependientes de calcio también llamadas paraoxonasas). Sus sustratos son compuestos que tienen un grupo P=O, o los metabolitos oxón de los plaguicidas parentales; con la hidrólisis son capaces de destruir la actividad anticolinesterasa de estos compuestos y de ser una ruta potencialmente significativa de desintoxicación. Sin embargo, aunque las A-esterasas muestran una baja afinidad por muchos compuestos, tienen alta afinidad por ciertos otros, tales como clorpirifos-oxón y diazinón-oxón (Tang, Rose & Chambers, 2006).

Para los OFs que contienen un átomo de azufre enlazado al fósforo (P=S), es necesaria una bioactivación metabólica, para que su principal actividad biológica se manifieste, ya que solo los compuestos OFs que contienen un doble enlace con un oxígeno son inhibidores eficaces de la AChE. Esta bioactivación consiste en una desulfuración oxidativa mediada por CYPs, y conduce a la formación de un "oxón" en el insecticida parental, que son compuestos bioactivados más neurotóxicos que el compuesto de origen. Aunque esta reacción se conoce desde hace varias décadas,

aún no se conoce con exactitud las isoformas CYPs involucradas (Costa, 2006). En la Figura 3 se observa un esquema de las principales vías metabólicas de un OF.

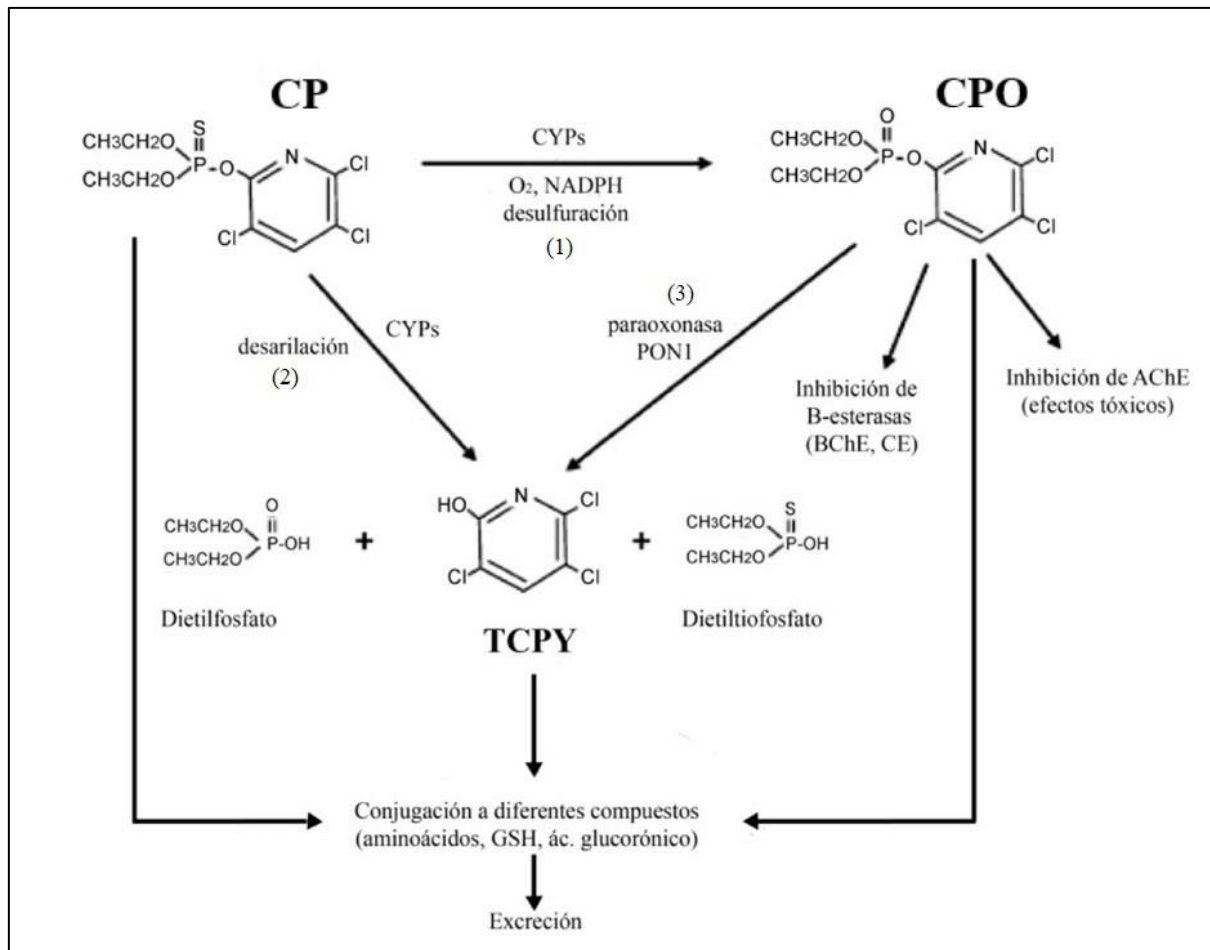


Figura 3: Principales vías metabólicas implicadas en la biotransformación de clorpirifos. La reacción (1) es una bioactivación, las otras son reacciones de detoxificación. CP: clorpirifos; CPO: clorpirifos oxón; TCPY: 3,5,6-tricloro-2-piridinol. Reacciones: (1) desulfuración oxidativa; (2) desarilación oxidativa; (3) hidrólisis mediada por PON1 (paraoxonasa 1). Fuente: Extraído y adaptado de Eaton et al., 2008.

5.2.3. Blancos de acción de los OFs

5.2.3.1. Enzima Acetilcolinesterasa (AChE)

El blanco primario de acción neurotóxica de los insecticidas OFs lo constituye la enzima AChE. Estos compuestos ejercen su acción tóxica inhibiéndola, lo que conduce a una acumulación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en la sinapsis y uniones neuromusculares con la consecuente estimulación excesiva de sus receptores lo que desencadena la crisis colinérgica (Lascano & Anguiano, 2011).

La enzima AChE pertenece a la familia de las B-esterasas, que hidroliza preferentemente ésteres de colina. La AChE se encuentra principalmente en el sistema nervioso central y periférico, en las uniones neuromusculares y en el sistema hematopoyético de vertebrados. Desempeña un papel muy importante en la neurotransmisión colinérgica al hidrolizar ACh, y por lo tanto terminar con la estimulación que produce este neurotransmisor (Lascano & Anguiano, 2011).

Las enzimas B-esterasas se caracterizan por poseer en su sitio activo el grupo -OH de una serina. En el caso de la AChE los aminoácidos directamente involucrados en la catálisis son la serina, la histidina y el ácido glutámico, que juntos conforman una triada catalítica. Teniendo en cuenta la estructura básica que los plaguicidas OFs adquieren en el metabolito bioactivado u oxón cuando el enlace P=O se polariza, el mismo activa al átomo de fósforo y promueve el ataque nucleofílico por el átomo de oxígeno al residuo serina del sitio activo presente en la enzima. Entonces, la serina es fosforilada y el grupo saliente del insecticida OF se disocia de la enzima (Lascano & Anguiano, 2011).

En condiciones fisiológicas la enzima acetilada es rápidamente hidrolizada cuando reacciona con su sustrato ACh, sin embargo cuando la enzima se encuentra fosforilada por el OF-oxón, esta unión es muy estable y el proceso de hidrólisis es muy lento. Mientras que la ruptura entre el enlace carbono-enzima, se lleva a cabo en unos pocos microsegundos, la ruptura entre el enlace fósforo-enzima puede llevar de unas pocas horas a varios días, dependiendo de la estructura química del OF. La AChE fosforilada es hidrolizada por el agua a una velocidad muy lenta, dependiendo, como ya se dijo, de la naturaleza química de los sustitutos R en el OF (ejemplo, la reactivación disminuye en el siguiente orden: desmetoxi > dietoxi > diisopropoxi). La reactivación de la AChE fosforilada no se produce una vez que el complejo enzima-inhibidor ha “envejecido” y puede ser considerada como irreversiblemente inhibida, y la única forma de restituir su actividad es por medio de la síntesis de nuevas enzimas, un proceso que podría llevar días (Costa, 2006; Lascano & Anguiano, 2011).

La inhibición enzimática de AChE por OFs, es el mecanismo clásico de toxicidad inducido por estos compuestos. La inhibición de AChE, producida por una intoxicación aguda a OFs, induce acumulación de ACh con la sobre-estimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos. Este “síndrome colinérgico” incluye el

aumento de la sudoración y salivación, la secreción bronquial profunda, broncoconstricción, miosis, aumento de la motilidad gastrointestinal, diarrea, temblores, espasmos musculares, y diversos efectos sobre el sistema nervioso central. Siendo la consecuencia más grave la falla de las vías respiratorias por causa de la inhibición de los centros respiratorios en el tronco cerebral, broncoconstricción e incremento de la secreción bronquial, y parálisis flácida de los músculos respiratorios. Produciéndose la muerte en intoxicaciones graves (Costa, 2006).

5.2.3.2. Enzima Carboxilesterasa (CES)

Otra enzima B-esterasa inhibida por OFs es la carboxilesterasa (CES) la cual representa otro blanco de toxicidad interesante, debido al número de reacciones que catalizan con compuestos endógenos y exógenos, y que se encuentran menos estudiadas que otras esterases (Casida & Quistad, 2005; Espinoza et al., 2016).

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de ésteres vía la adición de agua. Actúan como enzimas detoxificantes de fase I y están involucradas en procesos de detoxificación e inactivación metabólica de diversas drogas, tóxicos ambientales y carcinógenos. Las CES detoxifican plaguicidas OFs a través de su unión covalente a dichos compuestos y de manera estequiométrica, por tanto reducen la cantidad de estos compuestos disponibles para inhibir a la AChE. Por otro lado, participan de la hidrólisis y transesterificación de una variedad de sustancias como plaguicidas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (temocapril, cilazapril y imidapril), fármacos antitumorales (irinotecan (CPT-11) y capecitabina), y los narcóticos (cocaína, heroína y meperidina) (Imai, 2006; Satoh & Hosokawa, 2006; Imai & Ohura, 2010). Por otra parte las CES catalizan reacciones con endobióticos como el colesterol, ácidos grasos y lipoproteínas (Tsujita & Okuda, 1993; Becker et al., 1994; Ghosh, 2000; Diczfalusy et al., 2001; Hosokawa et al., 2008).

5.2.3.2.1. Isoformas de las CES

La enzima CES comprende una familia multigénica de isoenzimas. En humanos han sido descritas cinco familias de CES: CES1, principal esterasa hepática que metaboliza xenobióticos y fármacos; CES2, expresada principalmente en intestino delgado; CES3, expresada en cerebro, hígado y colon; y CES4, CES5 y CES6, las cuales fueron menos caracterizadas (Satoh & Hosokawa, 2006; Holmes et al., 2010).

CES1 y CES2 han sido las isoformas más estudiadas e importantes, debido a su mayor abundancia en órganos relevantes para el metabolismo de drogas y xenobióticos (Redinbo & Potter, 2005). Según Yan, Matoney & Yang (1999), en la placenta humana se expresan las isoformas CES1, CES2 y CES3.

Las isoformas de CES presentan distinta afinidad por un mismo sustrato, por tanto y considerando que las CES participan en el metabolismo de compuestos endógenos y xenobióticos, la inhibición particular de ciertas isoformas y no de otras podría interferir con el metabolismo de estas sustancias.

5.2.4. Clorpirifos y su formulado comercial Lorsban®

En Argentina, el plaguicida OF clorpirifos (CP) representa el segundo agroquímico más vendido después del Glifosato (Kleffmann & Partner S.R.L., 2012). En el Alto Valle es utilizado principalmente para combatir la carpocapsa (*Cydia pomonella*) en frutales de pepita.

CP es un insecticida sólido cristalino de color blanco que actúa inhibiendo la AChE, causando la muerte por colapso del sistema nervioso del insecto. Este insecticida es relativamente estable a hidrólisis en pH neutro y soluciones acuosas ácidas, pero su estabilidad disminuye a medida que aumenta el pH. En la Tabla 4 se presentan algunas características generales.

Tabla 4: Características generales del plaguicida organofosforado clorpirifos.

Características generales de clorpirifos	
Nombre común	Clorpirifos
Nombre IUPAC	O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato
Nombres comerciales	Lorsban® (Dow Agrosiences), Clorfox® (Gleba), CP 48% EC® (Sigma), CP LQ48%® (Lather Quimica), etc.
Formula química	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Peso molecular	350,59 g
Punto de fusión	41 – 42°C
Solubilidad en agua a 25°C	2 mg/L
K_{ow}*	5,11
K_{oc}**	6070
Presión de vapor (mPa)	2,5 a 25°C

*K_{ow}: coeficiente de partición octanol/agua; **K_{oc}: coeficiente de partición carbono orgánico/agua.

La estructura química de CP se encuentra en la Figura 4.

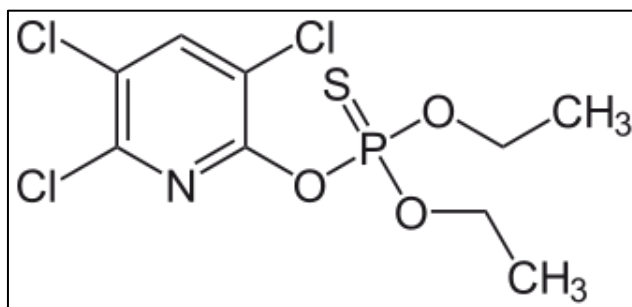


Figura 4: Estructura química de clorpirifos O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato.

Una de las formulaciones comerciales de CP más utilizada en la zona del Alto Valle es Lorsban®. Este insecticida de amplio espectro es marca registrada de Dow AgroSciences Argentina S.R.L, y es recomendado para el control de carpocapsa (*Cydia pomonella*), grafolita (*Cydia molesta*) y cochinilla harinosa (*Pseudococcus sp.*) en frutales de pepita (manzanos y perales) y gusano del brote del duraznero (*Cydia molesta*) en duraznero. Este producto se clasifica dentro de la Categoría toxicológica Clase II y se presenta en forma de gránulos color crema dispersables en agua. Tiene actividad por ingestión, contacto e inhalación (“Lorsban® 75WG” n.d.).

La composición de Lorsban® consta de un 75% peso en peso de principio activo clorpirifos etil: O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato, y un 25% de coadyuvantes e inertes tales como polímeros, emulsificantes, surfactantes, antiespumantes, preservativos, granulantes, antiaterronantes y humedad residual. El período de carencia de este producto es de 30 días entre la última aplicación y la cosecha (“Lorsban® 75WG” n.d.). Las dosis recomendadas según la plaga a combatir se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5: Dosis de aplicación según tipo de cultivo y plaga a combatir. Fuente: “Lorsban® 75WG” (n.d.).

CULTIVO	PLAGA	DOSIS
Manzano y Peral	Carpocapsa (<i>Cydia pomonella</i>)	85 g/100 L de agua
	Grafolita (<i>Cydia molesta</i>)	85 g/100 L de agua
	Cochinilla harinosa (<i>Pseudococcus sp.</i>)	75 g/100 L de agua
Durazno	Gusano del brote del duraznero (<i>Cydia molesta</i>)	85 g/100 L de agua

Estudios realizados en el Alto Valle han demostrado que la población se encuentra expuesta a plaguicidas OFs. Se ha comprobado que CP posee propiedades

que favorecen su llegada al ambiente intrauterino y que la placenta es un órgano afectado por éste (Guiñazú et al., 2012; Bulgaroni et al., 2013; Espinoza et al., 2016; Rivero-Osimani, 2016).

5.3. Placenta humana

5.3.1. Definición y función

La placenta es un órgano multifuncional que protege al feto en desarrollo durante el embarazo. Este órgano se desarrolla a partir del tercer mes de embarazo y el desarrollo del feto en el útero materno se encuentra ligado anatómica, genética y metabólicamente al desarrollo del mismo. El 98% del crecimiento del bebé ocurre durante el período fetal, cuando el feto es enteramente dependiente de la placenta, por tanto existe una asociación entre el peso del recién nacido y el peso de la placenta.

Dentro de las funciones de la placenta se incluye el intercambio de nutrientes, electrolitos y gases entre la madre y el feto. La placenta constituye una barrera para el feto frente a patógenos y al sistema inmune materno. Por otro lado, es capaz de sintetizar y secretar una gran cantidad de hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y otros productos bioactivos (Regnault et al., 2002). Otra función es la biotransformación de xenobióticos. La mayoría de las biotransformaciones que ocurren en el hígado están representados en la placenta (Benirschke et al., 2006) pero su capacidad de biotransformación se encuentra entre el 2 al 3,3% de la capacidad hepática (Rama Sastry, 1999), por tanto una gran mayoría de xenobióticos pueden pasar al feto prácticamente sin cambios.

5.3.2. Formación

La placenta humana comienza a formarse en la segunda semana de gestación y adquiere su forma definitiva a partir del tercer mes a partir del cual se desarrolla de forma delimitada. Está conformada por un componente materno, que es una transformación de la membrana uterina; y un componente fetal, que deriva del trofoblasto y del mesodermo extraembrionario (capa coriónica) que unidos forman la estructura llamada corión. Según la etapa de maduración celular de las células del trofoblasto pueden caracterizarse en citotrofoblastos (CT), que constituye una capa interna de proliferación activa, y en sincitiotrofoblastos (SCT), los cuales conforman

una capa celular externa. El CT junto al SCT conforman las vellosidades primarias, secundarias y terciarias, donde el CT genera columnas celulares que penetran en el SCT y son rodeadas por éste.

La parte materna de la placenta está constituida por la decidua basal. En la zona de unión del componente fetal y materno se entremezclan los trofoblastos con las células deciduales. Al principio las vellosidades del trofoblasto están formadas por el SCT, el CT, el tejido conjuntivo y el endotelio, pero al inicio del cuarto mes las células citotrofoblásticas y algunas células del tejido conjuntivo desaparecen. Entonces el SCT y la pared endotelial de los vasos sanguíneos se constituyen como las únicas capas que separan la circulación materna de la fetal (Langman et al., 2009).

Al final del embarazo, la placenta tiene un diámetro aproximado de 20 cm y un peso de 500 g, correspondiente a un 16% del peso fetal.

5.3.3. Sistema colinérgico placentario humano

Todos los componentes del sistema colinérgico: ACh, colina acetiltransferasa (ChAt), AChE, butirilcolinesterasa, receptores muscarínicos y receptores nicotínicos, han sido demostrados por métodos inequívocos en la placenta humana (Rama Sastry, 1997). La presencia de actividad de ACh en extractos de placenta humana se demostró mediante métodos de bioensayo a finales de 1920/principios de 1930. En los años siguientes se lograron mejoras en las técnicas de bioensayo para ACh y su detección por GC-MS (cromatografía gaseosa con espectrómetro de masas). Se ha establecido por GC-MS que la placenta humana a término contiene aproximadamente 112 nmol/g de tejido húmedo de ACh, que es aproximadamente 7 veces mayor que la del tejido cerebral (Rama Sastry, 1997).

La ACh se sintetiza a partir de Acetil-Coenzima A (ACoA) y colina. La reacción entre ACoA y colina es catalizada por la enzima ChAt. Algunos investigadores han obtenido preparaciones de ChAt con diferentes grados de purificación a partir de placenta humana. Se ha demostrado que ChAt del cerebro y de la placenta sintetizan ACh por el mismo mecanismo enzimático, es decir, el mecanismo de Theorell-Chance, con ACoA como sustrato principal y coenzima-A (CoA) como producto obligatorio (Rama Sastry, 1997).

Varias funciones no neuronales hipotéticas de ACh, se han postulado en la placenta, (a) la regulación del flujo sanguíneo, y del volumen del fluido en los vasos de la placenta; (b) la apertura y cierre de los canales trofoblásticos; (c) la introducción de propiedades contráctiles a miofibroblastos; (d) la facilitación de transporte de aminoácidos necesarios para el crecimiento del feto en la placenta; (e) la liberación de hormonas placentarias y (f) la modulación de la formación de prostaglandinas del miometrio y la placenta durante el parto. Todos estos roles son razonables, y algunos de ellos pueden llegar a estar vinculados entre sí para influir o mantener la función placentaria (Rama Sastry, 1997).

5.3.4. La placenta como biomarcador de la exposición a plaguicidas

Los xenobióticos pueden interferir con la función de la placenta en diversos niveles, por ejemplo, en eventos de señalización, transporte, la producción y liberación de hormonas, el pasaje de nutrientes y productos de desecho, la implantación, el crecimiento y la maduración celular. Dado que los efectos acumulativos de los eventos del ambiente intrauterino se reflejan en la placenta, este órgano es de gran utilidad para llevar a cabo estudios epidemiológicos. Además, es fácil de recoger, proporciona una importante cantidad de muestra para su análisis, y es a menudo el componente más accesible y fácilmente disponible de la tríada madre-placenta-feto (Magnarelli, 2015).

5.3.4.1. Explantos de placenta

Los explantos son porciones de tejido placentario humano que se utilizan como modelo de estudio de la respuesta placentaria a los contaminantes. Los mismos son utilizados para estudiar muchas facetas de la interface materno-fetal, que tienen que ver no sólo con el transporte de sustancias sino también con el metabolismo y el funcionamiento del sistema endócrino. Las características morfológicas y funcionales de los cultivos de explantos son comparables tanto a la situación que se desarrolla en el útero *in vivo*, así como con los cultivos primarios de células de trofoblasto aisladas (Miller et al., 2005).

5.4. Antecedentes

5.4.1. Estudios a nivel mundial sobre efectos de OFs

En poblaciones residentes rurales en el mundo, se han reportado microcalcificaciones, microinfartos y cambios morfológicos en las vellosidades terciarias de placentas de mujeres residentes en áreas agrícolas expuestas a paratión y una asociación positiva entre el retardo del crecimiento intrauterino y la exposición de embarazadas a OFs (Levario-Carrillo et al., 2004).

Estudios realizados en el cerebro de ratas neonatas y en la placenta de ratas expuestas experimentalmente a plaguicidas OFs como metilparatión, han demostrado que la expresión de los receptores muscarínicos de ACh (mAChR) M1 y M2 disminuye en el tejido expuesto a dichos compuestos (Colmenero Salas et al., 2009).

5.4.1.1. Efectos de clorpirifos

Entre 2002 y 2009, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (2009), o sus siglas en inglés EPA, sostuvo que se reportaron 126 incidentes agudos en los cuales estuvo involucrado CP, con más de 150 personas afectadas de las cuales 17 eran niños.

Existe evidencia de toxicidad genética y mutagenicidad en muchos estudios. La exposición aguda y crónica a CP causó un daño significativo al ADN en tejido de ratas, tales como hígado, cerebro, riñón y bazo, cuando se midió 24 horas después del tratamiento. El daño se reparó parcialmente a las 48 y 72 horas siguientes al tratamiento (Ojha, Yaduvanshi & Srivastava, 2011). CP causó daño al ADN en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) a 15,0 pg/L, y se estima que eso fue como resultado de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) (Gupta et al., 2010). CP causó el aumento de la tasa de migración de ADN, según se evaluó en la prueba de cometa, en linfocitos humanos a 10 µM (Sandal & Yilmaz, 2011). Cui et al. (2011) encontraron ruptura de la cadena de ADN e hipometilación de ADN en linfocitos de ratón. La estadística es variada, pero varios estudios recientes indican que CP es mutagénico o tiene toxicidad genética en seres humanos, ratas, ratones, hamsters chinos, renacuajos, peces y mosca de la fruta (Watts, 2012).

La estadística sobre carcinogenicidad es controversial. EPA (2009) reportó cero evidencias de carcinogenicidad en estudios con animales, pero hay muchos estudios epidemiológicos que indican que CP puede ser carcinogénico en seres humanos. La asociación más fuerte es con cáncer de pulmón y recto. También hay estudios de laboratorio que indican que CP es un factor de riesgo de cáncer de mama, debido a que genera alteraciones del sistema endocrino y causa la multiplicación de células de cáncer mamario (Ventura et al., 2012).

Varios análisis de exposición a CP y aumento de riesgo de varios cánceres se desarrollaron en Estados Unidos como parte de un Estudio de Salud y Agricultura, que involucró más de 50.000 aplicadores de plaguicidas:

- Un análisis de exámenes médicos periódicos de 64 operadores de control de termitas que usaban CP reveló gran disminución de la actividad de la butirilcolinesterasa, disminución de la AChE eritrocitaria y nitrógeno anormales en la orina y glóbulos blancos (Gotho et al., 2001).
- Un estudio de 12 personas expuestas a CP encontró una alta tasa de atopia y sensibilidad a antibióticos, células con CD26 alto (antígeno de activación de células T, un modulador clave de respuesta del sistema inmunológico) y una tasa más alta de autoinmunidad, en comparación con dos grupos control. Autoanticuerpos se dirigieron hacia músculos lisos, célula parietal, glándula tiroides, mielina y anticuerpos antinucleares (Thrasher, Madison & Broughton, 1993).

Sin embargo, en un estudio más extenso de 29 personas expuestas crónicamente a CP; Thrasher, Heuser & Broughton (2002), nuevamente encontraron células con CD26 alto y aumento de la frecuencia de autoanticuerpos, junto a fenotipo disminuido de CD5, y mitogénesis disminuida en respuesta a fitohemaglutinina y concanvalina.

Watts (2012), indicó que CP es un disruptor endócrino, inhibe el metabolismo de la testosterona, del estradiol, y la síntesis de la testosterona. Es anti-androgénico y estrogénico, y estimula la proliferación de células de cáncer mamario. Induce alteraciones en las glándulas tiroides y suprarrenales, y afecta en forma diferencial los niveles de las hormonas que estimulan la tiroides en hombres y mujeres.

Los efectos teratogénicos observados en ratas incluyen malformaciones de la columna vertebral, de las extremidades delanteras y traseras, falta de desarrollo de la columna, ausencia de vértebras torácicas y paladar hendido. En seres humanos, malformaciones del cerebro, ojos, oídos, paladar, dientes, corazón, pies, pezones y órganos genitales se han asociado con exposición gestacional a CP (Watts, 2012).

Los efectos reproductivos en animales incluyen peso fetal disminuido y viabilidad; aumento de la muerte fetal y de la reabsorción temprana; reducción de la motilidad y cantidad de los espermatozoides, disminución en la factibilidad de viabilidad y desarrollo de los ovocitos. En seres humanos, la exposición a CP se asocia con disminución de peso y estatura al nacer; daño al ADN en el espermatozoide y disminución en la concentración y motilidad del espermatozoide (Watts, 2012).

CP es una potente neurotoxina del desarrollo a bajos niveles de exposición, por debajo de los niveles que gatillan la inhibición de la colinesterasa fetal. Esto se demostró en numerosos estudios de laboratorio y en algunos estudios epidemiológicos recientes. Las exposiciones *in útero* y en la niñez temprana pueden generar anormalidades de comportamiento en la adolescencia y la edad adulta. Los estudios epidemiológicos encontraron desarrollo cognitivo y psicomotor retardado, y disminución del Índice de Inteligencia (IQ) (Watts, 2012).

5.4.2. Efectos de OFs en la placenta humana. Estudios en el Alto Valle

Los OFs son plaguicidas no polares que pueden atravesar las membranas celulares. Su grado de incorporación en los distintos compartimientos de la tríada madre-placenta-feto está determinada por las propiedades físico-químicas de estos agentes tales como la solubilidad en lípidos y sus características toxicocinéticas. Debido al alto grado de lipólisis que tiene lugar en el tejido adiposo durante la gestación tardía, se produce una redistribución del almacenamiento de los plaguicidas, que son liberados a la circulación materna y atraviesan las microvellosidades de la placenta. Es así que, contrariamente a la concepción de que la placenta representa una barrera que protege al feto de estos tóxicos ambientales, diversos estudios en ratas y en humanos han demostrado una importante transferencia transplacentaria. No obstante, a diferencia de los plaguicidas

organoclorados (OCs), los OF se metabolizan y se excretan rápidamente (Magnarelli, 2015).

La exposición ambiental humana a plaguicidas durante el período de gestación se asocia con resultados adversos en la reproducción (Arbuckle, Lin & Mery, 2001; Triche & Hossain, 2007), aborto espontáneo involuntario (Figa-Talamanca, 2006; Pathak et al., 2010), bajo peso al nacer (Figa-Talamanca, 2006; Lopez-Espinosa et al., 2007; Triche & Hossain, 2007) y el retraso del crecimiento intrauterino (Levario-Carrillo et al., 2004). También ha sido informado de la asociación de la exposición materna a plaguicidas con un mayor riesgo de malformaciones urogenitales (Fernández et al., 2007) y el desarrollo reproductivo alterado (Andersen et al., 2008).

Los efectos que estos xenobióticos podrían causar sobre el feto son preocupantes, principalmente debido a dos razones; a) durante la etapa intrauterina, los mecanismos de detoxificación y el sistema inmunológico no están completamente desarrollados y, b) la barrera hematoencefálica es inmadura y en comparación con la madre, en el feto hay una elevada concentración de tóxicos por peso, lo que impacta en el desarrollo de los órganos fetales (Magnarelli, 2015).

En las poblaciones rurales del Alto Valle, se ha demostrado la exposición en período de aplicación intensiva de OFs (meses septiembre a febrero) tanto en embarazadas (Souza et al., 2006; Vera, Santa Cruz & Magnarelli, 2012; Bulgaroni et al., 2012, 2013) como en niños y en sus madres (Bulgaroni, Rovedatti & Magnarelli, 2009). Asimismo, se ha observado disminución en la edad gestacional durante el período de aplicación de OFs (Souza et al., 2006) y disminución del peso al nacer (Rivero-Osimani, 2016; Quintana et al., 2017).

En el estudio de mujeres embarazadas, se ha demostrado que las mismas se encuentran expuestas residencialmente a anticolinesterásicos, ya que las actividades de AChE y butirilcolinesterasa de sangre periférica se encuentran disminuidas durante el período de aplicación de plaguicidas (Souza et al., 2005; Cecchi et al., 2012; Vera, Santa Cruz & Magnarelli, 2012; Bulgaroni et al., 2013). Adicionalmente, se reportó que placentas de mujeres embarazadas de comunidades de la zona, recolectadas en período de aplicación de plaguicidas, presentan mayor actividad de AChE (Souza et al., 2005), y menor actividad de CES (Vera, Santa Cruz & Magnarelli, 2012; V.

Bulgaroni et al., 2013; Rivero-Osimani, 2016) que las placentas recolectadas durante el período de receso.

Lombardo (2011), también realizó estudios con placentas a término de mujeres embarazadas residentes en zonas de aplicación intensiva de OFs, el estudio arrojó resultados sobre modificaciones en la expresión de las enzimas arginasa (ARG) y ornitina decarboxilasa (ODC) (involucradas en la biosíntesis de poliaminas), y expone que ello posiblemente esté asociado a una respuesta reparadora para mantener la homeostasis tisular.

Se demostró que CP induce la expresión de los receptores Tipo Toll TLR2 y TLR4 a altas concentraciones (100 μ M) y tiempos cortos de incubación (4 hs) y que MA sólo induce la expresión del TLR2 en dichas condiciones (Zappa, 2015).

Espinoza et al. (2016), reportaron que la línea celular humana de trofoblastos JEG-3 expresan CES1 y CES2, las cuales son inhibidas en diferente magnitud y con una cinética particular según el OFs al que se encuentren expuestas. Este estudio reportó una actividad destacable de las enzimas AChE y CES en la línea celular JEG-3 y su inhibición por exposición a plaguicidas metilazinfos y clorpirifos. MA produjo inhibición a 4 horas de incubación, en cambio CP produjo este efecto luego de 24 horas de incubación.

Gómez (2015), comprobó que la exposición *in vitro* a estos xenobióticos, considerando diversas concentraciones (entre ellas las representativas de los niveles en sangre de embarazada y de cordón umbilical), favorece la producción de EROs.

Recientemente, Colobig (2016), determinó la expresión de receptores muscarínicos: M1, M2 y M4 en células trofoblásticas JEG-3 expuestas a los OFs: CP y MA. En el estudio *in vitro*, comprobó que la expresión del receptor M1 fue inducida por el plaguicida CP a 4 hs de incubación. Por otro lado, en el estudio poblacional, encontró cambios significativos en la expresión del receptor M1 entre las muestras colectadas en período de receso de aplicación de plaguicidas y el grupo urbano (control). Otro hallazgo en el estudio poblacional fue la expresión del receptor M4 en las muestras recolectadas en el período de aplicación, no siendo así en las de período de receso ni en las de grupo control.

Todos estos resultados indican que la placenta es un blanco de acción para insecticidas OFs. La utilización de modelos *in vivo* (o poblacionales) e *in vitro* ha permitido demostrar la transferencia de plaguicidas OFs a través de la placenta. Al alcanzar la placenta, estos compuestos tóxicos, podrían interferir con su función a diversos niveles y perturbar ostensiblemente el desarrollo del feto, la implantación y/o el nacimiento.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Colección de muestras de placenta

Se obtuvieron placentas (n=6) de mujeres con buen estado de salud general, de similar grupo étnico y nivel educacional. Todas las mujeres fueron sometidas a cesárea programada debido a cesárea previa o presentación podálica del feto. Se excluyeron mujeres con embarazo múltiple, con enfermedad crónica (obesidad, diabetes, con enfermedad tiroidea, cardíaca o hipertensión), fumadoras activas, alcohólicas, consumidoras de drogas de abuso, medicadas con fármacos (excepto aquellos incluidos en el grupo A según Food Drug Administration-FDA), expuestas a Rayos X, también las pacientes con historia previa de eclampsia, pre-eclampsia y con serología positiva para Chagas, HIV y Toxoplasmosis. Se solicitó un consentimiento informado previo para la toma de muestra.

Las placentas utilizadas fueron provenientes de mujeres embarazadas entre 17 y 35 años de edad que concurren a la Clínica San Agustín de la Ciudad de Neuquén. Este estudio fue aprobado por la Comisión Asesora en Investigación Biomédica en Seres Humanos (CAIBSH) de la provincia de Neuquén.

6.1.1. Obtención de explantos de placenta.

Las placentas se recolectaron y procesaron inmediatamente después de la cesárea. Para aislar los explantos, se removió la placa coriónica y la decidua, y se seleccionaron cotiledones al azar que no presentaran infartos ni calcificaciones. El tejido se diseccionó en fragmentos de 15-20 mg (Ietta et al., 2010).

Los explantos se lavaron en buffer fosfato salino (PBS) 1x estéril, al cual se le agregó penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/mL) y fungizona (0,25 µg/mL).

6.2. Plaguicidas

Se utilizó el plaguicida OF clorpirifos (CP) con una pureza del 99% (Chemservice). Adicionalmente se utilizó el formulado comercial Lorsban® 75 WG (Dow AgroSciences). Ambos se dispersaron en dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración final de 0,5 M.

6.3. Cultivo de explantos de placenta

En tubos falcon estériles de 15 mL se colocó medio DMEM suplementado 10% SBF con Lorsban® (LB) y CP respectivamente, y se prepararon diluciones seriadas de cada plaguicida a concentraciones 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M. Para la muestra control se preparó medio DMEM suplementado 10% SBF con DMSO.

Una vez aislados los explantos se procedió a colocar 3 explantos por pocillo en una placa de 24 pocillos y se agregó 1,5 mL de medio con DMSO en la muestra control, y mismo volumen de las diluciones en tratamientos. En la Tabla 6 se observa la disposición de la placa. Por último se cultivaron por 24 y 48 horas a 37°C en 5% de CO₂.

Tabla 6: Esquema de cargado de la placa de 24 pocillos con los explantos de placenta.

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	0,01 μ M LB	0,01 μ M LB	0,1 μ M LB	0,1 μ M LB
B	1 μ M LB	1 μ M LB	10 μ M LB	10 μ M LB	100 μ M LB	100 μ M LB
C	DMSO	DMSO	0,01 μ M CP	0,01 μ M CP	0,1 μ M CP	0,1 μ M CP
D	1 μ M CP	1 μ M CP	10 μ M CP	10 μ M CP	100 μ M CP	100 μ M CP

6.4. Actividad de CES

Para medir la actividad de la CES en los explantos de placenta se utilizó la técnica colorimétrica de Morgan et al. (1994), modificada por Espinoza et al. (2016). Dicha técnica utiliza como sustrato α -naftil acetato, cuya hidrólisis produce α -naftol, el cual reacciona con el colorante Fast Garnet. Se utiliza BW284C5 como inhibidor de AChE.

La actividad enzimática de CES se determinó espectrofotométricamente en explantos expuestos por 24 y 48 horas a CP y LB, la misma se midió en nmol/min x mg de proteína. La intensidad de color desarrollada se leyó a 550 nm utilizando el lector de placa (espectrofotómetro).

Procedimiento.

- 1) Lisado de muestras: Los explantos expuestos se lisaron con 500 μ L de buffer fosfato de sodio 0,1 M con tritón al 0,5%, pH 6,5; se trasvasaron a microtubos eppendorf y se centrifugaron a 12400 rpm por 10 minutos a 4°C.
- 2) Preparado de la curva de calibración (testigos): Se rotularon cinco tubos crioviales del 0 al 4 y a cada uno se le agregó buffer fosfato de sodio 0,1 M con tritón al 0,5%, pH 6,5; α -naftol 6 mM (diluido en etanol) y etanol en un volumen final de 1 mL, como indica la Tabla 7.

Tabla 7: Reactivos y cantidades necesarias para la preparación de la curva de calibración.

N° de tubo	Buffer fosfato de sodio (μ L)	α -naftol (μ L)	Etanol (μ L)
0	930	0	70
1	930	10	60
2	930	20	50
3	930	40	30
4	930	60	10

- 3) Preparado de la solución de revelado: En un tubo falcon de 15 mL se agregaron los siguientes reactivos:
 - Agua destilada 7 mL
 - Buffer fosfato de sodio 0,1 M con tritón al 0,5%, pH 6,5 2,5 mL
 - α -naftil acetato 60 mM (diluido en etanol) 500 μ L
 - Inhibidor BW 284C5, 2 mM (diluido en etanol) 40 μ L

Por último se mezcló por inversión.

- 4) Cargado de la placa: Se utilizó una placa de 96 pocillos y se cargó como muestra la Tabla 8.
 - a) En cada pocillo “B” se colocaron 50 μ L de buffer fosfato de sodio 0,1 M con tritón al 0,5%, pH 6,5.
 - b) En cada pocillo “T” se agregaron 50 μ L de cada testigo (0, 1, 2, 3 y 4) por triplicado.
 - c) Se sembraron 50 μ L de cada muestra (M) por triplicado.
 - d) Se agregaron 100 μ L de solución de revelado en cada pocillo.

e) La placa fue ingresada al lector de placa y se incubó a 30°C durante 30 minutos.

El volumen final en cada pocillo de la placa es de 150 mL.

Tabla 8: Esquema del cargado de la placa de 96 pocillos para medición de la actividad de CES. B=Buffer; T=Testigo (curva de calibración); M=Muestra (0; 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 µM).

B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	T0	T0	T0	M 0	M 0	M 0	M 0	M 0	M 0	B	B
B	T1	T1	T1	M 0,01	M 0,01	M 0,01	M 0,01	M 0,01	M 0,01	B	B
B	T2	T2	T2	M 0,1	M 0,1	M 0,1	M 0,1	M 0,1	M 0,1	B	B
B	T3	T3	T3	M 1	M 1	M 1	M 1	M 1	M 1	B	B
B	T4	T4	T4	M 10	M 10	M 10	M 10	M 10	M 10	B	B
B	B	B	B	M 100	M 100	M 100	M 100	M 100	M 100	B	B
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

5) Medición de la absorbancia:

- Preparación del colorante: En un tubo falcon de 15 mL se agregó 0,01 g de Fast Garnet y se completó con agua destilada hasta alcanzar 12,5 mL.
- Se retiró la placa del lector y se agregaron 100 µL del colorante, se esperó 5 minutos para que se establezca la lectura.
- Se ingresó nuevamente la placa al lector y se midió la absorbancia a 550 nm.

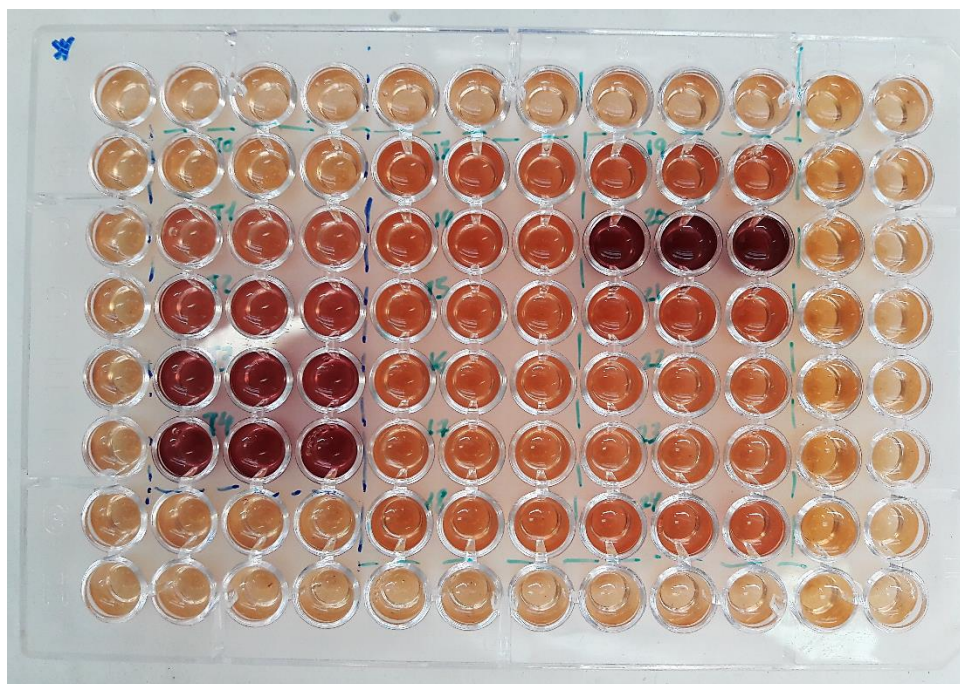


Figura 5: Imagen de la reacción del α -naftol con el colorante Fast Garnet.

6.5. Geles no desnaturalizantes de poliacrilamida

Se analizó la actividad de la enzima CES mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Se utilizó el equipo de electroforesis BioRad®.

Procedimiento

- 1) Preparación de los geles: Los geles de poliacrilamida fueron preparados en tubos falcon de 15 mL con los reactivos que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Reactivos y cantidades necesarias para la preparación de los geles Stacking y Separating.

Reactivos	Gel Stacking 4%	Gel Separating 7%
Agua destilada	3 mL	5 mL
Tris HCl	0,5 M; pH 6,8; 1,25 mL	1.5 M, pH 8.8; 2,5 mL
Acilamida	0,65 mL	2,3 mL
Persulfato de amonio	100 µL	200 µL
TEMED (tetrametil etilen diamina)	5 µL	5 µL

En el molde de vidrio de 1 mm se coloca el gel separating y se deja solidificar, luego se coloca el gel stacking y el peine de pocillos.

- 2) Preparación de las muestras: En microtubos eppendorf de 1,5 mL se colocó un volumen de muestra correspondiente a 0,05 mg de proteínas (calculado previamente) + un volumen necesario de loading buffer (SB 6x).
- 3) Siembra: Se sembraron 50 µL de muestra en doble corrida. En primer lugar se sembraron 25 µL de muestra en cada pocillo y se corrió el gel durante 7 minutos a corriente constante de 75 mA, 210 V. Se detuvo la corriente y se sembraron los 25 µL restantes, luego se reanudó la corrida manteniéndola 45 minutos en las mismas condiciones.
- 4) Visualización de las bandas: El gel se sumergió en solución de revelado durante 1 hora 30 minutos. La solución de revelado se preparó como indica la Tabla 10.

Tabla 10: Reactivos y cantidades necesarias para la preparación de la solución de revelado.

Reactivo	Cantidad
Buffer fosfato de sodio 0.05 M, pH 6.5	100 mL (68,5 mL de solución A: monobásico + 31,5 mL de solución B: dibásico)
Alfa naftil acetato 60 mM	1,6 mL
Beta naftil acetato 60 mM	1,6 mL
Fast Garnet	1,1 mL

6.6. Determinación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas de cada una de las muestras utilizando el método Bradford (1976), empleándose como testigo albúmina sérica bovina 1 mg/mL.

6.7. Estudio de expresión de transcritos de CES

Se analizó la expresión basal de CES 1, 2 y 3 en placentas, mediante la técnica de retro transcripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se estudiaron cambios en el nivel de transcritos de CES 1, 2 y 3 en los explantos expuestos a CP y a LB respecto de la condición basal.

6.7.1. Técnica de RT-PCR. Procedimiento

- 1) Extracción de ARN: Se extrajo el ARN total de los explantos de placenta, incubados durante 48 horas a distintas concentraciones de CP y LB, con el reactivo TRIzol reagent®.
- 2) Obtención de ADNc: Se retro-transcribió 1 µg de ARN en un volumen final de 20 µL. Se utilizaron 3 µL del cebador Oligo-DT y se llevó al bloque de 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 (Thermofisher 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.

3) Determinación de CES 1, 2 y 3 mediante PCR: El ADNc obtenido fue sometido a amplificación con la técnica PCR usando los primers descritos en la Tabla 11. El equipo utilizado fue el termociclador.

Las condiciones de amplificación para los transcritos específicos CES1, CES2 y CES3 fueron: 1 ciclo a 95°C por 3 min, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, 1 ciclo a 72°C por 10 min y 1 ciclo a 4°C por 10 min.

El protocolo de amplificación para ciclofilina incluyó: 1 ciclo a 95°C por 2 min, 32 ciclos a 95°C por 40 segundos, 58°C por 40 seg, 72°C por 40 seg, 1 ciclo a 72°C por 5 min y 1 ciclo a 4°C por 10 min.

Tabla 11: *Primers utilizados en la técnica PCR.*

Primer	Secuencia (Foward y Reverse)	Peso (pdb)
CES1	F: 5-AGAGGAGCTCTTGGAGACGACAT-3 R: 5-ACTCCTGCTTGTTAATTCCGACC-3	191
CES2	F: 5-AACCTGTCTGCCTGTGACCAAGT-3 R: 5-ACATCAGCAGCGTTAACATTTTCTG-3	316
CES3	F: 5-CTGGTCCTTAGCAAGAAGCTGAAA-3 R: 5-CATTTGGCTTGTGCGTCCGAGTT-3	317
Control interno: Ciclofilina	F: 5-GTCAACCCCACCGTCTTCTT-3 R: 5-CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT-3	97

6.7.2. Electroforesis en gel de agarosa 2%.

Los productos de la PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% con tinción con el colorante Gel Red.

Se sembraron 10 µL de muestra + 3 µL de loading buffer en cada pocillo del gel. La corrida se efectuó durante 60 minutos a una tensión constante de 90 V. A posteriori se realizó un análisis de imágenes por transiluminador UV.

Las intensidades relativas de las bandas CES1 y CES2 se estimaron mediante análisis de densitometría utilizando el programa Gel Pro Analyzer 3.2.

6.8. Análisis estadístico

Para el estudio de la actividad de CES, los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA seguido del test de Dunnett como prueba a posteriori, utilizando el programa Graphpad Prism 5.

7. RESULTADOS

7.1. Actividad de la CES

Se estudió si la exposición *in vitro* al OF CP y a su formulado comercial LB modula la actividad de la enzima CES.

La actividad de esta enzima se determinó espectrofotométricamente en explantos de placenta expuestos a CP y LB durante 24 y 48 horas, a concentraciones 0 (DMSO); 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μM .

7.1.1. Incubación con CP

La incubación de las muestras con CP por 24 y 48 horas no produjo diferencias significativas en la actividad de CES, a todas las concentraciones ensayadas del plaguicida, tal como se muestra en las Figuras 6 y 7.

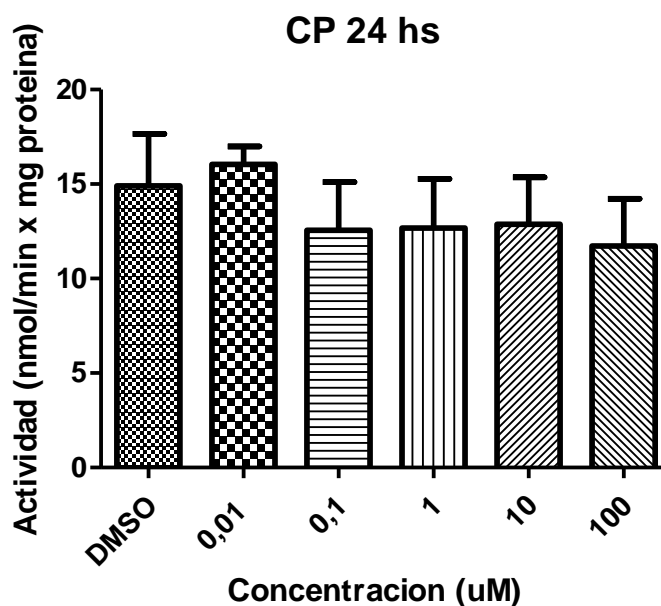


Figura 6: Actividad de CES en explantos de placentas incubados durante 24 hs con distintas concentraciones de clorpirifos. Los resultados se expresan en nmoles/min x mg de proteína ($n=6$), media \pm ES (error estándar). ANOVA test de Dunnett p NS.

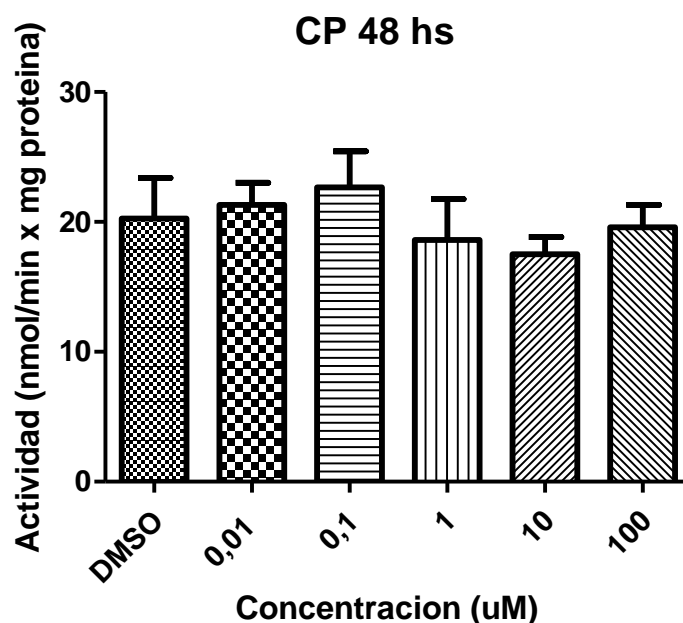


Figura 7: Actividad de CES en explantos de placentas incubados durante 48 hs con distintas concentraciones de clorpirifos. Los resultados se expresan en nmoles/min x mg de proteína ($n=6$), media \pm ES (error estándar). ANOVA test de Dunnett p NS.

7.1.2. Incubación con Lorsban®

Como se observa en la Figura 8, la incubación de los explantos con LB por 24 horas muestra una inhibición de la actividad de la enzima CES con respecto al control, siendo las muestras incubadas con las concentraciones 1, 10 y 100 μ M las de significancia estadística. La inhibición de CES a 1 μ M fue del 43,44%; a 10 μ M la inhibición fue del 47,12%; por último, a 100 μ M la inhibición fue del 50,53%.

Por otro lado, la incubación durante 48 horas no produjo diferencia significativa en las actividades de CES, en todas las muestras tratadas con el plaguicida, tal como se observa en la Figura 9.

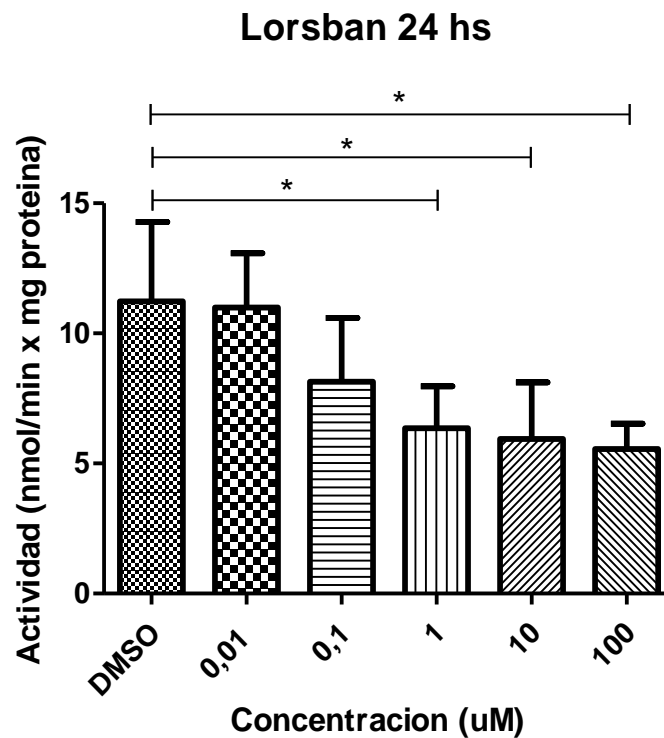


Figura 8: Actividad de CES en explantos de placentas incubados durante 24 hs con distintas concentraciones de Lorsban®. Los resultados se expresan en nmoles/min x mg de proteína (n=6), media \pm ES (error estándar). ANOVA test de Dunnett * $p < 0,05$.

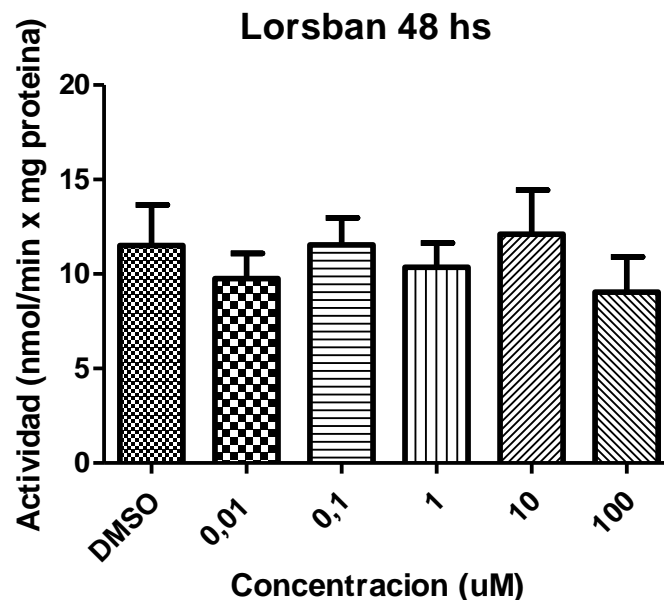


Figura 9: Actividad de CES en explantos de placentas incubados durante 48 hs con distintas concentraciones de Lorsban®. Los resultados se expresan en nmoles/min x mg de proteína (n=6), media \pm ES (error estándar). ANOVA test de Dunnett p NS.

7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se analizó la actividad enzimática de CES en explantos de placenta expuestos a CP y LB por 24 y 48 horas mediante electroforesis en geles no desnaturizantes de poliacrilamida. Se utilizaron reactivos específicos de CES, y el colorante Fast Garnet para revelar la actividad de la enzima mediante el teñido de las bandas donde se observa actividad enzimática.

7.2.1. Incubación con CP

Como se observa en la Figura 10, las bandas correspondientes a la actividad de CES son más intensas en el control y a CP 0,01 μM que en las muestras correspondientes a 0,1; 1; 10 y 100 μM . Se observa que la intensidad de las bandas decrece a medida que las concentraciones de CP son mayores, lo que indica una inhibición de actividad de CES a mayores concentraciones del plaguicida.

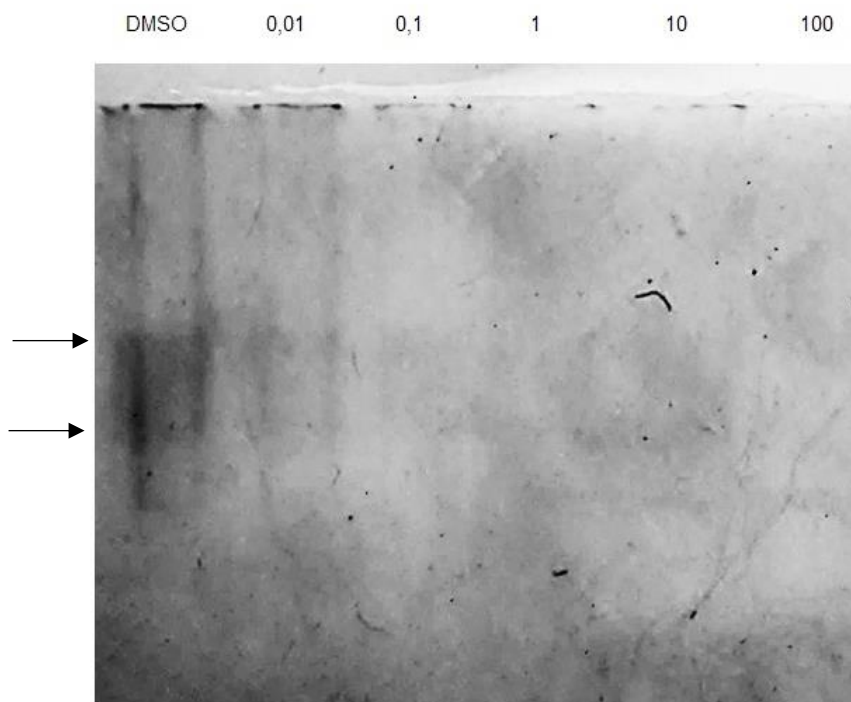


Figura 10: Actividad de la enzima CES en explantos de placenta expuestos al plaguicida CP durante 24 hs.

A las 48 horas de incubación con CP, no se observan bandas en el gel. Asimismo no se aprecian cambios en la actividad de CES con respecto al control. No se aprecia diferencia de actividad enzimática entre las muestras.

7.2.2. Incubación con Lorsban®

A 24 horas de exposición con LB, pudo observarse una banda correspondiente a la actividad de CES solo en el control (Figura 11). Lo cual indica que a todas las concentraciones ensayadas no se encuentra actividad enzimática, por lo que no aparece la banda en el gel. Se observa diferencia entre el control, donde se aprecia actividad de la enzima, y las correspondientes a 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M, donde no se aprecia dicha actividad.

En contraste, a las 48 horas de incubación con LB, el gel no presenta bandas correspondientes a actividad de CES. Asimismo, no se apreciaron cambios con respecto al control, lo cual indica similar actividad de las CES.

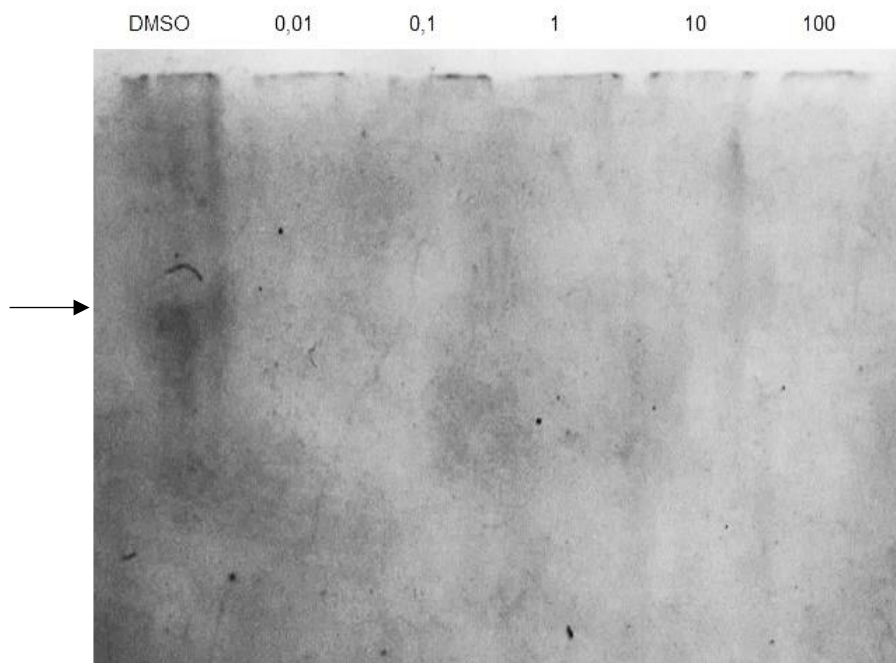


Figura 11: Actividad de la enzima CES en explantos de placenta expuestos al plaguicida Lorsban® durante 24 hs.

7.3. Estudio de la expresión de transcritos de CES

Se conoce que la placenta expresa 3 isoformas de CES: 1, 2 y 3. Su expresión puede depender de distintos factores, incluyendo los ambientales.

Se analizó la expresión basal de CES 1, 2 y 3 en explantos de placentas mediante la técnica RT-PCR convencional utilizando primers específicos. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Las intensidades relativas de las bandas de CES 1 y 2 se estimaron mediante un análisis de densitometría con el programa Gel Pro Analyzer 3.2.

Este análisis se realizó sobre explantos incubados durante 48 horas a distintas concentraciones de CP y LB.

7.3.1. Incubación con CP

Como demuestran las Figuras 12 y 13, la isoforma CES1 se expresó a todas las concentraciones utilizadas de CP. Se observa un aumento en la intensidad de la banda en la condición CP 100 μ M respecto del DMSO, correspondiente a un 95%.

La isoforma CES2 se expresó a 0,1; 1 y 10 μ M, mientras que no se observó banda a 0,01 y 100 μ M, probablemente debido a una falla en la amplificación. No se observaron cambios significativos entre las muestras incubadas con el plaguicida respecto del control DMSO (Figuras 14 y 15).

No se encontró expresión de CES3 en ninguna de las condiciones estudiadas con los primers utilizados.

7.3.2. Incubación con Lorsban®

Como demuestran las Figuras 12 y 13, la isoforma CES1 se expresó en las condiciones DMSO; 0,01; 10 y 100 μ M, observándose un incremento en la intensidad de la banda en las concentraciones 10 y 100 μ M, correspondientes a un 66,88% y 63,63% respectivamente. Asimismo, se observó que LB podría estar modulando la expresión a bajas concentraciones, ya que también se observó una disminución en la expresión de 28,78% a 0,01 μ M; 96,76% a 0,1 μ M; y 97,52% a 1 μ M.

Por otra parte la isoforma CES2 se expresó a todas las concentraciones utilizadas con el formulado comercial, no mostrando diferencias en la intensidad de la banda en ninguna de las condiciones estudiadas (Figuras 14 y 15).

No se encontró expresión de CES3, en ninguna de las condiciones estudiadas con los primers utilizados.

8. DISCUSIÓN

Estudios recientes realizados en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Bulgaroni et al., 2013; Rivero-Osimani, 2016) demuestran que embarazadas que residen en zonas rurales de esta región se encuentran expuestas a plaguicidas de uso agropecuario. En el LIBIQUIMA se ha demostrado que la exposición ambiental a plaguicidas de mujeres embarazadas impacta en la placenta (Bulgaroni et al., 2013; Rivero-Osimani, 2016) y en los trofoblastos (Guiñazú et al., 2012; Espinoza et al., 2016).

El desarrollo fetal y de la placenta involucra un intrincado balance de nutrientes, factores de crecimiento y vías de señalización que participan en momentos precisos de la gestación. Por lo tanto la placenta juega un papel central en estos procesos, y por esa razón, su buen funcionamiento y su madurez son importantes para el normal desarrollo del feto (Levario-Carrillo et al., 2010). Es claro que la placenta no es simplemente un participante pasivo en el embarazo, sino que se adapta al ambiente materno cambiando tanto su estructura como su función y asume un rol activo en la programación fetal desarrollada en el útero (Myatt, 2006). La placenta tampoco es un órgano pasivo frente a la llegada de los tóxicos a los cuales puede estar expuesta la madre, y si bien posee una capacidad metabólica más restringida que el hígado, expresa un número de enzimas relevantes para el metabolismo de sustancias tóxicas, ya que cumple con funciones del metabolismo de endobióticos y de xenobióticos. En este sentido, los cambios químicos que sufra la estructura del compuesto parental que llegó a la placenta va a determinar si el mismo se detoxifica, no cambia su toxicidad o si se bioactiva (Pelkonen, Vähäkangas & Gupta, 2006; Murayama et al., 2017).

La familia de enzimas citocromo P450 (CYPs) y las esterasas cumplen con un reconocido rol en el metabolismo de xenobióticos. La esterasas hidrolizan compuestos que contienen uniones éster, amida y tioéster y causan la activación de prodrogas o su detoxificación (Mangas et al., 2017). Las carboxilesterasas (CES) se expresan principalmente en tejidos que mantienen una función de barrera y que probablemente están expuestos a xenobióticos. Se ha postulado que su función principal es proteger las células de compuestos exógenos que contienen grupos éster (Hatfield et al., 2016). Las CES están ampliamente reconocidas por su acción hidrolítica frente a drogas y plaguicidas.

Hasta el momento no se había abordado el efecto del OF CP y su formulado comercial Lorsban® en explantos de placenta, una matriz más compleja que las líneas celulares trofoblásticas debido a que derivan de placentas a término, por lo tanto representarían un escenario más cercano al que ocurre en la exposición *in vivo* de las mujeres.

En el presente trabajo de Tesis se estudió en explantos de placentas a término, provenientes de mujeres sanas y sin exposición a plaguicidas, el efecto del OF CP y su formulado comercial Lorsban® sobre la actividad de CES (técnicas bioquímicas y geles de poliacrilamida) y la expresión de los transcritos de CES, CES1 y CES2 (por RT-PCR).

En el modelo experimental propuesto, se observó que la actividad de CES se afectó significativamente en explantos de placenta a término de mujeres residentes en zona urbana, principalmente con el formulado comercial. Los resultados muestran que la exposición de las muestras a CP, principio activo de 99% de pureza, no produce un cambio significativo en la actividad de CES con respecto al control, tanto a 24 horas como a 48 horas. Por otro lado, al analizar la exposición de los explantos al formulado comercial LB, en mismas condiciones de tiempo y concentración, la actividad de CES fue inhibida significativamente. El resultado obtenido mediante los geles no desnaturizantes de poliacrilamida, permitieron observar que LB inhibe prácticamente a todas las concentraciones ensayadas la actividad de CES (doble banda que se observa en el control y pierde intensidad con los tratamientos con LB). Llamativamente, el gel no desnaturizante de CP mostró también una disminución de la actividad a 24 hs, sin embargo en la técnica bioquímica no se habían observado cambios significativos. Estos resultados indicarían que se debe aumentar el número de muestras procesadas por la técnica bioquímica, ya que se muestran las medias de 3-5 placentas distintas mientras que el gel fue realizado con una sola muestra, por lo que no interfiere la variación interindividual de las personas lo que si ocurre en el gráfico de actividad. A las 48 hs, se observa muy poca actividad determinable por esta técnica en las muestras analizadas tanto para controles como tratados con CP y LB.

Los OFs, como CP, contienen una molécula de azufre ligado al fósforo mediante un doble enlace, en esta clase de OFs ocurre un importante paso de bioactivación metabólica, a través de una reacción denominada desulfuración

oxidativa donde se intercambia el azufre por un oxígeno. Esta reacción es mediada por la familia citocromo P450 (CYP), compuesta por distintas isoformas que oxidan una amplia variedad de xenobióticos, y se obtiene el análogo oxigenado u oxón el cual es el responsable de inhibir B-esterasas como AChE y CES (Colović et al., 2013). El oxón reacciona con un grupo hidroxilo de un residuo serina dentro del sitio activo de la enzima, fosforilando este grupo hidroxilo. Los oxones se unen irreversiblemente a enzimas blanco tales como CES y colinesterasas, inhibiéndolas, lo que permite utilizar los niveles de inhibición enzimática para evaluar la exposición a estos tóxicos (Magnarelli, 2015). Este proceso inactiva la enzima y bloquea la degradación del neurotransmisor acetilcolina (Lascano & Anguiano, 2011). Es reconocido que la neurotoxicidad de los OFs es un resultado de la inhibición de la AChE por los metabolitos oxones de estos compuestos, dicha inhibición produce la acumulación del neurotransmisor acetilcolina y lo que genera una hiper estimulación nerviosa.

Las consecuencias de la inactivación de CES no se encuentran tan estudiadas. Un trabajo recientemente publicado indica que el silenciamiento de CES1 en líneas celulares de macrófagos THP-1, redujo el consumo de colesterol, así como reguló la expresión de la enzima CYP27A1, relacionada al metabolismo del colesterol. Estos autores también observaron que la inhibición farmacológica de CES1, también disminuía la expresión de CYP27A1. Este trabajo indica que la inhibición de CES1 puede alterar el metabolismo del colesterol (Mangum et al., 2018).

Recientemente Rivero-Osimani (2016) reportó la disminución de niveles de progesterona (PG) en placentas expuestas a plaguicidas, asociando la disrupción endócrina con la exposición a plaguicidas. La síntesis de hormonas esteroideas en el SCT (sincitiotrofoblastos), como la PG, comienza con la entrada de colesterol a la mitocondria del SCT. Esta hormona es crítica en el desarrollo del endometrio, favorece la implantación, promueve el crecimiento uterino y es esencial para el mantenimiento del embarazo. El paso determinante de la tasa de síntesis de progesterona placentaria es la conversión del colesterol en pregnenolona por el citocromo P450_{scc} (CYP11A1) en las mitocondrias del SCT (Tuckey, 2005).

Los inhibidores de CES1 poseen aplicaciones potenciales en el tratamiento de hipertrigliceridemia, obesidad y diabetes tipo 2, debido a su rol en el metabolismo de esteroides del colesterol. Mientras que la CES2 posee un rol prominente en la activación

de prodrogas, incluyendo a los agentes anticancerígenos como capecitabina y CPT-11. La importancia del rol de carboxilesterasas en el metabolismo endógeno y exógeno en el último tiempo ha cobrado gran relevancia en el desarrollo y descubrimiento de nuevos inhibidores farmacológicos para estas enzimas (Zou et al., 2017)

CES es considerada un bioindicador sensible de la exposición ambiental a OF en diversas especies. Se ha observado la disminución de CES en homogenados de placentas en muestras de residentes rurales colectadas en el Alto Valle de Río Negro en período de pulverizaciones. La disminución de CES en placenta no sólo indica la llegada y bioactivación del OF en este compartimiento, sino que resulta sugerente de un mayor riesgo de exposición fetal a otros xenobióticos. Se sabe que las CES cumplen un rol detoxificante de narcóticos, de algunas drogas prescritas a las embarazadas y de piretroides (Magnarelli, 2015).

La actividad enzimática puede ser modulada por distintos mecanismos, uno de ellos es la transcripción génica de ARN a proteína. En este trabajo de Tesis se analizó también que ocurría con los transcritos de las isoformas CES1, CES2 y CES3, en la exposición a CP y LB por 24 y 48 hs.

Se observó que tanto CP como LB modulan la transcripción de CES1 a altas concentraciones, indicando que estos compuestos además de inhibir farmacológicamente estas enzimas, son capaces de inducir su transcripción génica, al menos de CES1; probablemente como un mecanismo compensador celular frente a la disminución de la actividad de la enzima. Adicionalmente no se observaron cambios en la expresión de CES2 y no se encontró expresión de CES3.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis demuestran que la actividad y expresión de CES se ve afectada por el OF CP, principalmente por el formulado comercial LB.

En este sentido, el formulado comercial es lo que se aplica a campo y por lo tanto la población va a estar expuesta a la mezcla de sustancias presentes en el mismo (principio activo-clorpirifos, más los inertes presentes en la formula). Un formulado comercial puede contener, además del principio activo, aditivos. Dentro de los aditivos se encuentran, 1- materiales de carga: diluyentes, adsorbentes,

acondicionantes, productos de molienda, soportes granulados y agentes de fluencia; 2- agentes tensioactivos: mojantes, agentes de extensión o difusión, agentes de penetración, emulsionantes, dispersantes, agentes de mantenimiento en suspensión, antiespumantes, antiformadores de polvo, agentes de unión, adhesivos, tixotropos y desintegrantes; 3- aditivos diversos: disolventes, estabilizantes o inhibidores de la descomposición, inhibidores de la corrosión, acomplejantes, anticongelantes, antievaporantes, conservantes (hongos), agentes de seguridad (fitotoxicidad), colorantes, odorantes, atrayentes, enmascarantes.

Mesnager et al. (2014), analizaron la toxicidad de 9 plaguicidas y sus formulados comerciales en tres líneas celulares humanas (HepG2, HEK293 y JEG3). Estudiaron glifosato, isoproturón, fluroxipir, pirimicarb, imidacloprid, acetamiprid, tebuconazol, epoxiconazol y prochloraz, los cuales constituyen, respectivamente, los principios activos de 3 herbicidas principales, 3 insecticidas y 3 fungicidas. Los autores determinaron que 8 formulaciones de 9 fueron hasta mil veces más tóxicas que sus principios activos.

Lorsban® es uno de los formulados comerciales más utilizados en el Alto Valle, y dados los resultados puede deducirse que, en la población rural de mujeres embarazadas expuestas a este producto, las posibilidades de que este xenobiótico ingrese al organismo y llegue a la placenta son altas. Sumado a esto, las poblaciones rurales pueden estar co-expuestas a otros compuestos endógenos, xenobióticos y fármacos, tal es el caso de embarazadas medicadas (Zhang et al., 2014) o co-expuestas a carbamatos (Sogorb & Villanova, 2002), piretroides (Anand et al., 2006) y narcóticos (Redinbo, Bencharit & Potter, 2003). Por lo tanto, las consecuencias del impacto de la exposición ambiental a plaguicidas en la placenta en la salud de la población estudiada no sólo deben ser evaluadas a corto plazo sino también a mediano y largo plazo.

9. CONCLUSIONES FINALES

Del presente trabajo puede concluirse que:

- CP no produjo un cambio significativo en la actividad de CES con respecto al control, tanto a 24 horas como a 48 horas.
- La actividad de CES se afectó significativamente en explantos de placenta a término de mujeres residentes en zona urbana, principalmente con el formulado comercial.
- Con LB la actividad de CES fue inhibida significativamente a 1, 10 y 100 μM a 24 hs de exposición. A 48 hs no se produjo un cambio significativo con respecto al control en todas las concentraciones ensayadas.
- Mediante geles no desnaturizantes de poliacrilamida, se pudo observar que LB inhibe prácticamente a todas las concentraciones ensayadas la actividad de CES.
- El gel no desnaturizante de CP mostró una disminución de la actividad a 24 hs, sin embargo en la técnica bioquímica no se habían observado cambios significativos.
- En el gel no desnaturizante de LB fue detectable actividad enzimática a 24 hs solo en el control, correspondiente a DMSO.
- A 48 hs no se observa actividad de CES, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, tanto en controles como en tratamientos.
- CP y LB modulan la transcripción de CES1 a concentraciones altas, indicando que estos compuestos además de inhibir farmacológicamente estas enzimas, son capaces de inducir su transcripción génica.
- Al analizar la expresión de CES2, no se encontraron cambios en la misma.
- No se encontró expresión del transcripto CES3.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Anand S.S.; Kim K.B.; Padilla S.; Muralidhara S.; Kim H.J.; Fisher J.W. & Bruckner J.V. (2006). Ontogeny of hepatic and plasma metabolism of deltamethrin in vitro: role in age-dependent acute neurotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals*, 34(3): 389-397.
- Andersen H.; Schmidt I.; Grandjean P; Jensen T.; Budtz-Jorgensen E.; Kjaerstad M.; Baelun J.; Nielsen J.; Skakkebaek N. & Main K. (2008). Impaired reproductive development in sons of women occupationally exposed to pesticides during pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, 116(4): 566-572.
- Anguiano O. (2011). Cap. 2: Clasificación de plaguicidas. En Anguiano O.L. & Montagna M.C., Clasificación y toxicología de plaguicidas (1ª ed., pp. 63-172). Neuquén: Educo-Universidad Nacional del Comahue.
- Anguiano O.L; Ferrari A.; Lascano C.I.; Copes W.; Soleño J.; Pechen De D'angelo A.M. & Montagna M.C. (2015). Conociendo los efectos adversos de los plaguicidas podremos cuidar nuestra salud y el ambiente (2ª ed.). Neuquén: el autor.
- Arbuckle T.; Lin Z. & Mery S. (2001). A exploratory analysis of pesticide exposure on de risk of spontaneous abortion in a Ontario farm population. *Environmental Health Perspectives*, 109(8): 851-857.
- Becker W.; Kentrup H.; Klumpp S.; Schultz J.E. & Joost H.G. (1994). Molecular cloning of a protein serine/threonine phosphatase containing a putative regulatory tetratricopeptide repeat domain. *Journal of Biological Chemistry*, 269(36): 86-92.
- Beltramino D.; Bossio J.C.; Callaghan S.; Corra L.; Gonzales C.; Lenardón A.; Longereich L. & Monti V. (2008). La salud ambiental de la niñez en la Argentina: evaluación de la exposición a plaguicidas organofosforados en niños de colonos tabacaleros. Sociedad Argentina de Pediatría (SAP), Universidad Nacional de Misiones, Memorial University of New foundland Canadian Institute of Child Health (CICH), Asociación Argentina de Médicos por el Medio Ambiente (AAMMA), Universidad Nacional del Litoral, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni”. 1-20.
- Benirschke K.; Kaufmann P. & Baergen R. (2006). Pathology of the human placenta (5ª ed.). New York: Springer.

- Bradford M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254.
- Bulgaroni V. (2008). Evaluación de la exposición residencial a plaguicidas en población infantil y prevención en salud ambiental. Tesis de grado, Universidad Nacional del Comahue.
- Bulgaroni V.; Lombardo P.; Rivero-Osimani V.; Vera B.; Dulgerian L.; Cerbán F.; Rivero V.; Magnarelli G. & Guiñazú N. (2013). Environmental pesticide exposure modulates cytokines, arginase and ornithine decarboxylase expression in human placenta. *Reproductive Toxicology*, 39: 23-32.
- Bulgaroni V.; Rovedatti M.G. & Magnarelli G. (2009). Acetilcolinesterasa y carboxilesterasa de saliva en el monitoreo de la exposición residencial infantil a organofosforados. Paper presentado en el I Congreso Internacional de la Infancia y de la Adolescencia .XVI Congreso Argentino De Toxicología, Puerto Madryn.
- Bulgaroni V.; Rovedatti M.G.; Sabino G. & Magnarelli G. (2012). Organophosphate pesticide environmental exposure: analysis of salivary cholinesterase and carboxilesterase activities in preschool children and their mothers. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(5): 7-14.
- Casida J. & Quistad G. (2005). Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chemico-Biological Interactions*, 157-158: 277-283.
- Cecchi A.; Rovedatti M.G.; Sabino G. & Magnarelli G. (2012). Environmental exposure to organophosphate pesticides: Assessment of endocrine disruption and hepatotoxicity in pregnant women. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 280-287.
- Colmenero Salas L.L.C.M.; Torres Reyes A.; González Horta C. & Sánchez Ramírez B. (2009). Expression of muscarinic cholinergic receptors in human term placenta. *Ginecología y Obstetricia de México*, 77: 323-328
- Colobig M.S. (2016). Exposición a plaguicidas organofosforados: modulación de la expresión de receptores muscarínicos. Tesis de grado, Universidad Nacional del Comahue.
- Colović M.B.; Krstić D.Z.; Lazarević-Pašti T.D.; Bondžić A.M. & Vasić V.M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335.
- Costa L.G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366(1-2): 1-13.

- Cui Y.; Guo J.; Xu B. & Chen Z. (2011). Genotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin to ICR mouse hepatocytes. [Research Support, Non-U S Govt]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 21(1): 70-74.
- Diczfalusy M.A.; Björkhem I.; Einarsson C.; Hillebrant C.G. & Alexson S.E. (2001). Characterization of enzymes involved in formation of ethyl esters of long-chain fatty acids in humans. *Journal of Lipid*, 42(7): 1025-1032.
- Eaton D.L.; Daroff R.B.; Autrup H.; Bridges J.; Buffler P.; Costa L.G.; Coyle J.; McKhann G.; Mobley W.C.; Nadel L.; Neubert D.; Schulte-Hermann R. & Spencer P.S. (2008). Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology*. 38(2): 1–125.
- EPA (2009). Recuperado el 2 de febrero de 2018 de <https://www3.epa.gov/>
- Eskenazi B.; Barr D.; Bradman A.; Furlong C.E.; Harley K.; Holland N.T.; Jewell N.P. & Weltzien E. (2004). Association of in utero organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of in agricultural population. *Environmental Health Perspectives*, 10: 1116-1124.
- 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.
- FAO (2003). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Roma.
- Fernández M.F.; Molina-Molina J.M.; Lopez-Espinosa M.J.; Freire C.; Campoy C.; Ibarluzea J.; Torne P.; Pedraza V. & Olea N. (2007). Biomonitoring of environmental estrogens in human tissues. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(3-4): 429-432.
- Figa-Talamanca, L (2006). Occupational risk factors and reproductive health of women. [Review]. *Occupational Medicine*, 56(8): 521-531.
- Ghosh S. (2000). Cholesteryl ester hydrolase in human monocyte/macrophage: cloning, sequencing, and expression of full-length cDNA. *Physiological Genomics*, 2(1):1-8.
- Gómez D.S. (2015). Efecto de los plaguicidas organofosforados clorpirifos y metilazinfos en la inducción de estrés oxidativo en trofoblastos. Tesis de grado, Universidad Nacional del Comahue.

- Gotho M.; Saito I.; Huang J.; Fukaya Y.; Matsumoto T.; Hisanaga N.; Shibata E.; Ichihara G.; Kamijima M. & Takeuchi Y. (2001). Changes in Cholinesterase Activity, Nerve Conduction Velocity, and Clinical Signs and Symptoms in Termite Control Operators Exposed to Chlorpyrifos. *Journal of Occupational Health*, 43(3): 157-164.
- Guiñazú N.; Rena V.; Genti-Raimondi S.; Rivero V. & Magnarelli G. (2012). Effects of the organophosphate insecticides phosmet and chlorpyrifos on trophoblasts JEG-3 cell death, proliferation and inflammatory molecule production. *Toxicology in Vitro*, 26(3): 406-413.
- Gupta S.C.; Mishra Sharma A.; Deepak Balaji T.G.R.; Kumar R.; Mishra R.K. & Chowdhuri D.K. (2010). Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(6): 1415-1423.
- Hakkola J.; Raunio H.; Purkunen R.; Pelkonen O.; Saarikoski S.; Cresteil T. & Pasanen M. (1996b). Direction of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy. *Biochemical Pharmacology*, 52(2): 379-383.
- Hakkola J.M.; Pasanen J.; Hukkanen O.; Pelkonen J.; Maenpaa R.J.; Edwards A.R.; Boobis & Raunio H. (1996a). Expression of xenobiotic metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta. *Biochemical Pharmacology*, 51(4): 403-411.
- Hatfield M.J.; Umans R.A.; Hyatt J.L.; Edwards C.C.; Wierdl M.; Tsurkan L.; Taylor M.R. & Potter P.M. (2016). Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 259(Pt B): 327-331.
- Holmes R.S.; Wright M.W.; Laulederkind S.J.; Cox L.A.; Hosokawa M.; Imai T.; Ishibashi S.; Lehner R.; Miyazaki M.; Perkins E.J.; Potter P.M.; Redinbo M.R.; Robert J.; Satoh T.; Yamashita T.; Yan B.; Yokoi T.; Zechner R. & Maltais L.J. (2010). Recommended nomenclature for five mammalian carboxylesterase gene families: human, mouse, and rat genes and proteins. *Mammalian Genome*, 21(9-10): 427-441.
- Hosokawa M.; Furihata T.; Yaginuma Y.; Yamamoto N.; Watanabe N.; Tsukada E.; Ohhata Y.; Kobayashi K.; Satoh T. & Chiba K. (2008). Structural organization and characterization of the regulatory element of the human carboxylesterase (CES1A1 and CES1A2) genes. *Drug Metabolism of Pharmacokinetics*, 23(1): 73-84.
- Ietta F.; Bechi N.; Romagnoli R.; Bhattacharjee J.; Realacci M.; Di Vito M.; Ferreti C & Paulesu L. (2010). 17 β -Estradiol modulates the macrophage migration inhibitory factor

- secretory pathway by regulating ABCA1 expression in human first-trimester placenta. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(3): 411-418.
- Imai T. & Ohura K. (2010). The role of intestinal carboxylesterase in the oral absorption of prodrugs. *Current Drug Metabolism*, 11(9): 793-805.
- Imai T. (2006). Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug Metabolism of Pharmacokinetics*, 21: 173–185.
- Jancova P.; Anzenbacher P. & Anzenbacherova E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 154(2): 103-116
- Kleffmann & Partner SRL. (2012). Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios. Recuperado 28 de enero de 2018 de <http://www.casafe.org/publicaciones/estadisticas/>
- Konstantinou I.K.; Hela D.G. & Albanis T.A. (2006). The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental pollution*, 141(3): 285-296.
- Langman J.; Sadler T.; Carreras i Goicoechea E. & Vigo Anglada M. (2009). Embriología médica (11ª ed.). España: Wolters Kluwer Health España, S.A.
- Lascano C.I. & Anguiano O.L. (2011). Cap. 3: Modo de acción de los plaguicidas. En Anguiano O.L. & Montagna M.C., Clasificación y toxicología de plaguicidas (1ª ed., pp. 187-233). Neuquén: Educo- Universidad Nacional del Comahue.
- Levario-Carrillo M.; Acosta-Maldonado B.; Reza-Lopez S. & Sánchez-Ramírez B. (2010). Effects of exposure to pesticides during pregnancy on placental maturity and weight of newborns: a cross-sectional pilot study in women from the Chihuahua State, Mexico. *Human and Experimental Toxicology*, 28(8): 451-459.
- Levario-Carrillo M.; Amato D.; Pstrosky-Wegman P.; Gonzales-Horta C.; Corona Y. & Sanin L. (2004). Relation between pesticide exposure and intruterine growth retardation. *Chemosphere*, 55(10): 1421-1427.
- Loewy R.M. (2000). Plaguicidas en aguas subterráneas del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Tesis de Maestría, Universidad Nacional del Comahue.
- Loewy R.M.; Kirs V.E.; Monza L.B. & Savini M.C. (2011). Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *Journal of environmental science and health*, 46: 662-670.

- Lombardo P. (2011). Exposición ambiental a plaguicidas organofosforados: Impacto sobre la actividad de arginasa y ornitina decarboxilasa en placenta humana. Tesis de grado, Universidad Nacional del Comahue.
- López Geta J.A.; Martínez Navarrete C.; Moreno Merino L. & Navarrete Martínez P. (1992). Las aguas subterráneas y los plaguicidas.
- Lopez-Espinosa M.J.; Granada A.; Carreno J.; Salvatierra M.; Olea-Serrano F. & Olea N. (2007). Organochlorine Pesticides in Placentas from Southern Spain and Some Related Factors. *Placenta*, 28(7): 631-638.
- Lorsban® 75WG | Argentina | Dow AgroSciences. Dowagro.com. Recuperado el 11 de diciembre de 2017 de <http://www.dowagro.com/es-ar/argentina/proteccion-de-cultivos/insecticidas/lorsban-75wg>
- Lu J.; Wu L.; Newman J.; Faber B. & Gan J. (2006). Degradation of Pesticides in Nursery Recycling Pond Waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7): 2658-2663.
- Magnarelli G. (2015). Exposición ambiental a plaguicidas: biomarcadores en matrices de la triada madre-placenta-feto. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 49(1): 39-53.
- Magnarelli G.; Rovedatti M.G. & Pechén de D'Angelo A.M. (2011). Cap. 6: Plaguicidas y salud humana. En Anguiano O.L. & Montagna M.C., Clasificación y toxicología de plaguicidas (1ª ed., pp. 309-340). Neuquén: Educo- Universidad Nacional del Comahue.
- Mangas I.; Estevez J.; Vilanova E. & França T.C. (2017). New insights on molecular interactions of organophosphorus pesticides with esterases. *Toxicology*, 376: 30-43.
- Mangum L.C.; Hou X.; Borazjani A.; Lee J.H.; Ross M.K. & Crow J.A. (2018). Silencing Carboxylesterase 1 in Human THP-1 Macrophages Perturbs Genes Regulated by PPAR γ /RXR and RAR/RXR: Downregulation of CYP27A1-LXR α Signaling. *Biochemical Journal*, 475(3): 621-642.
- Marutani M. & Edirveerasingam V. (2006). Influence of irrigation methods and an adjuvant on the persistence of carbaryl on pakchoi. *Journal of Environmental Quality*, 35(6): 1994–1998.
- Matsumura F. (1984). Differential Toxicities of Insecticides and Halogenated Aromatics (1ª ed.). New York: Pergamon Press.

- Mesnager 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 Research International*. 1-8.
- Mesnager R.; Bernay B. & Seralini G.E. (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, 313(2-3): 122–128.
- Miller R.; Genbacev O.; Turner M.; Aplin J.; Caniggia I. & Huppertz, B. (2005). Human placental explants in culture: Approaches and assessments. *Placenta*, 26(6): 439-448.
- Montoro Y.; Gomero L.; Moreno R. & Reyes M. (2009). Características de uso de plaguicidas químicos y riesgos para la salud en agricultores de la sierra Central de Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(4): 466-472.
- Morgan E.W.; Yan B.F.; Greenway D. & Parkinson A. (1994). Regulation of two rat-liver microsomal carboxylesterase isozymes - species-differences, tissue distribution, and the effects of age, sex, and xenobiotic treatment of rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(2): 513-526.
- Murayama N.; Kazuki Y.; Satoh D.; Arata K.; Harada T.; Shibata N.; Guengerich F.P. & Yamazaki H. (2017). Induction of Human Cytochrome P450 3A Enzymes in Cultured Placental Cells by Thalidomide and Relevance to Bioactivation and Toxicity. *Journal of Toxicological Science*., 42(3): 343–348.
- Myatt L. (2006). Placental adaptative responses and fetal programming. *Journal of Physiology*, 572(1): 25-80.
- Ojha A.; Yaduvanshi S.K. & Srivastava N. (2011). Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(2): 148-156.
- Pathak R.; Mustafia M.D.; Ahmed R.; Tripathi A.; Guleria K. & Banerjee B.D. (2010). Association between recurrent Miscarriages and Organochlorine Pesticide Levels. *Clinical Biochemistry*, 43(1-2): 131-135.
- Pavek P. & Smutny T. (2014) Nuclear receptors in regulation of biotransformation enzymes and drug transporters in the placental barrier. *Drug Metabolism Reviews*, 46(1): 19-32.
- Pelkonen O.; Vähäkangas K. & Gupta R. (2006). Placental toxicity of organophosphate and carbamate pesticides. *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*, 463-479.

- Prouillac C. & Lecoeur S. (2010). The Role of the Placenta in Fetal Exposure to Xenobiotics: Importance of Membrane Transporters and Human Models for Transfer Studies. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(10): 1623-1635.
- Quagliano J. (2009). El ciclo de vida de los plaguicidas organofosforados en los Agronegocios para la producción sustentable en la Argentina. Recuperado el 7 de enero de 2018 de <http://ciencianet.com.ar/index.php/2009/07/03/el-ciclo-de-vida-de-los-plaguicidas-organofosforados-en-los-agronegocios-para-la-produccion-sustentable-en-la-argentina/>
- Quintana M.M.; Vera B.; Magnarelli G.; Guiñazú N. & Rovedatti M.G. (2017). Neonatal, placental, and umbilical cord blood parameters in pregnant women residing in areas with intensive pesticide application. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 20736-20746.
- Rama Sastry B.V. (1997). Human Placental Cholinergic System. *Biochemical Pharmacology*, 53: 1577-1586.
- Rama Sastry B.V. (1999). Techniques to study human placental transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 38: 17-39.
- Ramírez J.A. & Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Instituto Nacional de Salud Pública. *Archivos De Prevención De Riesgos Laborales*, 4(2): 67-75.
- Redinbo M.R. & Potter P.M. (2005). Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *Drug Discovery Today*, 10: 313–325.
- Redinbo M.R.; Bencharit S. & Potter P.M. (2003). Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug Discovery. *Biochemical Society Transactions*, 620-624.
- Regnault T.R.; Anthony R.V.; Galan H.L. & Parker T.A. (2002). Placental development in normal and compromised pregnancies. *Review*, 23: 119-129.
- Rivero Osimani V.L. (2016). Impacto de plaguicidas organofosforados en marcadores de daño oxidativo y función mitocondrial de trofoblasto. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Comahue.
- Sandal S. & Yilmaz B. (2011). Genotoxic effects of chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan and 2,4-D on human peripheral lymphocytes cultured from smokers and nonsmokers. [Comparative Study Research Support, Non-U S Gov't]. *Environmental Toxicology*, 26(5): 433-442.

- Satoh T. & Hosokawa M. (2006). Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions*, 162: 195–211.
- Sogorb M.A. & Villanova E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology letters*, 128(1-3): 215-218.
- Souza M.S.; Cruz S.S.; Magnarelli G.; Pechen D´Angelo A.M. & Rovedatti M.G. (2005). Prenatal exposure to pesticides: analysis of human placental acetylcholinesterase, glutathione S-transferase and catalase as biomarkers of effect. *Biomarkers*, 10(5): 376-389.
- Souza M.S.; Magnarelli G.; Pechen D´Angelo A.M.; Rovedatti M.G.; Sánchez S. & Santa Cruz S. (2006). Biomarcadores para el monitoreo de la exposición intrauterina a plaguicidas en comunidades rurales. *Suplemento Acta Toxicológica Argentina*, 14: 69-72.
- Tabun. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. Recuperado el 30 de enero de 2018 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tabun#section=NIOSH-Toxicity-Data>
- Tang J.; Rose R.L. & Chambers J.E. (2006). Metabolism of organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*, 127-143.
- Thrasher J.D.; Heuser G. & Broughton A. (2002). Immunological abnormalities in human chronically exposed to chlorpyrifos. *Archives of Environmental Health*, 57(3): 181-187.
- Thrasher J.D.; Madison R. & Broughton A. (1993). Immunologic abnormalities in human exposed to chlorpyrifos: preliminary observations. *Archives of Environmental Health*, 48(2): 89-93.
- Triche E.W. & Hossain N. (2007). Environmental factors implicated in the causation of adverse pregnancy outcome. *Seminars in Perinatology*, 31(4): 240-242.
- Tsujita T. & Okuda H. (1993). Hydrolysis of cholesteryl oleate liquid crystals by hormone-sensitive lipase. *Journal of Biochemistry*, 113(2): 264-269.
- Tuckey R.C. (2005). Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta*, 26(4): 273-281.
- Van der Linden A.M.A.; Tiktak A.; Boesten J.J.T.I.; Leijnse A. (2009). Influence of pH-dependent sorption and transformation on simulated pesticide leaching. *Science of The Total Environment*, 407(10): 3415-3420.

- Ventura C.; Núñez M.; Miret N.; Martinel Lamas D.; Randi A.; Venturino A.; Rivera E. & Cocca C. (2012). Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticides. *Toxicology Letters*, 213(2): 184-193.
- Vera B.; Santa Cruz S. & Magnarelli G. (2012). Plasma cholinesterase and carboxylesterase activities and nuclear and mitochondrial lipid composition of human placenta associated with maternal exposure to pesticides. *Reproductive Toxicology*, 34(3): 402-407.
- Watts M. (2012). Clorpirifos: Un posible COP a nivel global. *Pesticide Action Network NorteAmerica (PANNA)*. Recuperado el 9 de enero de 2018 de https://rap-al.org/wp-content/uploads/2017/09/Clorpirifos_Rev_-2.pdf.
- Wesseling A.C.; Aragón L.; Castillo M.; Chaverri E.; Corriols F.; Matthew K.; Monge P.; Partanen T.; Ruepert C. & Van Wendel de Joode B. (2003). Consideraciones sobre plaguicidas peligrosos en América Central. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 68: 7-18.
- Yan B.; Matoney L. & Yang D. (1999). Human carboxylesterases in term placentae: enzymatic characterization, molecular cloning and evidence for the existence of multiple forms. *Placenta*, 20(7): 599-607.
- Zappa N. (2015). Exposición a plaguicidas organofosforados: modulación de la expresión de receptores Tipo Toll. Universidad Nacional del Comahue.
- Zhang C.; Xu Y.; Zhong Q.; Li X.; Gao P.; Feng C.; Chu Q.; Chen Y. & Liu D. (2014). In vitro evaluation of the inhibitory potential of pharmaceutical excipients on human carboxylesterase 1A and 2. *PLOS ONE*, 9(4), p.e93819.
- Zou L.W.; Jin Q.; Wang D.D.; Qian Q.K.; Hao D.C.; Ge G.B. & Yang L. (2017). Carboxylesterase inhibitors: an update. *Current Medicinal Chemistry*.