

“Efecto de plaguicidas neonicotinoides
sobre enzimas metabólicas en el
trofoblasto”

Tesis para optar por el título de
Licenciada en Saneamiento y
Protección Ambiental

Neuquén, 2022.

GABRIELA DAIANA NEUHAUS

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL AMBIENTE Y LA SALUD

GABRIELA DAIANA NEUHAUS

LEGAJO 127569

DIRECTORA: Mg. VERA, BERTA E.

CO DIRECTORA: Dra. GUIÑAZÚ ALANIZ, NATALIA L.

APROBACIÓN DE PLAN DE TESIS: 08 DE MAYO DE
2020

FINALIZACIÓN DE LA TESIS: 23 DE SEPTIEMBRE DE
2022

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que durante estos años me han apoyado y ayudado en esta etapa de aprendizaje y en este trabajo, con el cual concluyo la misma:

A mi directora y co-directora, Berta y Natalia, por el conocimiento y el apoyo brindado.

A mis compañeros de laboratorio, Sebastián, Piuqué y Eliana, por su incesante ayuda, solidaridad y compañerismo.

A mis amigos y compañeros de la facultad, por su compañerismo, apoyo, risas y momentos lindos compartidos.

A mis mejores amigos Nashi y Agus, por la incondicionalidad para juntarnos a estudiar charlas y risas compartidas durante toda la carrera y por todo el apoyo brindado.

Y principalmente a mis papás, Graciela y Edgardo, por su cariño, apoyo, ayuda, charlas, incondicionalidad y compañía. Por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad y por la motivación constante para alcanzar mis metas.

RESUMEN

Teniendo en cuenta que el acetamiprid (ACE) es un neonicotinoide (NEO) comúnmente utilizado en una amplia gama de cultivos contra las plagas de insectos, que se sabe poco sobre su toxicidad para los sistemas in vitro de mamíferos, y que los plaguicidas que se usan en todo el mundo se comercializan como mezclas llamadas formulaciones comerciales. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos celulares del formulado comercial de ACE (Assail®) en la línea celular de trofoblasto humano HTR-8 / SVneo.

Los resultados de esta tesis indican que el formulado comercial del NEO ACE afectó la expresión de la enzima CYP1A1 en trofoblastos de primer trimestre. Esta inducción de CYP1A1, observada por métodos cualitativos y cuantitativos, si bien mostró un aumento para las concentraciones de 0,1 y 100 μM de Assail®, es el resultado de un único ensayo. El trofoblasto es la célula específica de la placenta y todos los compuestos que lo alteren, podrían repercutir en un mal funcionamiento placentario. Lo que podría relacionarse con implicaciones clínicas y toxicológicas que pueden sufrir las mujeres expuestas, ya sea por el ambiente o la dieta, a estos plaguicidas durante el embarazo. Estos xenobióticos generalmente son metabolizados por la CYP1A1 pudiendo formar aducto de ADN en la placenta y el feto, lo que presupone un mayor riesgo de resultados adversos en el nacimiento.

Dado que los resultados de esta tesis nos muestran que la CYP1A1 es inducida por los NEO, es necesario poner a punto la medición de la actividad enzimática de CYP1A1. Además, es necesario ampliar este estudio utilizando otras líneas celulares como JEG-3 o cultivos de explantos de placenta. La importancia de ampliar este estudio, sumado a las evidencias de asociaciones positivas entre NEO y los efectos adversos al nacimiento, nos servirá para buscar normativas que disminuyan la exposición de las madres embarazadas a este tipo de compuestos.

ABSTRACT

Taking into account that Acetamiprid (ACE) is a neonicotinoid (NEO) commonly used in a wide range of crops against insect pests, and that little is known about its toxicity to mammalian in vitro systems, and that pesticides are used and marketed worldwide as mixtures called commercial formulations. The objective of this work was to evaluate the cellular effects of the ACE commercial formulation (Assail®) in the human trophoblast cell line HTR-8 / SVneo.

The results of this thesis indicate that NEO ACE affected the expression of CYP1A1 enzyme in first trimester trophoblasts. The CYP1A1 induction was observed either by qualitative and quantitative methods, at 0,1 and 100 µM of Assail®, although this is the result of a single experiment. The trophoblast is the placenta specific cell, and compounds able to alter trophoblast functioning may also have a negative impact on the placenta function. This later could be related to the clinical and toxicological consequences in pregnant women of after exposure to these pesticides during pregnancy. These xenobiotics are generally metabolized by CYP1A1 and are able to form DNA adducts in the placenta and fetus, which implies a higher risk of adverse birth outcomes.

Since the results of this thesis show that CYP1A1 is induced by NEOs, it is necessary to improve the measurement of CYP1A1 enzymatic activity. In addition, it is necessary to extend this study using other cell lines such as JEG-3 or explant cultures. The importance of expanding this type of study, in addition to the evidence of positive associations between NEO and adverse effects at birth, will help us to seek regulations that reduce the exposure of pregnant mothers to this type of compound.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE TABLAS	9
GLOSARIO	10
1. INTRODUCCION.....	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	14
3.1 PLAGUICIDAS.....	14
3.1.1 DEFINICION Y EVOLUCION HISTORICA	14
3.1.2 CLASIFICACIÓN	16
3.1.3 FORMULACIONES COMERCIALES	19
3.1.4 DINÁMICA DE LOS PLAGUICIDAS EN EL AMBIENTE	20
3.1.5 EXPOSICIÓN HUMANA Y VÍAS DE ENTRADA	21
3.1.6 EFECTOS DE LOS PLAGUICIDAS	22
3.1.7 PLAGUICIDAS NEONICOTINOIDES	24
3.1.7.1 GENERALIDADES.....	24
3.1.7.2 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES.....	25
3.1.7.3 MECANISMO DE ACCIÓN.....	26
3.1.7.4 METABOLISMO	27
3.1.7.5 EFECTOS TÓXICOS	29
3.1.7.6 ACETAMIPRID Y SU FORMULADO COMERCIAL	29
3.1.7.7 ANTECEDENTES DE NEONICOTINOIDES EN EL AMBIENTE	31
3.2 PLACENTA HUMANA	33
3.2.1 ANTECEDENTES DE EFECTOS DE PLAGUICIDAS EN ADULTOS Y NIÑOS.....	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.1 CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO CON EL PLAGUICIDA.....	38
4.2 NIVELES DE EXPRESION DE ENZIMAS CITOCROMO P450	38
4.2.1 EXTRACCION DE ARN Y OBTENCIÓN DE ADNc	38

4.2.2	NIVELES DE EXPRESIÓN DE CYP POR PCR.....	39
4.2.3	NIVELES DE EXPRESIÓN DE CYP POR PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	40
4.3	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CYP1A1.....	41
4.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
5.	RESULTADOS.....	43
5.1	EXPRESION DE ENZIMAS CITOCROMO P450 EN CÉLULAS HTR-8/SVneo Y EN PLACENTA.....	43
5.2	EXPRESION DE CYP1A1 EN CÉLULAS HTR-8/SVneo MEDIANTE PCR.....	44
5.3	EXPRESION DE CYP1A1 EN CÉLULAS HTR-8/SVneo mediante qPCR.....	45
5.4	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	47
6.	DISCUSIÓN.....	48
7.	CONCLUSIONES.....	55
8.	BIBLIOGRAFIA.....	56

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Incremento del uso de plaguicidas desde 1990 hasta los últimos datos disponibles (2007-2012). Cossi (2019)	15
FIGURA 2: Movimiento de plaguicidas en el medio ambiente. Cossi <i>et al.</i> (2019).....	21
FIGURA 3: Estructuras químicas de neonicotinoides comunes y compuestos relacionados. Figura adaptada de C. Giorio, <i>et al.</i> (2017)	26
FIGURA 4: (a) En una neurotransmisión normal la enzima acetilcolinesterasa (AChE) hidroliza la acetilcolina (ACh) previniendo la sobre-estimulación y el bloqueo de los receptores de acetilcolina; (b) en presencia de insecticidas neonicotinoides, la acetilcolinesterasa no puede hidrolizar a la molécula del neonicotinoide, que, al ser agonistas del receptor de acetilcolina se unen al receptor y provocan una sobre-estimulación y bloqueo de los mismos. Fuente: Cossi (2019)	27
FIGURA 5: Estructura química del acetamiprid.....	30
FIGURA 6: Representación esquemática de la embriogénesis humana, la formación de placenta y las principales vías reguladoras implicadas. A) Tras la fertilización por un espermatozoide, el óvulo se convierte en un cigoto y comienza a dividirse. B) Después de múltiples etapas de división, las células comienzan a diferenciarse en trofotodermo (azul) y masa celular interna (amarillo). C) En este punto, la masa celular interna se agrupa en un extremo, dejando una cavidad en el otro, y esta estructura ahora se llama blastocisto. D) El revestimiento endometrial comienza a proliferar y hace contacto directo con los CTB. E1) La proliferación y diferenciación por fusión da lugar a una capa STB multinucleada, bordeada por membrana de microvellosidades (MVM) que mira hacia la madre y la membrana basal (BM) hacia el feto. Estructuralmente cubre las vellosidades flotantes bañadas en sangre materna y crea la parte crucial de la barrera placentaria. E2) La proliferación por desprendimiento de la membrana basal y migración a la decidua da lugar a trofoblastos extravelosos (EVT). F) Tras la placentación exitosa, las células diferenciadas dan lugar a la placenta y al feto. G) Principales factores autocrinos y paracrinos, vías de señalización y factores de transcripción que regulan la fusión e invasión/migración del trofoblasto (Adaptado de Staud & Karahoda, 2018).....	35
FIGURA 7: (A) Productos de amplificación de CYP en trofoblastos HTR-8/SVneo. (B) Productos de amplificación de CYP en placenta. Se estudió el producto de amplificación de CYP 2B6, 2B6,1A1, 2C19, 1A2, 1A2* y 2D6, se evaluó la presencia de productos específicos e	

inespecíficos por medio de PCR convencional visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Fuente: Propia 43

FIGURA 8: Expresión relativa del transcrito para CYP1A1 en trofoblastos HTR-8/SVneo. Efecto del acetamiprid (ACE) (0,01-100 μ M) en los niveles del transcrito para CYP1A1 determinado por PCR convencional luego de 24 hora de exposición al insecticida. La expresión del ARNm fue representada como intensidades relativas comparados al control (A) mediante programa Gel Pro; (B) visualización por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Fuente: Propia 44

FIGURA 9: Puesta a punto de primers específicos de CYP1A1. Evaluación de eficiencia y especificidad del cebador específico en cuanto a ajustes lineales y curva de disociación para CYP1A1 e YWHAZ (gen estándar) en trofoblastos HTR-8/SVneo. Fuente: Propia 45 y 46

FIGURA 10: Expresión relativa del transcrito para CYP1A1 en trofoblastos HTR-8/SVneo. Efecto de acetamiprid (0,01-100 μ M) en los niveles del transcrito para CYP1A1, determinado por qPCR luego de 24 horas de exposición al insecticida. La expresión del ARNm fue representada como valores relativos comparados al control un experimento. Fuente: Propia
..... 46

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Clasificación de insecticidas en función de su toxicidad aguda según la OMS (Organización Mundial de la Salud; WHO, 2010). DL50: Dosis Letal 50	16
TABLA 2: Clasificación de plaguicidas según su vida media en el ambiente.....	17
TABLA 3: Clasificación de algunos insecticidas en función de su modo de acción según el IRAC (Insect Resistance Action Commitee: Versión 8.4. 2018)	18
TABLA 4: Características del insecticida acetamiprid. Datos tomados de Pesticide Properties DataBase (PPDB, 2018) y SPEX CertiPrep (2016)	30
TABLA 5: Registros de residuos de los principios activo de los plaguicidas metilazinfos, carbaril y acetamiprid provistos por el SENASA (2013-2016) (VATOXA, 2016) en pera y manzana.....	32
TABLA 6: Primers utilizados en la técnica RT-PCR.	39
TABLA 7: Primers utilizados en la técnica de qPCR	40
TABLA 8: Esquema de cargado de placa 24 pocillos con los tratamientos	41
TABLA 9: Condiciones y tiempos de exposición de los tres ensayos ECOD realizados	42
TABLA 10: Eficiencias y coeficientes de determinación (R2) de primers específicos y endógenos.....	45

GLOSARIO

ACE: Acetamiprid

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

AChR: Receptores colinérgicos de acetilcolina

CM: Carbamatos

CTB: citotrofoblasto

CYP: Citocromo P450

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECOD: Etoxicumarina-O-deetilasa

EROD: Etoxiresorufina-O-desetilasa

EVT: Trofoblasto extraveloso

IA: Ingrediente activo

nAChR: Receptores nicotínicos de acetilcolina

NEO: Neonicotinoides

NIT: Nitiazina

OC: Organoclorados

OF: Organofosforados

PBDE: Éteres de difenilo polibromado

PCB: Bifenilos policlorados

PFC: Compuestos perfluorados

PROD: Pentoxirresorufina-O-dealquilasa

SBF: Suero bobino fetal

SGA: Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos

SNC: Sistema nervioso central

STB: sincitiotrofoblasto

1. INTRODUCCION

La región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén produce el 80 y 90% respectivamente de las manzanas y peras de Argentina, en los últimos años se ha incorporado producción de fruta fina, olivos, frutos secos, horticultura y actividades agroindustriales asociadas en un área de 700 km². Esto conlleva la necesidad de combatir las plagas que atentan a dichos cultivos; para ello se utilizan sustancias o mezcla de sustancias que se denominan plaguicidas. Estos son compuestos diseñados y utilizados con el objeto de prevenir, destruir, repeler o simplemente, controlar la población plaga (Vega, 1985).

Estos compuestos se clasifican de varias formas, según su toxicidad, según el organismo al que afectan y según su naturaleza química. De acuerdo a su constitución química, los más utilizados en la actualidad son los provenientes de las familias de los organofosforados (OF), carbamatos (CM), piretroides y neonicotinoides (NEO) (LIBIQUIMA-CITAAC, 2016). En este sentido la familia de insecticidas NEO es una clase relativamente nueva de plaguicidas estructuralmente similar a la nicotina (Jana *et al.*, 2010; Ezzatabadipour *et al.*, 2012; Baldwin y Racowsky, 1987), desarrollada para reemplazar los insecticidas OF y CM (Jeschke *et al.*, 2011).

En el área estudiada, los plaguicidas se aplican mediante equipos de pulverización terrestres. Una vez aplicados, los remanentes de plaguicida que quedan sobre los cultivos, pueden moverse en el ambiente dependiendo de las condiciones climáticas, las características morfológicas de la superficie vegetal, las características del plaguicida y las particularidades de los cuerpos receptores (Enriquez, 2000), pudiendo de esta forma llegar a estar en contacto con el ser humano. Una condición a tener en cuenta es que el periodo de aplicación de los mismos coincide con la temporada de fuertes vientos en la zona del Alto Valle.

Antecedentes en mujeres embarazadas residentes en esta zona, determinaron durante el período de aplicación intensiva de plaguicidas (meses septiembre a febrero), que se encuentran expuestas a estos químicos (Vera, Santa Cruz & Magnarelli, 2012; Bulgaroni *et al.*, 2012; Bulgaroni *et al.*, 2013). El feto está expuesto a xenobióticos sólo a través de la placenta, que se considera como un medio que refleja la exposición química de la madre durante el embarazo y durante toda su vida (Leino *et al.*, 2013; Vizcaino *et al.*, 2014). Este órgano desempeña un papel crucial en el intercambio materno-fetal de nutrientes, gases y sustancias de desecho (Baker *et al.*, 1981; Myren *et al.*, 2007), además de cumplir un rol fundamental en la detoxificación de xenobióticos.

La detoxificación se produce principalmente mediante reacciones de Fase I, que introducen un grupo polar reactivo, dando lugar a la “funcionalización” del xenobiótico, en general a través de oxidaciones, reducciones o procesos de hidrólisis. La mayor parte de estas reacciones las llevan a cabo un grupo de enzimas llamadas monoxigenasas de la citocromo P450 (CYP) y monoxigenasas de función mixta (Vera, 2010).

Teniendo en cuenta la importancia que tiene la placenta en la detoxificación de los plaguicidas, se determinaron los efectos de los neonicotinoides utilizando un formulado comercial en una línea celular del trofoblasto del primer trimestre (HTR8/SVneo). Se realizaron estudios sobre la actividad enzimática y la expresión del sistema enzimático CYP.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión y actividad de enzimas del sistema citocromo P450, en trofoblastos expuestos a un formulado comercial del insecticida acetamiprid.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Indagar cambios en la expresión basal de enzimas citocromo P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, CYP2B6, CYP2C19, en trofoblastos HTR-8/SVneo expuestos al formulado comercial de acetamiprid.
- Investigar si la exposición al formulado comercial de acetamiprid altera la actividad de CYP1A1, CYP1A2 y CYP2B.
- Indagar cambios en la expresión basal de enzimas citocromo P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, CYP2B6, CYP2C19, en placenta expuesta al formulado comercial de acetamiprid.

3. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

3.1 PLAGUICIDAS

3.1.1 DEFINICION Y EVOLUCION HISTORICA

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, incluyendo a transmisores de enfermedades en humanos y animales, a plantas no deseadas o animales que causen daño durante o interfieren en la producción, procesamiento, almacenaje, transporte o comercio de alimentos.

A lo largo de la historia, el hombre ha ido modificando la naturaleza para satisfacer sus necesidades. Un ejemplo de este fenómeno es el uso intensivo de los plaguicidas para reducir las pérdidas producidas por las plagas sobre los cultivos (Peña *et al.*, 2001).

El uso amplio de plaguicidas se inició recién en el siglo XVIII con base de extractos de piretrum, sustancias obtenidas de los pétalos del Crisantemo, compuestos de cobre y arsénico, o compuestos de arsénico y plomo. A comienzos de este siglo el azufre, el cobre y determinados venenos como la nicotina y el arsénico eran de uso habitual en los cultivos de alto valor comercial: frutas, flores, plantas de invernaderos, entre otros. En 1802, en Francia, I. B. Prevost pudo observar la germinación de una espora bajo el microscopio y se notó que, si se agregaba una gota de sulfato de cobre, dicha germinación no se producía (Collard, 1985). Comenzaba a nacer la era del control químico de las plagas.

A partir de la década del 30, se da inicio a la era moderna de plaguicidas orgánicos obtenidos sintéticamente. Entre las principales moléculas desarrolladas se encuentran los tiocianatos de alquilo, óxido etileno, bromuro de metilo, naftaleno y diclorobenceno. La segunda generación se la puede ubicar cercana al año 1939, en donde se descubren las propiedades insecticidas del DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) y comienza la síntesis de hidrocarburos clorados: HCH (hexaclorociclohexano, o lindano), y Ciclodienos (dieldrin, endrin, clordano, y heptacloro).

El gran salto en el uso de compuestos químicos ocurrió con la segunda guerra mundial; tanto es así que en la inmediata postguerra se usaban en forma masiva compuestos organoclorados (OC) (DDT, lindano y dieldrin). En esta década Alemania comienza la síntesis de insecticidas OF, mientras que Inglaterra produce los primeros herbicidas fenoxiacéticos. Durante el transcurso de los años posteriores, en los '50 y '60, se obtuvo el grupo de los CM, el insecticida Malation (OF) y varios fungicidas. En 1970 el Doctor John Franz, investigador del

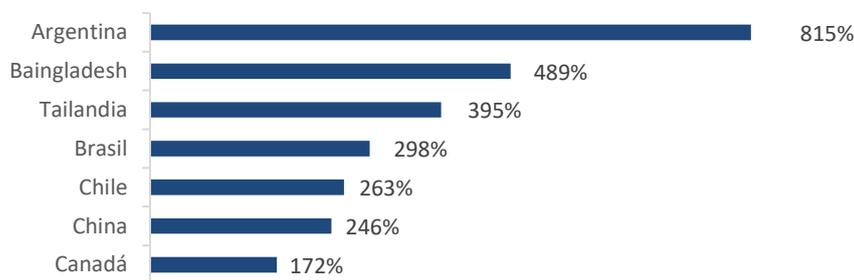
laboratorio Monsanto, descubrió que un componente químico tenía la propiedad de detener el crecimiento de las plantas, el que más tarde se conocería como Glifosato. Además, se introducen gran variedad de miembros de las familias de OF y CM, ambas neurotóxicas, así como fungicidas, herbicidas y otros plaguicidas.

Todo parecía indicar que con las moléculas descubiertas se contaba con la solución definitiva para las plagas que diezaban los cultivos; sin embargo, un libro escrito por Rachel Carson (Primavera Silenciosa) publicado en 1962 advertía de los efectos perjudiciales de los plaguicidas para la salud humana y el ambiente. A partir de ese momento se genera una preocupación por los efectos toxicológicos de los principios activos, forzando en cierto modo, a las compañías químicas a orientar sus investigaciones hacia productos de menor agresividad. Es entonces que tiene lugar la tercera generación de plaguicidas, donde los primeros insecticidas no neurotóxicos juegan un rol primario (Masia y Moltoni, 2012).

Más recientemente se conforma la cuarta generación de productos destinados al control de plagas incluyendo principios activos basados en la modificación del comportamiento de los insectos como antialimentarios y feromonas, endotoxinas proteicas de origen microbiano, además de la introducción de la familia NEO, compuestos sintéticos de la nicotina (imidacloprid, ACE, entre otros) y aceites esenciales.

Actualmente, el uso de plaguicidas se ha extendido y se encuentran entre los productos químicos más utilizados en el mundo, existiendo una inmensa variedad de compuestos empleados en jardinería, salud pública y, principalmente, en agricultura. Su uso se ha ido incrementando rápidamente en el mundo, alcanzando los 3,5 mil millones de kg de ingrediente activo (IA) por año durante los últimos 20 años (Figura 1) (Cossi, 2019).

Figura 1: Incremento del uso de plaguicidas desde 1990 hasta los últimos datos disponibles (2007-2012). Cossi (2019).



Se muestran algunos de los países que utilizan más de 20 millones de kilogramos de plaguicidas anualmente.

3.1.2 CLASIFICACIÓN

Los plaguicidas presentan múltiples clasificaciones en función de algunas de sus características principales, su toxicidad aguda, la vida media, su estructura química y la plaga que controlan.

En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda. La OMS utiliza actualmente las categorías de peligro de toxicidad aguda del Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA) como punto de partida para la clasificación (Tabla 1). Este cambio es coherente con la Resolución de la Asamblea Mundial de la Salud de 1975 que preveía que la clasificación de la OMS se desarrollaría con el tiempo en consulta con los países, organismos internacionales y organismos regionales. El SGA cumple con este requisito como un sistema de clasificación con aceptación global luego de una extensa consulta internacional (OMS, 2010).

Tabla 1: Clasificación de insecticidas en función de su toxicidad aguda según la OMS (Organización Mundial de la Salud; WHO, 2010). DL50: Dosis Letal 50.

Clase según OMS	LD ₅₀ en ratas (mg/Kg de peso corporal)	
	Oral	Dérmica
a Extremadamente peligroso	<5	<50
b Muy peligroso	5-50	50-200
I Moderadamente peligroso	50-2000	200-2000
II Ligeramente peligroso	Mas de 2000	
Poco probable que presente peligro agudo	5000 o mas	

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

Tabla 2: Clasificación de plaguicidas según su vida media en el ambiente.

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

Fuente: Ramírez y Lacasaña, 2001

^aCapacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó.

^bPeríodo de tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto o mezcla aplicada.

Según su estructura química se clasifican en:

- Organoclorados (ej. Clordano, DDT, dieldrín, lindano, metoxicloro).
- Organofosforados (ej. Acefato, azametifos, clorpirifos, diazinón, diclorvos, dimetoato, malatión, metilazinfos, profenofos, fosmet).
- Carbamatos (ej. Aldicarb, carbaril, carbofurán, carbosulfán, pirimicarb).
- Piretroides (ej. Cipermetrina, deltametrina, esfenvalerato, permetrina).
- Neonicotinoides (ej. ACE, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid).
- Benzoilureas (ej. Novalurón, clorfluazurón, teflubenzurón).

Otra forma de clasificarlos es según la plaga que controlan: los insecticidas (insectos), herbicidas (malezas), fungicidas (hongos), acaricidas (ácaros), rodenticida (roedores), nematocidas (nematodos), molusquicidas (caracoles, babosas), pediculicidas (piojos), etc. (Anguiano *et al.*, 2011).

Con respecto a los insecticidas neonicotínicos, en particular ACE es moderadamente peligroso (clasificación I, OMS, tabla 1), se degrada rápidamente y presenta bajos riesgos para el medio ambiente (USEPA, 2002). Un estudio que se realizó en suelos en condiciones experimentales muestra claramente que ACE tiene una persistencia moderada en el suelo bajo capacidad de campo y regímenes de humedad sumergida. En condiciones naturales de campo, es probable que la persistencia sea menor debido a las duras condiciones de temperatura, exposición a la luz solar, etc. (Gupta, Suman & Gajbhiye, Vt., 2007).

Numerosas familias de los insecticidas mencionados, ejercen el control de la plaga interfiriendo de alguna manera con la señalización nerviosa, por lo que se los clasifica como neurotóxicos. Resumiendo, como vemos en la Tabla 3, los insecticidas NEO son agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) y están dentro del subgrupo 4A.

Tabla 3: Clasificación de algunos insecticidas en función de su modo de acción según el IRAC (Insect Resistance Action Committee: Versión 8.4. 2018).

Grupo principal y sitio de acción primario	Subgrupo químico o ingrediente activo representativo
1 Inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) Acción nerviosa	1A Carbamatos
	1B Organofosforados
2 Antagonistas del receptor GABA Acción nerviosa	2A Ciclodienos
	2B Organoclorados
3 Moduladores del canal de sodio Acción nerviosa	3A Piretroides Piretrinas
	3B DDT Metoxicloro
4 Agonistas del receptor nicotínico (nAChR) de la acetilcolina Acción nerviosa	4A Neonicotinoides
	4B Nicotina
	4C Sulfoximina
	4D Butenolides
	4E Mesoiónicos
7 Miméticos de la hormona juvenil Regulación del crecimiento	7A Análogos de la hormona juvenil
	7B Fenoxicarb
	7C Piriproxifén

3.1.3 FORMULACIONES COMERCIALES

Los plaguicidas son comercializados generalmente como formulaciones líquidas (concentrado emulsionable, suspensiones concentradas, soluciones, emulsiones invertidas, microencapsulados) o sólida (polvos, cebos, gránulos, pellets, polvos mojables, gránulos dispersables, polvos solubles).

En cada producto comercial normalmente hay sólo una sustancia que tiene efecto plaguicida: es la denominada principio o IA, que es la sustancia química responsable del mecanismo de acción a través del cual mata, controla o repele a la plaga de interés. Existen también productos comerciales que incluyen más de un IA a fin de combinar los efectos de todos ellos. Pero muy raramente se incluyen más de tres IA en un mismo producto comercial (Ministerio de Agricultura, Ganadería & Pesca [MAGYP], Sin fecha).

El IA puede ser poco soluble en agua, químicamente inestable, y difícil de manipular y transportar. Es por eso que se comercializan en combinación con una mezcla de otros compuestos, los cuales, según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA), pueden ser denominados “inertes”, debido a que no poseen acción biocida específica. Los ingredientes inertes cumplen importantes funciones en cuanto a la efectividad y aplicabilidad de los plaguicidas. Actúan como solventes para ayudar al IA a penetrar en la superficie foliar de las plantas, facilitar la aplicación a campo, extender la vida post-cosecha, evitar la degradación debido a la exposición a radiación solar, mejorar la eficacia, entre otros (Mullin *et al.*, 2015). Entre los distintos compuestos inertes podemos encontrar humectantes, espesantes, tensioactivos, estabilizadores, antiespumantes. La mezcla de los IA e inertes se denomina formulación plaguicida (Randall *et al.*, 2008). En nuestro país, todo producto fitosanitario comercializado está regulado y debe indicar en su información básica el IA que contiene y el contenido del mismo en relación al contenido neto del producto comercial (SAGYPSA-SENASA, 1999).

Las formulaciones también pueden incluir coadyuvantes, sustancias químicas que se adicionan para incrementar y potenciar la actividad plaguicida, tales como surfactantes o tensioactivos para reducir la tensión superficial de las gotas, aceites para que las gotas penetren más fácilmente las membranas y adherentes, pegatinas o “stickers” para que las gotas se adhieran mejor a la planta; y también aditivos, sustancias que se agregan para modificar las propiedades del IA pero no su eficacia, tales como colorantes, esencias, espesantes y anticongelantes (Randall *et al.*, 2008).

La identidad de la mayoría de estas sustancias “inertes” se consideran “secreto comercial” y no son informadas en las etiquetas de los productos (Moses *et al.*, 1993; Mesnage *et al.*, 2014). Sin embargo, no se puede asumir que estas sustancias adicionadas a los IA sean inertes dado que poseen propiedades toxicológicas propias que, incluso, en algunos casos son de mayor relevancia que las propiedades toxicológicas del propio IA (Rozman *et al.*, 2010).

3.1.4 DINÁMICA DE LOS PLAGUICIDAS EN EL AMBIENTE

Las propiedades físico-químicas de los plaguicidas y las características del suelo junto a las condiciones climáticas determinan el destino y la persistencia del compuesto en el ambiente (Tiryaki & Temur, 2010).

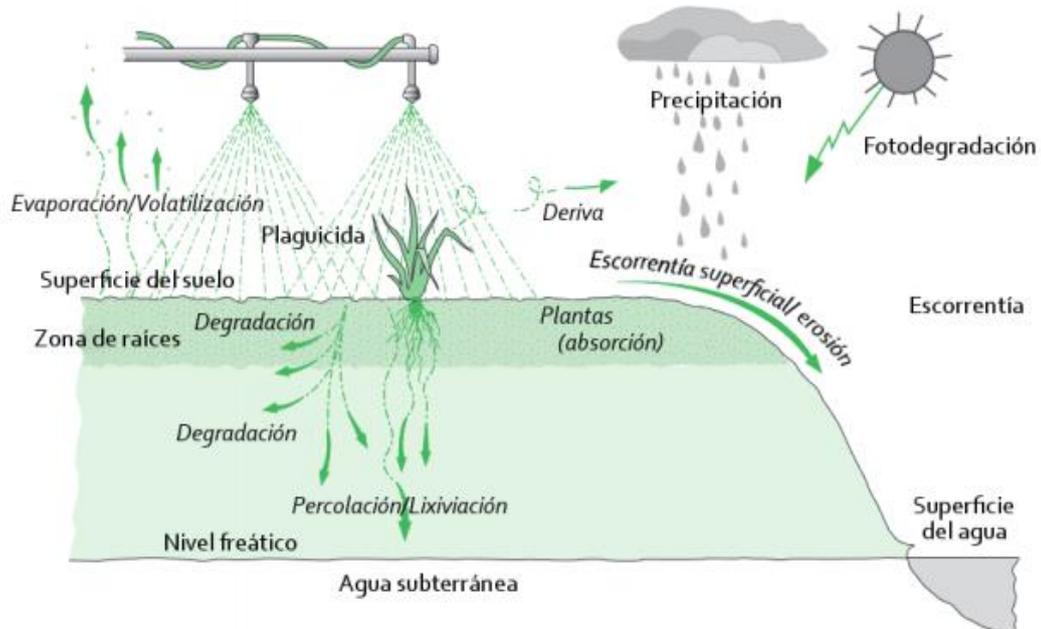
En la Figura 2 se muestra cómo el pesticida aplicado en un sitio puede pasar a la atmósfera por evaporación o permanecer en el suelo. En el segundo caso, varios procesos determinan su destino final, entre otros, su retención por sedimentos o por partículas suspendidas en el agua, fenómeno denominado adsorción; su ingreso en el metabolismo de las plantas; su degradación por microorganismos o biodegradación; y su arrastre por agua o lixiviación, que puede causar la contaminación de aguas superficiales o profundas. Las propiedades del pesticida y del suelo, más las condiciones climáticas definen la probabilidad de que acontezcan estos procesos. (Martínez-Ghersa, 2011).

Una importante vía de ingreso de los plaguicidas al medio ambiente (aire, suelo y agua) consiste en la contaminación difusa a través de la aplicación agrícola (fumigación, pulverización, espolvoreo, nebulización) (Pimentel y Levitan, 1986). Una vez dispersados, pueden sufrir alteraciones en su estructura debido a procesos bióticos y abióticos. Los procesos de transformación están influidos por distintos factores como la temperatura, la intensidad y duración de la luz solar, el pH o la composición del agua. Bajo condiciones favorables, los plaguicidas pueden degradarse hasta su mineralización completa, pero, en general, son degradados a otros productos cuya toxicidad, movilidad y efectos sobre el medio ambiente son poco conocidos y, en muchos casos, son compuestos más tóxicos y persistentes que los originales (Ruiz Marrondo, 2001).

Los NEO son insecticidas sistémicos solubles en agua, por lo que pueden ser tomados por una planta en desarrollo y se pueden encontrar dentro de los tejidos vasculares y el follaje, proporcionando protección contra los insectos herbívoros. Sin embargo, aun con la aplicación de plaguicidas se calcula que se pierde 1/3 de la producción a causa de las plagas y sólo un pequeño porcentaje de los productos aplicados alcanza a las plagas que se pretenden

controlar. El resto de tales productos se dispersan en el ambiente y representan un riesgo potencial para los ecosistemas y los organismos sobre los que no estaban dirigidos (organismos “no blanco”) produciendo daños indeseables y, en algunos casos, irreparables en el ambiente (Anguiano, 2011).

Figura 2: Movimiento de plaguicidas en el medio ambiente. Cossi et al. (2019)



3.1.5 EXPOSICIÓN HUMANA Y VÍAS DE ENTRADA

Todos los seres vivos, tanto organismos plaga como aquellos organismos no blanco de los plaguicidas, pueden estar directa o indirectamente expuestos no sólo a los IA de los plaguicidas sino también a las formulaciones comerciales, ya sea por exposición accidental, laboral, ambiental o por consumo.

- Exposición 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).

- Exposición 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).

Las vías de entrada constituyen el mecanismo por el cual los tóxicos entran en el organismo. La absorción de contaminantes ambientales, como los plaguicidas, ocurre principalmente a través de las vías digestiva, respiratoria y dérmica. Ogg *et al.* (2012) realizaron algunas observaciones sobre ellas:

- Oral: vía de ingreso por la boca. Los plaguicidas pueden ser ingeridos por accidente, por descuido o intencionalmente, pudiendo provocar enfermedades serias, daños severos, e incluso la muerte.
- Inhalación: ingreso por vía respiratoria (pulmones). Peligroso ya que los pulmones pueden absorber rápidamente los plaguicidas a la corriente sanguínea. Algunos plaguicidas pueden causar serios daños a los tejidos de la nariz, garganta y pulmones si se inhalan en suficiente cantidad. Los polvos mojables concentrados pueden representar un riesgo al momento de realizar la mezcla.
- Dermal: resulta en absorción inmediata después del contacto de la piel y ojos con el plaguicida. La absorción continuará mientras el plaguicida este en contacto con la piel y ojos. Es muy fácil transferir los residuos de plaguicidas de una parte del cuerpo a otra, aumentando el potencial de envenenamiento.

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 periodo embrionario como en el fetal (Eskenazi *et al.*, 2004), los efectos pueden ser a corto o largo plazo.

3.1.6 EFECTOS DE LOS PLAGUICIDAS

Según Pimentel (1995) el uso masivo de plaguicidas de amplio espectro a lo largo del tiempo termina induciendo resistencia de los organismos blanco, contaminación de los ecosistemas y múltiples efectos adversos sobre organismos no blanco entre otros efectos no deseados.

En nuestro organismo, estos efectos pueden ser de variada gravedad. A partir de ciertas dosis, los plaguicidas son tóxicos tanto para las plagas como para las personas. Decir que una

dosis es segura implica mucho más que afirmar que no provocaría una intoxicación aguda letal. Los efectos de los plaguicidas en los seres humanos varían según sus modos de acción, las dosis y las características de cada individuo. Pueden producir efectos reconocibles de inmediato o manifestarse con retardos de meses o años. Pueden generar efectos reversibles, persistentes o permanentes (Wolansky, 2011).

- Intoxicación aguda: cuadro clínico que se presenta en las primeras 24 horas luego de la exposición a plaguicidas cuyos signos y síntomas dependen del grupo químico al que pertenecen (Álvarez, 2010). A su vez, cada tipo de intoxicación se la puede clasificar según el tipo de exposición y su origen:
 - Ocupacional: exposición a agroquímicos en actividades como el preparado de caldo, mezcla, traslado, aplicación.
 - Accidental: exposición de manera no intencional, a través de alimentos contaminados.
 - Intencional: exposición al agroquímico con intención de causar daño, como suicidios u homicidios.
- Intoxicación crónica: cuadro clínico que se presenta luego de exposición repetida a dosis bajas de plaguicidas por periodos de tiempo prolongados. Se requiere documentar por medio de estudios epidemiológicos la relación causal entre la exposición a plaguicidas y los efectos a largo plazo sobre la salud (cancerígenos, entre otros) (Álvarez, 2010). Las intoxicaciones crónicas se clasifican en:
 - Ocupacional: por la exposición repetida a dosis bajas de agroquímicos por largo tiempo en las actividades laborales.
 - Medioambiental: cuando la población en general es afectada por diferentes vías de exposición (agua, aire, alimentos contaminados). La exposición es secundaria a las actividades laborales; accidentales (derrames en fuentes de agua) y de tipo intencional (residuos de agroquímicos echados en fuentes de agua) (Álvarez, 2010).

Luego de una exposición aguda o acumulativa a plaguicidas pueden ocurrir efectos leves y pasajeros, como sarpullido o adormecimiento de los dedos; moderados, como crisis más frecuentes en los asmáticos; o graves, como convulsiones. Entre las consecuencias irreversibles más serias se cuentan malformaciones congénitas luego de exposición repetida durante períodos sensibles de la gestación, trastornos glandulares y cáncer. El rango de dosis capaz de

producir efectos adversos de variada severidad es muy extenso, pero como regla general se cumple que, a mayor dosis, mayor daño (Wolansky, 2011).

Con respecto a las formulaciones comerciales, como se mencionó anteriormente, son mezclas de un IA con actividad tóxica y un excipiente teóricamente inerte desde el punto de vista biológico. Sin embargo, numerosos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que, en la mayoría de los casos, los riesgos potenciales a los que los seres vivos se ven sometidos por exposición a formulaciones comerciales son, en muchos casos, más perjudiciales que el daño ocasionado por el compuesto activo (IARC, 1987, 1991).

3.1.7 PLAGUICIDAS NEONICOTINOIDES

3.1.7.1 GENERALIDADES

El desarrollo de esta clase de insecticidas comenzó en la década de los '80 por Shell, con el producto nitiazina (NIT), y en la década de los '90 por Bayer con el producto imidacloprid. Los NEO se desarrollaron en gran parte debido a que muestran una menor toxicidad al humano, en comparación con los OC, OF y CM, utilizados anteriormente a gran escala. La mayoría de los NEO muestran mucha menor toxicidad en los mamíferos que en los insectos, pero algunos productos de degradación son tóxicos (Yamamoto & Casida, 1999).

La nicotina actúa como un insecticida, pero también es tóxico para los mamíferos. De hecho, la nicotina tiene una menor dosis letal para ratas que las moscas. Esto estimuló una búsqueda científica de compuestos que retienen las propiedades insecticidas de la nicotina, con un menor efecto selectivo sobre los mamíferos, pero la investigación inicial de los compuestos relacionados con la nicotina como insecticidas no tuvo éxito. El precursor de NIT fue sintetizado por primera vez por un químico de la Universidad de Purdue, Estados Unidos. Investigadores de Shell encontraron que este precursor mostró potencial insecticida. Se descubrió que la NIT era un agonista del receptor de acetilcolina postsináptica, lo que significa que tiene el mismo modo de acción que la nicotina, y no actúa como un inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE), en contraste con los insecticidas OF y CM. Mientras la NIT tiene la especificidad deseada, no es fotoestable, por lo que no era comercialmente viable. Los NEO se desarrollaron después del fracaso comercial de NIT. El primer NEO comercial, imidacloprid, fue desarrollado por Bayer una década después. (Yamamoto & Casida, 1999).

Las principales regiones de uso de NEO son América Latina, Asia, América del Norte (75% del uso total) y Europa (11% del uso total) (Bass *et al.*, 2015).

3.1.7.2 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

La mayoría de los NEO son solubles en agua y se descomponen lentamente en el medio ambiente para que puedan ser absorbidos por la planta y, proporcionan protección de los insectos cuando esta crece.

Por otro lado, algunas características fisicoquímicas de estos plaguicidas pueden aumentar la probabilidad de contaminar el medio ambiente, como por ejemplo una alta lipofilicidad, alta bioacumulación, larga vida media y/o alta capacidad de lixiviación.

Como se observa en la figura 3, estos compuestos presentan una estructura base derivada de la nicotina, de allí su nombre, pero con ciertas variaciones que marcan la diferencia entre las distintas generaciones, clasificados como:

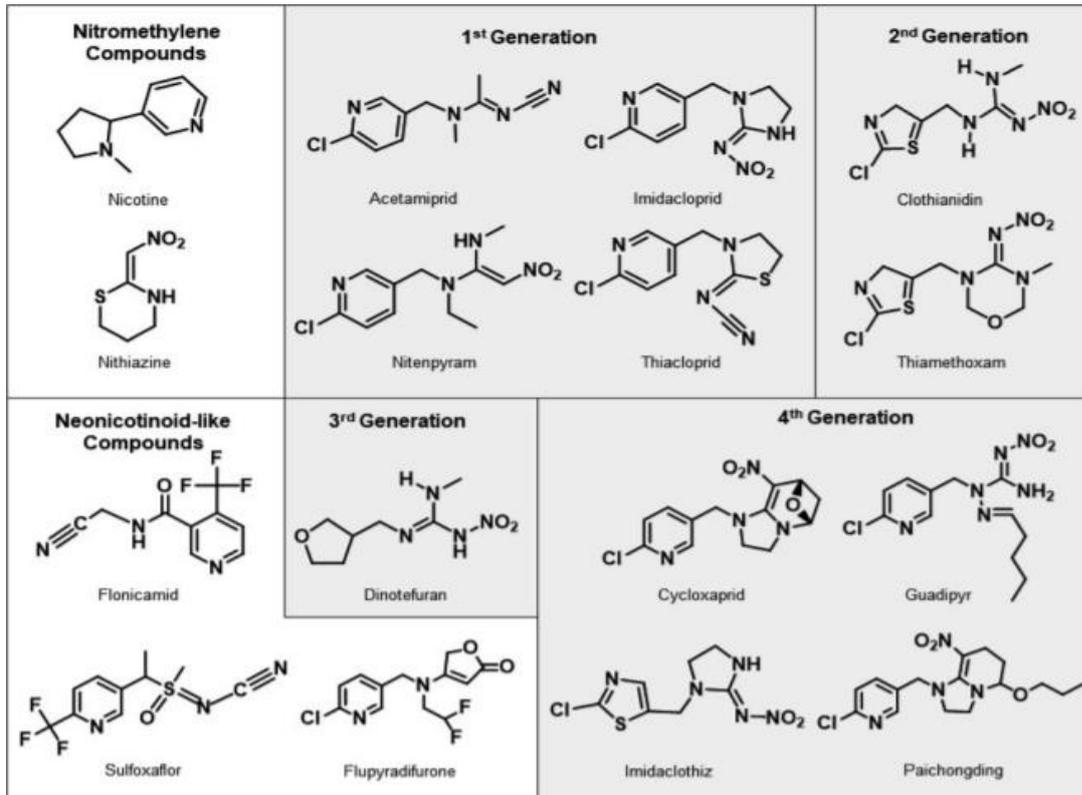
- Primera generación: subclase cloronicotilínicos, a este grupo pertenecen imidacloprid, nitenpyran, ACE y tiacloprid. Todos ellos con un átomo de cloro en la posición 6 del anillo piridilo.

- Segunda generación: subclase tianicotilínico, grupo al que pertenecen tiametoxam y clotianidina, que se caracterizan por un cloro en la posición 2 del anillo tiazolil.

- Tercera generación: NEO que conserva una parte de la primera generación y otra parte de la segunda generación, cuya característica es un anillo furano, donde se encuentra el dinotefuran (Tanner & Czerwenka, 2011).

Se han identificado varios otros compuestos como NEO o similares a los NEO, incluyendo NIT, foncamid, flupiradifurona, sulfoxaflor, guadipyr, cicloxaprid, paichongding e imidaclothiz (Jeschke & Nauen, 2008; Simon-Delso *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014; Nauen *et al.*, 2015; Giorio *et al.*, 2017).

Figura 3: Estructuras químicas de NEO comunes y compuestos relacionados. Figura adaptada de Giorio et al., (2017).



3.1.7.3 MECANISMO DE ACCIÓN

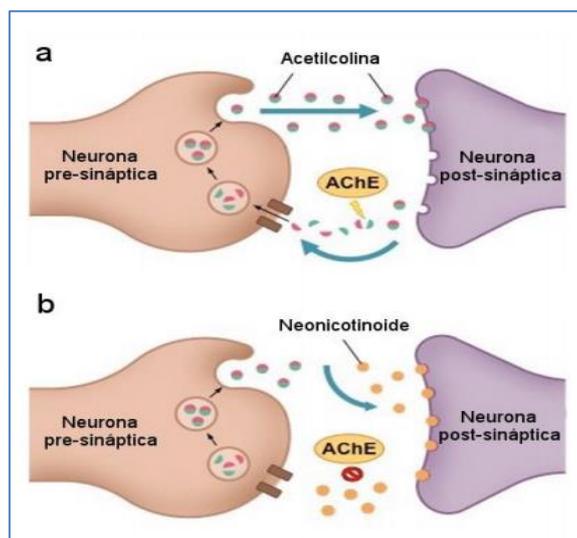
Los NEO son derivados de la nicotina e imitan la acción de la acetilcolina (ACh), que es uno de los principales neurotransmisores excitatorios en el sistema nervioso central (SNC) de los insectos. Bajo condiciones fisiológicas normales luego de que la ACh es liberada por la célula presináptica se une a los receptores colinérgicos (AChR) y activa un canal catiónico intrínseco. La apertura del canal resulta en una despolarización de la célula postsináptica principalmente debido a la entrada de ion sodio (Na^+). La acción sináptica de la ACh se termina cuando la enzima AchE hidroliza rápidamente la ACh. Los NEO por su parte activan los nAChR, pero no son sensibles a la degradación de la AchE por lo que la activación persiste. Esta activación persistente desencadena una sobre estimulación de las sinapsis colinérgicas y resulta en la hiperexcitación, convulsiones, parálisis y muerte del insecto (Bloomquist, 2009; Cossi, 2019), ver Figura 4.

Se pensó que los NEO tenían una toxicidad limitada para los humanos debido a su alta especificidad hacia los nAChR de insectos. Sin embargo, un estudio *in vitro* demostró que los NEO estimulan las neuronas a través de nAChR de manera similar a la nicotina (Kimura-Kuroda

et al., 2012), y los modelos murinos *in vivo* informaron efectos neuroconductuales (Hirano *et al.*, 2015; Sano *et al.*, 2016; Tanaka, 2012).

La principal diferencia entre el modo de acción de los NEO y otros plaguicidas son sus efectos acumulativos con el tiempo debido a que las neuronas no se regeneran. Otros insecticidas pueden unirse irreversiblemente a receptores o enzimas específicas pero sus efectos son temporales, dado que pueden ser revertidos una vez que los receptores o las enzimas son regenerados (Sanchez-Bayo *et al.*, 2016).

Figura 4: (a) En una neurotransmisión normal la enzima AChE hidroliza la ACh previniendo la sobre-estimulación y el bloqueo de los AChR; (b) en presencia de insecticidas NEO, la AChE no puede hidrolizar a la molécula del NEO, que, al ser agonistas del AChR se unen al receptor y provocan una sobre-estimulación y bloqueo de los mismos. Fuente: Cossi (2019).



3.1.7.4 METABOLISMO

La familia enzimática de las CYP son un sistema muy importante, capaz de metabolizar compuestos estructuralmente diferentes, siendo el catalizador biológico más versátil conocido (Porter & Coon, 1991). Se encuentran ampliamente distribuidas en animales —desde artrópodos o invertebrados hasta mamíferos—, plantas y protistas, para los que se supone un origen común (Nelson, 2011). Se conocen más de 18000 secuencias de CYP organizadas en familias (Guengerich, 2013). Dentro de un mismo organismo, este sistema se encuentra en diferentes tejidos como riñón, pulmón, piel, cerebro, corteza adrenal, placenta, testículos y otros (Ding & Kaminsky, 2003)

Las reacciones de biotransformación de xenobióticos es el conjunto de procesos enzimáticos destinados a incrementar la hidrofilia de estos compuestos para facilitar su neutralización y eliminación. Estos procesos se han agrupado en dos fases:

- Fase I: catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependientes del CYP, donde los xenobióticos son transformados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, y convertidos en productos más hidrosolubles a causa de la formación de nuevos grupos funcionales polares (carboxilo, hidroxilo, amino).

- Fase II: participan una serie de transferasas que actúan sobre los xenobióticos, o los metabolitos generados en las reacciones de fase I, para combinarlos mediante reacciones de conjugación (glucronoconjugación, sulfonación y acetilación) con moléculas endógenas de carácter polar (ácido glucurónico, sulfatos, acetatos, glutatión o algunos aminoácidos) para facilitar su transporte por el organismo y su rápida excreción. El objetivo final es aumentar la solubilidad en agua de los compuestos y facilitar su excreción a través de la orina o la bilis (Guengerich, 2012; Gallego-Fernández, 2011).

Aunque la función principal de las CYP es participar en las reacciones de detoxificación, también interviene en procesos de activación metabólica, así compuestos inertes y poco reactivos son transformados en otros que resultan tóxicos para el organismo por su reactividad química que causan daño celular por mecanismos de mutagénesis, carcinogénesis, entre otros (Rendic & Guengerich, 2012; Guengerich, 2012; Gallego-Fernández, 2011).

El metabolismo de los NEO particularmente, puede ser dividido en dos fases: la primera, es una oxidación microsomal dependiente las CYP y la CYP3A4 es la enzima más importante (desmetilación, nitroreducción, cianohidrólisis, hidroxilación y declorinación), por tanto, los inhibidores de las CYP pueden potenciar los efectos de los NEO en insectos; posteriormente, sufre reacciones de conjugación (segunda fase). En humanos, en general, su metabolismo es lento y la mayoría de compuestos son excretados en orina sin mayores cambios en su estructura molecular (Giraldo *et al.*, 2018).

Aunque se conoce relativamente poco sobre el efecto de NEO en humanos y animales, ciertamente estos insecticidas poseen la capacidad de alterar la viabilidad de distintos tipos celulares y parte de su metabolismo resulta en la producción de especies reactivas (Cavas *et al.*, 2012; Şenyıldız *et al.*, 2018). Otro aspecto para resaltar, que contribuye a la toxicidad de los NEO en seres humanos, es el solvente utilizado en varias partes del mundo, N-metil-pirrolidona. Este compuesto explica la mayoría de síntomas gastrointestinales presentados por

los pacientes que ingieren estos venenos, básicamente por sus efectos irritantes directos sobre la mucosa del tracto gastrointestinal y por su liposolubilidad (Giraldo *et al.*, 2018).

3.1.7.5 EFECTOS TÓXICOS

Debido a su relativamente reciente introducción en el mercado, aún existe escasa información sobre el impacto de los NEO en especies no blanco, especialmente a largo plazo (Anderson *et al.*, 2015; Godfray *et al.*, 2015; Main *et al.*, 2018). Sin embargo, algunos reportes de casos coinciden en que las manifestaciones de toxicidad varían desde casos leves de taquicardia, hipertensión, midriasis, somnolencia, náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea, hasta casos severos como falla ventilatoria, coma, convulsiones, arritmias ventriculares e, incluso, la muerte (David *et al.*, 2007; Shadnia & Moghaddam, 2008; Mohamed *et al.*, 2009; Phua *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2013; Karatas, 2009; Imamura *et al.*, 2010;)

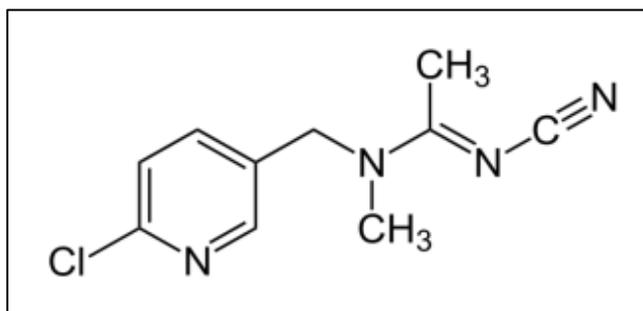
En líneas generales, los NEO podrían causar una variedad de efectos tóxicos en animales y humanos, como neurotoxicidad, inmunotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y efectos citotóxicos reproductivos en vertebrados e invertebrados (Bal *et al.*, 2012; Yardimci *et al.* 2014; Crosby *et al.*, 2015). Incluso causar la muerte, aunque la tasa de mortalidad de dos grandes estudios fue del 0 al 2,9%, que es mucho menor que la de otros insecticidas (Phua *et al.*, 2009; Mohamed *et al.*, 2009)

3.1.7.6 ACETAMIPRID Y SU FORMULADO COMERCIAL

El NEO ACE se usa ampliamente en la agricultura mundial. Sin embargo, recientemente se ha incluido en la lista de vigilancia de la UE como un posible contaminante del agua para ser monitoreado (Decisión de Ejecución 2018/840 / CE) (Comisión Europea, 2018). En Argentina, se aplica principalmente para controlar las plagas de lepidópteros y hemípteros en una variedad de cultivos (CASAFE, 2017/2019).

ACE, (E)-N 1 -[(6-cloro-3-piridil)metil]-N 2 -ciano-N 1 -metil acetamidina (Figura 5), es un insecticida sistémico de cadena abierta y corresponde al grupo de las N-cianoamidinas.

Figura 5: Estructura química del ACE.



Presenta alta solubilidad en agua, es estable bajo determinadas condiciones en sistemas acuáticos y posee un bajo potencial de bioacumulación (Tabla 4). En exposiciones agudas, es muy tóxico para algunos invertebrados acuáticos, moderadamente tóxico para mamíferos, aves, abejas y moluscos y prácticamente no tóxico para peces (US EPA, 2005).

Tabla 4: Características del insecticida ACE. Datos tomados de Pesticide Properties DataBase (PPDB, 2018) y SPEX CertiPrep (2016).

Clase	Neonicotinoide
Modo de acción	Sistémico Agonista del receptor nicotínico de acetilcolina
Peso molecular (g mol ⁻¹)	222,68
Solubilidad en agua (20°C; µg L ⁻¹)	Excelente (≥1000)
Solubilidad en acetona (20°C; µg L ⁻¹)	Excelente (≥1000)
Volatilidad (presión de vapor, 20°C, mPa)	Baja (1,73 x 10 ⁻⁴)
Vida media en agua-fotólisis (20°C, pH 7)	Estable (34 días)
Vida media en agua-hidrolisis (20°C, pH 7)	Estable*
Kow -log Kow (20°C, pH 7)	6,3 x 10 - 0,8
Bioconcentración (FBC; 1kg ⁻¹)**	Bajo potencial (22)
Toxicidad (según la OMS)	II. Moderadamente peligroso

*Se mantiene estable entre los 22-45°C y pH 4-7. La degradación ocurre a pH y temperaturas más elevados; por ejemplo, la vida media a 25°C, pH 9 es de 420 días y a 45°C, pH 9 de 13 días. **Factor de bioconcentración (FBC): concentración del compuesto químico en el tejido sobre la concentración del químico en el agua. Describe la partición de un contaminante entre la fase acuosa y la fase orgánica.

El ACE fue introducido y registrado por primera vez en Japón en 1995 para el control de distintas plagas (Matsuda, 1996). En Francia su uso ya se encuentra prohibido desde septiembre de 2018 (Sciences et avenir, 2018).

En Argentina su uso está oficialmente aceptado por el SENASA como insecticida para el control de distintas especies plaga de lepidópteros y hemípteros en cultivos de algodón, frutales (manzana, pera y durazno), pimiento, tomate y poroto (CASAFE, 2017/2019).

Existen 21 formulaciones comerciales autorizadas en Argentina con distintas concentraciones de IA: Acegoal, Acero, Aceta 70 WP, ACE 20 DVA, Agromiprid 20 SP, Assail, Mospilan, Mospilan ST, Wizard, Floux, Marder, Adama Cormoran, entre otras (VATOXA, 2018).

Assail® (SUMMIT AGRO), está compuesto por 70% del IA ACE y 30 % de otros ingredientes, entre ellos coadyuvantes. Inscripto ante el SENASA bajo el N° 35.990. Fabricante del principio activo: NIPPON SODA CO. LTD (Summit Agro, 2020). Su presentación se encuentra en forma de polvo mojable, en caja de 1 kg (10 sobres de 100 g cada uno) (Summit Agro, sin fecha).

3.1.7.7 ANTECEDENTES DE NEONICOTINOIDES EN EL AMBIENTE

En el período comprendido entre 2005 y 2014, se ha demostrado una mayor detección de residuos de NEO en las frutas (Lozowicka *et al.*, 2016), lo que denota el uso creciente de esta familia de insecticidas para fines agrícolas. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en el informe de monitoreo de plaguicidas de 2014 encontró a NEO en 12 de 19 muestras derivadas de diferentes frutas y verduras (Cimino *et al.*, 2017).

Varios estudios demostraron la presencia de una amplia variedad de residuos de plaguicidas en aguas subterráneas y superficiales, algunos con altas frecuencias de detección tanto de origen puntual como difuso (Loewy *et al.*, 1999; Loewy *et al.*, 2006; Tosi *et al.*, 2009). Otras investigaciones que abarcaron el uso de indicadores ambientales para la evaluación de las prácticas agrícolas en una microcuenca de la región, demostraron además la migración fuera del sitio de aplicación de agroquímicos, detectando la presencia de residuos de plaguicidas en suelo, agua superficial y agua subterránea. Se pudo confirmar también que la deriva es una vía significativa de entrada de plaguicidas al agua superficial mientras que la percolación y los flujos preferenciales constituyen las principales vías de transporte que contribuyen a la contaminación sub-superficial (Loewy *et al.*, 2011).

Se reportaron distintos problemas ambientales asociados al uso de NEO, como por ejemplo una elevada toxicidad para polinizadores (principalmente abejas), insectos benéficos (predadores y parasitoides de plagas agrícolas) y también para invertebrados acuáticos (Pisa *et al.*, 2015; Sánchez-Bayo *et al.*, 2016)

El estudio más reciente disponible en la bibliografía sobre niveles de residuos de plaguicidas en esta zona, indica que en aguas de drenajes de áreas cultivadas se detectan residuos de plaguicidas desde octubre hasta febrero de cada año (Loewy *et al.*, 2011).

A partir de datos provistos por el SENASA (2013-2016) se encontraron residuos de ACE en pera y manzana (Tabla 5) en cultivos de Salta, Chaco, Tucumán, Misiones, Santa Fe, Córdoba, Mendoza, Buenos Aires, La Pampa, Neuquén y Río Negro. El hecho de que no existan o no se encuentren datos asociados a concentraciones de ACE en el ambiente acuático no implica que el plaguicida no se encuentre presente. En otras partes del mundo (Texas, EEUU) se detectaron concentraciones de ACE de hasta 44,1 µg L⁻¹ (Anderson *et al.*, 2013).

En Patagonia Norte se utiliza principalmente ACE para el control de distintas plagas como la carpocapsa, insecto que afecta la producción de peras y manzanas (INTA, 2019).

En este contexto, para el desarrollo de este trabajo de tesis se seleccionó un formulado comercial del NEO ACE, Assail®, para estudiar su toxicidad en organismos no blancos.

Tabla 5: Registros de residuos de los IA de los plaguicidas metilazinfos, carbaril y ACE provistos por el SENASA (2013-2016) (VATOXA, 2016) en pera y manzana.

EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA	METILAZINFOS		CARBARIL		ACETAMIPRID	
	MANZANA	PERA	MANZANA	PERA	MANZANA	PERA
SALTA						X
CHACO		X				
TUCUMAN					X	X
MISIONES	X					X
SANTA FE	X				X	X
CORDOBA					X	X
MENDOZA	X	X		X	X	X
BUENOS AIRES					X	X
LA PAMPA						X
NEUQUÉN						X
RIO NEGRO	X		X		X	

3.2 PLACENTA HUMANA

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

El proceso de gestación comienza luego de la fecundación del óvulo, donde se reinicia la meiosis y los pronúcleos masculino y femenino se fusionan originándose el cigoto. De esta manera, mientras el embrión es transportado por el oviducto hacia el útero, se inicia el desarrollo embrionario. En los seres humanos, los embriones llegan al útero al quinto día de la fecundación y comienzan su diferenciación al estadio de blastocisto, lo que deberá ocurrir de manera sincronizada con la regulación hormonal que se da en el tejido uterino para permitir la implantación. Este proceso dará origen a la relación íntima que mantienen los tejidos maternos y fetales durante la gestación.

El blastocisto está formado por dos tipos celulares: el macizo celular interno, que dará origen al embrión propiamente dicho, y las células del trofoblasto, que invadirán el estroma materno hasta alcanzar las arterias espiraladas, y desarrollarán posteriormente la parte fetal de la placenta. De esta manera, la implantación se define como el proceso de invasión del endometrio materno por las células del trofoblasto en el que se establece una comunicación física y molecular entre la madre y el embrión. Durante este proceso, el trofoblasto desarrolla funciones fundamentales, como la invasión, la migración y la diferenciación para formar la parte fetal de la placenta (Staun -Ram *et al.*, 2005).

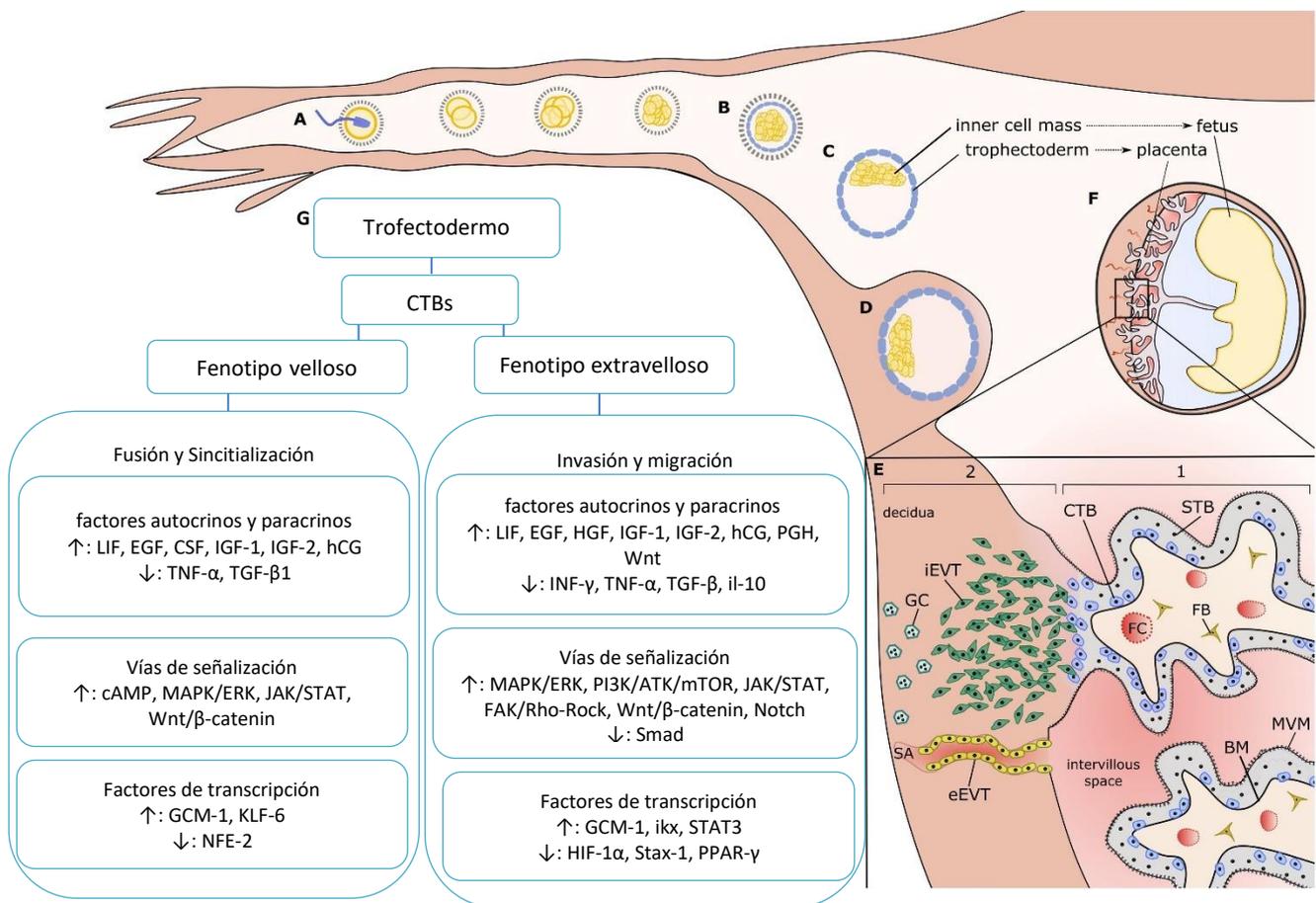
En paralelo, ocurre la diferenciación de los fibroblastos del estroma endometrial en células deciduales, los cuales darán origen a la parte materna de la placenta.

La gestación temprana culmina con el desarrollo completo de la placenta, la cual a partir de este momento será la encargada de suplir las demandas metabólicas del embrión durante el resto del embarazo.

Con respecto al transporte de compuestos, la placenta tiene funciones conflictivas, ya que debe garantizar un suministro adecuado de nutrientes, hormonas y otros compuestos endógenos para el feto en desarrollo, al mismo tiempo que proporciona una barrera a los agentes peligrosos que circulan en la sangre materna. Este conflicto se resuelve parcialmente mediante la organización y la arquitectura del principal elemento unitario de la barrera placentaria, el sincitiotrofoblasto (STB).

Tras la implantación, las células citotrofoblásticas (CTB) se derivan del trofotodermo, la capa más externa del blastocisto. De naturaleza altamente proliferativa, dan lugar a células trofoblásticas de dos fenotipos: el fenotipo veloso que se distingue por la fusión celular a STB multinucleado terminalmente diferenciado y el fenotipo extraveloso caracterizado por células CTB que se desprenden de las velosidades placentarias y se diferencian en trofoblastos intersticiales (iEVT), invadiendo decidua o trofoblastos endovasculares (eEVT), que participan en la remodelación de las arterias espirales maternas (Chang *et al.*, 2018). Ver Figura 6.

Figura 6: Representación esquemática de la embriogénesis humana, la formación de placenta y las principales vías reguladoras implicadas. A) Tras la fertilización por un espermatozoide, el óvulo se convierte en un cigoto y comienza a dividirse. B) Después de múltiples etapas de división, las células comienzan a diferenciarse en trofotodermo (azul) y masa celular interna (amarillo). C) En este punto, la masa celular interna se agrupa en un extremo, dejando una cavidad en el otro, y esta estructura ahora se llama blastocisto. D) El revestimiento endometrial comienza a proliferar y hace contacto directo con los CTB. E1) La proliferación y diferenciación por fusión da lugar a una capa STB multinucleada, bordeada por membrana de microvellosidades (MVM) que mira hacia la madre y la membrana basal (BM) hacia el feto. Estructuralmente cubre las vellosidades flotantes bañadas en sangre materna y crea la parte crucial de la barrera placentaria. E2) La proliferación por desprendimiento de la membrana basal y migración a la decidua da lugar a trofoblastos extravelosos (EVT). F) Tras la placentación exitosa, las células diferenciadas dan lugar a la placenta y al feto. G) Principales factores autocrinos y paracrinos, vías de señalización y factores de transcripción que regulan la fusión e invasión/migración del trofoblasto (Adaptado de Staud & Karahoda, 2018).



El funcionamiento apropiado de la placenta es un pre-requisito para un embarazo saludable; las sustancias que interfieran con las funciones de este órgano podrían representar un riesgo para la madre y el feto. Un embarazo exitoso requiere de una adecuada cooperación entre los compartimentos materno, placentario y fetal. Una placenta bien desarrollada con

una óptima interacción materno-fetal asegura la llegada de nutrientes al feto, la remoción de productos de deshecho y la producción de hormonas esenciales para el mantenimiento del embarazo, la mantención de un ambiente inmunológico benéfico para el desarrollo fetal. Una alteración en la diferenciación del CTB puede llevar a enfermedades durante el embarazo, tales como preeclampsia. Una hipoxia persistente junto con un incremento de HIF-1 (factor inducible por hipoxia, se considera el principal regulador transcripcional de la respuesta celular y del desarrollo a la hipoxia) y TNF- α (factor de necrosis tumoral) inducen una disminución de la sincitialización y como consecuencia de un aumento de la apoptosis (Lunghi *et al.*, 2007)

Debido a la complejidad y diversidad de las funciones desarrolladas por la placenta, se ha propuesto a este órgano como herramienta para biomonitorrear, investigar y predecir aspectos de la toxicidad durante el desarrollo (Myllynen *et al.*, 2005).

Una de las dificultades que se enfrenta al realizar estudios que involucran exposición en humanos, es la dificultad para lograr asociaciones entre la exposición y sus efectos, sobre todo cuando se trata de exposiciones a contaminantes que se encuentran a bajos niveles en el ambiente. Una excelente herramienta que permite indagar sobre posibles efectos a bajas concentraciones, son los modelos de exposición *in vitro* de líneas celulares humanas. Las líneas celulares de trofoblasto humano se han utilizado ampliamente para investigar los efectos *in vitro* de los xenobióticos en la placenta (Guiñazú *et al.*, 2012; Dominguez-López *et al.*, 2014; Mannelli *et al.*, 2015).

En este trabajo se trabajó con la línea celular HTR-8/SVneo que se deriva de placenta normal del primer trimestre. Las mismas, se utilizan ampliamente para estudiar múltiples procesos fisiológicos, incluida la diferenciación, adhesión, migración e implantación del trofoblasto. La línea celular HTR-8/SVneo contiene una población heterogénea de células con diferentes fenotipos. Se generó utilizando citotrofoblastos extravellosos recién aislados de la placenta del primer trimestre y se transfectó con un plásmido que contenía el antígeno T grande del virus simio 40 (Abou-Kheir *et al.*, 2016).

3.2.1 ANTECEDENTES DE EFECTOS DE PLAGUICIDAS EN ADULTOS Y NIÑOS

Una investigación en California determinó que la exposición ambiental en los niños tiene consecuencias neurológicas. El estudio duró 12 años en los que se documentó cómo la salud de niños se deteriora con la exposición diaria a los agroquímicos. El estudio fue desarrollado por el Centro para la Evaluación de la Salud de la Madre y el Niño de Salinas. Las conclusiones fueron que los niños expuestos a los agrotóxicos durante la infancia, incluso durante la

gestación, tienen “efectos alarmantes” en la salud. A medida que crecen se acrecientan los problemas de aprendizaje y atención (Eskenazi *et al.*, 2004).

En otro estudio realizado en Shangai, se investigó la relación entre los niveles de exposición a plaguicidas OF en mujeres embarazadas y sus posibles efectos adversos en la salud perinatal. Se encontraron niveles altos de plaguicidas OF en la orina de las mujeres embarazadas; se observó que un alto nivel de plaguicidas afectaba adversamente la duración de la gestación, no encontraron relación entre el crecimiento fetal y la exposición a plaguicidas OF. Dado que los niveles de plaguicidas en la orina materna en Shanghai eran mucho más altos que los reportados en los países desarrollados, sugieren la realización de más estudios sobre los efectos de la exposición a OF en el útero respecto al crecimiento fetal y el desarrollo neurológico del niño (Wang *et al.*, 2012)

Un estudio realizado en el Alto Valle por investigadoras de las Universidades Nacional del Comahue y de Buenos Aires concluyó que la exposición residencial a plaguicidas en el área rural tiene impacto sobre los embarazos en el tercer mes de gestación. Se arribó a la conclusión que hay una disminución del peso del neonato, una alteración en la fragilidad de los glóbulos rojos y una disminución de la actividad de defensa antioxidante de estas células y daño en el ADN de los linfocitos en los grupos rurales expuestos ambientalmente (Quintana *et al.*, 2017).

Los datos sobre toxicidad por neonicotinoides son escasos cuando se habla de seres humanos; sin embargo, algunos reportes de casos coinciden en que las manifestaciones de toxicidad varían desde casos leves de taquicardia, hipertensión, midriasis, somnolencia, náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea, hasta casos severos como falla ventilatoria, coma, convulsiones, arritmias ventriculares e, incluso, la muerte (David *et al.*, 2007; Shadnia *et al.*, 2008; Mohamed *et al.*, 2009; Phua *et al.*, 2009; Karatas, 2009; Imamura *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO CON EL PLAGUICIDA

Para el cultivo y el tratamiento con el plaguicida se utilizó la línea celular de trofoblastos del primer trimestre HTR-8/SVneo que fue donada por la Dra. Alicia Damiano (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), suplementado con 5% de suero de bovino fetal (SBF) (NATOCOR, Córdoba, Argentina), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (GIBCO, Carlsbad, CA, EE. UU.), a 37°C en 5% de dióxido de carbono. Se colocaron 10⁶ células en placas de Petri de 100 mm y se incubaron en condiciones estándar de cultivo celular hasta lograr una confluencia del 80-90%. Se lavaron dos veces en PBS pH 7,4 y se colocaron en placas de 6 y 24 wells. Las células se trataron con tripsina al 0,1%/ EDTA (GIBCO, Carlsbad, CA, EE. UU.).

El formulado Assail® se disolvió en DMSO a concentraciones de 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 µM y las células se trataron durante 24 horas a estas concentraciones, como control se trataron las células con DMSO (0,02%).

4.2 NIVELES DE EXPRESION DE ENZIMAS CITOCROMO P450

4.2.1 EXTRACCION DE ARN Y OBTENCIÓN DE ADNc

Para el estudio de la expresión basal de las enzimas CYP1A1, 1A2, 3A4, 2D6, 2B6, 2C19 en el trofoblasto, se realizó la extracción de ARN utilizando el reactivo Trizol®(Invitrogen) en cultivos celulares de HTR-8/SVneo (expuestos al formulado comercial Assail® durante 24 horas) y en muestras de placentas, siguiendo el protocolo del fabricante.

Se determinó la pureza y concentración del ARN extraído midiendo la relación entre las absorbancias a 260/280 nm (UV/vis 16030 Shimadzu). A partir del ARN se sintetizó ADNc, utilizando el kit de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para lo cual se retro-transcribieron 2 µg de ARN en un volumen final de 20 µL. Se utilizaron 3 µL del primer Oligo-DT (PB-L) 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 (Thermo Scientific), 0,1 µL de inhibidor de ARNasa (Thermo Fisher), 0,3 µL de la enzima transcriptasa reversa (M-MLV (Invitrogen)), 4 µL de buffer transcriptasa reversa (Invitrogen) y 2,1 µL de agua DEPC. Luego se continuó el baño seco a 70°C por 10 minutos. El ADNc sintetizado fue conservado a -20 °C hasta su utilización.

4.2.2 NIVELES DE EXPRESIÓN DE CYP POR PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una técnica cualitativa cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. Este proceso se lleva a cabo mediante ciclos alternados de temperaturas altas y bajas, que permiten separar las hebras de ADN formadas entre sí tras cada fase de replicación y la unión nuevamente de estas hebras al contar con la presencia de cebadores o “primers” específicos, nucleótidos y la enzima polimerasa.

Con una mezcla de ADNc obtenido se realizó la amplificación con la técnica PCR usando los primers descritos en la Tabla 6. Utilizando un termociclador, se setearon las condiciones de amplificación para las distintas isoformas de CYP: 1 ciclo a 95°C por 3 min; 35 ciclos a 95°C por 30 seg, 57°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 6: Primers utilizados en la técnica RT-PCR

Primer	Secuencia (Forward y Reverse)	Peso (pb)
CYP2B6	F: 5'- CCC CAA GGA CAC AGA AGT ATT TC -3' R: 5'- GAT TGA AGG CGT CTG GTT TTT C -3'	83
CYP3A4	F: 5'- GAT TGA CTC TCA GAA TTC AAA AGA AAC TGA -3' R: 5'- GGT GAG TGG CCA GTT CAT ACA TAA TG -3'	149
CYP2C19	F: 5'- CTT TCA TCC TGG GCT GTG CT -3' R: 5'- CGG GAA ATA ATC AAT GAT AGT GGG -3'	196
CYP1A1	F: 5'- GTC ATC TGT GCC ATT TGC TTT G -3' R: 5'- CAA CCA CCT CCC CGA AAT TAT T -3'	97
CYP1A2	F: 5'- CAT CCC CCA CAG CAC AAC AA -3' R: 5'- TCC CAC TTG GCC AGG ACT TC -3'	246
CYP2D6	F: 5'- CCT ACG CTT CCA AAA GGC TTT -3' R: 5'- AGA GAA CAG GTC AGC CAC CAC T -3'	193
Control interno: Ciclofilina	F: 5'- GTC AAC CCC ACC GTG TTC TT -3' R: 5'- CTG CTG TCT TTG GGA CCT TGT -3'	97

Lo siguiente fue realizar otra PCR convencional para evaluar la expresión de la isoforma CYP1A1 utilizando el ADNc a las concentraciones testeadas en las 24 horas de exposición (0,01

μM, 0,1 μM, 1 μM, 10 μM y 100 μM) y un tercer ensayo para las isoformas CYP1A1, 1A2, 3A4, 2D6, 2B6, 2C19 en mezcla de ADNc de placenta, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Los productos de las PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% con tinción con el colorante Gel Red. Se sembraron 10 μL de muestra con 4 μL de loading buffer en cada pocillo del gel, se utilizó un marcador de peso de 100 pb (PB-L). 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 se estimaron mediante análisis de densitometría utilizando el programa Gel Pro Analyzer 3.2.

4.2.3 NIVELES DE EXPRESIÓN DE CYP POR PCR CUANTITATIVA (qPCR)

La expresión de los genes de las enzimas del complejo CYP fue determinada empleando el ensayo de qPCR en el Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf). Para ello, 5 μl de una dilución 1:12,5 de cada muestra fue amplificada en un volumen final de reacción de 15 μl, conteniendo el reactivo IQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), primers específicos y agua DEPC. El gen del polipéptido zeta de la proteína de activación de tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa (YWHAZ) fue empleado como control interno para normalizar la expresión de los genes de interés. Las especificaciones de los primers se encuentran detalladas en la Tabla 7.

Tabla 7: Primers utilizados en la técnica de qPCR

Primer	Secuencia (Forward y Reverse)	Tamaño del producto (pb)
CYP1A1	F: 5´- GTC ATC TGT GCC ATT TGC TTT G -3´ R: 5´- CAA CCA CCT CCC CGA AAT TAT T -3´	97
YWHAZ	F: 5´-CCTGCATGAAGTCTGTAAGTACTGAG-3´ R: 5´- TTGAGACGACCCTCCAAGATG-3´	120

Se estudió la eficiencia de los primers, las mismas alcanzaron el 100%. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos de amplificación, los cuales consistieron en 95°C por 15 segundos seguido de 60°C por 60 segundos. Se realizó también el análisis de las curvas de disociación. Todas las reacciones de qPCR fueron realizadas en triplicados y controles sin molde fueron incluidos. Los productos de

qPCR fueron confirmados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain. La expresión relativa de los genes fue calculada mediante el método para cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CYP1A1

Para determinar la actividad de CYP1A1, inicialmente las células se cultivaron y se expusieron a los tratamientos con Assail® con la metodología ya descrita, en una placa de 24 pocillos, ver Tabla 8. Se prosiguió retirando los estímulos y añadiendo a cada pocillo, la solución incubadora 10 μ M, compuesta por 7-etoxicumarina (Técnica ECOD: etoxicumarina-O-deetilasa) como sustrato de CYP1A1 en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) sin SBF. Luego se llevó a incubadora en condiciones estándar de cultivo celular por 30 minutos, y se colocó un volumen de sobrenadante de cada pocillo en una placa negra de 96 pocillos por duplicado, se añadió la solución de frenado (buffer glicina 0,1mM y etanol en relación 1:1, pH 10,4). Luego se le colocó papel aluminio para trabajar en oscuridad.

Tabla 8: Esquema de cargado de placa 24 pocillos con los tratamientos.

	1	2	3	4	5	6	
A	DMSO	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	24 horas
B	DMSO	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	24 horas
C	DMSO	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	48 horas
D	DMSO	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	48 horas

Se practicaron 3 ensayos ECOD, las condiciones se expresan en la Tabla 9.

La fluorescencia de las muestras se midió a 380 nm de excitación y 460 nm de emisión en un fluorómetro (Hitachi F-7000 Fluorescence Spectrophotometer) a 30 minutos, 1 hora y 4 horas de incubación.

Tabla 9: Condiciones y tiempos de exposición de los tres ensayos ECOD realizados.

ECOD	N° cél./pocillo	Volumen solución incubadora (µL/pocillo)	Volumen sobrenadante (µL/pocillo)	Volumen solución de frenado (µL/pocillo)	Tiempo exposición a los tratamientos (horas)
1	500.000	500	75	100	24 y 48
2	200.000	350	100	100	24
3	300.000	350	100	100	24

4.4 ANALISIS ESTADISTICO

Todos los datos fueron obtenidos de por lo menos dos replicas biológicas y los resultados fueron mostrados como promedio \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por medio de Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnet como prueba a posteriori para evaluar diferencias significativas en comparación al control de tratamientos. Un nivel de significancia de 5% ($p < 0,05$) fue seleccionado para evaluar diferencias significativas. El análisis estadístico y los gráficos de barras fueron realizados con el software GraphPad Prism v5.

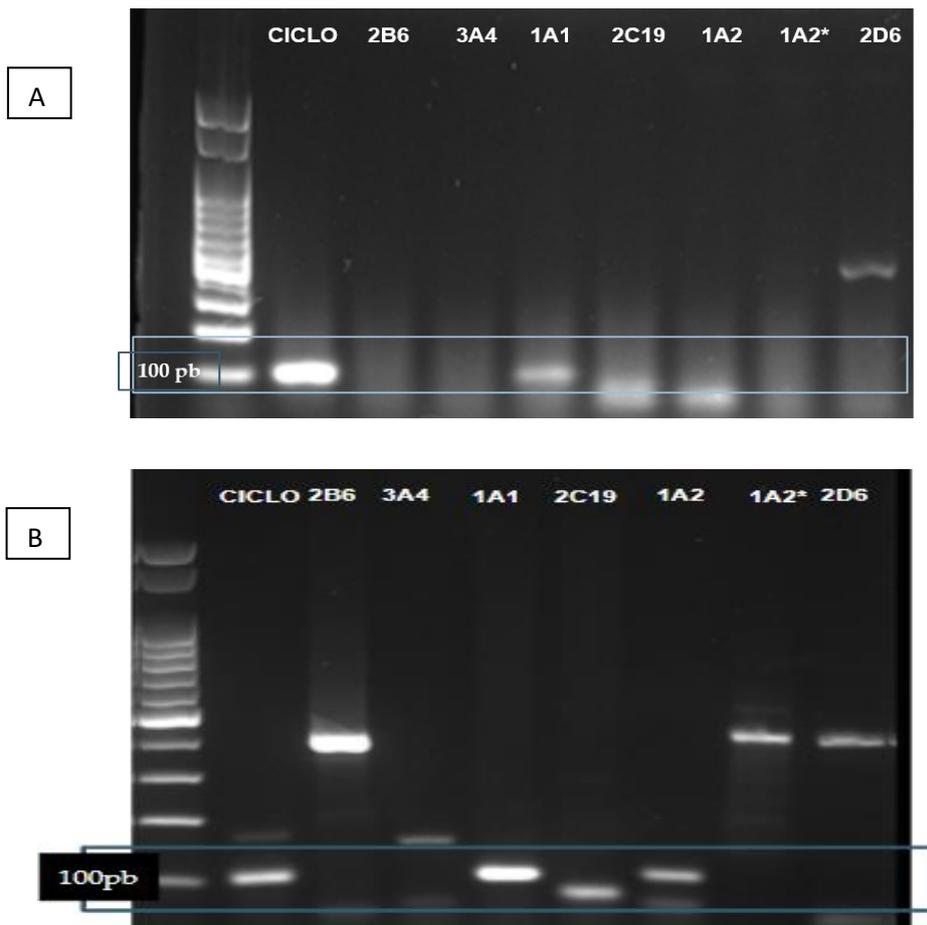
5. RESULTADOS

5.1 EXPRESION DE ENZIMAS CITOCROMO P450 EN CÉLULAS HTR-8/SVneo Y EN PLACENTA

El estudio de las isoformas de las enzimas del complejo CYP: CYP1A1, 1A2, 3A4, 2D6, 2B6, 2C19 se llevó a cabo en una mezcla de ADNc de trofoblastos HTR-8/SVneo y en placenta por PCR cualitativa como se describió en 4.3.2.

Se observó la expresión de CYP1A1 (97 pb) en la muestra de ADNc de trofoblastos HTR-8/SVneo y en placenta, como demuestra la Figura 7 a y b. Mientras que con los demás primers testeados no se obtuvieron los productos en los pesos correspondientes para los pares de bases esperados.

Figura 7: (A) Productos de amplificación de CYP en trofoblastos HTR-8/SVneo (B) Productos de amplificación de CYP en placenta. Se estudió el producto de amplificación de CYP 2B6, 2B6,1A1, 2C19, 1A2, 1A2 y 2D6, se evaluó la presencia de productos específicos e inespecíficos por medio de PCR convencional visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Fuente: Propia.*

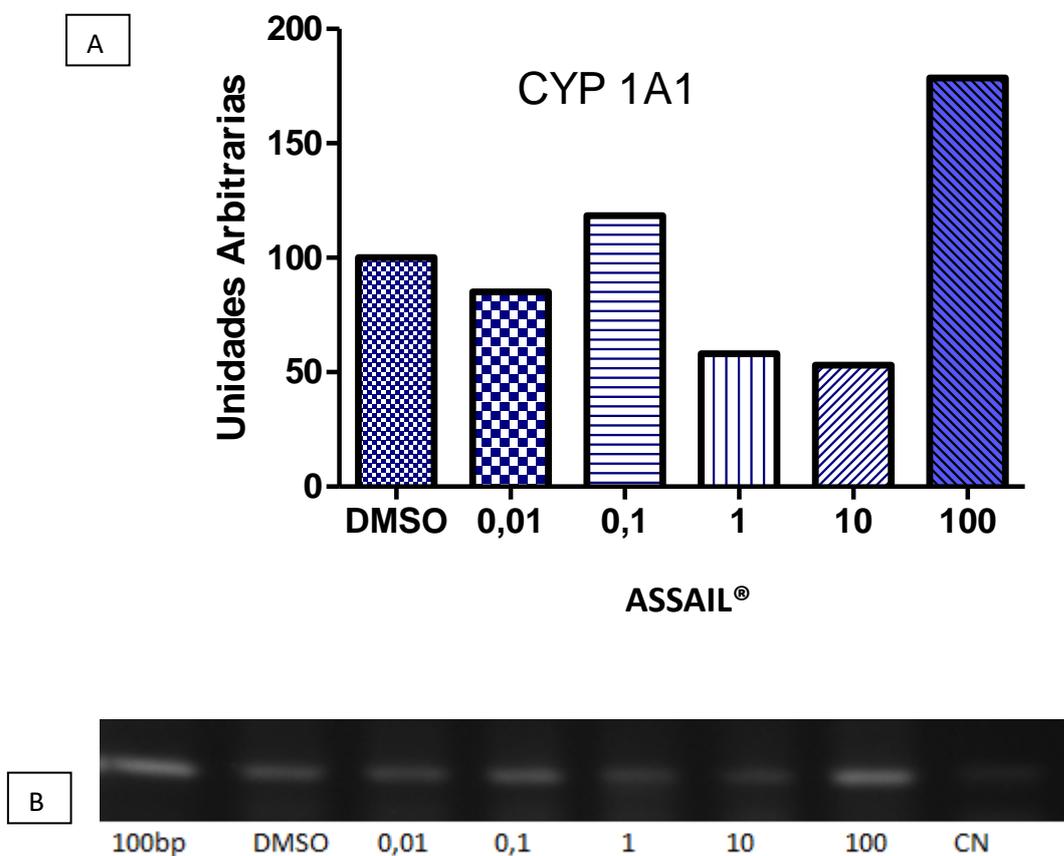


Ciclo, corresponde al estándar interno de expresión positiva ciclofilina.

5.2 EXPRESION DE CYP1A1 EN CÉLULAS HTR-8/SVneo MEDIANTE PCR

Con el ADNc obtenido de los cultivos celulares de trofoblastos HTR-8/SVneo, expuestos al formulado comercial Assail® durante 24 horas, se procedió a realizar una PCR cualitativa obteniéndose los resultados observados en la Figura 8.

Figura 8: Expresión relativa del transcripto para CYP1A1 en trofoblastos HTR-8/SVneo. Efecto de Assail® (0,01-100 µM) en los niveles del transcripto para CYP1A1 determinado por PCR convencional luego de 24 horas de exposición al insecticida. La expresión del ARNm fue representada como intensidades relativas comparados al control (A) mediante programa Gel Pro; (B) visualización por electroforesis en gel de agarosa al 2%.



Se observó un aumento de la expresión de CYP1A1 en las células expuestas a concentraciones de 0,1 µM y 100 µM de Assail®, respecto al control. Cabe aclarar que los resultados corresponden a un único experimento.

5.3 EXPRESION DE CYP1A1 EN CÉLULAS HTR-8/SVneo mediante qPCR

Se evaluaron los niveles de expresión de CYP1A1 en células HTR8 tratadas con Assail® durante 24 horas mediante qPCR.

Primero se evaluó la eficiencia de primers específicos para CYP1A1 como así también para el gen estándar interno YWHAZ.

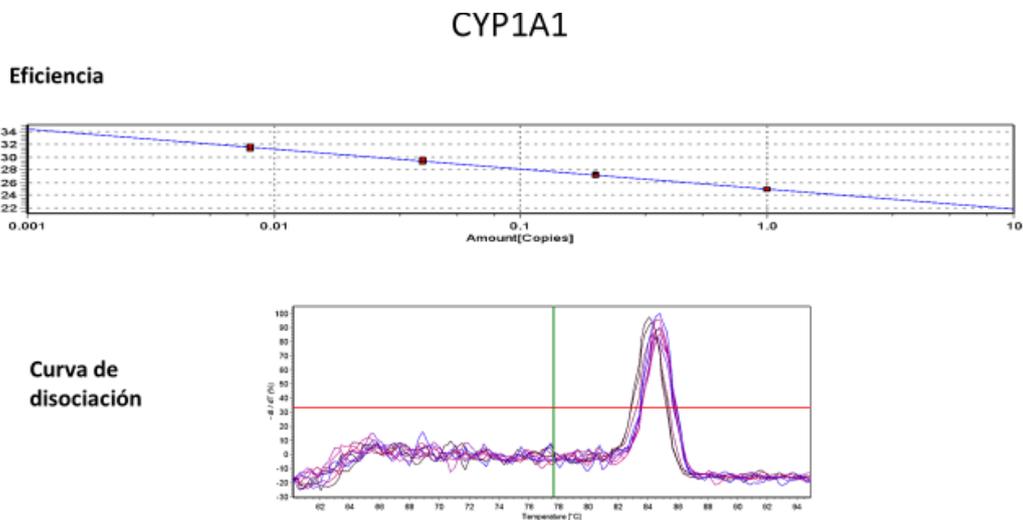
La Tabla 10 resume la eficiencia de cada par de primers y los coeficientes de determinación para cada ajuste lineal.

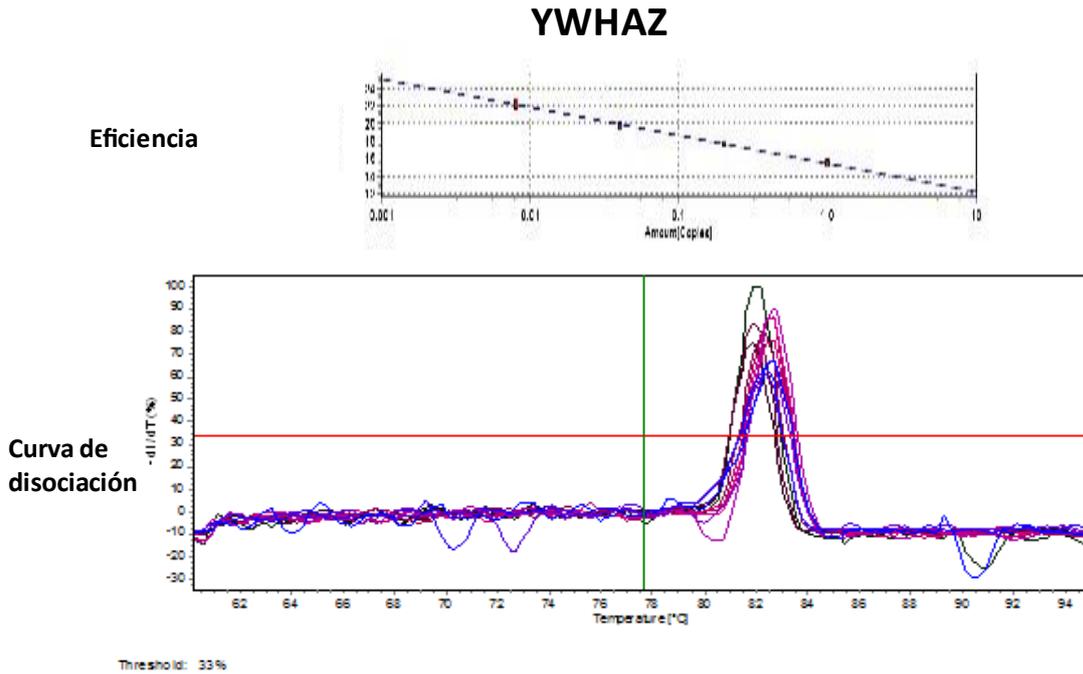
Tabla 10: Eficiencias y coeficientes de determinación (R^2) de primers específicos y endógenos.

Gen	Eficiencia	R^2
CYP1A1	1,09	0,992
YWHAZ	1,05	0,995

La Figura 9 muestra los resultados de los ajustes de las curvas de calibración para los primers estudiados y la especificidad de los productos a través de curvas de disociación.

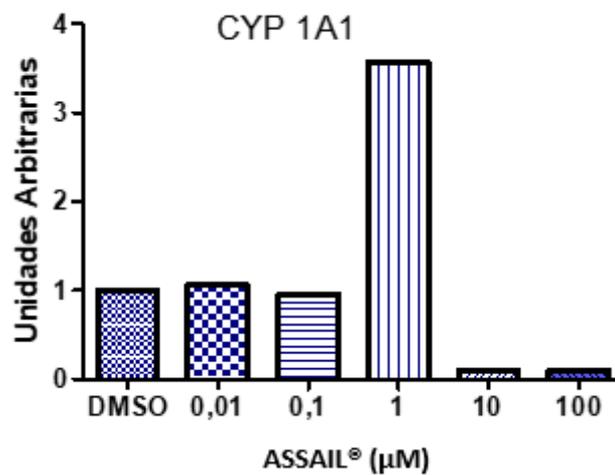
Figura 9: Puesta a punto de primers específicos de CYP1A1. Evaluación de eficiencia y especificidad del cebador específico en cuanto a ajustes lineales y curva de disociación para CYP1A1 e YWHAZ (gen estándar) en trofoblastos HTR-8/SVneo. Fuente: Propia.





Una vez obtenida la eficiencia de los primers se realizó una qPCR, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 10 para el experimento de exposición a distintas concentraciones de Assail® durante 24 horas.

Figura 10: Expresión relativa del transcripto para CYP1A1 en trofoblastos HTR-8/SVneo. Efecto de Assail® (0,01-100 µM) en los niveles del transcripto para CYP1A1, determinado por qPCR luego de 24 h de exposición al insecticida. La expresión del ARNm fue representada como valores relativos comparados al control un experimento. Fuente: Propia.



Se observó un aumento de expresión de CYP1A1 a la concentración de 1 μM de Assail®, respecto al control. Los resultados mostrados corresponden a un único experimento.

Al igual que para la PCR cualitativa, en este caso tampoco se pudieron realizar repeticiones del ensayo debido a las medidas de aislamiento dictadas durante el año 2020, por pandemia virus SARS-CoV 2, considerando el cierre total de la universidad.

5.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Al evaluar la actividad de CYP1A1, por ensayo ECOD, los valores de la actividad fueron muy bajos. Se observó en las lecturas de fluorescencia realizadas a los 30 minutos, un aumento no significativo de la actividad enzimática a las concentraciones 0,1 μM y 1 μM de Assail® (valores no mostrados). En la mayoría de las lecturas de fluorescencia a 1 y 4 horas fue prácticamente indetectable la actividad enzimática. Otras condiciones del ensayo que no se realizaron, podrían haber mejorado la detección de la actividad enzimática.

6. DISCUSIÓN

Actualmente hay un uso global generalizado de NEO, acumulándose en suelos (Goulson, 2013), agua potable (Seccia *et al.*, 2005), verduras y frutas (Xie *et al.*, 2011), leche bovina (Seccia *et al.*, 2008). Adicionalmente, los NEO son insecticidas sistémicos, es decir se distribuyen en todas las partes de la planta. En conjunto, los usos y sus características determinan que en nuestra vida diaria estemos expuestos a estos compuestos o a sus metabolitos. En nuestro país se encuentran aprobados para su uso numerosos formulados comerciales que contienen NEO para la sanidad vegetal, como ACE e imidacloprid, entre otros (SENASA, 1999).

La exposición a NEO en la población general se da por principalmente por la ingestión de estos, particularmente por su presencia en alimentos, y si bien muchas organizaciones internacionales intentan establecer directivas para disminuir el nivel de los NEO, los niveles aceptables varían de país a país. Por ejemplo, los límites máximos de residuos (LMR) en el té de imidacloprid es de 0,5 mg/kg en China, que es 10 veces superior a la de la Unión Europea (0,05 mg/kg) (Han, 2018)

Como se ha mencionado, existe una asociación positiva entre exposición de las madres al imidacloprid durante el embarazo y efectos adversos al momento del nacimiento. Yang y col. relacionaron la exposición de madres a imidacloprid con anencefalia basado en 73 casos de anencefalia (6 expuestos / 67 no expuestos) de Valle de San Joaquín de California (Yang *et al.*, 2014). Por otra parte, la exposición prenatal y en la vida temprana a plaguicidas, ha sido una preocupación creciente en relación con el desarrollo neurológico o neurocognitivo de los niños. Algunos estudios han descrito asociaciones entre trastorno de espectro autista (TEA) y la exposición a imidacloprid, un NEO de uso doméstico utilizado para tratamiento contra pulgas y garrapatas en mascotas. Las probabilidades de que los niños desarrollen TEA fueron ligeramente más altas en niños expuestos durante el período prenatal (n=407) a imidacloprid con respecto a los controles (n=262) que presentaron un neurodesarrollo normal (Keil *et al.*, 2014).

En cuanto a la exposición laboral a NEO en aplicadores de plaguicidas, se correlacionó en una región de Grecia la frecuencia en la aplicación de NEO con el daño oxidativo del ADN en la sangre de los aplicadores (Koureas *et al.*, 2014); disfunción pulmonar (Hernandez *et al.*, 2008); y la prevalencia de síntomas neurológicos, que fueron asociados positivamente con concentraciones de un metabolito de ACE en orina (Marfo *et al.*, 2015) como así también se

asoció la presencia de NEO con problemas en la salud reproductiva (Gu *et al.*, 2013).

En otro estudio, se evaluó en muestras de orina de niños japoneses, presencia de siete NEO (ACE, clotianidina, dinotefurano, tiacloprid, tiametoxam, imidacloprid, andnitenpiram); cuatro metabolitos de OF (dialquifosfatos [DAP]), incluyendo dimetilfo-esfato, tiofosfato de dimetilo, fosfato de dietilo y tiofosfato de dietilo; y tres metabolitos de piretroides -PYR (Ácido 3-fenoxibenzoico, ácido trans-crisantemo dicarboxílico y 3- (2,2-diclorovinil) -2,2-di-ácido metilciclopropanocarboxílico). Se demostró que las concentraciones de Σ NEO estaban correlacionadas con todas las concentraciones de DAP para ambos sexos, pero no se correlacionan con ningún metabolito PYR, sugiriendo que las fuentes de exposición humana a los NEO pueden ser similares a los de los OP. En vista de que la coexposición de NEO y OP parece ocurrir en nuestra vida diaria se sugiere la necesidad de realizar de estudios epidemiológicos para evaluar exposición crónica a bajas dosis en niños (Osaka *et al.*, 2016).

La familia de las enzimas CYP son las responsables del metabolismo de compuestos exógenos sometiéndolos primero a una fase I donde son transformados enzimáticamente a formas más polares. Representan la mayoría de las enzimas de fase I en el organismo (115 genes y pseudogenes) y desempeñan funciones críticas en el metabolismo de xenobióticos y vías endógenas (por ejemplo, carbohidratos, ácidos grasos, colesterol, ácido retinoico y metabolismo/biosíntesis de esteroides). Las CYP se expresan predominantemente en el hígado, pero también se expresan en otros órganos, donde encuentran directamente sustancias extrañas (por ejemplo, intestino delgado, intestino, riñones, pulmón y tejido adiposo). Durante el embarazo, el feto se desarrolla de forma rápida y generalmente es más inmaduro en comparación con el adulto en su capacidad para metabolizar compuestos (Robinson *et al.*, 2020).

La actividad de las enzimas CYP puede ser analizada mediante distintas estrategias, por ejemplo, la medición de las actividades de etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD) y etoxicumarina-O-deetilasa (ECOD). El sistema del CYP desempeña un papel clave en el metabolismo de los compuestos xenobióticos, siendo la vía más importante en la placenta humana (Stejskalová, 2013). Aunque se sabe que la actividad de EROD es específica para la isoforma CYP1, la expresión de ARNm de CYP1A2 y CYP1B1 es insignificante en comparación con CYP1A1 en trofoblasto placentario a término y el ARNm de CYP1B1 no es inducible en células placentarias, Lucie Stejskalová *et al.* (2013) suponen que la actividad de EROD podría representar la actividad específica de CYP1A1 en trofoblasto placentario. En este sentido, las actividades de la ECOD, la EROD y la pentoxirresorufina-O-dealquilasa (PROD), permiten realizar mediciones

indirectas del sistema CYP (Gagnaire *et al.*, 2010).

En este trabajo de tesis se estudió el efecto de los NEO tanto en cultivos celulares de trofoblastos del primer trimestre de gestación (línea celular de trofoblasto humano HTR-8/SVneo) como en placentas. Estudiamos la actividad de las enzimas del sistema CYP en cultivo de trofoblasto humano después de la exposición a ACE. El ensayo de actividad ECOD llevado a cabo en la tesis no dio valores detectables en las condiciones utilizadas. Debería haberse repetido variando los parámetros o utilizando otro marcador como EROD, ya que se han informado diferentes respuestas en la inducción de la actividad ECOD/ EROD /PROD para los mismos xenobióticos en cultivos primarios de hepatocitos según sea el marcador utilizado (Fontaine *et al.*, 1998).

Se sabe que la expresión de CYP1A1 está controlada principalmente por ligandos del receptor de hidrocarburos arilo (AHR), que los glucocorticoides aumentaron significativamente la actividad enzimática con EROD en cultivos de trofoblasto, pero no tendrían ningún efecto sobre la expresión de genes diana AHR por sí mismos, pero pueden potenciar la inducción de CYP1A1 en trofoblasto placentario a término (Stejskalová *et al.*, 2013). Esta evidencia indicaría que existe una intercomunicación celular entre los receptores AHR y GR (receptores de corticoides presentes en CTB y STB) en la regulación del gen CYP1A1 en placenta humana, puede tener importantes implicaciones clínicas y toxicológicas ya que muchas mujeres son tratadas con glucocorticoides durante el embarazo por diversas indicaciones (Lunghi *et al.*, 2010; Marciniak *et al.*, 2011) y la mayoría de las mujeres embarazadas están expuestas a ligandos AHR, ya sea por contaminación ambiental o por la dieta. Estos xenobióticos generalmente son metabolizados por CYP1A1 a compuestos reactivos y procarcinógenos que pueden formar aductos de ADN en la placenta y en el feto, pudiendo generar efectos adversos en el parto. (Stejskalová *et al.*, 2013)

En otro estudio evaluaron la actividad de CYP1A, CYP2E1 en 25 placentas de primer trimestre utilizando etoxiresorufina y clorzoxazona, 4-metilumbeliferona, detectaron actividad de CYP1A en todas las placentas muestreadas pero la actividad de CYP2E1 fue indetectable. La actividad de CYP1A se elevó significativamente en las placentas de las madres fumadoras ($P < 0.05$) y fueron mayores en mujeres que fumaban y bebían alcohol ($P < 0.05$ y $P < 0.01$ respectivamente). Las actividades enzimáticas se correlacionaron significativamente de forma negativa con la edad gestacional ($P < 0,05$, $r = 0,54$, UGT) y la edad materna ($P < 0,001$, $r = 0,63$, CYP1A) (Collier *et al.*, 2002).

Robinson (2020), al estudiar la actividad de la enzima del CYP humano vio que la misma, es

menor en el feto en comparación con el adulto; sin embargo, existen datos cuantitativos limitados con respecto a las diferencias específicas en magnitud o grado de inducibilidad que podría tener este complejo debido a factores ambientales (Robinson *et al.*, 2020).

En cuanto a la expresión de CYP implicados en la transformación xenobiótica, como 2E1, 3A4, 2C9, 2A6, 2C8; y 2B6, se expresan significativamente más en el hígado adulto en comparación con la placenta. Al tener en cuenta también la expresión en los distintos compartimientos (amnios, placa basal, corion, vellosidades y CTB) aislados de placentas de segundo trimestre y de placentas a término, se observó que la mayoría de los CYP fueron expresadas a niveles bajos en células y tejidos placentarios. Solo las CYP con funciones importantes en esteroidogénesis y metabolismo del colesterol, por ejemplo, 19A1 tendió a expresarse mayormente en la placa basal y vellosidades en comparación con el corion o el amnios. Las CYP específicas parecían mostrar diferencias en cuanto a su expresión dependiendo de la edad gestacional (segundo trimestre frente a placentas a término) dentro de compartimientos de tejido específicos (p. ej., 26B1, 2W1, 7B1 en el amnios).

Se sabe que, en los seres humanos, CYP1A1 y 1A2 comparten una región promotora bidireccional, ubicada en el cromosoma 15q24.1 y que biotransforman contaminantes comunes como los hidrocarburos arílicos policíclicos, aminas aromáticas y policlorados bifenilos en compuestos polares, promoviendo su excreción (Santes-Palacios *et al.*, 2016).

La familia CYP1A también es activa en el metabolismo endógeno de los ácidos grasos poliinsaturados y la transformación de ácido araquidónico a ácido 19-hidroxieicosatetraenoico (una molécula de señalización que induce aumentos de la presión arterial, vasoconstricción) y 17 β -estradiol. Debido a su inducibilidad, CYP1A1 ha sido investigado como un biomarcador de diversas exposiciones ambientales, incluido el humo del cigarrillo (Janssen, 2017; O’Shaughnessy, 2011), éteres de difenilo polibromado (PBDE) y niveles de bifenilos policlorados (PCB) se han correlacionado con diferencias genéticas polimórficas en actividad (Lind, 2014)

Al medir en muestras de sangre materna y de cordón umbilical, diversas sustancias químicas incluidos PCB, OC, PBDE, PBDE hidroxilados (OH-PBDE) y compuestos perfluorados (PFC) en suero y metales en sangre entera encontraron que las concentraciones de mercurio (Hg) y PBDE con menos bromo eran a menudo más altas en la sangre o el suero del cordón umbilical que en las muestras de la madre; mientras que para la mayoría de los PFC y el plomo (Pb), las concentraciones en sangre o suero del cordón umbilical fueron generalmente iguales o menores que su par materno lo que sugiere que para muchas sustancias químicas, los fetos

pueden experimentar exposiciones más altas que sus madres y resaltan la necesidad de caracterizar los riesgos potenciales para la salud e implementar políticas sanitarias destinadas a reducir las fuentes de exposición (Morello, 2016).

En este trabajo de tesis también se determinó la expresión de CYP1A1, por métodos de biología molecular, PCR convencional y RT-PCR cuantitativa. Mediante qPCR fue posible evaluar la eficiencia de los primers específicos para CYP1A1 en trofoblastos HTR-8/SVneo resultando en 1.09 con un R² de 0,99. Se observó un aumento en la expresión relativa del transcripto CYP1A1 en concentración 100 µM de ACE en trofoblastos HTR-8/SVneo al realizarlo en forma cualitativa (PCR convencional), mientras que para el mismo experimento al evaluar el efecto de ACE en 24 hs a distintas concentraciones en forma cuantitativa (RT-PCR) dio una mayor expresión en concentración 1 µM. Se observó entonces un aumento en la expresión analizada por ambas técnicas, aunque a distintas concentraciones. En este sentido, se deberían haber realizado al menos dos experimentos más para poder observar el comportamiento de las células a las distintas concentraciones de ACE, pero debido a las disposiciones de aislamiento impuestas por la pandemia COVID-19 hubo una restricción al acceso a los laboratorios.

Se ha confirmado la actividad funcional en la placenta para las enzimas CYP de fase I, en particular las isoformas CYP1A y CYP2E1 como así también se ha encontrado actividad en varias enzimas de fase II (Sulfotransferasas, glutatión-S-transferasas, uridina difosfateglucuronosiltransferasas y N-acetiltransferasa). Sin embargo, no se ha demostrado que estas enzimas jueguen un papel importante en la desintoxicación, con la excepción de la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa placentaria, que es capaz de desactivar los glucocorticoides tanto en la placenta como en la circulación fetal. Hukkanen *et al.* (1998) informaron que ni los ARNm de CYP1A1 ni CYP1A2 se expresan en muestras de endometrio, sin embargo, la familia CYP1 está modulada por ligandos del receptor de arilhidrocarburos (AhR), incluidos los contaminantes ambientales y humo de tabaco. Estos datos indican que existe una baja expresión de enzimas de fase I y II necesaria para la metabolización de fármacos en la placenta humana y en el endometrio (Bremer *et al.*, 2007). En estudios más recientes se ha visto una baja expresión de las enzimas CYP1A en el hígado fetal y en placentas recolectadas en segundo trimestre y a término no fueron detectadas por la técnica de RT-PCR (Robinson, 2020).

Por otra parte, se sabe que la enzima aromatasa (CYP19) en humanos sufre una regulación altamente específica de tejido y promotor. En el embarazo la placenta produce los estrógenos

necesarios para un embarazo saludable y constituyen el principal promotor del CYP19 placentario. La exposición a ciertos plaguicidas, como la atrazina, se asocia con un aumento de la expresión de CYP19, pero se sabe que insecticidas NEO como tiacloprid y tiametoxam inducen la expresión de CYP19 y la actividad de la aromatasa a concentraciones relativamente bajas (0,1-1,0 μM), mostrando curvas de concentración-respuesta no monotónicas con una disminución en la inducción génica y la actividad catalítica a concentraciones más altas en células H295R (carcinoma adrenocortical humano). Mientras que, ninguno de los NEO estudiados aumentó la expresión de CYP19 o la actividad de la aromatasa en las células HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical primaria) (Caron-Beaudoin, 2016).

Estos métodos de estudio como el análisis mediante RT-qPCR desarrollados en el último tiempo representan herramientas útiles para evaluar el riesgo que pueden representar los NEO y otras sustancias químicas en las mujeres embarazadas expuestas. Sería necesario ampliar los mismos en otras líneas celulares como JEG-3; BeWo, como así también en cultivos de explantos. La ventaja de las líneas celulares es que pueden propagarse indefinidamente *in vitro*, exhiben muchas similitudes, pero se han encontrado diferencias con respecto a la expresión génica específica del trofoblasto. Por estas razones se deberían confirmar con cultivos primarios (explantos) una vez establecidas las condiciones de cultivo en las líneas celulares. Tomando todas estas características en consideración, este sistema *in vitro* podría ser un modelo adecuado para el estudio de los efectos de los productos químicos que interfieren con los procesos involucrados en implantación (Bremer *et al.*, 2007).

Dentro de la familia CYP, se sabe que en mamíferos las enzimas CYP3A4, 2C19 y 2B6, convierten a los NEO TMX (tiametoxam) en CLT (clotianidina); CYP3A4, 2C19 y 2A6 metabolizan CLT a desmetil 1-CLT, y CYP2C19 convierte TMX en desmetil-TMX. Se vio que estas enzimas estaban involucradas en muchos sustratos NEO, que aumentaron o disminuyeron en diferentes partes del organismo de algunos mamíferos como el hígado y el cerebro. En otros estudios se consideró que, debido a esta actividad enzimática, NEO como TMX podrían ser hepatotóxicos y hepatocarcinogénicos. Como consecuencia la compleja actividad de las enzimas desintoxicantes en los mamíferos ya no estaría solamente asociada con su capacidad para proporcionar resistencia a los NEO, sino también con su capacidad para aumentar la toxicidad (Houchat *et al.*, 2020).

En este trabajo de tesis se estudió la expresión por PCR convencional de 2B6; 3A4; 2C19; 1A1; 1A2; 2D6 tanto en la línea celular de trofoblasto humano HTR-8/SVneo como en placentas, observando expresión solamente de 1A1. Dadas las condiciones sanitarias ya

mencionadas no se pudieron realizar otros experimentos para poder corroborar si las condiciones utilizadas eran las óptimas.

7. CONCLUSIONES

El NEO ACE afecta la expresión de CYP1A1 en trofoblastos de primer trimestre. El trofoblasto es la célula específica de la placenta y compuestos que lo alteren, podrían repercutir en un mal funcionamiento placentario. La inducción de CYP1A1, por los distintos métodos estudiados (cualitativo y cuantitativo) mostró diferencias para las distintas concentraciones de ACE. Esto puede relacionarse con implicaciones clínicas y toxicológicas que podrían sufrir las mujeres expuestas a estos plaguicidas durante el embarazo. Estos xenobióticos generalmente son metabolizados por CYP1A1 pudiendo formar aducto de ADN en la placenta y el feto. Como consecuencia, podemos suponer que el feto tiene mayor riesgo de resultados adversos al nacimiento ya que la actividad de *cyp1a1* se encuentra afectada por los NEO.

Es necesario ampliar este estudio utilizando otras líneas celulares como JEG-3 o cultivos de explantos y modificar las condiciones para la medición de la actividad enzimática de CYP1A1.

8. BIBLIOGRAFIA

Abou-Kheir W.; Barrak J.; Hadadeh O. & Daoud G. (2017). HTR-8/SVneo cell line contains a mixed population of cells. Placenta. Epub 2016 Dec 7. PMID: 28161053.

Álvarez V.H. (2010). Protocolo de vigilancia y control de intoxicaciones por plaguicidas. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, Colombia. pp. 46. Recuperado de https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/INTOXICACION_POR_PLAGUICIDAS.pdf

Anderson J.C.; Dubetz C. & Palace V.P. (2015). Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. Sci. Total Environ. 505, 409–422.

Anderson T.A.; Salice C.J.; Erickson R.A.; McMurry S.T.; Cox S.B. & Smith L.M. (2013). Effects of land use and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. Chemosphere, 92(1), 84–90.

Anguiano O.L.; Montagna M.C.; Ferrari A.; Soleno J.; Lascanoc. I.; Loewy R.M.; Pechén D’Angelo A.M. & Magnarelli G.G. (2011). Clasificación y toxicología de plaguicidas. Ed. Educo.

Baker H.; Frank O.; Deangelis B.; Feingold S. & Kaminetzky H.A. (1981). Role of placenta in maternal-fetal vitamin transfer in humans. Am. J. Obstet. Gynecol. 141, 792–796.

Bal R.; Türk G.; Tuzcu M.; Yilmaz O.; Kuloglu T.; Gundogdu R.; Gür S.; Agca A.; Ulas M.; Cambay Z.; Tuzcu Z.; Gencoglu H.; Guvenc M.; Ozsahin A.D.; Kocaman N.; Aslan A. & Etem E. (2012). Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats. J Environ Sci Health B. 47(5):434-44.

Baldwin K.V. & Racowsky C. (1987) Nicotine and cotinine effects on development of two-cell mouse embryos *in vitro*. Reprod Toxicol 1: 173–178.

Bass C.; Denholm I.; Williamson M.S. & Nauen R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. Pesticide Biochemistry and Physiology. 121: 78–87.

Bloomquist J. R. (2009). Insecticides: chemistries and characteristics. In E. B. Radcliffe, W. D. Hutchinson, and R. E. Cancelado (eds.), Radcliffe's IPM World Textbook. University of Minnesota, St. Paul, Minnesota.

Bremer S.; Brittebo E.; Dencker L.; Ehlert Knudsen L.; Mathisien L.; Olovsson M.; Pazos P.; Pellizzer C.; Ricci Paulesu L.; Schaefer W.; Schwarz M. & Staud F. (2007). *In Vitro* Tests for Detecting Chemicals Affecting the Embryo Implantation Process The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 62 — A Strategic Workshop of the EU ReProTect Projecta

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. *Reprod Toxicol* 39:23-32.

Bulgaroni V.; Rovedatti M.G.; Sabino G.; Magnarelli G.G. (2012). Organophosphate pesticide environmental exposure: analysis of salivary cholinesterase and carboxylesterase activities in preschool children and their mothers. *Environ. Monit. Assess* 184: 3307-3314.

Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes [CASAFE]. (2017/2019). Guía de productos fitosanitarios 2017/2019.

Caron-Beaudoin E.; Denison M.S. & Sanderson J.T. (2016). Effects of Neonicotinoids on Promoter-Specific Expression and Activity of Aromatase (CYP19) in Human Adrenocortical Carcinoma (H295R) and Primary Umbilical Vein Endothelial (HUVEC) Cells. INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Quebec, Canada; and Department of Environmental Toxicology, University of California, Davis, California

Çavaş T.; Çinkiliç N.; Vatan Ö.; Yılmaz D. & Coşkun M. (2012). In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and γ H2AX foci assays. *Pestic. Biochem. Physiol.* 104, 212–217.

Chang C.W.; Wakeland A.K. & Parast M.M. (2018). Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension. *J Endocrinol.* PMID: 29259074; PMCID: PMC5741095.

Chen M.; Tao L.; McLean J. & Lu C. (2014). Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: implication for dietary exposures, *J. Agric. Food Chem.* 62, 6082–6090.

Cimino A.M.; Boyles A.L.; Thayer K.A. & Perry M.J. (2017). Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review. *Environ. Health Perspect.* 125, 155–162.

Collard P. (1985). El Desarrollo de la Microbiología. Editorial Reverté. Barcelona. España. Páginas 161 y 162.

Collier A.C.; Tingle M.D.; Paxton J.W.; Mitchell M.D. & Keelan J.A. (2002). Localización y actividades de las enzimas metabolizantes en la placenta humana del primer trimestre: el efecto de la edad materna y gestacional, el tabaquismo y el consumo de alcohol. Human Reproduction, Volumen 17, Número 10, páginas 2564–2572.

Comisión Europea. (2018). Decisión de Ejecución (UE) 2018/840 de la Comisión, de 5 de junio, por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, y se deroga la Decisión de Ejecución (UE) 2015/495 de la Comisión

Cossi P.F.; Kristoff G.; Pérez A.F. & Ríos de Molina M.C. (2019). Efectos de la exposición subcrónica a concentraciones ambientales de contaminantes de relevancia en un gasterópodo nativo de agua dulce: *Biomphalaria straminea*.

Crosby E.B.; Bailey J.M.; Oliveri A.N. & Levin E.D. (2015). Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. Neurotoxicol. Teratol. 49:81–90.

David D.; George I.A. & Peter J.V. (2007). Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: imidacloprid poisoning in a human. Clin Toxicol Phila Pa. 45(5): 485-486.

David D.; George I.A. & Peter J.V. (2007). Toxicology of the newer neonicotinoid insecticides: imidacloprid poisoning in a human. Clin Toxicol Phila Pa.

Ding X. & Kaminsky L.S. (2003). Human extrahepatic cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 43:149-73.

Dominguez López P.; Díaz Cueto L.; Olivares A.; Ulloa Aguirre A. & Arechavaleta Velasco F. (2014). Thymol and carvacrol prevent cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. Jjournal Biochem. Mol. Toxicol. 28, 246–255.

Eriquez A. (2000). Evaluación del Riesgo Ambiental a la Liberación de Plaguicidas. Laboratorio de Ecotoxicidad. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Chile. Sinexis S.A.

Eskenazi B.; Harley K.; Bardman A.; Weltzien E.; Jewell N.; Berr D.; Furlong C. & Holland N. (2004). “Association of in Utero Organophosphate Pesticide Exposure and Fetal Growth and Length of Gestation in an Agricultural Population”. *Environmental Health Perspectives* volume 1120

Ezzatabadipour M.; Azizollahi S.; Sarvazad A.; Mirkahnooj Z.; Mahdinia Z.; Nematollahi-Mahani S.N. (2012). Effects of concurrent chronic administration of alcohol and nicotine on rat sperm parameters. *Andrologia* 44: 330–336.

FAO (2003). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Roma.

Fontaine F.; de Sousa G.; Duchene P.; Rahmani R. (1998). Cytochrome P450 Induction and Cytotoxic effects of Antimalarials in Rat Hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. 12(5):545-9. doi: 10.1016/s0887-2333(98)00033-2. PMID: 20654438.

Gagnaire B.; Geffard O.; Noury P.; Garric J. (2010). *In vivo* indirect measurement of cytochrome P450-associated activities in freshwater gastropod molluscs. *Environ Toxicol*. ;25(6):545-53. doi: 10.1002/tox.20515. PMID: 19526537.

Gallego-Fernández A. (2011). Generalidades del Citocromo P450. Aspectos fundamentales del citocromo P450. Madrid: Colección Docencia Universitaria. p. 7-32.

Giorio C.; Safer A.; Sánchez-Bayo F.; Tapparo A.; Lentola A.; Girolami V.; Van Lexmond M.B. & Bonmatin J.M. (2017). An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 1: new molecules, metabolism, fate, and transport, *Environmental Science and Pollution Research*, 1-33.

Giorio C.; Safer A.; Sánchez-Bayo F.; Tapparo A.; Lentola A.; Girolami V.; Van Lexmond M.B. & Bonmatin J.M. (2017). An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 1: new molecules, metabolism, fate, and transport, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–33.

Giraldo J.A.; Estrada A.F. & Mejía M.C. (2018). Toxicidad por neonicotinoides: revisión de tema y reporte de dos casos *Toxicity by Neonicotinoids: Two Case Reports and Topic Review / Toxicidade por neonicotinóides: revisão do assunto e reporte de dois casos.*

Godfray H.C.J.; Blacquiere T.; Field L.M.; Hails R.S.; Potts S.G.; Raine N.E.; Vanbergen A.J. & McLean A.R. (2015). A restatement of recent advances in the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B* 1818, 282.

Goulson D. (2013). REVIEW: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977e987.

Gu Y.H.; Li Y.; Huang X.F.; Zheng J.F.; Yang J.; Diao H.; Yuan Y.; Xu Y.; Liu M.; Shi H.J.; Xu W.P. (2013). Reproductive effects of two neonicotinoid insecticides on mouse sperm function and early embryonic development *in vitro*. *PloS One* 8, e70112

Guengerich F.P. (2013). New trends in cytochrome P450 research at the half-century mark. *J Biol Chem.* 288:17063-4.

Guengerich F.R. (2012). Cytochromes P450. In: Azenbacher P, Zanger UM editors. *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA Weinheim. p. 27-66.

Guengerich F.R. (2012). Cytochromes P450. In: Azenbacher P, Zanger UM editors. *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA Weinheim. p. 27-66

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

Gupta, Suman & Gajbhiye, Vt. (2007). Persistence of Acetamiprid in Soil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology.* 78. 349-52. 10.1007/s00128-007-9097-7.

Han W.; Tian Y. & Shen X. (2018). Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview, *Chemosphere*, Volume 192, Pages 59-65, ISSN 0045-6535.

Hernandez A.F.; Casado I.; Pena G.; Gil F.; Villanueva E.; Pla A. (2008). Low level of exposure to pesticides leads to lung dysfunction in occupationally exposed subjects. *Inhal. Toxicol.* 20, 839e849.

Hirano T.; Yanai S.; Omotehara T.; Hashimoto R.; Umemura Y.; Kubota N.; Minami K.; Nagahara D.; Matsuo E.; Aihara Y.; Shinohara R.; Furuyashiki T.; Mantani Y.; Yokoyama T.; Kitagawa H. & Hoshi N. (2015). The combined effect of clothianidin and environmental stress on the behavioral and reproductive function in male mice. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 1207–1215.

Houchat J.N.; Cartereau A.; Le Mauff A.; Taillebois E. & Thany SH. (2020). An Overview on the Effect of Neonicotinoid Insecticides on Mammalian Cholinergic Functions through the Activation of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *International journal of environmental research and public health*, 17(9), 3222.

Hukkanen J.; Mäntylä M.; Kangas L.; Wirta P.; Hakkola J.; Paakki P.; Evisalmi S.; Pelkonen O. & Raunio H. (1998). Expression of cytochrome P450 genes encoding enzymes active in the metabolism of tamoxifen in human uterine endometrium. *Pharmacol Toxicol.* 82(2):93-7.

Imamura T.; Yanagawa Y.; Nishikawa K.; Matsumoto N. & Sakamoto T. (2010). Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans. *Clin Toxicol Phila Pa.* 48(8): 851-853.

Imamura T.; Yanagawa Y.; Nishikawa K.; Matsumoto N. & Sakamoto T. (2010). Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans. *Clin Toxicol Phila Pa.*

Insecticide Resistance Action Committee [IARC] (1987). Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs Volumes 1 to 42, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Lyon: International Agency for Research on Cancer, p. 440.

Insecticide Resistance Action Committee [IARC] (1991) Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, Lyon: International Agency for Research on Cancer, p. 612.

Insecticide Resistance Action Committee [IRAC] MoA Classification Scheme, Version 8.4. (2018). Insecticide Resistance Action Committee. Recuperado de <http://www.irc-online.org/documents/moa-classification/>

Jana K.; Samanta P.K.; De D.K. (2010). Nicotine diminishes testicular gametogenesis, steroidogenesis, and steroidogenic acute regulatory protein expression in adult albino rats: possible influence on pituitary gonadotropins and alteration of testicular antioxidant status. *Toxicol Sci* 116: 647–659.

Janssen B.G.; Gyselaers W.; Byun H.M.; Roels H.A.; Cuypers A.; Baccarelli A.A. & Nawrot T.S. (2017). Placental mitochondrial DNA and CYP1A1 gene methylation as molecular signatures for tobacco smoke exposure in pregnant women and the relevance for birth weight, *J. Transl. Med.*

Jeschke P. & Nauen R. (2008). Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry, *Pest Manage. Sci.* 64, 1084–1098.

Jeschke P.; Nauen R.; Schindler M. & Elbert A. (2011). Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *Journal of agricultural and food chemistry.* 59. 2897-908.

Ji L.; Brkic J.; Liu M.; Fu G.; Peng C. & Wang Y.L. (2013). Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspect Med.* 34(5):981-1023.

Karatas A.D. (2009). Severe central nervous system depression in a patient with acute imidacloprid poisoning. *Am J Emerg Med.* 27(9): 1171.e5-7.

Karatas A.D. (2009). Severe central nervous system depression in a patient with acute imidacloprid poisoning. *Am J Emerg Med.*

Keil A.P.; Daniels J.L.; Hertz-Picciotto I. (2014). Autism spectrum disorder, flea and tick medication, and adjustments for exposure misclassification: the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *Environ. Health* 13, 3.

Kimura-Kuroda J.; Komuta Y.; Kuroda Y.; Hayashi M. & Kawano H. (2012). Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS One* 7:e32432 (1–11).

Koureas M.; Tsezou A.; Tsakalof A.; Orfanidou T.; Hadjichristodoulou C. (2014). Increased levels of oxidative DNA damage in pesticide sprayers in Thessaly Region (Greece). Implications of pesticide exposure. *Sci. Total Environ.* 496, 358e364.

Leino O.; Kiviranta H.; Karjalainen A.K.; Kronberg-Kippilä S.H.; Larsen E.H.; Virtanen S. & Tuomisto J.T. (2013). Pollutant concentrations in placenta. *Food Chem. Toxicol.* 54, 59–69.

LIBIQUIMA-CITAAC (2016). Situación ambiental por agroquímicos e hidrocarburos en el alto valle de Rio Negro y Neuquén. Universidad Nacional del Comahue – CONICET.

Lin P.C.; Lin H.J.; Liao Y.Y.; Guo H.R. & Chen K.T. (2013). Acute poisoning with neonicotinoid insecticides: a case report and literature review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 112(4): 282-286.

Lin P-C.; Lin H-J.; Liao Y-Y.; Guo H-R. & Chen K-T. (2013). Acute poisoning with neonicotinoid insecticides: a case report and literature review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*

Lind L.; Penell J.; Syvänen A.C.; Axelsson T.; Ingelsson E.; Morris A.P.; Lindgren C.; Salihovic S.; Van Bavel B. & Lind P.M. (2014). Genetic variation in the CYP1A1 gene is related to circulating PCB118 levels in a population-based sample, *Environ. Res.* 133, 135–140. 30].

Loewy R.M.; Carvajal L.G.; Novelli M. & Pechen D'Angelo A.M. (2006). Azinphos methyl residues in shallow ground waters from the fruit production region of Northern Patagonia, Argentina. *J Environ Sci Health B* 41:869-881. ISSN 0360-1234.

Loewy R.M.; Kirs V.; Carvajal G.; Venturino A. & Pechen D'Angelo A.M. (1999). Groundwater contamination by azinphos methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina). *Sci Total Environ* 225:211218. ISSN: 0048-9697.

Loewy R.M.; Monza L.B.; Kirs V.E. & Savini M.C. (2011). Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *J Environ Sci Health B.* 46(8):662-70.

Lozowicka B.; Mojsak P.; Jankowska M.; Kaczynski P.; Hrynko I.; Rutkowska E.; Szabunko J. & Borusiewicz A. (2016). Toxicological studies for adults and children of insecticide residues with common mode of action (MoA) in pome, stone, berries and other small fruit. *Sci. Total Environ.* 566–567, 144–156.

Lunghi L.; Ferretti ME.; Medici S.; Biondi C. & Vesce F. (2007). Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 5:6.

Lunghi L.; Pavan B.; Biondi C.; Paolillo R.; Valerio A.; Vesce F. & Patella A. (2010). Use of glucocorticoids in pregnancy. *Curr Pharm Des.* 16(32):3616-37.

Magnarelli G.; Rovedatti M.G. & Pechén 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.

Main A.R.; Webb E.B.; Goynes K.W. & Mengel D. (2018). Neonicotinoid insecticides negatively affect performance measures of non-target terrestrial arthropods: a meta analysis. *Ecol. Appl.* 28 (5), 1232–1244.

Mannelli C.; Ietta F.; Avanzati A.M.; Skarzynski D. & Paulesu L. (2015). Biological tools to study the effects of environmental contaminants at the feto–maternal interface. *DoseResponse An Int. J.* 13, 1–11.

Marciniak B.; Patro-Małysza J.; Poniedziałek-Czajkowska E.; Kimber-Trojnar Z.; Leszczyńska-Gorzela B. & Oleszczuk J. (2011). Glucocorticoids in pregnancy. *Curr Pharm Biotechnol.* 12(5):750-7.

Marfo J.T.; Fujioka K.; Ikenaka Y.; Nakayama S.M.; Mizukawa H.; Aoyama Y.; Ishizuka M.; Taira K. (2015). Relationship between urinary N-Desmethyl-Acetamiprid and typical symptoms including neurological findings: a prevalence case-control study. *PLoS One* 10, e0142172.

Martínez-Ghersa M.A. (2011). Consecuencias ambientales del uso de pesticidas. *Ciencia hoy*, ISSN 0327-1218, Vol. 21, Nº. 122, págs. 30-35.

Masiá G. & Moltoni L. (2012). Innovaciones tecnológicas en la agricultura. Surgimiento y desarrollo de las técnicas de protección de cultivos. Trabajo presentado en el Tercer Congreso Latinoamericano de Historia Económica y XXIII Jornadas de Historia Económica, Universidad Nacional del Comahue, Neuquén.

Matsuda M. (1996). Mospilan® (acetamiprid, NI-25). A new systemic insecticide. *Agrochem Jpn*, 68, 20-21.

Mesnage R.; Defarge N.; Spiroux de Vendômois J. & Séralini G.E. (2014). Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed Res Int.*

Ministerio de Agricultura, Ganadería & Pesca [MAGYP]. (Sin fecha). Aplicación eficiente de fitosanitarios. Capítulo 2: plaguicidas químicos, composición y formulaciones, etiquetado, clasificación toxicológica, residuos y métodos de aplicación. Recuperado de <https://www.manualfitosanitario.com/InfoNews/INTA%20Aplicacion%20eficiente%20de%20fitosanitarios%20Cap%202.%20%20Formulaciones.pdf>

Mohamed F.; Gawarammana I.; Robertson T.A.; Roberts M.S.; Palangasinghe C.; Zawahir S.; Jayamanne S.; Kandasamy J.; Eddleston M.; Buckley N.A.; Dawson A.H. & Roberts D.M. (2009). Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. *PLoS One*. 4(4): e5127.

Mohamed F.; Gawarammana I.; Robertson T.A.; Roberts M.S.; Palangasinghe C.; Zawahir S.; Jayamanne S.; Kandasamy J.; Eddleston M.; Buckley N.A.; Dawson A.H. & Roberts D.M. (2009). Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. *PLoS One*.

Morello-Frosch R.; Cushing L.J.; Jesdale B.M.; Schwartz J.M.; Guo W.; Guo T.; Wang M.; Harwani S.; Petropoulou S.S.E.; Duong W.; Park J.S.; Petreas M.; Gajek R.; Alvaran J.; She J.; Dobraca D.; Das R. & Woodruff T.J. (2016). Environmental chemicals in an urban population of pregnant women and their newborns from san francisco, *Environ. Sci. Technol.* 50 (22) 12464–12472

Moses M.; Johnson E.S.; Anger W.K.; Burse V.W.; Horstman S.W.; Jackson R.J.; Lewis R.G.; Maddy K.T.; McConnell R.; Meggs W.J. & Zahm S.H. (1993). Environmental equity and pesticide exposure. *Toxicol Ind Health*, 9(5), 913-959.

Mullin C.A.; Chen J.; Fine J.D.; Frazier M.T. & Frazier J.L. (2015). The formulation makes the honey bee poison. *Pestic Biochem Physiol.* 120:27-35.

Myllynen P.; Pasanen M. & Pelkonen O. (2005). Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta.* 26(5):361–371.

Myren M.; Mose T.; Mathiesen L. & Knudsen L.E. (2007). The human placenta - an alternative for studying foetal exposure. *Toxicology* 21, 1332–1340.

Nauen R.; Jeschke P.; Velten R.; Beck M.E.; Ebbinghaus-Kintscher U.; Thielert W.; Wolfel K.; Haas M.; Kunz K. & Raupach G. (2015). Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide, *Pest Manage. Sci.* 71, 850–862.

Nelson D.R. (2011). Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochim Biophys Acta Prot Proteom.* 1814:14-8.

O’Shaughnessy P.J.; Monteiro A.; Bhattacharya S. & Fowler P.A. (2011). Maternal smoking and fetal sex significantly affect metabolic enzyme expression in the human fetal liver, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (9) 2851–2860.

Ogg C.L.; Hygnstrom J.R.; Bauer E.C.; Hansen P.J. (2012). Management Pesticide Poisoning Risk and Understanding the Signs and Symptoms. University of Nebraska. pp. 16.

Organización Mundial de la Salud. (2010). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. Recuperado de <http://nehrc.nhri.org.tw/toxic/ref/WHO%E8%BE%B2%E8%97%A5%E5%88%86%E9%A1%9E.pdf>

Osaka A.; Ueyama J.; Kondo T.; Nomura H.; Sugiura Y.; Saito I.; Nakane K.; Takaishi A.; Ogi H.; Wakusawa S.; Ito Y. & Kamijima M. (2016) Exposure characterization of three major insecticide lines in urine of young children in Japan—neonicotinoids, organophosphates, and pyrethroids, *Environmental Research*, Volume 147, Pages 89-96, ISSN 0013-9351

Peña C.E.; Carter D. & Ayala F. (2001). Toxicología ambiental: evaluación de riesgos y restauración ambiental. The University of Arizona, Southwest hazardous waste program. In: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/> Last checked: November 9th 2016.

Pesticide Properties DataBase [PPDB]. (2018). Agriculture & Environment Research Unit, University of Hertfordshire. Recuperado de <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> [07-11-2018].

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

Phua D.H.; Lin C.C.; Wu M-L.; Deng J-F. & Yang C-C. (2009). Neonicotinoid insecticides: an emerging cause of acute pesticide poisoning. *Clin Toxicol Phila Pa.*

Pimentel D. & Levitan L. (1986). Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Bioscience*, 36(2), 86-91.

Pimentel D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and environmental Ethics*, 8(1).

Pisa L.W.; Amaral Rogers V.; Belzunces L.P.; Bonmatin J.M.; Downs C.A.; Goulson D.; Kreutzweiser D.P.; Krupke C.; Liess M.; McField M.; Morrissey C.A.; Noome D.A.; Settele J.; Simon Delso N.; Stark J.D.; Van der Sluijs J.P.; Van Dyck H. & Wiemers M. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22, pp. 68-102.

Porter T. & Coon M. (1991). Cytochrome P-450: multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 266:13469–13472.

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. *Environ Sci Pollut Res* 24, 20736–20746.

Ramírez J. A. & Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención y Riesgos Laborales* 2: 67-75.

Randall C.; Hock W.; Crow E.; Hudak-Wise C. & Kasai J. (2008). National Pesticide Applicator Certification Core Manual. Washington, DC: National Association of State Departments of Agriculture Research Foundation.

Rendic S. & Guengerich F.P. (2012). Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem Res Toxicol*.

Robinson J.F.; Hamilton E.G.; Lam J.; Chen H. & Woodruff T.J. (2020). Differences in cytochrome p450 enzyme expression and activity in fetal and adult tissues. *Placenta*. 100:35-44.

Rozman K.K.; Doull J. & Hayes W.J. (2010). Dose and time determining, and other factors influencing, toxicity. En R. Krieger (Ed), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)* (pp. 3-101). Cambridge, EEUU: Academic Press

Ruiz Marrondo S. (2001). Desarrollo de métodos de electroforesis capilar en fase micelar. Aplicación al análisis de herbicidas y de sus productos de degradación (Tesis de doctorado). Universitat Politècnica de Catalunya, España, Barcelona.

SAGYPSA-SENASA (1999). Resolución 350/1999 Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Sanidad vegetal. Recuperado el 12 de octubre de 2020. Recuperado de:

<http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-350-1999-sagpya-secretaria-de-agricultura-ganaderia-pesca-y-alimentos>

Sanchez-Bayo F.; Goka K. & Hayasaka D. (2016). Contamination of the aquatic environment with neonicotinoids and its implication for ecosystems. *Ecosyst. Front. Environ. Sci.*, 4, p. 71.

Sánchez-Bayo F.; Goka K. & Hayasaka D. (2016). Contamination of the aquatic environment with neonicotinoids and its implication for ecosystems. *Front Environ Sci*, 4, 71.

Sano K.; Isobe T.; Yang J.; Win-Shwe T.T.; Yoshikane M.; Nakayama S.F.; Kawashima T.; Suzuki G.; Hashimoto S.; Nohara K.; Tohyama C. & Maekawa F. (2016). In utero and lactational exposure to acetamiprid induces abnormalities in socio-sexual and anxiety-related behaviors of male mice. *Front. Neurosci.* 10, 1–12.

Santes-Palacios R.; Ornelas-Ayala D.; Cabañas N.; Marroquín-Perez A.; Hernández-Magaña A.; Olguín-Reyes S.D.R.; Camacho-Carranza R. & Espinosa-Aguirre J.J. (2016). Regulation of human cytochrome P4501A1 (hCYP1A1): a plausible target for chemoprevention? *BioMed Res. Int.* 5341081

Sciences et avenir. (2018). La France interdit les néonicotinoïdes partir du 1er septembre 2018. Recuperado de https://www.sciencesetavenir.fr/animaux/arthropodes/la-franceinterdit-les-neonicotinoides-a-partir-du-1er-septembre-2018_127031 [07/11/2018].

Seccia S.; Fidente P.; Barbini D.; Morrica P. (2005). Multiresidue determination of nicotinoid insecticide residues in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 553, 21e26

Seccia S.; Fidente P.; Montesano D. & Morrica P. (2008). Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A* 1214, 115e120.

Şenyildiz M.; Kilinc A. & Ozden S. (2018). Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. *Toxicol. Ind. Health* 34, 375–383.

Shadnia S. & Moghaddam H.H. (2008). Fatal intoxication with imidacloprid insecticide. *Am J Emerg Med.* 26(5): 634.e1-4.

Shadnia S. & Moghaddam H.H. (2008). Fatal intoxication with imidacloprid insecticide. *Am J Emerg Med*.

Simon-Delso N.; Amaral-Rogers V.; Belzunces L.P.; Bonmatin J.M.; Chagnon M.; Downs C.; Furlan L.; Gibbons D.W.; Giorio C.; Girolami V.; Goulson D.; Kreutzweiser D.P.; Krupke C.H.; Liess M.; Long E.; McField M.; Mineau P.; Mitchell E.A.D.; Morrissey C.A.; Noome D.A.; Pisa L.; Settele J.; Stark J.D.; Tapparo A.; Van Dyck H.; Van Praagh J.; Van der Sluijs J.P.; Whitehorn P.R.; Wiemers M.; Bonmatin Jean-Marc; Goulson D.; Bijleveld van Lexmond M. & Noome D.A. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental science and pollution research international*, 2015-01, Vol.22 (1), p.5-34.

SPEX CertiPrep. (2016). Guide to Pesticide Solubility. Metuchen, NJ. Recuperado de <https://www.spexcertiprep.com/knowledge-base/files/Guide-to-Pesticide-Solubility.pdf> [07/11/2018].

Staud F. & Karahoda R. (2018). Trophoblast: The central unit of fetal growth, protection and programming. *Int J Biochem Cell Biol*. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30266525.

Staud F. & Karahoda R. (2018). Trophoblast: The central unit of fetal growth, protection and programming. *Int J Biochem Cell Biol*. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30266525. Álvarez V.H. (2010). Protocolo de vigilancia y control de intoxicaciones por plaguicidas. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, Colombia. pp. 46. Recuperado de https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/INTOXICACION_POR_PLAGUICIDAS.pdf

Staun-Ram E. & Shalev E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol*. 20; 3-56.

Stejskalová L.; Vrzal R.; Rulcová A.; Dvořák Z.; Pávek P. (2013). Effects of glucocorticoids on cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) expression in isolated human placental trophoblast *J Appl Biomed*. 11: 163–172, 2013 DOI 10.2478/v10136-012-0022-y ISSN 1214-0287

Summit Agro. Assail. Recuperaado de <https://www.summitagro.com.ar/producto/assail-2/>

Summit Agro. Proyecto de marbete assail. Recuperado de <https://www.summitagro.com.ar/wp-content/uploads/2020/11/ASSAIL.pdf>

Sur R. & Tork A.S. (2003). Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bull. Insectology* 56, 35–40.

Tanaka T. (2012). Reproductive and neurobehavioral effects of clothianidin administered to mice in the diet. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* 95, 151–159.

Tanner G. & Czerwenka C. (2011). LC-MS/MS Analysis of Neonicotinoid Insecticides in Honey: Methodology and Residue Findings in Austrian Honeys. *Journal Agriculture Food Chemistry* 59, 12271–12277.

Telugu BP.; Adachi K.; Schlitt JM.; Ezashi T.; Schust DJ.; Roberts RM. & Schulzc LC. (2013). Comparison of extravillous trophoblast cells derived from human embryonic stem cells and from first trimester human placentas. *Placenta.* 34: 536e543.

Tiryaki O. & Temur C. (2010). The fate of pesticide in the environment. *J Biol Environ Sci,* 4(10), 29-38.

Tosi A.P.; Pechen D’Angelo A.M.; Savini M.C. & Loewy R.M. (2009). Evaluación de riesgo por plaguicidas sobre aguas superficiales de la Región Norpatagónica Argentina. *Acta Toxicol Argent* 17: 1-6. ISSN: 0327-9286.

US EPA (2005). Pesticides. Acetamiprid. Recuperado de https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-099050_27-Jul05_a.pdf [07/11/2018].

US EPA. (2002). Pesticides. Fact Sheet for Acetamiprid. US EPA: Washington, DC.

VATOXA (Vademécum Toxicológico Alimentario Argentino). (2018). Recuperado de <http://www.naturalezadederechos.org/indexagro.htm> [06/08/2018].

Vega S. (1985). Toxicología I: Evaluación de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS, OMS, 69 pp.

Vera B. (2010). Esterasas y composición lipídica de la placenta humana en la exposición ambiental a plaguicidas organofosforados. Tesis de posgrado. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Comahue.

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. *Reprod Toxicol* 34: 402-407.

Vizcaino E.; Grimalt J.O.; Fernández-Somoano A. & Tardon A. (2014). Transport of persistent organic pollutants across the human placenta. *Environ Int.*

Wang P.; Tian Y.; Wang X.J.; Gao Y.; Shi R.; Wang G.Q.; Hu G.H. & Shen X.M. (2012). Organophosphate pesticide exposure and perinatal outcomes in Shanghai, China. *Environ Int.* 42:100-4.

Wolansky M.J. (2011). Plaguicidas y Salud Humana; Asociación Civil Ciencia Hoy; Ciencia Hoy; 21; 122; 23-29.

Xie W.; Han C.; Qian Y.; Ding H.; Chen X.; Xi J. (2011). Determination of neonicotinoid pesticides residues in agricultural samples by solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 4426e4433

Yamamoto I. & Casida J. E. (1999). Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. Tokyo: Springer. 300 pp.

Yang W.; Carmichael S.L.; Roberts E.M.; Kegley S.E.; Padula A.M.; English P.B. & Shaw G.M. (2014). Residential agricultural pesticide exposures and risk of neural tube defects and orofacial clefts among offspring in the San Joaquin Valley of California. *Am J Epidemiol.* 179(6):740-8.

Yardimci M.; Sevgiler Y.; Rencuzogullari E.; Arslan M.; Buyukleyla M. & Yilmaz M. (2014). Sex-, tissue-, and exposure duration-dependent effects of imidacloprid modulated by piperonyl butoxide and menadione in rats. Part I: oxidative and neurotoxic potentials. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 65:387–98.

Yeh I.J.; Lin T.J. & Hwang D.Y. (2010). Acute multiple organ failure with imidacloprid and alcohol ingestion. *Am. J. Emerg. Med.* 28:255.e1–e3.