



Facultad de Ciencias Médicas  
UNLP

**EFECTO DE CONTAMINANTES  
AMBIENTALES SOBRE EL METABOLISMO  
LIPÍDICO Y EL SISTEMA DE DEFENSA  
ANTIOXIDANTE EN TEJIDOS DE RATA**

Tesista: Bioq. Mariana Astiz

Director: Prof. Dr. Carlos Alberto Marra

Co-Director: Dra. Maria J. Tacconi de Alaniz

La Plata, 2009

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de doctor en ciencias de la salud de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Bajo la dirección del Dr. Carlos A. Marra y la co-dirección de la Dra. Maria J. Tacconi de Alaniz.

## **RECONOCIMIENTOS**

A la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP y al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), por haberme brindado el espacio y los medios para la ejecución de este trabajo.

Al sostén económico en becas y subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) que permitieron el desarrollo de este trabajo de investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Un trabajo de tesis doctoral representa un logro personal en el que participan muchísimas personas, por lo que me resulta imprescindible recordar a todos los que lo hicieron posible.

A mis padres, por mostrarme siempre el camino del trabajo, la dedicación, el esfuerzo y la honestidad, por confiar y apoyar todas mis decisiones, por estar todos los días cerca mío.

A mi director de tesis, Dr. Carlos A. Marra, por haber confiado en mí desde el primer día, por su inmensa generosidad en dedicarme su tiempo, su energía, su magnífica inteligencia y su ayuda constante. Por transmitirme su entusiasmo y dedicación al trabajo, por sus consejos, su comprensión y paciencia, por ser mucho más que un director de tesis. Ojala nos esperen muchísimos años de trabajo juntos.

A mi co-directora Dra. Maria J. Tacconi de Alaniz, a quien admiro profundamente por su increíble capacidad, por ser un ejemplo de investigadora, madre, abuela, amiga. Por participar en todos los experimentos, por sus acertados consejos, por la libertad con la que me permitió trabajar, por su compromiso incondicional con el desarrollo de este trabajo y con mi formación.

A la Dra. Norma M. Giusto, por ser la responsable de mi llegada a este grupo de trabajo, un consejo que nunca terminaré de agradecerle.

A las “Chicas”, Norma, por su eterna paciencia, su amistad y su inmejorable desempeño en el laboratorio. A Eva, Cristina y Graciela por las horas de trabajo que invirtieron para esta tesis y por el cariño incondicional que siempre me demostraron. A todas por ser parte indispensable de todos los experimentos con gran esmero y profesionalismo.

A Natha, por su compañía diaria y su invaluable amistad. Y al resto de mis compañeros del INIBIOLP, a todos por ayudarme siempre, por ser tan amigables y buena gente.

A mi hermana Valentina, por ser mi compañera preferida siempre, por su dulzura, amor y generosidad.

Muy especialmente agradezco a Damián, por haberme elegido y no arrepentirse, por todos los momentos compartidos y los que vendrán, por su paciencia, ayuda y tiempo, por saber esperar y alentarme siempre a seguir.

A mis amigos, por entender mis tiempos y estar siempre cerca.

A todos..... muchas gracias.

## TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

Parte de los resultados de este trabajo de tesis doctoral han sido comunicados en reuniones científicas:

Evento: **III Jornadas Científicas de Ciencias Médicas 2007**

Carácter de participación: Presentación de póster “*Alteración del sistema de defensa antioxidante glutatión-dependiente en testículo de rata por intoxicación crónica con zineb, glifosato y dimetoato*”

23 de Octubre de 2007, Facultad de Ciencias Médicas UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina

Evento: **XLIII Reunión Anual de SAIB** (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular)

Carácter de participación: Presentación de póster “*Effect of pesticides on the antioxidant defence system in various rat tissues*”

17-20 de Noviembre de 2007, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Evento: **XLIII Reunión Anual de SAIB** (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular)

Carácter de participación: Presentación de póster “*Testicular steroidogenesis in rats intoxicated with dimethoate, zineb, or glyphosate*”

17-20 de Noviembre de 2007, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Evento: **XLIII Reunión Anual de SAIB** (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular)

Carácter de participación: Presentación de póster “*Dimethoate inhibits testosterone biosynthesis through a mechanism that involves COX-2 and StAR*”

17-20 de Noviembre de 2007, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Evento: **XLIV Reunión Anual de SAIB** (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular)

Carácter de participación: Comunicación oral “*Effect of pesticides on apoptosis biomarkers in various rat tissues*”

8-11 de Noviembre de 2008, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

Evento: **XLIV Reunión Anual de SAIB** (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular)

Carácter de participación: Presentación de póster “*Subclinical intoxication in professional sprayers: effects on oxidative stress biomarkers and other biochemical parameters*”

8-11 de Noviembre de 2008, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

Evento: **XLIV Reunión Anual de SAIB** (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular)

Carácter de participación: Presentación de póster “*Dimethoate-induced lipid peroxidation in Leydig cells is reverted by in vitro  $\alpha$ -tocopherol addition*”  
8-11 de Noviembre de 2008, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

Evento: **IV Jornadas Científicas de Ciencias Médicas 2008**

Carácter de participación: Presentación de póster “*Utilidad de varios biomarcadores sistémicos para la evaluación del riesgo de intoxicación en fumigadores profesionales*”

26 de Octubre de 2008, Facultad de Ciencias Médicas UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Evento: **XI Congreso de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata 2009**

Carácter de participación: Presentación de póster “*Cambios histológicos y bioquímicos en testículo de rata inducidos por intoxicación sub-crónica con agroquímicos de uso frecuente*”

17-18 de Septiembre de 2009, Facultad de Ciencias Médicas UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Evento: **Reunión anual de la Sociedad Argentina de Fisiología**

Carácter de participación: Presentación de póster “*Efecto de agroquímicos sobre la supervivencia celular en tejidos de rata*”

15-16 de Octubre de 2009, Facultad de Ciencias Médicas UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Evento: **XLV Reunión anual de SAIB** (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular)

Carácter de participación: Presentación de póster “*Frequently -used agrochemicals lead to functional and morphological sperm alterations in rats*”

10-13 de Noviembre de 2009, San Miguel de Tucumán, Argentina.

Evento: **XLV Reunión anual de SAIB** (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular)

Carácter de participación: Presentación de póster “*Rofecoxib prevents dimethoate-induced inhibition of testosterone biosynthesis in rat Leydig cells*”

10-13 de Noviembre de 2009, San Miguel de Tucumán, Argentina.

Parte de los resultados de este trabajo de tesis doctoral han sido publicados en revistas internacionales con referato:

**Astiz, M., Alaniz, M.J.T. de, Marra, C.A.,** 2009. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28, 465-473.

**Astiz, M., Hurtado de Catalfo, G., Alaniz, M.J.T. de, Marra, C.A., 2009.** Involvement of lipids in dimethoate-induced inhibition of testosterone biosynthesis in rat interstitial cells. *Lipids* 44 (8), 703-718.

**Astiz, M., Alaniz, M.J.T. de, Marra, C.A., 2009.** Impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system of rat. *Pesticide Biochemical and Physiology* 94 (1-3), 93-99.

**Astiz, M., Alaniz, M.J.T. de, Marra, C.A., 2009.** Effect of pesticides on apoptosis biomarkers in the rat liver and brain". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (7), 2025-2032.

# ÍNDICE



## ABREVIATURAS

## INTRODUCCIÓN

Radicales libres y especies reactivas.....	3
Especies reactivas del oxígeno.....	4
Otras especies reactivas.....	11
Rol fisiológico de las especies reactivas.....	15
Sistema de defensa antioxidante.....	16
¿Que es un antioxidante?.....	17
Sistema antioxidante enzimático.....	18
Sistema antioxidante no enzimático.....	24
Estrés oxidativo y supervivencia celular.....	34
Daño oxidativo al DNA.....	35
Daño oxidativo a lípidos.....	37
Daño oxidativo a proteínas.....	40
Respuesta de las células al daño oxidativo.....	42
Caspasas.....	43
Calpaínas.....	45
Vínculo funcional entre caspasas y calpaínas.....	47
La mitocondria como foco central del proceso apoptótico.....	48
Rol del entorno en el estrés oxidativo.....	51
Relación entre estrés oxidativo y patologías humanas.....	53
Estrés oxidativo en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson.....	54
Características de los plaguicidas.....	59
Agroquímicos en la Argentina.....	62
Gestión sustentable de los plaguicidas.....	64
Selección del modelo experimental. Agroquímicos investigados.....	67
Hipótesis.....	68

Objetivos generales.....	69
Objetivos específicos.....	70

## **CAPÍTULO I: Efecto de un fungicida, un insecticida y un herbicida sobre el estado redox de varios tejidos de rata**

INTRODUCCIÓN.....	71
Selección de los agroquímicos investigados y tejidos analizados.....	71
Modelo experimental para el estudio del daño oxidativo por agroquímicos.....	77
MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
Esquema de tratamiento.....	79
Colección de muestras.....	81
Determinaciones.....	84
1. Biomarcadores de estrés oxidativo.....	84
2. Biomarcadores del sistema de defensa antioxidante.....	87
3. Biomarcadores de daño oxidativo.....	98
4. Biomarcadores de metabolismo lipídico.....	102
5. Biomarcadores de química clínica.....	106
6. Biomarcadores de muerte celular.....	107
7. Cuantificación de proteínas totales.....	118
8. Histopatología.....	120
Estadística.....	121
RESULTADOS.....	122
DISCUSIÓN.....	155
CONCLUSIONES PARCIALES.....	176

## **CAPÍTULO II: Efecto protector del ácido lipoico frente al estrés oxidativo asociado a la administración de agroquímicos**

INTRODUCCIÓN.....	178
-------------------	-----

MATERIALES Y MÉTODOS.....	182
Esquema de tratamiento.....	182
Colección de muestras.....	187
Determinaciones.....	188
Estadística.....	188
RESULTADOS.....	190
DISCUSIÓN.....	202
CONCLUSIONES PARCIALES.....	209

### **CAPÍTULO III: Detección de plaguicidas o sus residuos**

INTRODUCCIÓN.....	211
MATERIALES Y MÉTODOS.....	216
Colección de muestras.....	216
Determinaciones.....	217
1. Detección de glifosato en plasma.....	217
2. Detección de dimetoato en plasma y homogenatos.....	219
3. Detección de zineb en plasma y homogenatos.....	221
RESULTADOS.....	223
DISCUSIÓN.....	232
CONCLUSIONES PARCIALES.....	237

### **CAPÍTULO IV: Biomarcadores de estrés oxidativo y defensa antioxidante en la evaluación de riesgo en poblaciones humanas expuestas a agroquímicos**

INTRODUCCIÓN.....	238
MATERIALES Y MÉTODOS.....	242
Colección de muestras.....	242
Determinaciones.....	243
1. Concentración plasmática de cobre.....	244

2. Concentración de proteínas secuestradoras de metales.....	245
Estadística.....	248
RESULTADOS.....	249
DISCUSIÓN.....	267
CONCLUSIONES PARCIALES.....	279
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>282</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>286</b>

## **ABREVIATURAS**

AChE: acetil colinesterasa  
AD: enfermedad de Alzheimer  
AMPA: ácido aminometilfosfónico  
ANOVA: análisis de varianza  
BChE: butiril colinesterasa, pseudo colinesterasa o colinesterasa plasmática  
C: grupo de animales control, sin inyección i.p.  
CASAFE: Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes  
CAT: catalasa  
CC: corteza cerebral  
CL: cardiolipina  
CPF: clorpirifós  
CRP: ceruloplasmina  
Cyto c: citocromo c  
D: grupo de animales inyectados i.p. con dimetoato 15 mg/Kg peso corporal  
DHHA: ácido dihidrolipoico  
DL<sub>50</sub>: dosis letal 50  
DMF: desoximorfolinofructosa  
D.O.: densidad óptica  
DS: desvío standard  
DTT: ditionitrosito  
EMAGs: ésteres metílicos de ácidos grasos  
FAD: flavin adenin dinucleótido  
FAL: fosfatasa alcalina  
FMN: flavin mononucleótido  
FRAP: capacidad reductora total del plasma  
G: grupo de animales inyectados i.p. con glifosato 10 mg/Kg peso corporal  
GD: grupo de animales inyectados i.p. con glifosato y dimetoato  
GLC: cromatografía gas-líquido  
GPx: glutatión peroxidasa  
GR: glutatión reductasa  
GSH: glutatión reducido  
GSSG: glutatión oxidado  
GST: glutatión transferasa

$\gamma$ -GT:  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa  
HD: enfermedad de Huntington  
HPLC: cromatografía líquida de alta presión  
HSP: proteínas de shock térmico  
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria  
i.p.: inyección intraperitoneal  
LA: ácido lipoico  
LDH: lactato deshidrogenasa.  
LMR: límite máximo de residuos de plaguicidas  
MME: membrana mitocondrial externa  
MMI: membrana mitocondrial interna  
MTs: metalotioneínas  
NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada  
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida  
NADP<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma oxidada  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida  
NO<sup>•</sup>: óxido nítrico  
NOx: nitratos más nitritos  
NOS: óxido nítrico sintasa  
OS: estrés oxidativo  
OPs: organofosforados  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: radical superóxido  
O<sub>2</sub><sup>2-</sup>: anión peróxido  
OH<sup>•</sup>: radical hidroxilo  
ONOO<sup>-</sup>: anión peroxinitrito  
PCOs: carbonilos proteicos  
PD: enfermedad de Parkinson  
PEG-400: polietilenglicol-400  
PHGPx: fosfolípido hidroperóxido-glutation peroxidasa  
PM: permetrina  
PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados  
RNS: especies reactivas del nitrógeno  
ROS: especies reactivas del oxígeno

SDA: sistema de defensa antioxidante

SN: sustancia nigra

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

SNpc: sustancia nigra pars compacta

SOD: superóxido dismutasa

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TGO: transaminasa glutámico-oxalacética

TGP: transaminasa glutámico-pirúvica

$\alpha$ -Toc:  $\alpha$ -tocoferol

V: grupo de animales control, inyectados i.p. con PEG-400

Z: grupo de animales inyectados i.p. con zineb 15 mg/Kg peso corporal

ZD: grupo de animales inyectados i.p. con zineb y dimetoato

ZG: grupo de animales inyectados i.p. con zineb y glifosato

ZGD: grupo de animales inyectados i.p. con zineb, glifosato y dimetoato



# INTRODUCCIÓN

El incremento de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas observada en estudios epidemiológicos realizados en las últimas décadas, conjuntamente con la falta de evidencia del rol de la herencia en este aumento, sugiere la injerencia de factores ambientales como posibles inductores de estos desórdenes (Ritz y Yu, 2000). En la actualidad, numerosos científicos en todo el mundo orientan sus investigaciones hacia el estudio de la interacción del ambiente con la predisposición genética a padecer alguno de estos trastornos (Di Monte, 2003). Los pesticidas utilizados en la agroindustria (durante la producción, procesamiento, almacenamiento y empaque de alimentos para consumo humano) constituyen uno de los principales focos de atención por su ubicuidad en el ambiente con el que tenemos un contacto continuo (Priyadarshi et al., 2001; Bolognesi y Morasso, 2000; Hatcher et al., 2008). Nos referiremos a esta cuestión con mayor detalle en otra sección de este mismo capítulo.

Muchos de estos pesticidas permanecen como residuos y ejercen sus mecanismos

tóxicos a través de la alteración del estado redox celular. El “estrés oxidativo” (OS) es una expresión que se refiere al establecimiento de un desbalance entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) y las defensas antioxidantes presentes en mayor o menor medida en todos los tejidos. Fue Sies quien introdujo el término como título del libro que editó en 1985 *“Oxidative stress”*. En su segunda edición en 1991 lo define como *“una alteración en el balance prooxidante-antioxidante en favor del primero, llevando a un daño potencial”*. A este daño se lo llama “daño oxidativo”.

Se ha implicado al OS en la patogénesis de más de 100 desórdenes entre los cuales se encuentran varias enfermedades neurodegenerativas humanas. En la gran mayoría de estos trastornos se ha visto que aumenta la formación de ROS/RNS acompañando al daño tisular (Gilgun-Sherki et al., 2001). La muerte de neuronas dopaminérgicas (que es patognomónica de la enfermedad de Parkinson) ha sido vinculada a la disfunción mitocondrial (Heales et al., 1999; Pope et al., 2008; Jenner, 1998), a la peroxidación lipídica (Honig y Rosenberg, 2000; Gorman et al., 1996; Jenner, 1998), a la acumulación de hierro libre (Gu et al., 1998; Jenner, 1998), a la disfunción proteosomal (Zhou et al., 2004; Wang et al., 2006; McNaught y Jenner, 2001; Miller y Wilson, 2003; Zeng et al., 2005) y al aumento de los niveles de óxido nítrico (Singh y Dikshit, 2007; Jenner, 1998)

La evaluación del riesgo de exposición a tóxicos y a polucionantes ambientales en general -especialmente plaguicidas- esta sufriendo en esta última década, un profundo reenfoque que incluye la evaluación de los efectos sobre la salud causados por exposiciones prolongadas a dosis bajas (Fitsanakis et al., 2002).

La importancia de las reacciones radicalarias en el daño por radiación, la preservación de alimentos, la combustión y la industria de pinturas y gomas, ha sido estudiada desde hace muchos años. Sin embargo, este problema era poco apreciado por biólogos. El interés por este tipo de cuestiones despertó en la década del 80 con el

descubrimiento de la importancia de las reacciones radicalarias en la fisiología de los organismos vivos y en el mecanismo de acción de varias toxinas.

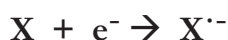
## Radicales libres y especies reactivas

Un radical libre es una especie capaz de existir en forma independiente (en general por muy cortos períodos de tiempo) y que posee uno o más electrones desapareados. Esta última característica los hace extremadamente reactivos.

Los radicales se pueden formar por la pérdida de un electrón:

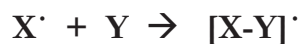


O por la ganancia de un electrón por una especie no radicalaria:



Dos radicales pueden reaccionar compartiendo sus electrones desapareados y formar una unión covalente. Sin embargo, cuando un radical reacciona con un no-radical, resulta una nueva especie radicalaria, es así como pueden darse reacciones en cadena o propagatorias.

- Un radical  $X^{\cdot}$  puede formar un *aducto* con quien reacciona. Este producto tendrá un electrón desapareado:



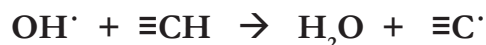
- El radical  $X^{\cdot}$  puede actuar como un *agente reductor* donando su electrón desapareado a un no-radical. De modo que la especie que recibe el electrón se convierte en un radical:



- El radical  $X^{\cdot}$  puede también comportarse como un *agente oxidante*, aceptando un electrón de un no-radical. La especie que donó el electrón se convertirá en un radical:



- Un radical  $X^{\cdot}$  como el  $OH^{\cdot}$  (radical hidroxilo, al cual estudiaremos en detalle más adelante en este capítulo) puede *abstraer un átomo de hidrógeno* de la unión C—H. Debido a que el átomo de hidrógeno tiene solo un electrón, el electrón desapareado quedará como residente en el átomo de carbono:



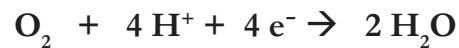
Todos estos mecanismos de generación de radicales libres han sido descriptos extensamente por Halliwell y Gutteridge en 1999.

### Especies reactivas del oxígeno

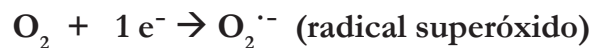
En organismos aeróbicos entre el 85 y el 90 % del  $O_2$  es utilizado por la mitocondria siendo esta organela la principal fuente de energía útil producida bajo la forma de ATP en las células. Como es bien sabido, la esencia de la producción de energía metabólica reside en la oxidación de los nutrientes provenientes de los alimentos. Los electrones cedidos durante los procesos catabólicos son captados por transportadores de electrones como  $NAD^+$  (nicotinamida adenina dinucleótido) y flavinas (FAD ó flavina adenina dinucleótido y FMN ó flavina mononucleótido). Estos transportadores electrónicos reducidos ( $NADH$ ,  $FADH_2$  y  $FMNH_2$ ) son re-oxidados por el  $O_2$  en la mitocondria produciendo la energía suficiente para la síntesis de ATP. El último complejo de la cadena transportadora, encargado de reducir al oxígeno, es la citocromo-oxidasa. Esta remueve un electrón de cada uno de los cuatro grupos  $Fe^{2+}$ -hemínico del citocromo c

oxidándolos a citocromo-Fe<sup>3+</sup>. Entregando finalmente los cuatro electrones al O<sub>2</sub> que actúa como aceptor final.

La reacción global de este proceso es:



Diversos pasos en la ruta de la reducción del O<sub>2</sub> por medio de los complejos mitocondriales (complejos I, II, y III) tienen el potencial para producir radicales libres al dejar escapar un electrón que reduce en forma incompleta al aceptor final (O<sub>2</sub>). De modo tal que, por ejemplo al recibir un electrón (en lugar de cuatro) se genera el radical superóxido (Jackson et al., 2002):

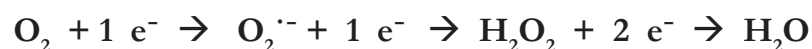


En organismos netamente aeróbicos (como los mamíferos) la cadena transportadora de electrones mitocondrial es probablemente la *principal* fuente de O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. A niveles fisiológicos de presión parcial de O<sub>2</sub>, se estima que alrededor del 1 al 3 % del oxígeno reducido en la mitocondria formará radical O<sub>2</sub><sup>·-</sup>.

Cuando el radical superóxido recibe otro electrón se genera el peróxido (O<sub>2</sub><sup>2-</sup>), siendo su forma protonada el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) el cual no es de por sí una especie radicalaria a pesar de ser altamente reactivo:



La adición de dos electrones al peróxido de hidrógeno genera una molécula de agua. En síntesis, la secuencia de reacciones se puede esquematizar como sigue (Halliwell y Gutteridge, 1999):



Las denominadas ROS (especies reactivas del oxígeno) constituyen una clase

colectiva o genérica que agrupa no solo a los radicales del oxígeno (radical superóxido;  $O_2^{\cdot-}$  e hidroxilo;  $OH^{\cdot}$ ), sino también a los derivados no radicalarios tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) y el ozono ( $O_3$ ) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Especies reactivas del oxígeno

Radicales	No radicales
Superóxido $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno $H_2O_2$
Hidroxilo $OH^{\cdot}$	Ácido hipocloroso $HOCl$
Peroxilo $RO_2^{\cdot}$	Ozono $O_3$
Alcoxilo $RO^{\cdot}$	Oxígeno singulete $^1\Delta_g$
Hidroperoxilo $HO_2^{\cdot}$	Peroxinitrito $ONOO^-$

A continuación resumiremos brevemente las características salientes de las principales especies radicalarias y no radicalarias con especial énfasis en su rol como generadores de estrés oxidativo, para luego describir someramente al sistema de defensa antioxidante.

#### *Radical superóxido*

Se genera cuando el  $O_2$  toma un solo electrón. Por dismutación se transforma en peróxido de hidrógeno siendo esta reacción catalizada en condiciones fisiológicas por la enzima superóxido dismutasa (SOD):



A su vez, el radical superóxido puede reaccionar con ascorbato ( $\text{AH}_2$ ) o tioles orgánicos destruyéndolos por oxidación:



En solución acuosa a pH 7.40 no resulta ser muy reactivo, de modo que las velocidades de reacción con DNA, lípidos, aminoácidos, y muchas otras biomoléculas de importancia crítica son en general bajas. Su forma protonada ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) es más reactiva y por su neutralidad eléctrica, capaz de atravesar membranas. Así, el radical  $\text{HO}_2^{\cdot}$  puede iniciar reacciones de peroxidación de ácidos grasos por si mismo causando severos daños a las estructuras ricas en lípidos. A pH fisiológico solo existe una pequeña cantidad de  $\text{HO}_2^{\cdot}$  en equilibrio con  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ( $[\text{O}_2^{\cdot-}] / [\text{HO}_2^{\cdot}] = 100/1$ ).

El radical superóxido puede interferir con la actividad de enzimas del sistema de defensa antioxidante tales como la catalasa y la glutatión peroxidasa (Franceschutti, 1996; Tabatabaie y Floyd, 1994; Radi et al., 1991; Kono y Fridovich, 1982). Esta cuestión se volverá trascendente a la hora de interpretar algunos de los resultados obtenidos en este estudio.

Además del daño directo provocado por el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , este puede resultar citotóxico por la generación de otras especies reactivas. La dismutación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  genera  $\text{H}_2\text{O}_2$  que resulta ser poco reactivo a las concentraciones fisiológicas. Una especie mucho más reactiva y citotóxica es el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) producido por la reacción instantánea entre el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y el  $\text{NO}^{\cdot}$ . Una descripción pormenorizada del peróxido de hidrógeno y del peroxinitrito se presentará mas adelante.

#### *Radical hidroxilo*

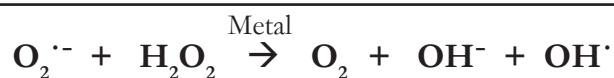
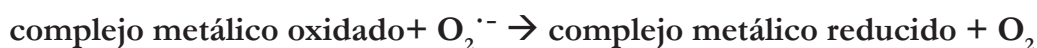
El radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) se puede generar en un sistema biológico a través de las reacciones de Fenton y Häber-Weiss. Ambas son ejemplo de reacciones de generación de



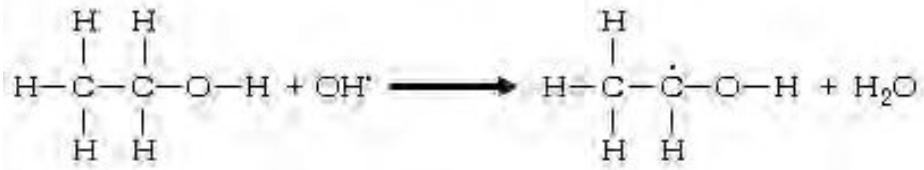
radicales libres peligrosos catalizada por iones metálicos:



Trazas de  $\text{Fe}^{2+}$  son capaces de reaccionar rápidamente con  $\text{H}_2\text{O}_2$  produciendo este radical el cual, a su vez, puede generar una reacción de propagación en cadena con cualquier molécula orgánica presente en el medio. Por otra parte, al igual que el Fe, el cobre puede catalizar la reacción de Fenton. Como dijimos, la reacción de Häber-Weiss es otra forma de generación de  $\text{OH}^\bullet$ .



Tan pronto como se forma, el  $\text{OH}^\bullet$  es capaz de reaccionar con moléculas que se encuentren muy cerca tales como hidratos de carbono, aminoácidos, fosfolípidos, bases púricas o pirimidínicas, ácidos orgánicos, etc. (Buettner, 1993). Estas reacciones promovidas por el radical  $\text{OH}^\bullet$  se pueden clasificar en tres categorías: (i) abstracción de hidrógeno, (ii) adición de  $\text{OH}^\bullet$  y (iii) transferencia electrónica. Todas ellas ilustran un principio importante de la química de los radicales: *la reacción de un radical libre con especies no-radicalarias produce un radical libre diferente*. En principio, este nuevo radical libre puede ser más, menos, o igualmente reactivo que el radical originario. Los radicales producidos por reacción con  $\text{OH}^\bullet$  son en general menos reactivos. Un ejemplo típico de reacción de abstracción de hidrógeno es la reacción de  $\text{OH}^\bullet$  con alcoholes, el radical hidroxilo sustrae el átomo de hidrógeno y se combina con este para formar agua dejando un electrón desapareado en el átomo de carbono del alcohol:



Luego, el radical de carbono podrá reaccionar con  $\text{O}_2$  para dar radicales peroxilo, o reaccionar con otro radical para formar un producto no radicalario con dos electrones apareados formando una unión covalente. Un ejemplo de gran importancia biológica de la abstracción de hidrógenos es la capacidad de iniciar la cadena de peroxidación lipídica.

En cambio, la reacción con compuestos aromáticos se da por adición. Por ejemplo, el  $\text{OH}^{\bullet}$  se adiciona a la base púrica guanina del DNA para formar el radical 8-hidroxi guanina, y de la misma manera, se puede adicionar al doble enlace de la base pirimidínica timina. A su vez, el radical timina puede reaccionar con  $\text{O}_2$  para dar el radical peroxilo de la base. De este modo, si el  $\text{OH}^{\bullet}$  se genera en adyacencias del DNA puede dañar a las bases nitrogenadas e inducir fracturas de las cadenas de los ácidos nucleicos (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### *Radicales alcoxilo y peroxilo*

La descomposición de peróxidos orgánicos puede dar lugar a radicales alcoxilo ( $\text{RO}^{\bullet}$ ) y peroxilo ( $\text{RO}_2^{\bullet}$ ), en los sistemas biológicos sufren a menudo re-arreglos moleculares dando otras especies radicalarias (algunos  $\text{RO}_2^{\bullet}$  se descomponen liberando  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). En general los radicales peroxilo y alcoxilo son buenos agentes oxidantes y pueden abstraer  $\text{H}^{\bullet}$  de otras moléculas, esta reacción es importante en la peroxidación de lípidos. Al mismo tiempo son capaces de reaccionar directamente con DNA y grupos  $-\text{SH}$  de proteínas o del glutatión reducido (Halliwell y Gutteridge, 1999). Los radicales alcoxilo y

peroxilo de compuestos aromáticos tienden a ser menos reactivos que los correspondientes alifáticos, ya que los electrones se pueden deslocalizar en el anillo bencénico.

### *Peróxido de hidrógeno*

El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es una especie activa del oxígeno no radicalaria, muy soluble en agua y, por su neutralidad eléctrica y pequeño tamaño, es capaz de atravesar las membranas celulares. Cualquier sistema biológico que genere  $\text{O}_2^{\cdot-}$  tiene la capacidad de producir por dismutación peróxido de hidrógeno. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un oxidante fuerte y un reductor débil, pero en términos comparativos es poco reactivo, no oxida significativamente al DNA, a los lípidos, ni tampoco a las proteínas. El daño que podría provocar el peróxido de hidrógeno a las macromoléculas estaría entonces mediado por su capacidad para atravesar las membranas celulares, y una vez en el interior de la célula, reaccionar con hierro o cobre formando especies reactivas más dañinas como el radical hidroxilo. El peróxido de hidrógeno parece ser una molécula muy ubicua, este hecho enfatiza la importancia de los mecanismos de secuestro de iones metálicos para prevenir la toxicidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  *in vivo* disminuyendo así la posibilidad de que ocurra la reacción de Fenton (Halliwell et al., 2000; Halliwell y Gutteridge, 1999).

### *Ácido hipocloroso*

El ácido hipocloroso es producido por la enzima mieloperoxidasa que es especialmente activa en células de la serie blanca, fundamentalmente neutrófilos activados. Usualmente se produce mediante la reacción:



El HOCl ha tomado gran relevancia biomédica por su alta reactividad y su capacidad para dañar biomoléculas. Puede oxidar tioles, ascorbato, NAD(P)H y llevar a la

clorinación de bases nitrogenadas del DNA y de residuos de tirosina en proteínas. Además es capaz de atravesar las biomembranas celulares (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### *Oxígeno singulete*

El oxígeno singulete ( $^1\Delta_g \text{O}_2$ ) no es un radical libre porque no posee un electrón desapareado. Sin embargo, la restricción de *spin* que enlentece la reacción del  $\text{O}_2$  con especies no-radicalarias es removida, de modo que los oxígenos singuletes son mucho más oxidantes que el oxígeno molecular. La formación de oxígeno singulete es extremadamente importante en las reacciones fotoquímicas y ha cobrado creciente relevancia en la comprensión del proceso de fotoenvejecimiento dérmico y su rol en la etiopatogenia de los epitelomas, melanomas y otros cánceres de piel (Gutteridge, 1995; Halliwell y Gutteridge, 1999). Por otro lado, también es crucial su papel durante la fotoinactivación de agroquímicos por radiación solar, y por ende, en el establecimiento de sus vidas medias.

### **Otras especies reactivas**

Una gran cantidad de especies reactivas diferentes de las del oxígeno pueden generarse en los sistemas vivos. Los compuestos con grupos tioles ( $\text{R—SH}$ ) se oxidan en presencia de metales de transición para formar radicales *tilos* o *tioílos* ( $\text{RS}^\bullet$ ):



Por otra parte, los mismos **metales de transición** en estado catiónico pueden ser considerados radicales libres por tener electrones desapareados. Los cationes derivados del hierro, cobre, cadmio, níquel, cromo, mercurio, plomo y vanadio tienen la capacidad de producir ROS mediante reacciones tipo Fenton o Häber-Weiss productoras de radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno o anión superóxido (Stohs y Bagchi, 1995).

Así es como son capaces de provocar daño a lípidos, DNA, depleción de sulfhidrilos y alteración de la homeostasis del calcio. Estos efectos han sido extensamente implicados en la etiopatogénesis de enfermedades neurodegenerativas humanas (Rana, 2008; Bush y Curtain, 2008). Las diferencias en la toxicidad de cada uno de los metales de transición dependen fundamentalmente de la absorción, la solubilidad, el transporte, la reactividad química y la capacidad de formar complejos en el organismo.

Algunos óxidos del nitrógeno como  $\text{NO}^{\bullet}$  (óxido nítrico) y  $\text{NO}_2^{\bullet}$  (dióxido de nitrógeno) se agrupan bajo el nombre de especies reactivas del nitrógeno (RNS). La importancia de estas especies (**Tabla 2**) ha crecido enormemente en los últimos años abriendo un nuevo panorama de investigación sobre la incumbencia de especies reactivas del nitrógeno en el desarrollo de numerosas enfermedades humanas.

**Tabla 2.** Especies reactivas del nitrógeno

Radicales	No radicales
Óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ )	Ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ )
Dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ )	Tritóxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ )
	Ión nitrilo ( $\text{NO}_2^+$ )
	Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )
	Ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ )
	Anión nitroxilo ( $\text{NO}^-$ )

### *Óxido nítrico*

Se trata de un gas moderadamente soluble en agua que es capaz de difundir muy rápidamente a través de las biomembranas. El interés por el óxido nítrico se

incrementó luego del descubrimiento de sus múltiples roles fisiológicos. El NO<sup>•</sup> regula principalmente el tono de los vasos sanguíneos, y está también involucrado en el proceso de agregación plaquetaria y en la neurotransmisión en el SNC y SNP (Choi et al., 2002). Es sintetizado en organismos vivos principalmente por la acción de un grupo de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS) que convierten el aminoácido L-arginina en NO<sup>•</sup> y L-citrulina. Estas isoenzimas requieren oxígeno, FAD, FMN, tetrahidrobiopterina y hemo (en algunos casos Ca y calmodulina) para poder completar su ciclo catalítico.

La actividad de NOS es cuidadosamente regulada en tejidos sanos y está comprendida por al menos tres isoenzimas: (i) NOS *neuronal* (nNOS), que originariamente fuera identificada en el sistema nervioso y es de expresión constitutiva, (ii) NOS *endotelial* (eNOS), que también se expresa en forma constitutiva y es activa en la regulación de la presión sanguínea, y (iii) NOS *inducible* (iNOS), que fue identificada en macrófagos, hepatocitos, astrocitos, y otras estirpes celulares protagónicas en eventos pro-inflamatorios, su actividad está sujeta a inducción y es Ca<sup>2+</sup>-independiente. A diferencia de esta última, la nNOS y la eNOS son ambas isoenzimas Ca<sup>2+</sup>- y calmodulina-dependientes.

El NO<sup>•</sup> es generalmente poco reactivo con la mayoría de las especies no radicalarias, sin embargo, reacciona muy rápida y eficientemente con el radical superóxido, peróxido e hidroxilo:

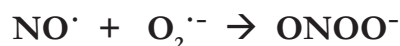


La exposición de células a óxido nítrico en concentraciones supra fisiológicas puede causar la modificación covalente de grupos —SH en la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Peuchen et al., 1997; Dawson y Dawson, 1996) y dañar a las proteínas ferro-sulfuradas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Jackson et al.,

2002; Moro et al., 2005; Heales et al., 1999). El NO<sup>•</sup> puede también inhibir la actividad de la aconitasa, creatina quinasa, ATP sintasa y citocromo-oxidasa (Navarro y Boveris, 2008). En la citocromo-oxidasa, por ejemplo, compete con el O<sub>2</sub> por el sitio activo (Jackson et al., 2002; Bolaños et al., 1994; Moro et al., 2005; Poderoso et al., 1996; Peuchen et al., 1997).

### *Peroxinitrito*

Se forma por la reacción entre el óxido nítrico y el anión superóxido:



Esta reacción es muy rápida pues presenta una constante de velocidad del orden  $k \approx 7.10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y tiene una gran relevancia biológica por al menos dos razones. En primer término, cada uno de los reactantes (NO<sup>•</sup> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) puede antagonizar los efectos biológicos del otro. Por ejemplo, la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en exceso próxima al endotelio vascular (o *in situ*) causa una rápida y poderosa vasoconstricción. En segundo lugar, la generación de ONOO<sup>-</sup> causa la oxidación de lípidos, la fractura de las cadenas del DNA por nitración y desaminación de bases (especialmente de guanina), nitración de residuos de aminoácidos aromáticos y la destrucción de restos tioles activos (—SH). La nitración de tirosinas puede llevar asimismo a la inactivación enzimática por inhabilitación del sitio activo, del sitio de reconocimiento de sustrato o cofactor, o de ambos (Peuchen et al., 1997; Navarro y Boveris, 2008; Dalle-Donne et al., 2006). Algunos *targets* de ataque incluyen a las glutatión transferasa, la Mn-SOD, proteínas estructurales, la prostaciclina sintasa, la aconitasa y a la ceruloplasmina entre otras. También inhibe la síntesis de DNA y libera hierro de los depósitos intracelulares de ferritina promoviendo reacciones tipo Fenton (Dawson y Dawson, 1996; Heales et al., 1999; Singh y Dikshit, 2007). Este último efecto ha sido implicado directamente en la etiopatogénesis del mal de Parkinson (Micheli, 1998).

Al pH fisiológico, el  $\text{ONOO}^-$  se protona formando ácido peroxinitroso ( $\text{HOONO}$ ) el cual sufre re-arreglos moleculares dando por dismutación nitrato y nitrito como productos finales (Halliwell y Gutteridge, 1999). Esta propiedad será extensamente aprovechada en este trabajo de tesis para estimar indirectamente su concentración, pues la suma de nitratos y nitritos en el medio celular resulta directamente proporcional a la concentración de  $\text{HOONO}$  y es insensible a los niveles dietarios de estos aniones (Miranda et al., 2001).

### **Rol fisiológico de las especies reactivas**

La producción de ROS/RNS tiene innumerables propósitos fisiológicos. Citaremos a continuación solo algunos:

- Las especies de hierro son cofactores de citocromos P450 y de las hemoperoxidasas.
- El  $\text{NO}^{\cdot}$  está involucrado en la regulación del tono vascular.
- El  $\text{H}_2\text{O}_2$  está involucrado en la síntesis de las hormonas tiroideas.
- Algunas mutaciones inducidas por especies reactivas pueden ser de importancia para los procesos evolutivos permitiendo una respuesta adaptativa a las condiciones cambiantes del entorno.
- Los ROS/RNS afectan la transcripción de genes (se han identificado en mamíferos más de 100 genes regulados por el estado redox celular), la tasa de crecimiento/proliferación celular, e incluso cumplirían un rol en la señalización intracelular (Jackson et al., 2002).
- El mecanismo de defensa de los fagocitos contra organismos invasores consiste en la liberación de estas especies reactivas ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}$ ) lo cual resulta muy efectivo como agente bactericida (Colton y Gilbert, 1987).



Teniendo en cuenta sus variadas funciones, esta claro que las especies reactivas son generadas en forma continua en las células. Sin embargo, producidas en exceso pueden oxidar biomoléculas, llevando a múltiples daños que eventualmente culminan en la muerte celular. Por esta razón las células han desarrollado un *sistema de defensa antioxidante* (SDA) de manera de limitar la formación de especies activas a cotas o rangos fisiológicos evitando el daño celular que puedan causar (De Zwart, 1999). A continuación haremos una síntesis de los componentes del SDA.

### **Sistema de defensa antioxidante**

Las defensas antioxidantes comprenden:

- Agentes que remueven catalíticamente radicales libres y otras especies reactivas, como son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).
- Proteínas que disminuyen la disponibilidad de pro-oxidantes, tales como hemo e iones de hierro y cobre. Entre éstas proteínas se encuentran las transferrinas, haptoglobinas, hemopexinas, ceruloplasmina (CRP) y metalotioneínas (MTs).
- Proteínas que protegen a las biomoléculas del daño por otros mecanismos como son las proteínas de shock térmico o HSP.
- Agentes de bajo peso molecular que neutralizan ROS/RNS. Ejemplos de ellos son el glutatión (GSH),  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -Toc), ácido ascórbico, y otros antioxidantes lipo-e hidro-solubles. De aquí la íntima relación que existe entre la nutrición y las defensas antioxidantes.

La composición de las defensas antioxidantes varía según el tejido y el tipo de célula en un tejido dado, por otro lado, el fluido extracelular tiene mecanismos protectivos

diferentes a los del ambiente intracelular. Las defensas antioxidantes pueden inducirse por la exposición a ROS/RNS y/o por señales moleculares endógenas como son las de las citoquinas (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### *¿Qué es un antioxidante?*

El término *antioxidante* es muy utilizado pero pocas veces bien definido. Los expertos en tecnología de alimentos definen un antioxidante como aquel compuesto que inhibe la peroxidación lipídica y el consecuente enranciamiento de los alimentos. Los expertos en polímeros usan antioxidantes para controlar la polimerización en la manufactura de las gomas, plásticos y pinturas. ¿Cómo se extienden estos conceptos a los organismos vivos?. Se ha propuesto como definición de antioxidante la de ser “*cualquier sustancia que cuando se presenta en bajas concentraciones en comparación con la del sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de este sustrato*”. El término *sustrato oxidable* incluye a cualquier tipo de molécula encontrada *in vivo*, pues todas son factibles de sufrir daño oxidativo si se las sitúa en el ambiente apropiado.

La protección antioxidante fisiológica involucra a una gran variedad de componentes químicos de origen endógeno y exógeno (**Tabla 3**), que interaccionan mediante efectos sinérgicos y complementarios, así la protección antioxidante resulta ser un mecanismo muy flexible y eficiente (Jacob, 1995).

**Tabla 3.** Componentes del sistema de defensa antioxidante

Antioxidantes endógenos	Antioxidantes exógenos	Proteínas de unión a metales	Enzimas
glutación (GSH)	vitamina C (ascorbato)	ceruloplasmina (CRP)	superóxido dismutasa (SOD)
NADPH y NADH	vitamina E ( $\alpha$ -Toc)	metalotioneínas (MTs)	catalasa (CAT)
ubiquinol	carotenoides	ferritina	glutación peroxidasa (GPx)
ácido úrico		transferrina	glutación reductasa (GR)
bilirrubina		albúmina	glutación transferasa (GST)

El sistema antioxidante se puede dividir en dos principales líneas de defensa: sistema antioxidante enzimático y no enzimático.

### Sistema antioxidante enzimático

#### *Superóxido dismutasa (SOD)*

Existen dos isoenzimas principales de la superóxido dismutasa: CuZn-SOD y Mn-SOD. Las SODs catalizan la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno:



La CuZn-SOD se ha hallado en virtualmente todas las células eucariotas, y es de ubicación citosólica principalmente. Tiene una masa molecular relativa de 32 KDa, y contiene dos subunidades, cada una de las cuales posee en su sitio activo un ión cobre y

uno de zinc. Los iones de cobre parecen ser parte de la reacción de dismutación sufriendo una oxidación y reducción alternativa, mientras que los iones  $Zn^{2+}$  no actúan durante el ciclo catalítico pero ayudan a la estabilización de la estructura enzimática. El cianuro es un potente inhibidor de la CuZn-SOD, por lo que es frecuentemente empleado en la determinación selectiva de la proporción de las isoenzimas SOD. Esta enzima también se inhibe por incubación en presencia de dietil-ditiocarbamatos que se unen al cobre y lo remueven de su sitio activo (estos compuestos inhiben también otras enzimas que utilizan Cu en su sitio activo).

La Mn-SOD no es inhibida por  $CN^-$  ni por ditiocarbamatos, tiene una masa molecular relativa de 40 KDa, y contiene Mn (III) en su sitio activo. A pesar de estas diferencias la Mn-SOD cataliza la misma reacción que la isoenzima que contiene Cu y Zn. En la mayoría de los tejidos animales la Mn-SOD está ubicada en las mitocondrias y consta de 4 subunidades. La remoción del Mn de su sitio activo causa la pérdida de la actividad catalítica.

El descubrimiento de las SOD dio lugar a la teoría que propone al radical superóxido como principal responsable de la toxicidad del oxígeno y plantea a la SOD como la principal defensa antioxidante, por lo que se la suele denominar la *enzima centinela* del SDA.

### *Catalasa (CAT)*

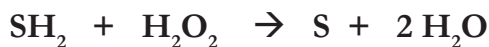
La dismutación de  $O_2^{\bullet -}$  genera  $H_2O_2$ . Los organismos aerobios contienen dos tipos de enzimas capaces de remover el peróxido de hidrógeno: la catalasa y la peroxidasa.

La catalasa provoca la descomposición directa de  $H_2O_2$  a  $O_2$  y  $H_2O$ :



mientras que la peroxidasa, remueve peróxido de hidrógeno utilizando un segundo

sustrato ( $\text{SH}_2$ ):



La mayoría de las células aeróbicas contienen catalasa. En los animales esta enzima está especialmente concentrada en el hígado. En los eritrocitos ayuda a la protección contra el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado por la dismutación de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  resultante de la autooxidación de la hemoglobina. Como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  difunde rápidamente entre los tejidos, los eritrocitos pueden proteger a otras células del organismo captando  $\text{H}_2\text{O}_2$  y neutralizándolo eficientemente. El cerebro, los riñones y el músculo tienen una actividad de catalasa mucho menor respecto a la observada en el hígado.

Estructuralmente la catalasa consiste en cuatro subunidades proteicas cada una de las cuales contiene un grupo hemo con  $\text{Fe}^{3+}$  unido a su sitio activo conjuntamente con una molécula de NADPH. La disociación de la catalasa en sus subunidades constitutivas por almacenamiento prolongado o por exposición a pHs extremos causa la pérdida de su actividad biológica. Por otro lado la pre-incubación de la molécula con cantidades apropiadas de etanol la activa para su determinación *in vitro* (Aebi, 1984) tal como se verá en la parte experimental.

Es muy difícil lograr la saturación de la catalasa debido a que esta enzima tiene una gran  $V_{\text{max}}$ . Puede ser inhibida por azida, cianuro, HOCl y aminotriazol.

La actividad de catalasa en tejidos animales y vegetales se encuentra en los peroxisomas debido a que en estas organelas es en donde se ubican la mayoría de las enzimas productoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las mitocondrias y el retículo endoplásmico (al menos en el hígado) prácticamente no contienen actividad de CAT. Así es como la mayor parte de la actividad de la enzima que se determina en los homogenatos celulares se debe a la ruptura de los peroxisomas durante la obtención de las muestras. Esto es así debido a que los peroxisomas son organelas muy frágiles que pierden su integridad durante el

proceso de homogenización (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### *Glutación peroxidasas (GPx)*

La familia de las glutación peroxidasas (GPx) remueven  $\text{H}_2\text{O}_2$  acoplando su reducción a  $\text{H}_2\text{O}$  con la oxidación de glutación reducido (GSH):



Estas enzimas están ampliamente distribuidas en todos los tejidos animales y utilizan específicamente GSH como donador de hidrógenos. Sin embargo, pueden catalizar la reducción de otros peróxidos (orgánicos) diferentes del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Es así que catalizan la reducción GSH-dependiente de hidroperóxidos de ácidos grasos y colesterol 7- $\beta$ -hidroperóxidos entre otros. En todos los casos el grupo peroxilo se reduce a alcohol:



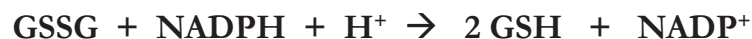
Estructuralmente las GPx tienen cuatro subunidades cada una de las cuales tiene un átomo de selenio en su sitio activo que está presente como selenocisteína (una cisteína donde el átomo de azufre es reemplazado por el de selenio, es decir R—SeH en lugar de R—SH). Esta es una de las razones por las cuales es esencial incorporar selenio a través de la dieta como un elemento antioxidante.

Las peroxidasas que contienen selenio comprenden una super-familia de proteínas de las cuales existen varios miembros. Uno es la glutación peroxidasa clásica, mientras que otro es la fosfolípido hidroperóxido-glutación peroxidasa (PHGPx). La PHGPx es una proteína monomérica capaz de reducir hidroperóxidos de ácidos grasos y colesterol esterificados reduciéndolos a alcoholes. Esta enzima también resulta activa en la reducción de hidroperóxidos de timina formados como consecuencia del ataque de radicales libres al DNA.

Tejidos como el músculo esquelético y ciertas regiones del cerebro tienen niveles muy bajos de catalasa pero muy altos de GPx. El hígado contiene niveles elevados de ambas enzimas pero con diferente localización. Mientras que la catalasa se ubica en su totalidad en los peroxisomas, la glutatión peroxidasa se encuentra principalmente en el citosol y también en la matriz de la mitocondria (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### *Glutatión reductasa (GR)*

La relación entre glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) en células normales es muy elevada y está sustentada por un mecanismo enzimático que recompone el GSH a partir del GSSG. Esta función es llevada a cabo por la glutatión reductasa mediante la reacción:



En las células animales el NADPH requerido por la GR es provisto principalmente por los dos primeros pasos de la vía de las pentosas fosfato, catalizados por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa. De modo que ambas enzimas resultan ser complementos imprescindibles del sistema de defensa antioxidante enzimático.

La glutatión reductasa (GR) está compuesta por dos subunidades proteicas cada una con una molécula de FAD en su sitio activo. Aparentemente el NADPH reduce al FAD, que luego cede sus electrones al puente disulfuro entre dos residuos cisteína del sitio activo. Los dos grupos —SH así formados, interaccionan con el GSSG y lo reducen a dos moléculas de GSH restituyendo el disulfuro de la proteína (Halliwell y Gutteridge, 1999).

*Glutación transferasa (GST)*

El glutación también está involucrado en el metabolismo de xenobióticos tales como los plaguicidas. Muchos compuestos son metabolizados por conjugación con GSH previo a su eliminación, este proceso está catalizado por las glutación transferasas (GST):



El hígado es especialmente rico en esta actividad enzimática, y el resultado de la conjugación con glutación es lograr un compuesto que se pueda excretar con la bilis a través de bombas para GSH-conjugados ATP-dependientes. Alternativamente, los productos se pueden transformar en conjugados de N-acetilcisteína por degradación y acetilación pudiendo ser excretados a través de la orina. En presencia de grandes cantidades de xenobióticos, sobre todo si son hepatotóxicos, puede disminuir la concentración hepática de glutación alterándose la capacidad antioxidante de este tejido, o afectarse la exportación de GSH a la sangre lo cual conduce a una disminución de la capacidad antioxidante sistémica.

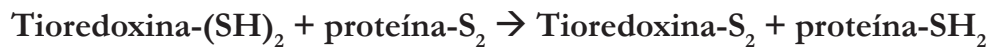
Algunos miembros de la súper-familia de GSTs tienen actividad de glutación peroxidasa frente a hidroperóxidos orgánicos, por lo que son llamados por algunos autores como GPx selenio-independientes (Halliwell y Gutteridge, 1999).

*Otras proteínas con actividad antioxidante.**Tiorredoxina*

De todas las proteínas con función antioxidante descritas hasta la actualidad, la tiorredoxina es la más importante. Es un polipéptido encontrado tanto en células eucariotas como en procariotas cuya actividad principal se concentra en el retículo endoplásmico. Esta enzima contiene dos grupos tioles adyacentes (en forma reducida)



que se convierten en un disulfuro cuando la tioredoxina se oxida. Es capaz de sufrir reacciones redox con muchas proteínas:



La tioredoxina se une a su proteína blanco y reduce el disulfuro mientras que sufre oxidación de los grupos —SH de sus cisteínas. La forma oxidada puede volver a reducirse a través de la acción de una enzima denominada tioredoxina reductasa, una flavoproteína muy parecida a la GR que incluso también utiliza NADPH como proveedor de electrones.

### Sistema antioxidante no enzimático

Así como las enzimas antioxidantes resultan muy importantes en la defensa celular contra las especies reactivas, también cumplen un rol crucial compuestos de bajo peso molecular de origen endógeno o exógeno (provenientes de la dieta) y varias proteínas especializadas en la captura de metales de transición.

*Proteínas secuestradoras de metales: transferrina, ferritina, ceruloplasmina y metalotioneínas*

El Fe y el Cu son esenciales para el organismo porque forman parte de proteínas y enzimas involucradas en la respiración celular, en el transporte de oxígeno, en la formación de óxido nítrico y en muchas otras. Al mismo tiempo, estos metales en estado libre son potencialmente peligrosos por su capacidad para catalizar transferencias de un solo electrón, generando productos de autooxidación (oxidación de adrenalina, dopamina, ascorbato), conversión de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{OH}^\bullet$  y descomposición de peróxidos lipídicos a radicales muy reactivos como el peroxilo y el alcoxilo. Además de los metales “libres” los grupos hemo o ciertas hemo-proteínas pueden descomponer peróxidos lipídicos e

interaccionar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  causando daño. Así es como los organismos han desarrollado mecanismos de almacenamiento y transporte de estos compuestos.

La **transferrina** es una glicoproteína sintetizada principalmente en el hígado, especializada en el transporte de Fe proveniente de la absorción intestinal y del catabolismo del grupo hemo. Las células que requieren Fe expresan en su membrana al receptor de la transferrina. El hierro captado se deposita unido a la **ferritina** que constituye la principal proteína encargada de su almacenamiento, junto con la hemosiderina.

El cobre, es un catalizador muy poderoso del daño por radicales libres pues, además de convertir  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{OH}^\bullet$ , descomponer lipoperóxidos y catalizar las reacciones de autooxidación; causa daño al DNA y estimula la peroxidación de las LDL. El Cu es absorbido a partir de los alimentos e ingresa a la sangre unido a la albúmina. El complejo [Cu-albúmina] es captado luego por el hígado, que incorpora al metal en la proteína **ceruloplasmina** (CRP). La ceruloplasmina se secreta al plasma y el Cu en exceso se excreta junto con la bilis. La CRP tiene 6 sitios de unión al Cu de alta afinidad.

El estrés oxidativo puede llevar a una mayor liberación de Fe y posiblemente también de Cu. Esto podría explicar por qué las células tienen un sistema enzimático que remueve  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (SOD),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (catalasa y peroxidasa) y peróxidos lipídicos para su defensa antioxidante. Las **metalotioneínas** (MTs) son una amplia familia de proteínas de bajo peso molecular que se encuentran en el citosol de células eucariotas especialmente en hígado, riñón e intestino. Cada molécula de metalotioneína puede unir entre 5 a 7 átomos metálicos entre los que se encuentran  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ . Las funciones probables de estas proteínas son el almacenamiento de metales en una forma no tóxica, la regulación celular del metabolismo del Zn y Cu, y el control de la absorción intestinal de cationes metálicos, aunque también se las ha involucrado en la regulación de la expresión génica en células eucariotas (Halliwell y Gutteridge, 1999).

*Principales antioxidantes endógenos de bajo peso molecular**Glutati3n*

Adem1s de su rol como sustrato en reacciones catalizadas por la glutati3n peroxidasa y glutati3n transferasa, el GSH est1 involucrado en otros procesos metab3licos como el mantenimiento de los niveles de ascorbato, la comunicaci3n intercelular, y la prevenci3n de la oxidaci3n de grupos —SH de las prote3nas y su subsecuente *cross-linking*. Tambi3n puede quelar iones Cu disminuyendo su capacidad para generar radicales libres y es un agente radioprotectivo. Es el principal “buffer-redox” de las c3lulas, tiene una elevada capacidad pues en condiciones fisiol3gicas, solo el 1 % del glutati3n celular se encuentra en su forma oxidada (GSSG) (Giustarini et al., 2003). A continuaci3n mencionaremos brevemente dos aspectos cruciales vinculados al glutati3n: su bios3ntesis y su funci3n como *scavenger* de especies reactivas.

El glutati3n se sintetiza a trav3s de dos pasos enzim1ticos. Primero la enzima  $\gamma$ -glutamil cisteinil sintetasa cataliza la formaci3n del dip3ptido glutamil-ciste3na:

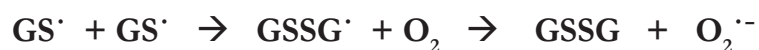


que es luego convertido en GSH por la glutati3n sintetasa:



Las c3lulas pueden sintetizar la ciste3na a partir de la metionina. La enzima  $\gamma$ -glutamil cisteinil sintetasa es inhibida por el GSH que compite con el glutamato por el sitio activo (Halliwell y Gutteridge, 1999).

*In vitro*, el GSH neutraliza especies reactivas como OH $\cdot$ , HOCl, peroxinitrito, RO $\cdot$ , RO $_2\cdot$ , radicales de C y  $^1O_2$ . Estas reacciones con radicales libres generan el radical tilo o tio3lo (GS $\cdot$ ) que a su vez produce O $_2\cdot^-$  por la reacci3n:



Debido a esto, la SOD coopera con el GSH en la remoción de los radicales libres *in vivo*, como también lo hace el ascorbato (AScH<sup>-</sup>):



La reacción de GSH con peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) da lugar a la formación de nitrosotioles (GSNO) que se descomponen luego regenerando óxido nítrico (NO<sup>•</sup>).

El GSH se encuentra en las células en concentraciones del orden milimolar lo que hace que sea posible una eficiente neutralización de estas especies reactivas *in vivo*.

### *Bilirrubina*

La bilirrubina es el producto final del catabolismo del grupo hemo. La mayor parte del hemo proviene de la destrucción de los eritrocitos en el bazo y el resto (alrededor del 20 %) proviene de otras proteínas con grupos hemo como los citocromos y la catalasa. *In vitro* la bilirrubina es un poderoso neutralizante de radicales peroxilo y de oxígeno singulete. Sin embargo, hay poca evidencia experimental directa acerca del rol fundamental que pudiera desempeñar la bilirrubina como antioxidante *in vivo* (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### *Ácido lipoico*

El ácido lipoico, también llamado ácido tióctico, es un cofactor esencial de complejos multienzimáticos que catalizan la descarboxilación de  $\alpha$ -cetoácidos como el piruvato (a acetil coenzima A) y  $\alpha$ -cetogluturato (a succinil coenzima A) en el ciclo de Krebs. Tanto la forma oxidada (DHHLA) como la reducida del ácido lipoico (LA) muestran propiedades antioxidantes *in vitro* pues neutralizan RO<sub>2</sub><sup>•</sup>, HOCl, OH<sup>•</sup>, ONOOH, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (solo DHHLA) y oxígeno singulete. Además, puede unir Fe y Cu y convertirlos en formas poco reactivas. El ácido dihidrolipoico (DHHLA) es un agente reductor muy poderoso

( $E^0$  - 0.32 V para la cupla DHLA/ácido lipoico), y es así como puede reducir GSSG a GSH ( $E^0$  -0.24 V), dihidroascorbato a ascorbato, y regenerar  $\alpha$ -tocoferol a partir del radical tocoferilo directamente o a través del ascorbato (Kagan et al., 1992).

Se ha visto que la administración de ácido lipoico revierte algunos de los efectos producidos por la deficiencia de  $\alpha$ -tocoferol y vitamina C en roedores (Rosenberg y Culik, 1959).

*In vivo* se requiere que un agente reductor convierta ácido lipoico en DHLA. Esta función la desempeña la lipoamida deshidrogenasa que emplea NADH o NADPH. La glutatión reductasa y la tioredoxina reductasa también tienen actividad reductora sobre el ácido lipoico (Packer et al., 1995).

Desde el punto de vista de su posible uso terapéutico el ácido lipoico cumple con varias de las características de un antioxidante “ideal”. Se absorbe con la dieta rápidamente, se convierte en células y tejidos en su forma activa, puede desempeñar una variedad de acciones como antioxidante incluyendo la interacción con otros antioxidantes tanto en la fase acuosa como en la lipídica y tiene baja toxicidad (Packer y Tritschler, 1996). Además, el ácido lipoico es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica (Panigrahi et al., 1996) propiedad que será aprovechada en el presente trabajo de tesis.

### *Coenzima Q*

Juega un papel crucial en la cadena de transporte de electrones mitocondrial sufriendo una oxidación y reducción alternativa vía el intermediario radicalario ubisemiquinona ( $\text{CoQH}^\cdot$ ). *In vitro*, el ubiquinol ( $\text{CoQH}_2$ ) puede neutralizar radicales  $\text{RO}_2^\cdot$  e inhibir la peroxidación lipídica:



El contenido de ubiquinol de las LDL resulta ser un factor importante para su

resistencia a la peroxidación. Este antioxidante es capaz también de regenerar  $\alpha$ -tocoferol a partir de su radical en lipoproteínas y biomembranas. La velocidad de neutralización de  $\text{RO}_2^\cdot$  por el  $\text{CoQH}_2$  es 10 veces menor que la del  $\alpha$ -tocoferol, de manera que el reciclado podría ser más importante *in vivo*, ya que las concentraciones de ubiquinol y  $\alpha$ -tocoferol en muchas biomembranas celulares son comparables. En contraste, las LDL contienen mucho menos ubiquinol que  $\alpha$ -tocoferol (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### *Ácido úrico*

El ácido úrico se produce por la oxidación de la hipoxantina y xantina mediante la xantina oxidasa y deshidrogenasa respectivamente. En plasma la concentración se ubica en el rango milimolar. Al pH fisiológico casi todo el ácido úrico se encuentra en forma de urato.

Oxidantes fuertes como  $\text{OH}^\cdot$  oxidan al urato transformándolo en un radical libre, el electrón desapareado deslocaliza a través del anillo purínico dando lugar a una estabilización por resonancia. *In vitro* es un poderoso neutralizador de  $\text{RO}_2^\cdot$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2$  singulete,  $\text{O}_3$  y  $\text{NO}_2^\cdot$ . El urato también protege a las proteínas de la nitración por adición de  $\text{ONOO}^-$  y puede quelar iones metálicos. Por su elevada concentración en plasma, parece resultar suficiente para neutralizar ROS/RNS *in vivo* (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### *Principales antioxidantes obtenidos a través de la dieta*

#### *Ácido ascórbico*

El ácido ascórbico tiene grupos  $\text{—OH}$  ionizables siendo el mono-anión la forma más frecuente al pH fisiológico. Las plantas y muchos animales (incluyendo las ratas)

tienen la capacidad de sintetizar ácido ascórbico, mientras que los humanos y otros primates carecen de la actividad enzimática (gulonolactona-oxidasa) indispensable para el último paso de su biosíntesis. El ascorbato es necesario *in vivo* como cofactor de al menos ocho enzimas, las más conocidas están involucradas en la vía de biosíntesis del colágeno. El ascorbato también es cofactor de la enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilasa que convierte dopamina en noradrenalina.

Las células de mamíferos incorporan ascorbato a partir de los fluidos tisulares por captación favorecida por el gradiente de  $\text{Na}^+$ . La absorción intestinal del ascorbato también es  $\text{Na}^+$ -dependiente.

*In vitro* el ascorbato ha demostrado ser un antioxidante muy efectivo protegiendo las biomoléculas de los daños causados por ROS y por RNS. Los niveles de ascorbato encontrados *in vivo* (30-100  $\mu\text{M}$  en plasma humano) serían suficientes para que pueda alcanzar efectos antioxidantes como los registrados *in vitro*. Actúa como scavenger de radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{HO}_2^{\cdot}$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $\text{RO}_2^{\cdot}$ , tioilo y del ácido hipocloroso y peroxinitroso. También regenera  $\alpha$ -tocoferol a partir del radical tocoferilo en lipoproteínas y membranas.

La oxidación del ascorbato por reacción con ROS/RNS en fluidos corporales genera el radical semidihidroascorbato que es inestable y sufre su oxidación a dihidroascorbato. Este último puede ser luego reducido a ascorbato por enzimas que dependen de GSH o NADH. Si no es reducido, sufre ruptura del anillo y se hidroliza irreversiblemente a oxalato, treonato, y xilonato principalmente (Cadenas y Packer, 2002).

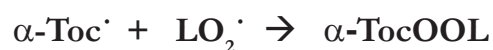
*In vitro*, la vitamina C puede también ejercer un efecto pro-oxidante al reducir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , que en contacto con  $\text{H}_2\text{O}_2$  cataliza la formación del radical hidroxilo. No existe hasta el momento evidencia concreta sobre si estos efectos pro-oxidantes serían relevantes fisiológicamente (Halliwell y Gutteridge, 1999).

*Vitamina E (α-Toc)*

La vitamina E es un *scavenger* de radicales peroxilo y probablemente el inhibidor más importante de la reacción en cadena de peroxidación de lípidos, aunque esta puede ser prevenida por inhibición de su inicio a través de enzimas que neutralizan ROS/RNS y de proteínas secuestradoras de metales de transición. El nombre “vitamina E” no refiere a ninguna estructura química en especial, es mas bien un término genérico de tipo nutricional. Las principales fuentes alimenticias de vitamina E son el germen de trigo, los aceites vegetales, margarinas, nueces, granos y vegetales de hojas verdes. Existen ocho sustancias naturales con actividad de vitamina E, *d*-α-, *d*-β-, *d*-γ- y *d*-δ-tocoferoles y *d*-α-, *d*-β-, *d*-γ- y *d*-δ-tocotrienoles. Los tocoferoles tienen tres carbonos asimétricos dando lugar a ocho isómeros ópticos. El más efectivo biológicamente es el RRR-α-tocoferol formalmente llamado *d*-α-tocoferol. Los tocoferoles y los tocotrienoles inhiben la cadena de peroxidación lipídica porque son capaces de neutralizar radicales lipoperóxidos (LO<sub>2</sub>·) con una velocidad mayor a la de la reacción de este radical con el ácido graso adyacente o con las proteínas de membrana. El radical tocoferilo (α-Toc·) es lo suficientemente estable para evitar que la cadena de peroxidación continúe:



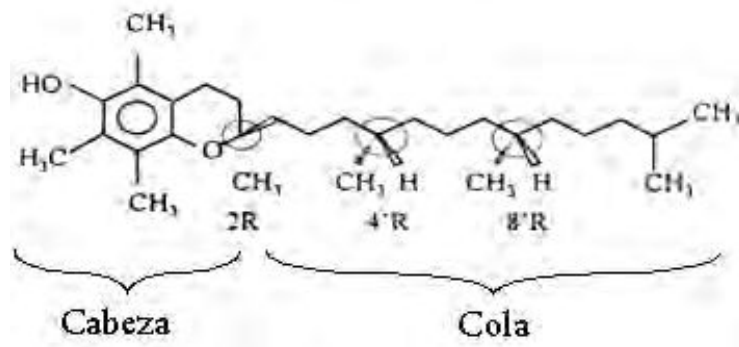
Los tocoferoles reaccionan con el oxígeno singulete protegiendo a las biomembranas de esta especie reactiva. Sin embargo, el α-Toc reacciona lentamente con O<sub>2</sub><sup>·-</sup> y con OH·, mientras que el radical α-Toc· puede reaccionar con un radical peroxilo para dar una especie no radicalaria:



El α-Toc es una molécula liposoluble por lo que tiende a concentrarse en las membranas y en las lipoproteínas. La cola hidrofóbica se encuentra anclada en las biomembranas exponiendo al anillo cromanol, que contiene el OH fenólico, hacia la



superficie (Halliwell y Gutteridge, 1999).



Así, el grupo cromanol de la cabeza de la molécula parece ser el principal responsable de las propiedades antioxidantes del  $\alpha$ -tocoferol (esta involucrado en la neutralización de radicales  $RO_2^{\cdot}$ ), mientras que la cola es responsable de la cinética de transporte y de su retención en las membranas (Burton y Traber, 1990).

Durante su acción como antioxidante cortando la cadena de peroxidación lipídica se consume el  $\alpha$ -tocoferol al transformarse a su forma radicalaria. Afortunadamente existen mecanismos fisiológicos a través de los cuales la forma radicalaria se re-convierte en  $\alpha$ -tocoferol. Uno de estos mecanismos es la reducción por ascorbato, aunque el ubiquinol también es capaz de reciclar  $\alpha$ -tocoferol, se cree que el primer mecanismo es el mas importante *in vivo* (Buettner, 1993).

Al igual que el ascorbato, los tocoferoles pueden reducir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  a  $Cu^+$  y así pueden ejercer un efecto pro-oxidante en sistemas *in vitro*, aunque se cree que estos efectos no serían significativos *in vivo*.

Se absorbe un alto porcentaje de  $\alpha$ -tocoferol de los alimentos y, por sus características liposolubles, es empaquetado en los quilomicrones. Durante el catabolismo de los quilomicrones por la lipoproteinlipasa, la vitamina E puede ser transferida a otras lipoproteínas o a los tejidos. Luego llega al hígado en los remanentes de quilomicrones. Los niveles de RRR- $\alpha$ -tocoferol son mayores en plasma porque el hígado incorpora

selectivamente este isómero en las VLDL. La secreción hepática de las VLDL renueva el stock de RRR- $\alpha$ -tocoferol del plasma (Burton y Traber, 1990). Burton y Traber también estudiaron la cinética de recambio de  $\alpha$ -tocoferol y observaron que en tejidos como el hígado, bazo, plasma y glóbulos rojos la molécula tiene un recambio rápido, mientras que en tejidos como el corazón, testículo, músculo y cerebro el recambio es mucho más lento.

### *Carotenoides*

Existe evidencia epidemiológica que indica que las dietas ricas en frutas, granos y vegetales ayudan a prevenir enfermedades en humanos, sobre todo enfermedades cardiovasculares y cáncer. A menudo esta propiedad le fue conferida a un grupo de isoprenoides denominados carotenoides. Son un grupo de pigmentos encontrados en vegetales. Se acumulan principalmente en el tejido adiposo (80-85 % del total) y en el hígado (8-12 %). Los niveles plasmáticos varían en función del tipo de dieta. En el plasma humano usualmente están presentes en un rango  $\mu$ molar (licopeno 0.5-1.0  $\mu$ M;  $\beta$ -caroteno 0.3-0.6  $\mu$ M;  $\alpha$ -caroteno 0.05-0.1  $\mu$ M y luteína 0.3  $\mu$ M).

La estructura química de los carotenoides es compleja y variada, y se caracteriza por presentar enlaces dobles conjugados formando la parte central de la molécula. Esto permite una extensa deslocalización de los electrones a lo largo de toda la molécula, razón por la cual los carotenoides son capaces de inactivar moléculas excitadas permaneciendo como especies poco reactivas. Por ejemplo son capaces de inactivar oxígeno singulete (Miller et al., 1996). Algunos pueden inducir la expresión de enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos incluyendo las enzimas P450-dependientes, que juegan un rol fundamental en la detoxificación de compuestos exógenos como los que nos ocupan en este trabajo de tesis (Jackson et al., 2002).

### *Fenoles vegetales*

Los fenoles contienen característicamente oxidrilos unidos a anillos bencénicos. Estas sustancias son especialmente abundantes en vegetales e incluyen a una gran cantidad de compuestos de diversa complejidad estructural (los tocoferoles y los tocotrienoles forman parte de ellos). Muchos fenoles diferentes de la vitamina E tienen la capacidad de interrumpir la cadena de peroxidación lipídica. Los que presentan dos grupos —OH adyacentes tienen la capacidad de quelar metales dando lugar a especies con baja tendencia a promover reacciones de generación de radicales libres. Además pueden neutralizar especies reactivas del oxígeno como  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $ONOOH$  y  $HOCl$ . Ejemplos característicos son el ácido cafeico, antocianinas, catequinas, epicatequinas, resveratrol, sesamol e isovitexina (Frei y Higdon, 2003; Halliwell y Gutteridge, 1999).

### **Estrés oxidativo y supervivencia celular**

Tal como se mencionó antes, el OS puede ser consecuencia de una disminución de las capacidades antioxidantes, de un incremento en la producción de ROS/RNS o de ambos. Resulta interesante resumir a continuación el efecto neto que tiene el OS en la sobrevivencia de las células.

El OS puede desencadenar un proceso de adaptación, de daño celular más o menos permanente, e incluso la muerte de la célula por lisis o apoptosis.

Las células pueden soportar un estrés oxidativo moderado que a menudo es neutralizado por la inducción de la síntesis de componentes del sistema de defensa antioxidante. Esta reacción defensiva es un intento por restaurar el balance entre prooxidantes y antioxidantes. No se sabe demasiado acerca de estos mecanismos en células eucariotas pero datos obtenidos a partir de estudios en bacterias revelan que

proteínas reguladas por el estado redox controlan la traducción de los mRNAs específicos para las enzimas del SDA. La sobrevivencia de la célula sometida a OS está en consecuencia signada por la magnitud del daño oxidativo a sus principales familias de moléculas, y por esa razón, haremos una síntesis de la injerencia de cada uno de estos tipos de daño sobre el efecto final.

### **Daño oxidativo al DNA**

Los ROS/RNS pueden dañar al DNA a través de un ataque químico directo (daño a las bases púricas y pirimidínicas o a los azúcares) o de mecanismos indirectos (activación de endonucleasas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes, interferencia con enzimas que replican o reparan el DNA, o con vías de señalización nuclear y citoplasmática). La molécula de DNA es muy estable, sin embargo, en células que sufren estrés oxidativo se pueden observar fracturas en sus cadenas.

Es interesante señalar que no todos los ROS/RNS dañan al DNA por igual. Según parece, el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{NO}^{\cdot}$  o el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no reaccionarían con ninguna de las bases del DNA o del RNA ni con las pentosas a una velocidad significativa. En contraste, la exposición de la molécula de DNA a  $\text{OH}^{\cdot}$  produce una multitud de productos de oxidación ya que reacciona con los azúcares, las purinas y las pirimidinas. Por ejemplo, el radical hidroxilo puede formar un aducto con la guanina uniéndose a las posiciones 4, 5 u 8 del anillo purínico. La 8-OH-guanina es uno de los productos de oxidación más frecuentes (Dalle-Donne et al., 2006) y se ha visto que altera la capacidad de la enzima encargada de metilar las citosinas adyacentes, de esta forma puede alterar los patrones de metilación que son de gran importancia para la regulación de la expresión génica. Algo similar ocurre con el anillo de la adenina, las pirimidinas también son atacadas por el radical hidroxilo produciendo numerosos compuestos. Así, la timina puede sufrir

una abstracción de hidrógeno en el anillo o en el grupo metilo dando lugar a especies radicalarias que se pueden transformar en peróxidos de timina. La desoxiribosa también es atacada por el radical hidroxilo dando lugar a varios productos, y en este caso cualquiera de las posiciones de la estructura del azúcar son susceptibles a la formación de radicales de carbono por el mecanismo de abstracción de hidrógeno. En presencia de  $O_2$  estos productos se transforman en radicales peroxilo.

El daño por  $OH^\bullet$  requiere que este se produzca en las cercanías de su blanco molecular pues se trata de una especie tan reactiva que es incapaz de difundir distancias relativamente grandes desde su sitio de formación (Wiseman y Halliwell, 1996).

El oxígeno singlete genera muchos productos derivados de guanina incluyendo 8-OH-guanina. Los radicales formados en la peroxidación lipídica ( $RO_2^\bullet$ ,  $RO^\bullet$ ) son capaces de dañar al DNA. Mientras que los RNS ( $NO_2^\bullet$ ,  $ONOOH$ ,  $N_2O_3$  y  $HNO_2$ ) son capaces de producir nitración, nitrosación y desaminación de bases del DNA.

Asimismo, existe un vínculo estrecho entre factores puramente físicos y daño por radicales libres. La exposición de las células a la luz UV puede causar daño al DNA por dos mecanismos; la luz UV convierte  $H_2O_2$  en  $OH^\bullet$  por homólisis, y por sí misma la luz UV de cierta longitud de onda causa el *cross-linking* (enlace covalente) de dos pirimidinas adyacentes formando los denominados *dímeros de pirimidina* (De Zwart et al., 1999; Halliwell y Gutteridge, 1999).

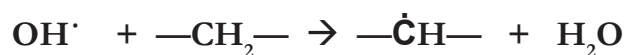
Todos estos daños mediados por radicales y especies altamente reactivas implican que deben funcionar de manera óptima las enzimas encargadas de la reparación del DNA. Sin embargo, este requisito no siempre se cumple y entonces sobrevienen cambios permanentes que se traducen en mutaciones heredables.

## Daño oxidativo a lípidos

La peroxidación lipídica ha sido definida como el deterioro por fractura de cadena de los lípidos enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados (o PUFAs). Las membranas celulares son el blanco predilecto de este tipo de daño pues contienen grandes cantidades de PUFAs que forman parte de los lípidos anfipáticos que las constituyen. Al mismo tiempo, algunos tejidos son más dañados que otros por ser especialmente ricos en lípidos con alto grado de insaturación. El sistema nervioso se encuentra entre los más sensibles (Gorman et al., 1996).

La *iniciación* de la peroxidación lipídica ocurre cuando el ácido graso es atacado por cualquier especie con suficiente reactividad como para abstraer un átomo de hidrógeno del carbono metilénico ( $-\text{CH}_2-$ ). Los ácidos grasos saturados o monoinsaturados son más resistentes a este ataque que los PUFAs. La presencia de dos dobles enlaces adyacentes a un grupo metileno debilita substancialmente la energía de unión del átomo de hidrógeno al carbono, dando hidrógenos bis-alílicos.

Los radicales  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$  y  $\text{RO}_2^\bullet$  son capaces, al menos termodinámicamente, de oxidar PUFAs. Los radicales hidroxilos pueden iniciar la reacción de peroxidación rápidamente:



En contraste, el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  no tiene la suficiente reactividad como para abstraer un hidrógeno de los ácidos grasos y para lograrlo debería actuar en un entorno muy hidrofóbico lo cual no es posible teniendo en cuenta que es portador de una carga negativa. La forma protonada del radical superóxido ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) es más reactiva y puede abstraer hidrógenos incluso en un entorno lipídico debido a su neutralidad. Como el átomo de hidrógeno tiene solo un electrón, la abstracción de un H de un grupo  $-\text{CH}_2-$  deja un átomo de C con un electrón desapareado ( $-\dot{\text{C}}\text{H}-$ ). Este radical de

carbono se estabiliza a través de re-arreglos intramoleculares formando *dienos conjugados*. Frecuentemente en organismos aeróbicos ocurre que este radical de carbono se combina con el O<sub>2</sub> dando un radical peroxilo (R-OO• o RO<sub>2</sub>•). Los radicales peroxilo son capaces de abstraer otro H de otra molécula de lípido, por ejemplo en una cadena de ácido graso adyacente, constituyéndose así la denominada fase de *propagación* de la peroxidación de lípidos. El nuevo radical de carbono puede reaccionar con el O<sub>2</sub> para formar otro radical peroxilo y así la *cadena de peroxidación* lipídica podría continuar (**Figura 1**).

El radical peroxilo se combina fácilmente con un átomo de H para formar un hidroperóxido lipídico (LOOH). Entre éstos se incluyen los lipoperóxidos cíclicos (cuando el H es abstraído de la misma molécula). Un simple evento de iniciación puede llevar a la formación de múltiples moléculas de peróxido como resultado de la reacción en cadena (Burton y Traber, 1990).

**Figura 1.** Proceso de peroxidación de PUFAs que forman parte de la membrana celular

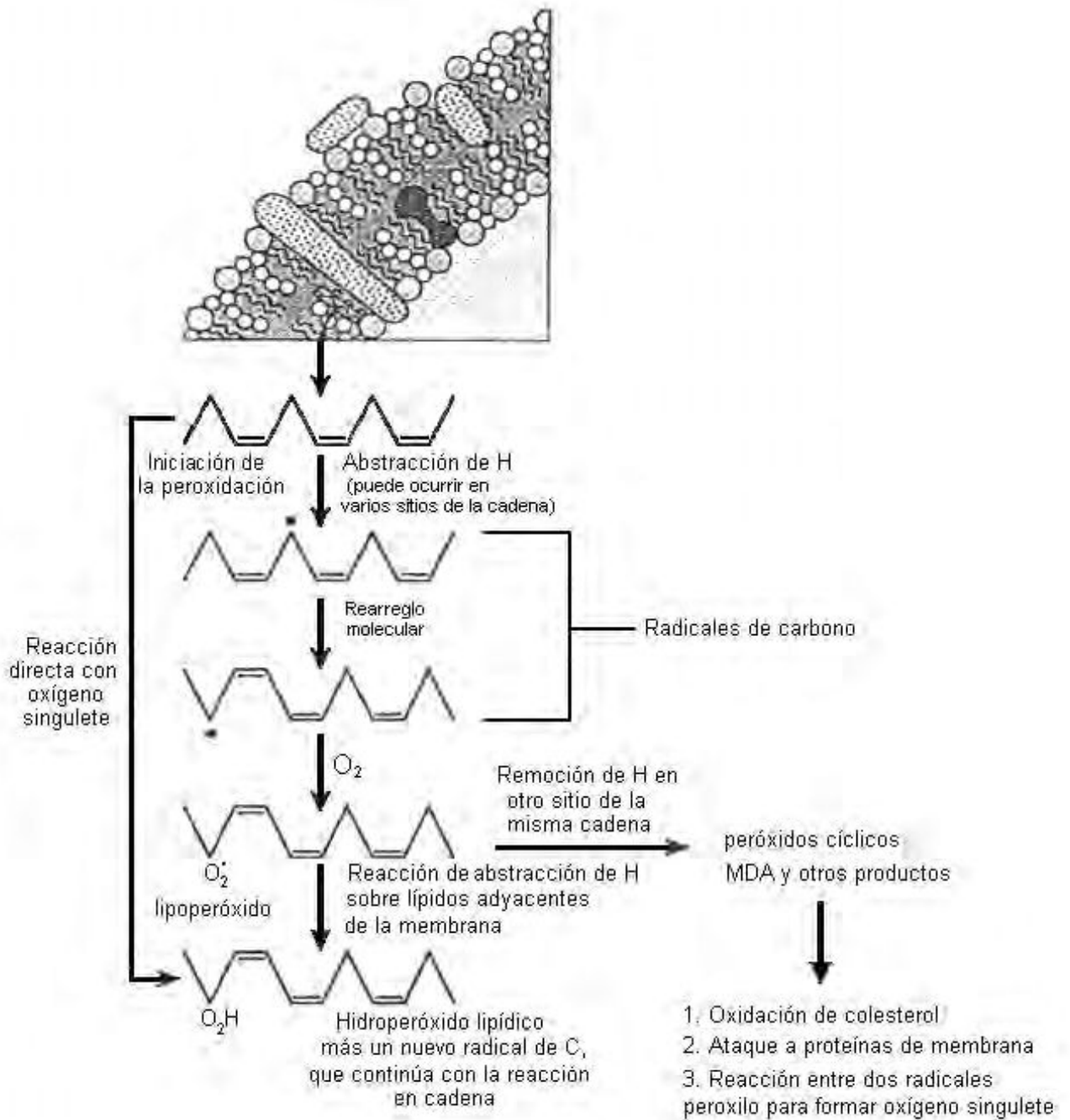


Figura tomada de Free Radicals in Biology and Medicine, Halliwell y Gutteridge, 1999, esquematiza la reacción de peroxidación lipídica en cadena en ácidos grasos que componen lípidos de membrana.



La descomposición de los peróxidos lipídicos por calor, o por la presencia de metales como Fe y Cu, da lugar a una mezcla compleja de productos entre los que se encuentran epóxidos, aldehídos saturados (hexanal), aldehídos no saturados (hexenal principalmente), cetonas (butanona, hexanona) e hidrocarburos (Buettner, 1993). El malondialdehído (MDA) es uno de los productos mayoritarios de ésta descomposición y es capaz de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando un aducto coloreado que se puede medir espectrofotométricamente. Este constituye el fundamento de la reacción de TBARS (del Inglés *thiobarbituric acid-reactive substances*) que se utiliza profusamente para cuantificar *in vitro* la peroxidación de lípidos.

La generación de radicales alcoxilo y peroxilo a partir de los ácidos grasos anclados a membranas y presentes en lipoproteínas, es capaz de causar daños severos a las proteínas ubicadas cerca de ellos. De modo que existe una interacción entre el daño peroxidativo a lípidos y a proteínas. Sin embargo, los peróxidos lipídicos presentes en las biomembranas pueden ser removidos por la enzima fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPx). Alternativamente, pueden ser separados de la membrana por fosfolipasas y luego reducidos por enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx). La peroxidación de los lípidos de las membranas celulares lleva a la pérdida de la fluidez de las mismas, y también a caídas en el potencial transmembrana, aumentos en la permeabilidad a H<sup>+</sup> y otros iones, y alteración de la función biológica de muchos componentes proteicos de su estructura (Gutteridge, 1995; Griffiths et al., 2002).

### **Daño oxidativo a proteínas**

El daño oxidativo a proteínas es de gran importancia *in vivo* porque suele involucrar la interferencia con su función biológica. Puede provocar daño a receptores, enzimas, vías de traducción de señales, sistemas de transporte, mecanismos de mantenimiento de

la homeostasis intracelular de iones, mecanismos enzimáticos de reparación del DNA, entre muchas otras. Asimismo, las proteínas oxidadas pueden ser reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario y desencadenar respuestas hiperérgicas.

Por ataque oxidativo a proteínas se pueden formar múltiples productos de oxidación dependiendo de la especie oxidante y de la especie blanco del ataque oxidativo. La reacción de RNS ( $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}_2^\cdot$  y  $\text{NO}_2\text{Cl}$ ) con la tirosina lleva a la producción de 3-nitrotirosina, también puede ocurrir la nitración de fenilalanina y triptofano. El ataque de  $\text{OH}^\cdot$  u oxígeno singulete puede generar múltiples productos de oxidación (Griffiths et al., 2002; Dalle-Donne et al., 2006). En contraste, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a niveles fisiológicos tienen poco efecto sobre las proteínas, a menos que se encuentre un grupo —SH oxidable en un sitio accesible de la molécula.

El daño a las proteínas por ataque *directo* de los ROS/RNS o por *daño secundario* involucrando a productos finales de la peroxidación lipídica (tales como el MDA), llevan a la producción de derivados carbonilos (PCOs) de las cadenas laterales de los aminoácidos (Pocernich et al., 2001). Los PCOs son los marcadores más usados para establecer daño oxidativo a estas macromoléculas pues tienen ventajas sobre los peróxidos lipídicos, son más estables, se forman tempranamente, y se mantienen por más tiempo en circulación (Dalle-Donne et al., 2003 a y b). La determinación de PCOs fue el método que adoptamos en el presente trabajo para escrutar el daño oxidativo a proteínas.

Siendo que este tipo de daño ocurre *in vivo* algunas veces tienen lugar mecanismos de reparación sobre la proteína dañada. Por ejemplo, mediante re-reducción (por GSH y tioredoxina) de puentes disulfuro formados por especies oxidantes. Cuando una proteína es dañada en forma irreversible por ROS o RNS queda marcada para la degradación proteolítica incrementándose así el recambio de proteínas en células expuestas a estrés oxidativo. En contraste, las proteínas con un alto grado de oxidación y/o agregadas

como consecuencia del daño, muchas veces resisten a la degradación proteolítica y se acumulan en las células. Esta es la base molecular del daño observado en enfermedades neurodegenerativas humanas como la enfermedad de Parkinson, el mal de Alzheimer, las demencias por cuerpos de Lewy y las encefalopatías espongiiformes. En todas estas entidades clínicas la proteína oxidada y dañada, se agrega y desata señales de muerte celular programada (Gu et al., 1998; Dean et al., 1997). Los sistemas proteolíticos que reconocen proteínas oxidadas están presentes tanto en el citosol como en la mitocondria de las células de los mamíferos (Dean et al., 1997) y se cree que en algunas enfermedades neurológicas se encuentran inoperantes ya sea por causas endógenas (mutacionales) o exógenas (sobrecargas por xenobióticos como los plaguicidas, u otros polucionantes) (Zhou et al., 2004; Wang et al., 2006).

### **Respuesta de las células al daño oxidativo**

Los tejidos parecen responder al estrés oxidativo a través de un aumento o una disminución de la proliferación celular, un cambio en la respuesta inmune, o la inducción de muerte celular programada (apoptosis) (Orrenius, 2004). Todos estos procesos involucran vías de señalización ATP-dependientes y solo podrían ocurrir en el contexto de una célula viable. Una situación de estrés oxidativo severo da lugar a muerte celular por necrosis, un proceso patológico pasivo que no requiere ATP. Los efectos del estrés oxidativo dependen de varios factores, en especial del tipo celular, del nivel de estrés, y de la disponibilidad y efectividad de mecanismos protectivos (Jackson et al., 2002).

Durante la muerte celular por **necrosis** la célula presenta fallas osmóticas severas por la pérdida de su capacidad para regular la homeostasis de iones. Esto se traduce en el ingreso masivo de agua hasta que finalmente, las membranas mitocondriales, plasmática,

peroxisomal y lisosomal pierden su integridad liberando su contenido y afectando así a las células adyacentes. Este proceso es acompañado de una intensa reacción inflamatoria local.

En cambio, durante la **apoptosis** la célula inicia un proceso finamente regulado que involucra la activación de enzimas y de complejas cascadas de señalización que aún no han sido completamente dilucidadas. La membrana plasmática pierde su asimetría, se produce contracción y condensación de la célula acompañadas de la fragmentación de la cromatina que previamente se condensó en acúmulos característicos de este proceso (picnosis). Esto está asociado a rupturas de doble cadena del DNA en las regiones internucleosómicas (así es como el DNA genómico aislado resulta en un patrón de escalera, el “*ladder pattern*” en los electroforegramas en gel de agarosa). También ocurre el colapso de la estructura del citoesqueleto, fragmentación nuclear, y descomposición de la célula entera en cuerpos apoptóticos, sin ruptura de las membranas mitocondriales y lisosomales ni liberación del contenido celular. De esta forma las células en proceso de muerte no afectan la viabilidad de sus vecinas, y los cuerpos apoptóticos son luego fagocitados en ausencia de reacción inflamatoria local. Estos procesos de degradación controlada de los componentes celulares son llevados a cabo por familias de proteasas. Las dos familias más estudiadas son las caspasas y las calpaínas. A continuación describiremos brevemente sus principales características.

## Caspasas

La activación de las caspasas ha sido identificada como uno de los marcadores del proceso apoptótico. Son una familia de cisteinil-proteasas que hidrolizan a sus sustratos por destrucción de enlaces peptídicos en los que intervengan residuos de ácido aspártico. Son usualmente sintetizadas como zimógenos inactivos (las pro-caspasas) que son

clivados proteolíticamente en los inicios del proceso apoptótico quedando habilitadas como caspasas activas (Orrenius, 2004). Cada pro-caspasa consiste en un pro-dominio grande (20 KDa) y un dominio menor (10 KDa), de modo que el clivaje y la consecuente hetero-dimerización de la subunidad grande con la pequeña resultan en la activación de la caspasa. Según su posición en la cascada apoptótica se dividen en caspasas *iniciadoras* (clivan a otras caspasas) como las 2, 8, 9, 10 y caspasas *efectoras* 1, 3, 6, 7 responsables en conjunto de la proteólisis de los sustratos observada durante el proceso de muerte (Adrain y Martin, 2001). Las caspasas efectoras son activadas con la ayuda de moléculas adaptadoras, en especial el Apaf-1 (del Inglés *Apoptosome-ATP-dependent pro-caspase activating factor one*) que catalizan el proceso.

La activación de las caspasas es típicamente bloqueada por la falta de ATP (Eguchi et al., 1997). Dependen también del estado redox celular fundamentalmente debido a la presencia de un residuo de cisteína en su sitio activo cuyo grupo —SH puede ser modificado por oxidación o por alquilación. De modo que la activación de las caspasas es óptima en ambientes reductores (Rami et al, 2000; Honig y Rosenberg, 2000; Chandra et al., 2000).

El estrés oxidativo lleva a la muerte celular programada mediada por caspasas a través dos vías principales: *mediada por receptor* e *intrínseca* (Honig y Rosenberg, 2000).

#### *Mediada por receptor*

El estrés oxidativo puede resultar en la activación de receptores de muerte celular localizados en la membrana plasmática tales como el receptor Fas (FasR) acoplado al ligando Fas (FasL). FasR recluta a una proteína adaptadora que activa a la caspasa 8 y ésta puede luego activar a la caspasa 3 y a la 1 clivando a Bid. La proteína Bid truncada (tBid) se transloca a la mitocondria y conduce finalmente a la liberación del citocromo c mediado por Bax (ver más adelante).

### *Vía intrínseca*

La pérdida de la homeostasis redox también puede resultar en la disfunción mitocondrial con la liberación de proteínas pro-apoptóticas como el citocromo c por otra vía alternativa a la anterior. Una vez en el citosol, el citocromo c liberado inicia la formación del complejo conocido como *apoptosoma* por unión a una molécula adaptadora Apaf-1. Esto lleva a la oligomerización de Apaf-1 a través del reclutamiento y la activación de pro-caspasa 9. Finalmente la caspasa 9 activada cliva y activa a los efectores de la apoptosis corriente abajo que son las caspasas 1, 3, 6 y 7. Las caspasas activas, en especial la caspasa 3, orquestan la fragmentación del DNA, la condensación nuclear, y el colapso del citoesqueleto a través del clivaje de multitud de sustratos.

### **Calpaínas**

Las calpaínas (o *calcium-dependent neutral protease*) son proteasas intracelulares constituyentes de una superfamilia independiente de las caspasas. Se han identificado al menos 15 calpaínas en mamíferos, dos de las cuales la I (o micro;  $\mu$ ) y la II (o mili; m) se diferencian por sus requerimientos de calcio *in vitro* (Sorimachi et al, 1997; Artal-Sanz y Tavernarakis, 2005). Se expresan con gran actividad específica en cerebro. Las  $\mu$ -calpaínas están distribuidas tanto en las dendritas como en los cuerpos neuronales, mientras que las m-calpaínas se expresan fundamentalmente en los axones y en la glía.

Estructuralmente, las calpaínas tienen un dominio proteasa combinado con un dominio de unión al Ca tipo calmodulina. La ubicua y constitutiva expresión de las calpaínas refleja seguramente su rol central en el metabolismo de la célula. Cada una esta compuesta por dos subunidades, una regulatoria de 30 KDa que es idéntica para las dos isoenzimas y una catalítica de 80 KDa única para cada una. La subunidad mayor puede dividirse en cuatro dominios, el segundo es el dominio con la actividad proteasa y el

cuarto tiene el sitio de unión al calcio. La función de los dominios I y III no está aún del todo clara. La subunidad pequeña tiene dos dominios, uno N-terminal con una región hidrofóbica, y otro C-terminal que tiene un sub-dominio de unión al calcio. Al parecer éste es quien regula la actividad total de la calpaína (Sorimachi et al., 1997; Chong et al., 2005).

La activación de las calpaínas es iniciada por el calcio con autólisis limitada. Las  $\mu$ -calpaínas tienen una gran afinidad por el calcio y son activadas con concentraciones del orden  $\mu$ molar mientras que las m-calpaínas tienen menor afinidad y se activan con concentraciones milimolares. La actividad de estas proteasas es además regulada por una proteína intracelular denominada calpastatina-fosforilada. (Wang et al., 1998; Pörn-Ares et al., 1998)

Las calpaínas funcionan no solo como reguladores centrales en el proceso de remodelado del citoesqueleto sino también en el proceso de muerte programada. La activación de las calpaínas ocurre por una progresión de eventos complejos que se inician con la unión del calcio a estructuras *EF-Hand*, así las calpaínas se vuelven autocatalíticas, clivándose a sí mismas en ambas subunidades (la grande y la menor) liberando como productos del clivaje péptidos N-terminales de 76 y 18 KDa respectivamente. Existe relación entre el OS, la producción de RNS y el nivel de calcio endocelular (Marra et al., 2007). Normalmente los niveles intracelulares de calcio libre son muy bajos (cerca de 0.1  $\mu$ M) aunque la concentración de calcio total sea mucho mayor. El catión se halla confinado principalmente en depósitos mitocondriales y microsomales, y en una zona específica del citoplasma contigua a la cara interna de la membrana plasmática. Esto se logra a través de mecanismos activos (bombas iónicas) que dependen de ATP y de la intervención del citoesqueleto que delimita zonas funcionales de almacenaje del catión. El estrés oxidativo altera el metabolismo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , el daño por ROS/RNS puede causar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde sus depósitos. A su vez, los peróxidos pueden

dañar el sistema de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico e interferir con el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática por medio de la oxidación de grupos —SH esenciales en los canales de membrana. El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede provocar la *disrupción* del citoesqueleto que conduce a la activación de las calpaínas (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Otro rol fisiológico del calcio es la regulación de las sintasas de óxido nítrico (eNOS y nNOS). Es concebible que la superproducción de  $\text{NO}^{\bullet}$  lleve a la formación de  $\text{ONOO}^{-}$  con innumerables efectos citotóxicos atribuibles a esta especie (Dawson y Dawson, 1996; Heales et al., 1999; Singh y Dikshit, 2007). El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  también puede conducir al aumento de la producción de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  en ciertas células que contienen la enzima xantina deshidrogenasa. Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  son finalmente responsables de la activación de endonucleasas dependientes de calcio que provocan la fragmentación del DNA (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### **Vínculo funcional entre calpaínas y caspasas**

Existe alguna evidencia que indica que la apoptosis podría ocurrir sin la activación de las caspasas. Las calpaínas podrían jugar un papel decisivo en la muerte celular tomando el control de este proceso. En el SNC, estos dos sistemas deberían de hecho interactuar. La activación de las calpaínas ha sido implicada en la etiopatogenia de la neurodegeneración en varias enfermedades humanas tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), de Parkinson (PD), de Huntington (HD), etc. Las grandes similitudes existentes en los sustratos para ambas familias de enzimas proteolíticas sugiere que ambas contribuyan a la desregulación estructural y a la pérdida de la funcionalidad de células nerviosas bajo condiciones neurodegenerativas.

Las calpaínas también están involucradas en la activación de caspasas directamente





fracciones enriquecidas en mitocondrias para inducir apoptosis en sistemas libres de células (Ricci et al., 2003). Durante el proceso de muerte, la mitocondria puede alterar su potencial transmembrana (Sen et al., 2006; Ricci et al., 2003). Mas aún, se sabe fehacientemente que varias proteínas mitocondriales se liberan al citosol en la etapa inicial de la cascada apoptótica. Algunas de ellas son, Smac, AIF, Endo G, Omi/Htra2, además del citocromo c (Chong et al., 2005; Ostrander et al., 2001; Chang y Reynolds, 2006). Asimismo, se ha probado que la familia de proteínas Bcl-2 (Bax, Bid, tBid) que desempeñan un rol protagónico (median la translocación del citocromo c al citosol) se localizan principalmente en la membrana externa de la mitocondria (Ostrander et al., 2001; Orrenius, 2004). El Cyto c es una de las señales exportadas desde la mitocondria hacia el citoplasma involucrada en la activación de las caspasas (Adrain y Martin, 2001). El mecanismo subyacente a la liberación de citocromo c no se conoce todavía, pero se sabe que en la membrana mitocondrial interna (MMI) este citocromo está asociado con fosfolípidos, principalmente la cardiolipina (CL), y que esta asociación facilita el transporte de electrones a nivel de los complejos III y IV de la cadena respiratoria (Petrosillo et al., 2003). La unión de Cyto c a la CL es estequiométrica y específica (Petrosillo et al., 2009). Numerosos autores sugieren que el primer paso en la liberación de citocromo c es precisamente su disociación de la CL (Orrenius, 2004). La CL es rica en ácidos grasos poliinsaturados y esta composición parece ser esencial para su interacción con el Cyto c.

Esta evidencia experimental coloca a la mitocondria en la escena central de la vida y la muerte de la célula (Orrenius, 2004). Las funciones mitocondriales incluyen la importación de proteínas, el mantenimiento de la homeostasis del calcio, la generación de ATP, y la génesis de lípidos. Todos estos trascendentales procesos dependen del potencial transmembrana y la pérdida de éste durante la apoptosis contribuye decididamente a la muerte de la células (Ricci et al., 2003; Von Ahsen et al., 2000).

En resumen, el estrés oxidativo altera críticamente la homeostasis redox celular y puede causar daño por múltiples vías que a menudo se superponen e interactúan en forma muy compleja. Estas interacciones conducirían eventualmente a la muerte por diferentes mecanismos como los antes descritos (**Figura 3**).

**Figura 3.** Resumen sobre las consecuencias del estrés oxidativo en la supervivencia celular.

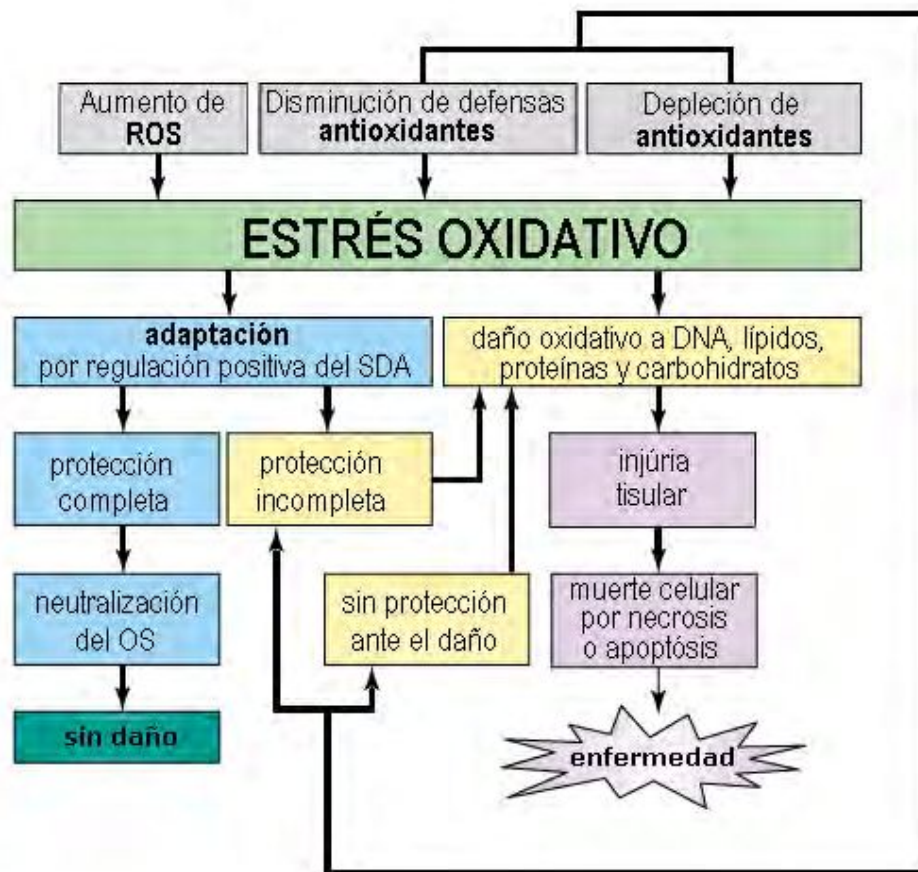


Figura tomada de Dalle-Donne et al., 2003a, muestra los orígenes y consecuencias del estrés oxidativo en la enfermedad.

## Rol del entorno en el estrés oxidativo

Se ha vinculado a los radicales libres y con mecanismos de acción de xenobióticos. En principio, la acción de las toxinas vinculadas a la producción de ROS/RNS resulta de varios mecanismos que pueden presentarse individualmente o en conjunto. Entre estos se destacan los siguientes:

- La toxina es en sí misma un radical libre (ej.: dióxido de nitrógeno).
- El metabolismo de la toxina produce un radical libre (ej.:  $\text{CCl}_4$ ).
- La toxina sufre un *ciclo redox* (ej.: es inicialmente reducida por un sistema celular para dar una molécula que luego es oxidada por el  $\text{O}_2$ . Esto produce  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y regenera el compuesto original, pudiéndose repetir este ciclo numerosas veces).
- El xenobiótico interfiere con las defensas antioxidantes (ej.: muchas toxinas se metabolizan por conjugación con el glutatión, de modo que ciertas dosis del xenobiótico pueden causar una depleción del contenido celular de GSH y desbalancear el equilibrio prooxidante-antioxidante).
- La toxina estimula la generación endógena de ROS/RNS (ej.: alterando la cadena de transporte de electrones, aumentando la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , activando fagocitos, o por otros mecanismos).

Existen ejemplos claros de superposición de estos efectos. El más conocido podría ser el del humo del cigarrillo el cual contiene en sí mismo radicales libres ( $\text{NO}^{\cdot}$ ,  $\text{NO}_2^{\cdot}$ ), agentes que causan depleción de GSH, sustancias que realizan ciclos redox, y compuestos que activan a los fagocitos en el pulmón causando el incremento de la producción de ROS/RNS locales y sistémicos. Es bien conocido el hecho que los fumadores presentan disminuciones de GSH,  $\alpha$ -Toc y ascorbato en sangre periférica (Sobczak et al., 2004; Liu et al., 1998). La lista de xenobióticos que comparten estos mecanismos de alteración del

balance redox es inmensa. Dentro de los agentes productores de ROS/RNS encontramos solventes orgánicos, hidrocarburos halogenados usados profusamente en la industria (cloroformo, halotano, pentaclorofenol), drogas diabéticas (aloxano, streptozotocina), difenoles y quinonas. También, alcoholes (en especial el etanol), antitérmicos (como el paracetamol), contaminantes del aire de procedencia industrial (dióxido de nitrógeno, ozono, dióxido de azufre).

Muchos metales de transición (titanio, aluminio, plomo, vanadio, molibdeno, cromo, mercurio, níquel, cobalto, cadmio, arsénico) que contaminan el agua y proceden de actividades industriales como la curtiembre o la fabricación de pinturas y barnices, y que además están presentes en aerosoles de uso domiciliario y artículos de tocador (como jabones líquidos, talcos y antitranspirantes). También antibióticos (penicilinas sintéticas, cefalosporinas, tetraciclinas), nitro y azo-compuestos, aditivos de la industria alimenticia tales como conservantes, edulcorantes, acidulantes, enturbiantes, aromatizantes, estabilizantes y colorantes, además de muchos otros de uso permitido en varios países. Y por supuesto, los agroquímicos (micomicidas, herbicidas y plaguicidas en general) de los cuales nos ocuparemos en forma pormenorizada.

La medicina, la industria, y la agricultura moderna coinciden en utilizar una *gran cantidad* de xenobióticos que persiguen como principal objetivo mejorar nuestra calidad de vida. Estamos expuestos a algunas de éstas sustancias en forma deliberada (antibioticoterapia, por ejemplo) pero en la gran mayoría de los casos la exposición es involuntaria debido a que están presentes en el ambiente en el que vivimos (aire, agua y alimentos).

Esta exposición a una mezcla innumerable e indescriptible de compuestos tiene la posibilidad de desatar mecanismos de daño oxidativo que interaccionan entre sí, se prolongan en el tiempo, y generan una situación de exposición crónica a mezclas muy

complejas con efectos por ahora inciertos. Este hecho tuvo injerencia fundamental en la hipótesis de este trabajo de tesis.

### **Relación entre estrés oxidativo y patologías humanas**

Los radicales libres y otras especies reactivas han sido implicados en más de 100 enfermedades humanas (**Tabla 4**). El criterio que se sigue internacionalmente para implicar a ROS/RNS como contribuyentes significativos del daño tisular en enfermedades humanas es el siguiente:

- El agente debe estar siempre presente en el sitio de daño.
- El período de formación debe ser consistente con el período de daño tisular.
- La aplicación directa del agente en el tejido en concentraciones comparables a las halladas *in vivo* debería reproducir todo o casi todo el daño observado.
- La remoción del agente o la inhibición de su formación debería disminuir el daño (Halliwell y Gutteridge, 1999).

**Tabla 4.** Algunos ejemplos de enfermedades humanas asociadas a la generación de ROS/RNS.

Órgano/Sistema	Ejemplos
Sistema inmune	glomerulonefritis, vasculitis, enfermedades autoinmunes, hepatitis
Sistema cardiovascular	ACV, infarto de miocardio, talasemia y otras anemias crónicas, cardiopatía alcohólica, aterosclerosis, cardiotoxicidad por antraciclina, intoxicación por plomo, malaria.
Sistema respiratorio	Efectos del humo de cigarrillo, enfisema, hiperoxia, displasia bronco-pulmonar, toxicidad por paraquat, asma, asbestosis, EPOC.
Sistema renal	Síndromes nefróticos autoinmunes, nefrotoxicidad por metales pesados, hemodiálisis.
Sistema digestivo	Alcoholismo, daño hepático por endotoxinas e hidrocarburos halogenados, pancreatitis
Sistema nervioso y cerebro	Oxígeno hiperbárico, exposición a neurotoxinas, deficiencia de vitamina E, enfermedades neurodegenerativas, sobrecarga de aluminio.

Se cree que en la etiopatogenia de éstas, y muchas otras enfermedades humanas, el mecanismo más relevante es la sobreproducción de especies reactivas antes que la deficiencia de antioxidantes, y es éste generalmente el blanco para la intervención terapéutica.

### **Estrés oxidativo en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson**

La incidencia de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (SNC)



muestra una alarmante tendencia al incremento sostenido que acompaña a la elevación en el promedio de la expectativa de vida. La enfermedad de Parkinson (PD) es la segunda enfermedad neurodegenerativa en incidencia (solo superada por el mal de Alzheimer) afectando a millones de personas que comprenden al 2 % de la población mundial entre los 50 y 60 años (Kanthasamy et al., 2005). La prevalencia se incrementa un 5 % por década de vida después de ese rango de edades (Aschner, 2000; Giasson y Lee, 2001; Lang y Obeso, 2004). De modo que la edad es un indiscutible factor de riesgo para esta dolencia, y en base a este factor se la clasifica en tres sub-categorías: *idiopática*, cuando se presenta después de los 40 años; *temprana* cuando se da entre los 21 y los 40 años; y *juvenil*, si se presenta antes de los 20 años de vida. Aunque los síntomas clínicos son similares en los tres sub-tipos, existen diferencias que las caracterizan en otros parámetros clínicos, bioquímicos y epidemiológicos. La incidencia de las formas temprana y juvenil es muy rara, y el PD idiopático da cuenta de más del 90 % del total de casos (Dawson y Dawson, 2003; Gasser, 2001). Científicos en todo el mundo trabajan arduamente en el esclarecimiento de la etiología de esta enfermedad caracterizada por la apoptosis selectiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra-pars compacta (SNpc) que es la región del cerebro encargada de controlar la motricidad fina. Esta muerte neuronal selectiva está acompañada de la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas eosinofílicas llamados cuerpos de Lewy (Testa et al., 2005; Hirsch et al., 1988; Fearnley y Lees, 1991; Mardsen, 1990). La subsecuente disminución del nivel de dopamina resulta en una disfunción motriz progresiva e irreversible (Aschner, 2000; Giasson y Lee, 2001; Lang y Obeso, 2004). Investigaciones de tipo mas bien epidemiológico indican que existen varias mutaciones genéticas asociadas al riesgo de padecer PD, sobre todo las que involucran a la codificación para parkina,  $\alpha$ -sinucleína, varias isoformas del citocromo P-450, mieloperoxidasa, oxidasas del SNC y para enzimas del sistema de defensa antioxidante



(Di Monte, 2003; Paolini et al., 2004; Fong et al., 2007). Sin embargo, cuidadosos estudios genéticos efectuados en gemelos (mellizos monocigóticos) concluyeron en el 2003 que los factores hereditarios no son los desencadenantes del PD idiopático y que el próximo desafío científico sería la identificación de los factores no genéticos o ambientales que lo provocan (Di Monte, 2003). En la actualidad se considera que esta enfermedad es multifactorial y que se desarrolla a partir de una interacción entre el genotipo del paciente y determinados xenobióticos presentes en su entorno (Di Monte, 2003). Es más, se cree que cada uno de nosotros presenta una especie de “huella dactilar genética” que resulta única en cuanto al resultado de sus capacidades metabólicas y que involucraría a múltiples genes que codifican para enzimas depuradoras de fase I y fase II (Aldridge et al., 2003). Al interactuar estos sistemas enzimáticos con sustancias ingresadas a nuestro organismo es que se generan neurotoxinas altamente selectivas. A pesar de existir una vulnerabilidad individual, la enfermedad nunca se establecería de no existir la exposición a estos contaminantes (Di Monte, 2003; Paolini et al., 2004; Le Couteur et al., 1999; Hernández et al., 2005).

Existen numerosísimas investigaciones que vinculan a la enfermedad de Parkinson con la bioacumulación de metales pesados, insecticidas, herbicidas, funguicidas, monóxido de carbono, toxinas fúngicas e hidrocarburos aromáticos entre otros contaminantes (Paolini et al., 2004; Di Monte, 2003; Radad et al., 2006; Barlow et al., 2005; Ritz y Yu, 2000). No obstante la significativa producción de datos experimentales, los expertos sostienen que *“El estudio de la influencia de los factores ambientales en la patogénesis del PD es significativamente lento, siendo necesario promover estudios clínicos y experimentales en este campo cuyo desarrollo recién comienza”* (Di Monte, 2003). Del análisis de la evidencia experimental disponible sobre este tema se desprenden varios hechos concretos:

- Los plaguicidas, metales, y otros factores ambientales, juegan un rol fundamental

en la etiopatogenia del mal de Parkinson idiopático. Todos ellos comparten la misma característica al ser capaces de provocar un aumento de ROS/RNS (Paolini et al., 2004; Di Monte, 2003; Nielsen et al., 2006; Testa et al., 2005; Beard, 2006; Kanthasamy et al., 2005; Migliore y Coppedé, 2008; Hatcher et al., 2008; Prakasam et al., 2001; López et al., 2007)

- Estos contaminantes ambientales nos intoxican sub-clínicamente durante años a través del agua, los alimentos y el aire, de modo que esta contaminación dejó de ser un problema confinado a las áreas rurales o a prácticas profesionales específicas (Beard, 2006; Bolognesi y Morasso, 2000; Di Monte, 2003; Paolini et al., 2004)
- Todos los contaminantes estudiados producen alteraciones en el sistema de defensa antioxidante neuronal (Barlow et al., 2005; Sharma et al., 2005 a y b; Kitazawa et al., 2001; Gao et al., 2003; Altuntas et al., 2003) y
- El mecanismo de muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas es mediado por estos desbalances en el sistema de defensa antioxidante (se observó disminución de los niveles intracelulares de GSH, disfunción mitocondrial, daño oxidativo a lípidos, ácidos nucleicos y proteínas). Esto lleva a la activación de rutas pro-apoptóticas (o a la supresión de mecanismos anti-apoptóticos) que son sensibles a la intervención con sustancias antioxidantes diversas (Grammatopoulos et al., 2005; Migliore y Coppedé, 2008).

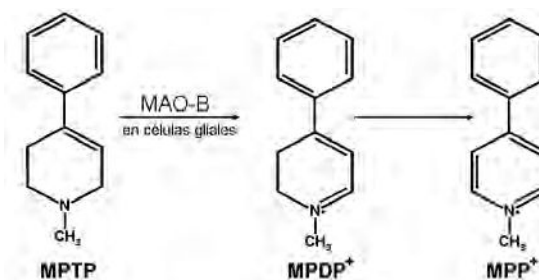
En consecuencia, resulta claro que tal como preconiza Di Monte (2003), *“Cualquier esfuerzo destinado a dilucidar estos hechos debe ser considerado de interés en el esclarecimiento de la patogénesis del PD, su prevención y especialmente su tratamiento”*.

Se puso especial atención en los **plaguicidas** cuando en 1982 los médicos de

un hospital en California se sorprendieron al recibir pacientes muy jóvenes con signos y síntomas de enfermedad de Parkinson (Le Couteur et al., 1999). Observaron que estos pacientes habían consumido una heroína sintética de manufactura casera que se encontraba contaminada con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). La estructura química de este contaminante resultó tener gran semejanza con la estructura del paraquat (herbicida ampliamente utilizado en todo el mundo). El MPTP cruza la barrera hemato-encefálica y es oxidado por la monoamino-oxidasa B (MAO-B). Esta enzima está situada en la membrana mitocondrial de las células gliales y la oxidación del MPTP produce MPDP<sup>+</sup> que luego forma MPP<sup>+</sup> (**Figura 4**). Este catión orgánico es ingresado a las neuronas de la sustancia nigra, por un sistema de captación de catecolaminas perisinaptosomal y resulta ser muy neurotóxico, provocando la depleción de dopamina y el establecimiento rápido del síndrome parkinsoniano (Hatcher et al., 2008; Speciale, 2002).

**Figura 4.** MPTP y sus metabolitos. Su semejanza estructural con el herbicida paraquat.

**A**



**B**



Figura 4A, tomada de Halliwell y Gutteridge, 1999. El MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidro-piridina) es oxidado a MPDP<sup>+</sup> (ion 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina) que se convierte en MPP<sup>+</sup> (ion 1-metil-4-fenilpiridinium) por un mecanismo no completamente dilucidado. Figura 4B, estructura molecular del herbicida paraquat.

El MPTP es un poderoso inhibidor del complejo mitocondrial I, de modo que la muerte neuronal ocurre principalmente debido a la interferencia con el metabolismo energético. Las consecuencias secundarias se asocian a aumentos del calcio intracelular y a la producción de RNS y ROS. Actualmente el MPTP es utilizado para generar modelos animales de enfermedad de Parkinson y estudiar posibles estrategias terapéuticas (Speciale, 2002).

El MPTP contiene un anillo piridina así como también lo contienen muchos compuestos de uso industrial como los plaguicidas. Tal es el caso del profusamente utilizado paraquat. Esto hace pensar en la posibilidad de que el PD sea causado por tóxicos ambientales entre otros factores.

Otros estudios han demostrado que la permetrina (PM) y los clorpirifós (CPF) afectan al sistema nigroestriado y aumentan la captación de dopamina por incremento de la expresión de su transportador (DAT) (Kou et al., 2006; Elwan et al., 2006).

## **Características de los plaguicidas**

La OMS denomina *plaguicida* a cualquier sustancia (o mezcla de sustancias) destinada a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran en la producción agropecuaria o forestal. Están incluidos los que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como los que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales. Esta definición comprende incluso a las sustancias defoliantes y desecantes.

Los plaguicidas pueden clasificarse según diferentes criterios. El *tipo de organismo* que controlan permite distinguir entre insecticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas,

rodenticidas o nematocidas. De acuerdo a su *modo de acción* se los denomina de contacto, de ingestión, sistémicos, defoliantes o repelentes. Por su *composición química* se los clasifica en organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretroides, dinitrofenoles, tiocarbamatos, bupiridílicos, organoazufrados, etc. Finalmente, por el *uso que se les asigna* se los llama agroquímicos, forestales, urbanos, domésticos o industriales.

Se define a la *persistencia* de un plaguicida a la capacidad para retener sus características físicas, químicas y funcionales en el medio en el cual es transportado o distribuido por un período limitado después de su emisión. Naturalmente los plaguicidas que persisten más tiempo en el ambiente tienen mayor probabilidad de interacción con los diversos elementos que conforman el ecosistema, y son al mismo tiempo los de mayor éxito comercial.

La exposición humana ya sea no intencional, accidental, o inevitable, ocurre como consecuencia del uso negligente de plaguicidas o por su persistencia en una variedad de medios incluyendo el aire, el agua, el suelo, plantas y animales, y muy especialmente en los alimentos y en objetos inanimados (Krieger, 1995; Claver et al., 2006). Los principales grupos de riesgo para intoxicaciones agudas con dosis altas (exposición directa) son los productores agropecuarios, los fumigadores, los empleados de fábricas de estos agroquímicos, vendedores, transportistas, jardineros, personas que viven en zonas aledañas a cultivos que reciben aplicaciones de plaguicidas, etc. Estas personas pueden incorporar accidentalmente los tóxicos por absorción dérmica (a través de ropas contaminadas), inhalación de aerosoles o por vía digestiva (Remor et al., 2008; Lopez et al., 2007; Prakasam et al., 2001). Por otra parte, la mayoría de la población está expuesta a bajas dosis en forma crónica (exposición indirecta) a través del consumo de alimentos tratados con plaguicidas y cosechados antes que los residuos haya bajado a niveles aceptables, ingestión de agua de bebida contaminada o por aire que contenga al

agroquímico (Claver et al., 2006; Stalikas y Konidari, 2001; Peruzzo et al., 2008).

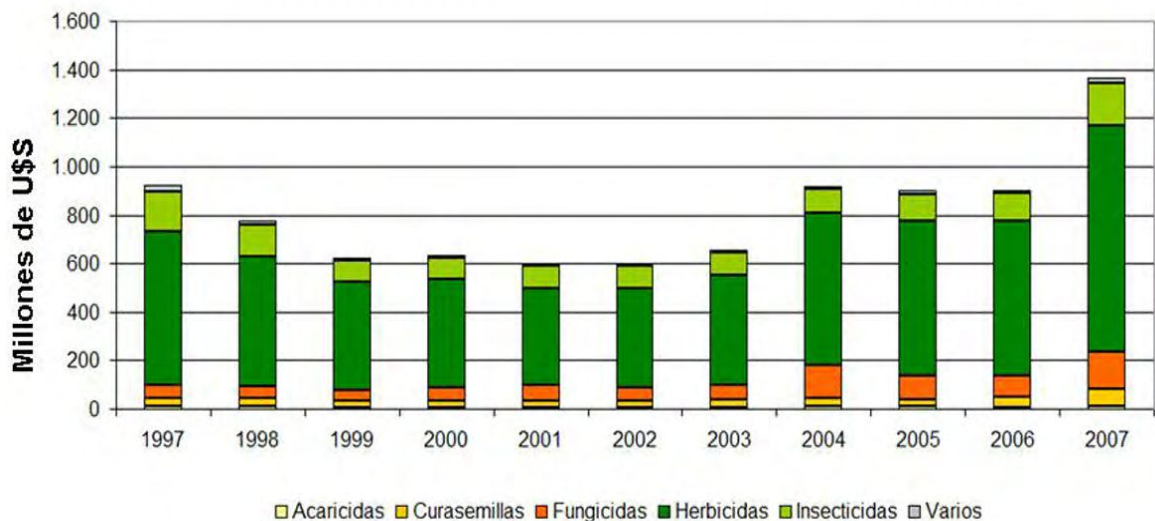
Se ha propuesto que el sistema nervioso en desarrollo es potencialmente más sensible a la exposición a plaguicidas que otros tejidos (Jia y Misra, 2007). En especial, el sistema dopaminérgico se desarrolla luego del nacimiento y una exposición durante la niñez tiene el potencial para contribuir a la neurodegeneración permanente y además incrementar la vulnerabilidad a la exposición a neurotoxinas durante la adultez (Thiruchelvam et al., 2002). Los niños están potencialmente más expuestos que los adultos a las toxinas ambientales debido a hábitos como gatear, llevarse las manos a la boca, y explorar con el gusto los objetos del mundo circundante. De esta manera pueden entrar en contacto con más facilidad que algunos adultos con superficies contaminadas con tóxicos. Son también más vulnerables a los residuos de plaguicidas presentes en los alimentos y debemos considerar que sus dietas tienen un alto contenido de frutas y verduras. Comparado con los adultos, los niños consumen una cantidad de alimentos considerablemente mayor en relación al peso corporal. Además, el cerebro en desarrollo es más sensible al estrés oxidativo por sus escasas reservas de antioxidantes y por la alta permeabilidad de la barrera hematoencefálica todavía inmadura (García et al., 2005; Rice y Barone, 2000).

En teoría, los humanos somos capaces de tolerar pequeñas dosis de xenobióticos gracias a la existencia de mecanismos de homeostasis o compensación fisiológica, que incluyen la detoxificación metabólica, la adaptación celular y la reparación. Por ello, se identifica un umbral por debajo del cual no se observan efectos adversos aparentes en las curvas que relacionan las dosis y los efectos. Por encima de esa dosis umbral, los mecanismos de compensación se saturan y sobrevienen alteraciones en diferentes órganos o sistemas. Las dosis umbral varían considerablemente para cada xenobiótico y y a eso se le suma que otros factores como la edad, el sexo, el estado nutricional y de salud general de las personas expuestas influyen en la toxicidad.

## Agroquímicos en la Argentina

Nuestro país se caracteriza por poseer importantes extensiones de tierras aptas para cultivo con una diversidad de climas y suelos que permiten la siembra de una gran variedad de productos. La evolución del mercado de productos fitosanitarios en los últimos 10 años (**Figura 5**) registra un aumento notable en las ventas, que se ha caracterizado por la preeminencia de los herbicidas. Estos agroquímicos representan los dos tercios del mercado y dentro de éstos el glifosato es el de mayor empleo pues se aplica en la denominada *siembra directa* en especial de la soja y en los *barbechos químicos* (Huerga y San Juan, 2004; CASAFE, 2007).

**Figura 5.** Evolución del mercado fitosanitario argentino en los últimos 10 años



Fuente: CASAFE, 2007

De acuerdo con las normas del SENASA existe una muy extensa lista de principios activos que tienen uso prohibido o restringido en la Argentina (Huerga y San Juan, 2004). Este trabajo de tesis fue desarrollado utilizando tres pesticidas que no pertenecen

aún a esta lista. No hay certeza sobre el cumplimiento de esta legislación ni tampoco se sabe si están debidamente implementados los sistemas de contralor. Al respecto podríamos comentar que en nuestro país, a pesar de existir regulaciones sobre el uso de plaguicidas, sólo uno de los grandes mercados mayoristas de frutas y verduras dispone de un procedimiento para determinar residuos en alimentos de origen vegetal, se trata del Mercado Central de Buenos Aires. Los restantes grandes conglomerados urbanos como La Plata, Rosario, Córdoba, Bahía Blanca, San Luís, Mendoza, etc., no cuentan con una estructura (laboratorios y operadores) que permita determinar residuos en frutas y verduras. Más aún, el hecho que el Mercado de Buenos Aires sólo atienda a la mitad aproximadamente de la demanda de la Región Metropolitana, perjudica el control de la calidad de los vegetales frescos por otro motivo, el cual es que los productores que no respeten los *tiempos de carencia* (período mínimo que debe transcurrir entre la aplicación de un plaguicida en un cultivo y su cosecha), no practiquen las debidas verificaciones de calidad o no realicen buenas prácticas de producción, puedan igualmente canalizar sus frutas y verduras hacia los restantes mercados mayoristas (sin control) que operan en el Gran Buenos Aires.

El Mercado Central, a su vez, no analiza todos los productos que ingresan sino que toma muestras aleatorias siguiendo normas de muestreo de la OMS. En el caso concreto de los residuos de plaguicidas, se enfatiza la extracción de muestras en los productos enviados por regiones o provincias que comienzan su ciclo estacional de entregas. Esto se basa en haber constatado que al inicio de las remesas es donde mayores probabilidades hay de que no se hayan respetado los tiempos de carencia que tienen todos los plaguicidas (Huerga y San Juan, 2004).

Respecto al control de los problemas de salud relacionados con el uso de los plaguicidas, hay dos fuentes de información oficial importantes y de alcance nacional



sobre casos de intoxicaciones por plaguicidas: el *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE)* y el *Programa Nacional de Prevención y Control de Intoxicaciones*, ambos pertenecientes al Ministerio de Salud y a la Superintendencia de Riesgos del Trabajo relacionada con el Ministerio de Trabajo.

No hay información epidemiológica o registros de los perjuicios de los plaguicidas en la salud humana que se adecue a la importancia del tema. Los existentes se refieren sólo a las exposiciones agudas (intencionales o no) a pesar de considerarse que, en el caso de los plaguicidas, las situaciones de toxicidad crónica son las de mayor ocurrencia y de diagnóstico más complejo. En la búsqueda de información sobre intoxicaciones a través de los registros, se puede tropezar con numerosos obstáculos que hemos resumido como sigue (Huerga y San Juan, 2004):

- No hay registros sistemáticos de intoxicaciones crónicas; sólo de agudas y parciales e incompletas.
- Bajo la denominación de *plaguicidas* se incorporan a las listas, intoxicaciones causadas por raticidas para uso hogareño, insecticidas organofosforados, curasemillas, desinfectantes para las fumigaciones urbanas, y los principios activos para fumigación del suelo.
- En el caso concreto de las intoxicaciones de personas, la cobertura del registro abarca solamente estaciones sanitarias de centros urbanos, en donde el empleo de plaguicidas dista por mucho de ser representativo del que ocurre en áreas rurales.

## **Gestión sustentable de los plaguicidas**

El uso de plaguicidas en la producción de alimentos inevitablemente deja residuos y habría que mantener normas estrictas para garantizar la seguridad del consumidor. La

producción de alimentos mediante el uso de sustancias químicas continuará suscitando preocupaciones acerca de las consecuencias que, en el largo plazo, tendrán las dosis moderadas de residuos de estos tóxicos. Internacionalmente la *Comisión del Codex Alimentarius* fija criterios normativos para todas las naciones. Esta comisión creada por la FAO y la OMS establecen (entre otros parámetros) los límites máximos de residuos de agroquímicos permitidos (LMRs) en los alimentos. Estos pueden ser utilizados por los países en desarrollo que aún no hayan fijado los suyos (como es el caso de la Argentina). Sin embargo, la reglamentación se basa en la toxicidad de los plaguicidas en forma *individual* y no protegen adecuadamente la salud de los efectos adversos por exposiciones acumulativas y/o simultáneas. Se requiere entonces un cuidado extra al fijar los niveles permitidos de estos compuestos incorporando las mezclas al proceso de establecimiento del riesgo (Moser et al., 2006).

Los residuos pueden resultar (a) del uso en cultivos sobre los cuales está permitido fumigar acorde con las prácticas agrícolas óptimas, (b) del uso excesivo de plaguicidas, o de su empleo muy cerca de la fecha de cosecha aún cuando se trate de una sustancia o formulación autorizada, (c) del uso ilegal de un plaguicida que no está aprobado para ese cultivo en particular, y/o (d) del uso incorrecto de plaguicidas después de la cosecha para reducir la infestación por plagas durante el almacenaje o la comercialización.

En países en desarrollo como el nuestro, muchos factores pueden contribuir a los altos residuos de plaguicidas. En general los usuarios son inexpertos, con bajo nivel de alfabetización y desconocen la toxicidad de los productos que utilizan. Las instrucciones de uso son complejas, con el agravante de un etiquetado en el idioma equivocado. Los envases pueden estar dañados o no llevar rótulos adecuados, etc. Para empeorar esto, muchas veces no se utiliza la indumentaria apropiada para evitar la absorción dérmica que es una de las principales vías de absorción de agroquímicos formulados, en especial

cuando se utilizan productos líquidos (Van Hemmen y Brouwer, 1995). Asimismo suele evitarse el uso de guantes y máscaras que deberían ser obligatorios. Las habilidades y el comportamiento del fumigador juegan un rol muy importante en los resultados finales. Otras variables tales como la duración de la aplicación, el área tratada, el volumen aplicado y el equipo de fumigación también pueden ser determinantes en el grado de exposición (Toumainen et al., 2002).

El uso constante de plaguicidas puede generar resistencia por insectos, lo que motiva al campesino a usar excesivas cantidades del producto (Pesticide Action Network-UK, 1998). Además, los gobiernos y los entes reguladores carecen de recursos (y a veces de voluntad) para llevar la vigilancia de las buenas prácticas sanitarias, de criterios de seguridad en la aplicación de plaguicidas, y de seguimiento de las incidencias de los residuos.

Para obtener los beneficios de la aplicación de los plaguicidas, sin que se produzcan efectos adversos en la salud humana y en el ambiente, es preciso contar con un esquema integral de gestión en el que intervengan diversos actores (las autoridades gubernamentales, la industria, los formuladores, los obreros, los comerciantes, los asesores, los aplicadores, los consumidores, el sector académico y la sociedad en general). En dicho esquema deben distinguirse las acciones a realizar previas al registro de los plaguicidas y las necesarias en las fases posteriores de su ciclo de vida integral. También se identifican diversos instrumentos que pueden permitir el logro de los objetivos, mediante la difusión de información (etiquetado, hojas de seguridad), educación y capacitación, monitoreo ambiental y biológico, establecimiento de regulaciones, empleo de instrumentos económicos, entre otros. La exposición a agroquímicos (formulados o no) es un problema de muy difícil solución que resulta ser aún más serio en países en desarrollo y con controles deficientes (Sawaya et al., 2000) por lo que, en general, no se es muy optimista en relación a este acuciante problema sanitario-ecológico.

## **Selección del modelo experimental. Agroquímicos investigados.**

Teniendo en cuenta la situación actual en nuestro país y en otros en vías de desarrollo, en este trabajo de tesis nos centramos en evaluar tres de los agroquímicos más utilizados en nuestro medio y en el resto del mundo. Se trata del herbicida glifosato (N-fosfometil-glicina), del insecticida dimetoato (O,O-dimetil-S-metil-carbamoil-metil fosforoditioato) y del micomicida zineb (zinc etilen-bis-ditiocarbamato) los cuales usamos en un protocolo de administración solitaria o en combinaciones de dos o las tres drogas.

Estos agroquímicos se investigaron como generadores de estrés oxidativo y productores de efectos nocivos sobre diferentes tejidos (hígado, cerebro, riñón, y sangre) empleando un modelo experimental de intoxicación sub-crónica en ratas Wistar tratadas con dosis bajas.

Marina Emborg revisó en el 2004 de manera muy exhaustiva las estrategias para abordar esta problemática utilizando animales de laboratorio como sujetos de estudio. Ella documentó fehacientemente la influencia de la especie, la edad, el género y el diseño experimental mismo en la confiabilidad de los resultados.

Los resultados obtenibles en ratas macho de la cepa Wistar son de indiscutible valor y con capacidad de ser extrapolables al humano.

## **HIPÓTESIS**

En este trabajo la hipótesis experimental básica fue determinar si la asociación de agroquímicos suministrados en forma crónica y en bajas dosis a ratas Wistar, constituye un modelo útil para el estudio de los daños ocasionados al sistema de defensa antioxidante tanto en tejidos depuradores (hígado y riñón) como en tejidos blanco (SNC), a los fines de contribuir al conocimiento de los mecanismos involucrados en la toxicidad debida a esta noxa.

## **OBJETIVOS GENERALES**

**(I)** Estudiar el efecto individual y combinado de un insecticida, un fungicida y un herbicida de uso rutinario en nuestro medio, sobre el metabolismo lipídico y el sistema de defensa antioxidante en SNC y otros tejidos de ratas Wistar machos adultos bajo exposición crónica y de nivel comparable a la sufrida por humanos que habitan áreas pobladas no rurales.

**(II)** Determinar simultáneamente el efecto pro-apoptótico y eventuales alteraciones de la arquitectura tisular, que la exposición individual o conjunta de los contaminantes pudiera ejercer sobre el tejido neuronal dopaminérgico (sustancia nigra) comparándolos con otros tejidos (corteza cerebral, hígado, riñón).

**(III)** Investigar el posible efecto protector de sustancias antioxidantes naturales sobre el metabolismo lipídico, el sistema de defensa antioxidante, y los mecanismos de muerte celular desencadenados por los pesticidas ensayados.

**(IV)** Estudiar la presencia de estos pesticidas en el ambiente y analizar la introducción de biomarcadores de estrés oxidativo y del sistema de defensa antioxidante como indicadores de exposición.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- (1)** Establecer el modelo de intoxicación simultánea a partir de datos bibliográficos y experiencia propia en nuestro laboratorio.
  
- (2)** Medir parámetros de estrés, daño oxidativo, y sistema de defensa antioxidante en áreas específicas del SNC: corteza, sustancia nigra. Comparar los datos obtenidos con similares determinaciones en tejido hepático, renal y sangre periférica de los animales expuestos.
  
- (3)** Analizar los cambios que se pudieran producir en los componentes lipídicos de SNC, hígado y sangre periférica.
  
- (4)** Determinar la actividad de marcadores bioquímicos de apoptosis en los tejidos antes mencionados y eventuales cambios en la arquitectura tisular.
  
- (5)** Administrar a los animales sustancias de origen natural durante el período de exposición, a fin de detectar un posible efecto protector que suprima o atenúe el estrés oxidativo-nitrativo que los contaminantes sean capaces de inducir.
  
- (6)** Detectar la presencia de los pesticidas empleados (zineb, dimetoato, glifosato) en plasma y tejidos de animales tratados y en productos vegetales comercializados localmente.
  
- (7)** Evaluar la versatilidad y utilidad clínica de algunos de los parámetros de estrés oxidativo-nitrativo y sistema de defensa antioxidante como biomarcadores para la evaluación de la exposición humana a plaguicidas con el fin de ser usados en forma diagnóstica o pronóstica en la práctica médica.

# **CAPÍTULO I**

**Efecto de un fungicida, un insecticida  
y un herbicida sobre el estado redox  
de varios tejidos de rata.**



## INTRODUCCIÓN

### **Selección de los agroquímicos investigados y tejidos analizados.**

Tal como comentamos en la parte introductoria general, hemos teniendo en cuenta la situación actual en nuestro país y en otros en vías de desarrollo. Por esa razón, este capítulo se dedicó a la evaluación de los agroquímicos más utilizados en nuestro medio y en el resto del mundo. Se investigaron el herbicida glifosato, el insecticida dimetoato y el micomicida zineb en un protocolo de administración solitaria o en combinaciones de dos o las tres drogas.

El **glifosato** (ácido N-(fosfometil) glicínico) es un herbicida no selectivo para el control post-emergente de las malezas anuales y perennes. Es de acción sistémica y una vez aplicado es absorbido por hojas y tallos verdes y trasportado hacia las raíces y órganos vegetativos subterráneos ocasionando la muerte por inhibición de la vía de

síntesis de aminoácidos aromáticos (específicamente, interfiere con la enzima que cataliza el sexto paso en la vía de biosíntesis, la shikimato-5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintetasa). El primer paso de la biotransformación del glifosato es el clivaje a glioxalato y ácido aminometilfosfónico (AMPA) que son productos biológicamente degradables (Stalikas y Konidari, 2001; Mañas et al., 2009). El glifosato es por mucho el herbicida más comercializado en la Argentina y en la mayoría de los países del mundo. Se lo aplica sobre maíz, soja, vid, papa, remolacha y muchos otros cultivos. La vida media de este herbicida en el suelo es menor a 60 días y su  $DL_{50}$  oral aguda en ratas es de 5000 mg/Kg de peso, sin embargo existen fuertes controversias aún no resueltas sobre ambos parámetros.

El **dimetoato** (O,O-dimetil-S-metil-carbamoil metil fosforoditioato) es un insecticida-acaricida organofosforado con actividad por contacto y sistémica. Las plantas lo absorben y lo trasladan por su vasculatura hacia todo el floema y su mecanismo de acción es mediante la inhibición de la enzima colinesterasa. Se lo aplica para controlar insectos en una gran variedad de cultivos como soja, sorgo, trigo, avena, cebada, centeno, lentejas, cítricos, manzanas, peras, olivos y hortalizas. Su persistencia en el ambiente se estima que es de 4 a 5 semanas (CASAFE, 2007) y su  $DL_{50}$  oral aguda en rata es de 400 mg/Kg de peso. Entre la última aplicación y la cosecha (período de carencia) deben transcurrir al menos 7 días para el melón, sandía y papa; 14 días para ajo, cebolla; y 20 días para cítricos, duraznos y hortalizas.

El **zineb** (etilen-bis-ditiocarbamato de zinc) es un fungicida del grupo de los ditiocarbamatos que se utiliza para proteger plantaciones de papas, zanahorias, cebollas, cítricos, frutas de carozo, garbanzos, tomate, vid y tabaco (entre otras) de las infecciones por hongos uni o pluricelulares. Su aplicación se realiza durante el período de agrolabor o especialmente luego de la cosecha y durante el almacenamiento y transporte. Su persistencia en el ambiente es de 10 a 20 semanas. Se deben suspender las aplicaciones 35 días antes de

la cosecha de durazno, pelón y damasco; y 40 días antes de la cosecha de ciruelo y cerezo. Tiene una  $DL_{50}$  oral aguda en rata de 5000 mg/Kg de peso (CASAFE, 2007).

Estos agroquímicos se investigaron como generadores de estrés oxidativo y productores de efectos nocivos sobre diferentes tejidos (hígado, cerebro, riñón, y sangre) empleando un modelo experimental de intoxicación sub-crónica en ratas Wistar tratadas con dosis bajas. Cada tejido y cada tipo de célula que compone ese tejido tienen capacidades particulares para soportar una situación de estrés oxidativo, de modo que se han seleccionado aquellos que se supuso sufrirían un impacto considerable durante la exposición al agroquímico. A continuación revisaremos brevemente las razones para la elección de estos tejidos.

### *Hígado*

Este tejido se halla entre los que estudiaremos en este trabajo de tesis por ser el hepatocito la principal célula involucrada en el metabolismo de xenobióticos. Los metabolitos resultantes de la biotransformación pueden ser más o menos tóxicos que el compuesto inicial, y por lo tanto el hígado resulta ser el órgano con mayor exposición a toxinas ingeridas con los alimentos (al igual que el tracto gastrointestinal). Así es como la hepatotoxicidad será un marcador muy importante en la evaluación del efecto de los compuestos estudiados. Por otro lado, el hígado es sin duda el tejido que mejor soporta una situación de estrés oxidativo por tener altas actividades específicas de las enzimas del sistema de defensa antioxidante (CAT, GST, GR, GPx, entre otras). Además, produce grandes cantidades de GSH exportable al plasma y al resto de los tejidos, y es capaz de empaquetar en lipoproteínas a los antioxidantes liposolubles obtenidos de la dieta. Este órgano funciona como un filtro de primera línea en la depuración (metabolismo) y excreción de xenobióticos. En nuestro modelo experimental la inyección i.p. funciona

evitando las variables de absorción inter-especie e inter-individuo que podrían alterar la reproducibilidad de los resultados, y el agroquímico alcanza el hígado post-absorción mesentérica vía sistema porta.

### *Riñón*

El riñón es el órgano de eliminación de compuestos por excelencia aunque también es importante en la metabolización de algunos xenobióticos. Resulta particularmente susceptible a efectos tóxicos de agentes externos o internos por su gran irrigación y por su función principal que es la de concentrar la orina incluyendo en ella a los xenobióticos como tales o a sus metabolitos. Sus capacidades antioxidantes resultan no ser tan robustas como las del hígado, en este trabajo se las estudiará en forma comparativa.

### *Cerebro*

El cerebro, y en especial la región de la sustancia nigra involucrada en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson, es sin duda el órgano más sensible a generadores de estrés oxidativo. Las razones para esta mayor sensibilidad radican en las cuestiones que se detallan a continuación:

- El cerebro corresponde a un pequeño porcentaje del peso corporal (2 %) y consume alrededor del 20 % del O<sub>2</sub> total. Así es como procesa una enorme cantidad de oxígeno en una relativamente pequeña masa tisular. Las neuronas utilizan la mayor parte del O<sub>2</sub> que reciben para producir el ATP necesario para el mantenimiento de los gradientes iónicos y esto depende de una importante población mitocondrial (Chang y Reynolds, 2006).
- Posee un gran tráfico de Ca<sup>2+</sup> a lo largo de las membranas neuronales, una interferencia con el tráfico de iones puede conducir a un incremento muy rápido

de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  generando estrés oxidativo.

- Varias regiones cerebrales como sustancia nigra (SN), núcleo caudado, putamen y globus pallidus, tienen niveles muy elevados de hierro (Fe) especialmente durante la adultez. Está claro entonces que un daño en el tejido cerebral llevará a la liberación de Fe de los depósitos, capaz en su estado libre de catalizar la producción de especies reactivas como la formación de  $\text{OH}^{\bullet}$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (vía Fenton/Häber-Weiss), peroxidación lipídica y autooxidación de neurotransmisores (Erikson et al., 1997).
- Los lípidos de las membranas de las neuronas contienen gran cantidad de cadenas de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente 20:5 y 22:6. Esto los convierte en un blanco predilecto de los propagadores de cadena que atacan las estructuras vinílicas y fracturan los dobles enlaces generando una serie de productos de oxidación (algunos de los cuales serán evaluados en este trabajo mediante la reacción para TBARS).
- Muchos neurotransmisores son moléculas autooxidables. La dopamina, L-DOPA y noradrenalina reaccionan con  $\text{O}_2$  para generar  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y quinonas reactivas que consumen GSH y se unen a grupos  $-\text{SH}$  de proteínas. Un ejemplo de esto es la oxidación de la dopamina por la monoamino-oxidasa, una flavoproteína presente en la membrana mitocondrial externa que cataliza la reacción:  
**monoamina ( $\text{RCH}_2\text{NH}_2$ ) +  $\text{O}_2$  +  $\text{H}_2\text{O}$   $\rightarrow$  aldehído ( $\text{RCHO}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  +  $\text{NH}_3$**   
 Además la dopamina puede autooxidarse dando neuromelanina y peróxido de hidrógeno. Teniendo en cuenta que la dopamina se encuentra en concentraciones muy elevadas (milimolares) en las células dopaminérgicas, podría representar una fuente importante de especies reactivas (Packer et al., 1997).
- Las defensas antioxidantes del SNC son muy precarias. En particular, la catalasa tiene muy baja actividad en la mayoría de las regiones del cerebro (Chong et

al., 2005). En general la actividad de catalasa es mayor en regiones como el hipotálamo o la sustancia nigra, respecto a regiones como la corteza o el cerebelo. La superóxido dismutasa se localiza principalmente en las neuronas mientras que la glutatión peroxidasa está ubicada en los astrocitos que constituyen los principales reservorios de GSH (Packer et al., 1997).

- Comparado con otras regiones del cerebro maduro, la SN tiene una mayor densidad de microglia (Gao et al., 2003). La microglia constituye una suerte de macrófagos residentes del sistema nervioso central, y como tales, son capaces de producir  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  (y probablemente  $NO^{\bullet}$ ) durante su activación. Algunos autores aseguran que las enfermedades neurodegenerativas están asociadas a un incremento de la proliferación de células de la microglia (gliosis reaccional) que llevaría a una producción excesiva de radicales libres (Packer et al., 1997).

El estrés oxidativo en el cerebro, al igual que en otros tejidos, conduce al daño de las estirpes celulares constitutivas por medio de los mecanismos antes mencionados: (a) incremento de la peroxidación lipídica, (b) daño oxidativo al DNA causando la modificación de bases y fracturas de cadena, (c) daño a proteínas y (d) cambios en la sobrevivencia celular por inducción de apoptosis o necrosis. En este trabajo evaluaremos estos efectos a través de los biomarcadores apropiados.

El término “biomarcador” es adoptado por expertos en estrés oxidativo y se refiere a un cambio en una molécula biológica como resultado del ataque por especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Se lo aplica tanto a los productos derivados de lípidos, como de proteínas, DNA e incluso al consumo de antioxidantes específicos (Griffiths et al., 2002).

Un biomarcador válido debería reunir una serie de características:

- Ser un producto de la modificación oxidativa que esté implicado directamente en el desarrollo de la enfermedad.
- Ser suficientemente estable, no susceptible a pérdidas durante el almacenamiento de la muestra a analizar.
- Ser representativo del balance entre la generación de daño oxidativo y el clearance de especies dañinas.
- Ser factible de determinación analítica mediante un ensayo específico, sensible, reproducible y robusto.
- No tener interferencias con factores de la dieta.

En la evaluación de los efectos de un xenobiótico sobre la producción de radicales libres y el sistema de defensa antioxidante, no es posible utilizar un biomarcador “universal” que defina la situación redox del tejido (Abuja y Albertini, 2001). Por eso es preciso contar con una batería de determinaciones que describan la producción de especies activas, el estado de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, y el daño a componentes celulares (biomembranas, DNA y proteínas) (De Zwart et al., 1999). Las técnicas utilizadas en este trabajo de tesis son aceptadas internacionalmente para la evaluación del estrés oxidativo (Dalle-Donne et al., 2006).

### **Modelo experimental para el estudio del daño oxidativo por agroquímicos**

Hemos ya mencionado el trabajo evaluativo de Marina Emborg quien revisó en el 2004 de manera muy exhaustiva las estrategias para abordar la problemática de la evaluación del daño oxidativo, utilizando animales de laboratorio como sujetos de estudio. A partir de este documento comparativo podemos afirmar que los resultados obtenibles en ratas macho de la cepa Wistar son de indudable valor y con capacidad de

ser extrapolables al humano.

Hasta ahora, la mayoría de las investigaciones se habían llevado a cabo con intoxicaciones agudas (Ranjbar et al., 2005), algunas de las cuales se condujeron por inyección intracraneal del agente tóxico (Emborg, 2004); o bien mediante intoxicaciones crónicas que emplearon un solo contaminante.

Desde el punto de vista mecanístico es interesante estudiar el efecto de un solo polucionante por vez; sin embargo, esto se aparta peligrosamente de la realidad, de modo que estos diseños experimentales descuidan el hecho que estamos diariamente sometidos a una exposición mínima y prolongada que involucra a *varios plaguicidas simultáneamente*. Sería imposible reproducir fehacientemente todas las condiciones del entorno para un individuo particular en una cierta región del planeta, pero podemos acercarnos a un modelo más confiable si estudiamos tanto los efectos de la intoxicación individual como combinada, producida por aquellos agroquímicos de uso más frecuente en nuestro medio (Cory-Slechta, 2005; Di Monte, 2003). Esto nos permitirá comparar los datos obtenidos para cada uno de ellos y las posibles sinergias o antagonismos que surjan de su interacción tal como sucede en la vida real, estableciendo además un índice de riesgo más cercano al verdadero (Jia y Misra, 2007; Patel et al., 2006). Por otra parte, cada componente de una mezcla tiene su propio potencial tóxico de manera que puede afectar a la de los otros componentes del “cocktail” modificando la toxicocinética y la toxicodinamia de los mismos (Simmons, 1995).

Por estas razones buscamos simular a través del modelo experimental una intoxicación sub-clínica con dosis muy bajas ( $1/50$  a  $1/250$  de la  $DL_{50}$ ) similares a las que estamos expuestos a lo largo de nuestra vida al consumir alimentos, agua, etc., contaminados con residuos de una variedad de tóxicos que se presentan como mezclas complejas (Hatcher et al., 2008; Claver et al., 2006).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Esquema de tratamiento.

Se utilizaron ratas Wistar machos (de  $190 \pm 20$  gr de peso corporal) libres de patógenos, que fueron adaptados al ambiente del bioterio una semana antes de comenzar el tratamiento. Durante el desarrollo del experimento se mantuvo a los animales en condiciones controladas de temperatura ( $25\text{ °C} \pm 3$ ) e iluminación, con un foto-período normal de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Las ratas fueron alimentadas con Purina Chow provista por Ganave Co. (Santa Fe, Argentina) y agua *ad libitum*, evaluadas clínicamente en búsqueda de signo-sintomatología específica (Moser et al., 2006) y pesadas todas las semanas a lo largo del experimento.

Los animales se separaron en 9 lotes experimentales, cada uno integrado por 4 ratas que se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) con los agroquímicos tres veces por

semana durante 5 semanas. Las suspensiones de los tres plaguicidas fueron preparadas en polietilenglicol-400 (PEG-400) como vehículo. Las dosis administradas a cada lote aparecen en la tabla adjunta (**Tabla 5**) y representan entre 1/50 y 1/250 de las  $DL_{50}$  para los agroquímicos utilizados (John et al., 2001; Jia y Misra, 2007; Benedetti et al., 2004).

**Tabla 5.** Lotes experimentales: dosis de drogas empleadas y tratamiento.

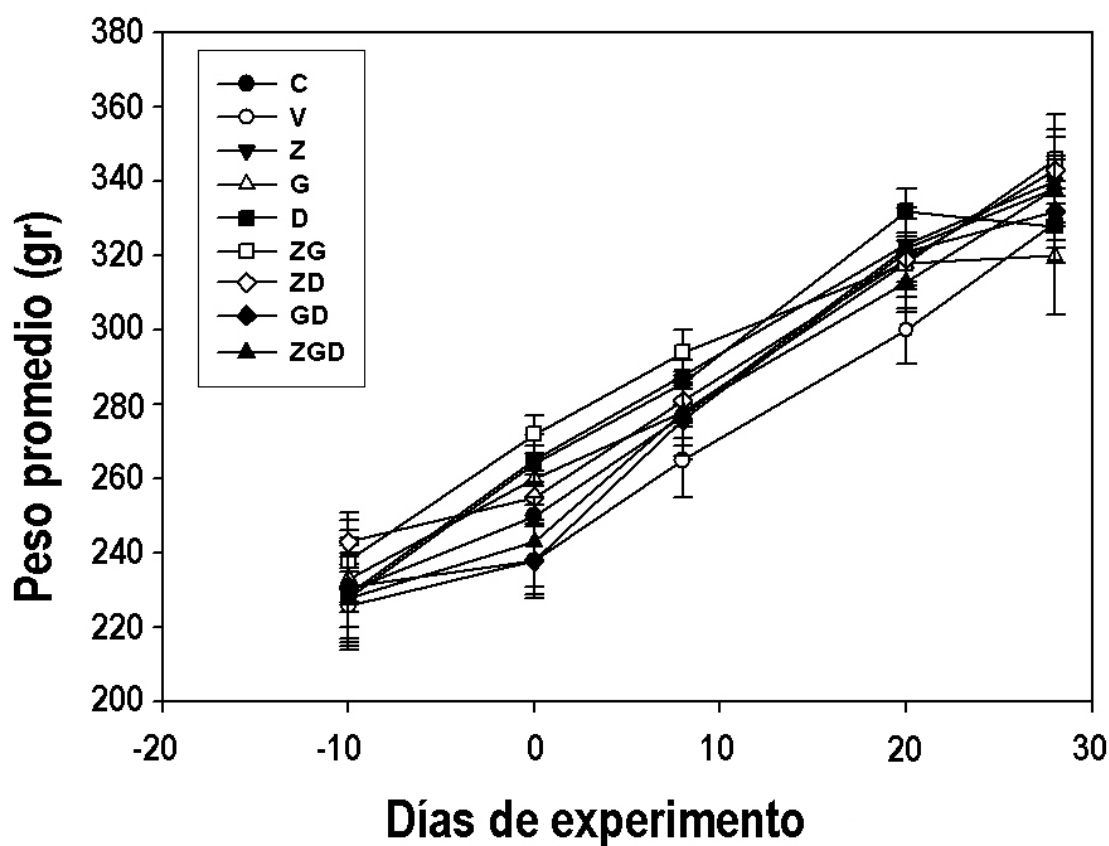
LOTES EXPERIMENTALES	TRATAMIENTO
Control (C)	sin inyección intraperitoneal
Control VEH (V)	i.p. PEG-400 en volumen equivalente
Zineb (Z)	i.p. 15 mg / Kg de peso
Glifosato (G)	i.p. 10 mg /Kg de peso
Dimetoato (D)	i.p. 15 mg/Kg de peso
Zineb+Glifosato (ZG)	i.p. $\Sigma$ [Z + G]
Zineb+Dimetoato(ZD)	i.p. $\Sigma$ [Z+D]
Glifosato+Dimetoato (GD)	i.p. $\Sigma$ [G+D]
Zineb+Glifosato+Dimetoato (ZGD)	i.p. $\Sigma$ [Z+G+D]

Los animales fueron inyectados intraperitonealmente cuidando de no lesionar órganos de la cavidad abdominal y empleando jeringas descartables apirógenas, esterilizadas y agujas atraumáticas (BD 0.30x13 30G ½). El régimen de inyección fue de 3 veces por semana durante un total de 5 semanas. Los plaguicidas se disolvieron en PEG-400 como vehículo.

Estudios previos de otros laboratorios han establecido dosis, tiempos de exposición, y vías de administración similares a las empleadas en este estudio como modelo válido para simular una intoxicación sub-crónica (John et al., 2001; Nielsen et al., 2006; Bolognesi y Morasso, 2000; Patel et al., 2006; Sivapiriya et al., 2006; Sharma et al., 2005b; Kamath y Rajini, 2007; Benedetti et al., 2004). Los animales fueron alimentados

y tratados de acuerdo con estándares internacionales (Reeves et al., 1993). Se llevó una curva de crecimiento para cada animal dentro de cada lote (**Figura 6**) de modo de mantener la proporción de droga inyectada en función del peso corporal.

**Figura 6.** Evolución del peso corporal en lotes experimentales.



Los animales se pesaron al inicio de cada semana del experimento. El gráfico muestra la evolución del peso corporal en función de los días para los grupos: C (control), V (inyección i.p. con PEG-400), Z, G, D, ZG, ZD, GD y ZGD tratados con inyecciones i.p., según lo indicado en la tabla 5.

### Colección de muestras.

Finalizado el período de exposición de 5 semanas, los animales fueron sacrificados por decapitación rápida sin previa anestesia utilizando guillotina, y se colectaron las muestras que se detallan a continuación.

## Sangre

Se recibió en tubos graduados cónicos de polipropileno heparinizados a razón de 10 UI/mL de sangre. La muestra se agitó por inversión suave para evitar la hemólisis y la coagulación, y se centrifugó en el punto máximo de velocidad de la centrífuga de mesa Rolco modelo HR-55 (Bs. As., Argentina) durante 10 minutos. Se separó el plasma y se tomaron alícuotas para diferentes determinaciones. Un mL de plasma se mezcló con 9 mL de reactivo de Folch para determinar la composición de ácidos grasos de lípidos plasmáticos, el resto del plasma se almacenó en ultrafreezer a -70 °C para realizar determinaciones de laboratorio de química clínica, biomarcadores de estrés, de daño oxidativo, y sistema de defensa antioxidante.

## Hígado

Se tomaron muestras de hígado que fueron homogenizadas sobre lecho de hielo con diferentes soluciones buffers. En una porción del tejido se empleó buffer fosfato de sodio pH 7.40, 140 mM adicionado de EDTA sódico 6 mM, en la proporción de 3 mL de buffer por cada gramo de tejido. El homogenato resultante se utilizó en las determinaciones de estrés, daño oxidativo, sistema enzimático de defensa antioxidante y análisis de composición de ácidos grasos. También se homogenizaron muestras de tejido hepático con *buffer de lisis* provisto por el kit comercial empleado para la determinación de la actividad de caspasa-3 (Caspase-3 Assay kit CASP-3-C, de Sigma Chem Co. Buenos Aires, Argentina) y para la medición de actividades de mili- (m) y micro- ( $\mu$ ) calpaínas. Asimismo la fracción mitocondrial se preparó previa homogenización del tejido con buffer provisto por el fabricante del kit comercial para aislamiento y purificación de mitocondrias (Mitochondria Isolation Kit, MITO-ISO1 de Sigma Co. USA). Para obtener el lisado previo a la extracción de DNA genómico, se trató el tejido hepático con buffer

“ATL” (DNA Blood and Tissue Extraction Kit adquirido a Qiagen CAT n° 69504, USA) suplementado con proteinasa K 100 µg/mL (Qiagen, Texas, USA). Finalmente, se empleó buffer fosfato sódico 50 mM adicionado con 10 % de formol ultrapuro (Merk, Alemania) para la fijación de pequeños trozos de tejido que fueron remitidos al servicio de Microscopía Óptica de la Cátedra de Histología de la Facultad de Ciencias Médicas.

### **Cerebro**

Los cerebros enteros se homogenizaron sobre hielo con buffer fosfato de sodio pH 7.40, 140 mM adicionado con EDTA sódico 6 mM. Las muestras se trataron en forma idéntica a la descrita para hígado. Además, se disectaron las regiones de sustancia nigra (SN) y corteza cerebral (CC) de localización contigua a la SN siguiendo lo indicado en el Atlas Paxinos & Watson (1998). De estas dos regiones se obtuvieron muestras para dosaje de actividad de caspasa-3, mili- y micro-calpaínas y DNA genómico, en forma idéntica a la descrita para el hígado. Las fracciones mitocondriales correspondientes a SN y CC se prepararon siguiendo el protocolo empleado para hígado con algunas variaciones en las condiciones de centrifugación. La elección de las velocidades de centrifugación se realizó teniendo en cuenta la pureza de la fracción por observación al microscopio electrónico de transmisión (ver más adelante). Finalmente, se empleó buffer fosfato sódico 50 mM adicionado con 10 % de formol ultrapuro para la fijación de pequeños trozos de corteza cerebral que fueron remitidos al servicio de Microscopía Óptica.

### **Riñón**

Los riñones se extrajeron, decapsularon y homogenizaron con buffer fosfato de sodio pH 7.40, 140 mM adicionado con EDTA sódico 6 mM para determinar biomarcadores de estrés y daño oxidativo, sistema enzimático de defensa antioxidante

y composición de ácidos grasos siguiendo las mismas metodologías utilizadas para el hígado. Finalmente, se empleó buffer fosfato sódico 50 mM adicionado con 10 % de formol ultrapuro para la fijación de pequeños trozos de tejido que fueron remitidos al servicio de Microscopía Óptica.

## **Determinaciones.**

### **1. Biomarcadores de estrés oxidativo**

#### **1.1. Nitritos y nitratos [NO<sub>x</sub>]**

##### *Fundamento:*

El método empleado cuantifica simultáneamente nitritos y nitratos en muestras biológicas. Para esto, se reducen previamente los nitratos existentes en la muestra empleando un exceso de vanadio (III) adicionado como clorhidrato de vanadio (Aldrich, Germany). Esta reducción es seguida por la determinación de los nitritos totales resultantes, mediante la reacción de Griess según Miranda et al. (2001) modificada por Beda y Nedospasov, 2005.

##### *Reactivos*

- Cloruro de vanadio: solución saturada en HCl 1 M.
- Reactivo de Griess: NED (N-[1-naftil]-etilendiamina, Sigma) al 0.1 % en agua bidestilada y SA (sulfanilamida, Sigma) al 2 % en HCl al 5 %. Griess premezclado: se mezclaron volúmenes iguales de NED y SA justo antes de emplear en la reacción colorimétrica.
- Solución estándar NaNO<sub>3</sub> (Merk ultrapuro) 1.42 mM en agua bidestilada.

##### *Procedimiento*

El plasma o los homogenatos de tejidos debieron ser previamente desproteinizados para luego ser sometidos a la reacción de Griess. Se siguió el siguiente protocolo:

- A 100  $\mu\text{L}$  de muestra se le agregó 400  $\mu\text{L}$  de metanol, se agitó con vortex y luego de 1 minuto se agregó 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se agitó y se dejó reposar por 1 hora. Se centrifugó a 14000 rpm 10 minutos. Se utilizó el sobrenadante (desproteinizado) para la reacción colorimétrica.
- La curva de calibración se preparó agregando  $\text{NaNO}_3$  stock y completando a 400  $\mu\text{L}$  con agua bidestilada de manera de obtener concentraciones en el rango de 100 a 500  $\mu\text{M}$ .
- En tubos aparte se dispensaron 400  $\mu\text{L}$  del desproteinizado.
- A todos los tubos (muestras y diluciones del  $\text{NaNO}_3$  stock) se les agregó 300  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{VCl}_3$  y 300  $\mu\text{L}$  de Griess premezclado agitando con vortex.
- Se incubaron los tubos 30 minutos a 37 °C y se leyó la D.O. (densidad óptica) contra agua bidestilada a 540 nm, en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

## 1.2. Poder reductor total determinado por ensayo FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma).

### *Fundamento*

A pH ácido se determinó la capacidad de la muestra (homogenatos de tejido o plasma) para reducir iones férricos ( $\text{Fe}^{+3}$ ) a ferrosos ( $\text{Fe}^{+2}$ ). La generación de  $\text{Fe}^{2+}$  a partir de  $\text{Fe}^{3+}$  se cuantificó colorimétricamente por formación de un complejo con tripiridil-triacina [ $\text{Fe}^{\text{II}}$ -TPZ] (Sigma Co.) de intenso color azul con un pico de absorción a 583 nm. Se trata de una reacción no específica que cuantifica todas aquellas sustancias que tienen capacidad reductora (bilirrubina, ácido úrico, vitámeros). La formación del complejo sigue una cinética aproximadamente lineal durante los primeros minutos de la reacción, por lo que se obtuvo un registro continuo de la D.O. y se calculó luego la pendiente

de la curva (Benzie y Strain, 1996). En nuestro caso hemos eliminado la contribución reductora del urato por tratamiento previo con uricasa. Se ha demostrado que el urato puede contribuir con más del 50 % de la capacidad reductora total (Schlesier et al., 2002; Benzie y Strain, 1996), lo que podría enmascarar cambios debidos a componentes minoritarios como lo sería el caso de los vitámeros antioxidantes C y E, y del glutatión.

#### *Reactivos*

- Buffer acético/acetato 300 mM, pH 3.60.
- Solución de TPZ (Sigma, USA) 10 mM en HCl 40 mM.
- Cloruro férrico (Biopack, Argentina) 20 mM en agua bidestilada.
- Reactivo de trabajo: se mezclaron 25 mL de buffer con 2.5 mL de TPZ y 2.5 mL de FeCl<sub>3</sub>.
- Uricasa de *Arthobacter globiformis* (Sigma, USA) disuelta en buffer fosfato 50 mM/ EDTA 1 mM/glicerol 25 mM, pH 8.50 agregada a razón de 1 U/μL (1U oxida 1 μmol de urato/min).

#### *Procedimiento*

Tratamiento previo: en todos los casos se agregó 10 μL de uricasa (1 UI/μL) y se incubó la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente con el fin de destruir el urato presente. Luego se la trató como se detalla seguidamente:

- Se tomó 1.5 mL de reactivo de trabajo y se lo termostató a 37 °C. Se inició la lectura de D.O. a 593 nm contra agua destilada.
- Se agregó al reactivo, 100 μL de muestra pre-tratada con uricasa. Se mezcló y se reanudó la lectura.
- Se obtuvieron los datos de D.O. por 4 minutos en el espectrofotómetro GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).
- Se calculó el incremento de D.O. en función del tiempo y se lo comparó con



la pendiente obtenida para un plasma patrón cuya capacidad antioxidante es conocida. El valor de FRAP de esta muestra patrón se obtuvo por calibración con una solución de concentración conocida de Trolox® (diacetato de  $\alpha$ -tocoferol) comercial.

## 2. Biomarcadores de sistema de defensa antioxidante.

### 2.1. Glutación.

#### 2.1.1. Glutación total por espectrofotometría cinética.

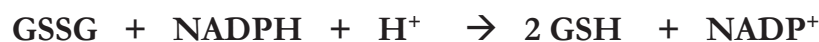
##### *Fundamento*

La determinación de glutación total se basa en la técnica de Anderson y Meister (1980). Inicialmente la muestra se pone en contacto con un exceso de ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB; Sigma Co., USA). Este compuesto transforma el GSH en GSSG a expensas de su conversión a TNB (5-tio-2-nitrobenzoico):



De esta forma todo el GSH presente inicialmente en la muestra se oxida y se suma al GSSG pre-existente que usualmente es minoritario representando un 1-5 % del total (Dalle-Donne et al., 2006).

Luego en la segunda fase, todo el GSSG se reduce a GSH mediante una reacción catalizada por la glutación reductasa (GR) NADPH-dependiente:



A medida que la GR produce GSH, éste reacciona con el DTNB remanente produciendo ulteriores cantidades de TNB. La velocidad de aparición de TNB se monitorea a 412 nm y resulta proporcional a la concentración total de glutación en la muestra.

##### *Reactivos*

- Buffer "A": buffer fosfato de sodio 140 mM, pH 7.50 con 6 mM de EDTA.

- Buffer “B”: NADPH (Sigma Co.) 0.25 mg/mL de buffer “A”
- DTNB (Sigma Co.) 6 mM en buffer “A”
- Glutación reductasa (168 U/mg de proteína, suspensión en 3.6 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.0 conteniendo 0.1 mM de ditioneitol, Sigma Co. USA): 5 UI cada 50  $\mu\text{L}$  de buffer “A”.
- Acido tricloroacético (TCA) al 5 % en agua bidestilada.
- Mezcla DTNB: se preparó en la proporción de 5 mL de agua bidestilada + 3 mL de solución de DTNB 6 mM + 300  $\mu\text{L}$  de TCA al 5 %.
- Solución patrón de glutación (Sigma Co., USA): GSH en buffer “A”/TCA en proporción 5 nmol en 40  $\mu\text{L}$ .

#### *Procedimiento*

- Los homogenatos o las muestras de plasma se trataron con TCA al 5 % en proporción de 1 volumen de muestra por cada 3 volúmenes de solución de TCA. Se agitó y se dejó reposar en frío 30 segundos.
- Se centrifugó a 14000 rpm (4 °C) y se separó el sobrenadante.
- Se cargó la cubeta de referencia con 3 mL de buffer “A” y la cubeta de la muestra con 2.10 mL de buffer “B” y se ajustó el equipo al cero de D.O. (412 nm).
- Se agregó a la cubeta de la muestra 850  $\mu\text{L}$  de mezcla DTNB y se invirtió para mezclar.
- Luego, se agregó 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de desproteinización y se invirtió para mezclar. Se incubó a 30 °C por 10 minutos.
- La reacción se inició con el agregado de una alícuota de buffer “A” que contuvo 5 UI de GR y se invirtió una vez más. Se inició el registro de la D.O. a 412 nm por 2 minutos en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

- Paralelamente se analizaron diferentes alícuotas del patrón (10, 20, 30 y 40  $\mu\text{L}$ ) siguiendo los mismos pasos que para la muestra.
- Se calculó  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  para los patrones, se trazó una curva de calibración y se interpolaron las pendientes de las curvas de las muestras, obteniéndose así el contenido de glutatión total en cada una de ellas.

### 2.1.1. Glutatión oxidado y reducido determinados por HPLC

#### *Fundamento*

El método determina tanto el glutatión oxidado (GSSG) como el reducido (GSH) en muestras biológicas mediante HPLC con detección UV-visible. En esta técnica se utiliza N-etilmaleimida (agente alquilante) para prevenir la oxidación del glutatión reducido durante el procesamiento de la muestra. El procedimiento se basa en la formación de derivados 2,4-dinitrofenilos, por reacción de los grupos amino libres con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno. El método de Giustarini et al. (2003) permite la cuantificación de ambas especies del glutatión en la misma corrida cromatográfica.

#### *Reactivos*

- Metanol (J.T. Baker, USA) 80 % en agua bidestilada (fase A) filtrado.
- Acetato de sodio (Anedra) 0.5 M pH 4.60 en fase A (fase B) filtrado.
- 1-Fluoro-2,4-dinitrobenceno (Sigma Co. USA) 1.5 % (v/v) en etanol absoluto.
- N-etilmaleimida (Sigma Co. USA) (NEM) 310 mM en agua bidestilada.
- Acido tricloroacético (TCA) al 10 % en agua bidestilada.
- Buffer Tris-HCl 1 M pH 10.0.
- Diclorometano (J.T. Baker, USA) calidad HPLC.

#### *Procedimiento*

- Durante el proceso de obtención de homogenatos o plasmas se hicieron reaccionar

sin demoras 0.5 mL de cada tipo de muestra con 50  $\mu$ L de N-etilmaleimida 310 mM en hielo por 5 segundos.

- Las muestras se diluyeron con un volumen igual de TCA al 10 % y se agitaron vigorosamente por 20 segundos.
- Se centrifugaron 5 minutos a 15000g.
- Se separaron los sobrenadantes, y se extrajo el exceso de NEM con 10 volúmenes de diclorometano agitando vigorosamente.
- Se separó la fase acuosa superior de la partición con diclorometano, y se la alcalinizó agregando 0.1 mL de buffer Tris-HCl 1 M pH 10.0.
- Se trataron las muestras con 0.3 mL de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno al 1.5 % (v/v) en etanol absoluto, incubando como mínimo 3 horas en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Finalizada la incubación las muestras se acidificaron con 20  $\mu$ L de HCl 37 % y se inyectaron 20  $\mu$ L en el equipo de HPLC.

#### *Sistema cromatográfico*

Columna: BioRad Biosil NH<sub>2</sub> (250 x 4.6 mm). Macherey-Nagel, Alemania.

Flujo: 1.20 mL/min.

Fase móvil: "A", metanol 80 %; "B", acetato de sodio 0.5 M pH 4.60 en fase "A".

Gradiente de fase móvil: 70 % de A+ 30 % de B, hasta equilibrio. Tras inyección de 20  $\mu$ L de muestra derivatizada, se mantuvo la proporción de partida por 10 minutos y luego se cambió a 5 % de A + 95 % de B mediante un gradiente lineal de 25 minutos.

Se mantuvo esta proporción hasta la elusión de ambas especies de glutatión.

Detección: UV a 355 nm, módulo Merk-Hitachi L4200 UV-Vis variable.

Equipo de HPLC: Merk-Hitachi L6200 con Intelligent Pump y D-2500 Chromato-Integrator.

## 2.2. Vitámeros E

### *Fundamento*

Los vitámeros E ( $\alpha$  y  $\gamma$ -tocoferol fundamentalmente) se midieron luego de extraerlos de la muestra por el método de Buttriss y Diplock (1984), usando la técnica de HPLC descrita por Bagnati et al. (1998). La técnica permite detectar y cuantificar tanto  $\alpha$ - como  $\gamma$ - tocoferol, con límites de detección de 0.5 y 1.0 ng, respectivamente.

### *Reactivos*

- EDTA (Sigma Co. USA) 200 mM en agua bidestilada.
- Suero patrón con concentración de vitámeros E conocida.
- Etanol absoluto con pirogalol (Sigma Co. USA) al 1 %.
- KOH en solución saturada.
- Solventes de fase móvil: acetonitrilo, metanol, diclorometano (J.T. Baker, USA).
- Hexano (J.T. Baker, USA).

### *Procedimiento*

- A 1 mL de homogenato (o 1 mL de plasma) se le agregaron 50  $\mu$ L de EDTA 200 mM.
- En forma similar se procesaron alícuotas de un suero patrón de concentración conocida (entre 50 y 1000  $\mu$ L) para obtener una curva de calibración.
- Luego se agregó 2 mL de etanol absoluto conteniendo 1 % de pirogalol y se incubó 2-3 minutos a 70 °C.
- Se adicionó 300  $\mu$ L de KOH saturada, se agitó y gaseó con nitrógeno.
- La muestra se saponificó a 70 °C por 30 minutos, se enfrió, y se le agregó 1 mL de agua bidestilada.
- Se extrajo con dos porciones de hexano de 3 mL cada una, se evaporó a seco bajo nitrógeno y se redisolvió en 300  $\mu$ L de fase móvil.

- Se ultrafiltraron las muestras justo antes de su análisis mediante membranas resistentes a solvente (Millipore, NY, USA) de 0.45  $\mu\text{m}$  y se inyectaron en el loop-500 del HPLC.

#### *Sistema cromatográfico*

Columna: fase reversa ECONOSIL C<sub>18</sub> 10 U, Lot. 2306, Cat. 60148, Length: 250 mm, I.D.: 4.6 mm. Alltech Associates, Inc., USA.

Fase móvil: acetonitrilo-diclorometano-metanol (67:19:14), modo isocrático.

Flujo: 1.50 mL/min.

Detección: UV a 292 nm para  $\alpha$  y  $\gamma$ -tocoferoles en detector Merk-Hitachi L4200 UV-Vis variable.

Equipo de HPLC: Merk-Hitachi L6200 con Intelligent Pump y D-2500 Chromato-Integrator.

### **2.3. Catalasa**

#### *Fundamento*

Se usó una adaptación del método de Aebi, (1984). La reacción se basó en una técnica cinética que mide la velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno a 230 nm.

#### *Reactivos*

- Sustrato peróxido: se diluyeron 0.34 mL de peróxido de hidrógeno de 100 volúmenes en 100 mL de buffer de reacción.
- Buffer de reacción: se mezclaron 75 mL de solución A (0.681 gr de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 100 mL de agua) con 50 mL de solución B (0.890 gr de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), y se ajustó el pH a 7.0.
- Reactivo de etanol: se diluyeron 9.6 mL de etanol absoluto con 0.4 mL de agua bidestilada.

- Reactivo tritón: se disolvió 1 mL de tritón X-100 con 9 mL de buffer de reacción.

#### *Procedimiento*

Se emplearon homogenatos de tejidos.

- Se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de muestra con 5  $\mu\text{L}$  de reactivo etanol y se incubó 20 minutos en hielo.
- Se agregó 50  $\mu\text{L}$  de reactivo tritón y se mezcló. Se incubó en hielo otros 3 minutos.
- El contenido se diluyó agregándole 4 mL de buffer de reacción, se mezcló y se quitó del hielo.
- Se cargaron cubetas de cuarzo con 0.5 mL de sustrato peróxido y 2.5 mL de buffer de reacción y se mezcló.
- Se leyó la línea de base y se constató su estabilidad en el tiempo (D.O. aprox. 0.50).
- La reacción se inició por agregado de una alícuota apropiada de la muestra, dependiendo del tejido analizado.
- Se mezcló y leyó la D.O. por 2 minutos en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

Se calculó el valor de  $k$  usando la siguiente ecuación:

$$k = (2.30/t) \cdot \log (\text{D.O. final} - \text{D.O. inicial})$$

Efectuando luego el cociente entre el valor de  $k$  y el dato de proteínas, se calculó la actividad específica de la enzima.

## 2.4. Glutación peroxidasa

### *Fundamento*

Las glutatión peroxidasas son isoenzimas que catalizan la reducción de hidroperóxidos a expensas del glutatión reducido:



“R” puede ser un radical alifático o aromático, o simplemente un hidrógeno. El método cinético de Flohé y Gunzler (1984) permite determinar el total de la actividad GPx.

En este método, el GSSG generado en la reacción anterior es nuevamente reducido a GSH a expensas de NADPH en una reacción acoplada que emplea glutatión reductasa (GR):



Para determinar la actividad se sigue la cinética de oxidación del NADPH a 340 nm.

### *Reactivos*

- Buffer fosfato de potasio 0.1 M pH 7.0 con EDTA 1 mM.
- GSH (Sigma, Co. USA) 10 mM en agua bidestilada.
- NADPH (Sigma Co. USA) 3 mM en bicarbonato de sodio al 0.1 %.
- Glutatión reductasa (Sigma Co. USA, idéntica a la que se usó en la determinación de glutatión total).
- Azida sódica (Mallinckrodt, USA) 100 mM.
- Ter-butil hidroperóxido, THBP (Sigma Co. USA) 12 mM.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2mM.

### *Procedimiento*

La reacción se desarrolló a 37 °C.

- Se agregó al tubo de reacción 550 μL de buffer fosfato de potasio 0.1 M con EDTA 1 mM, pH 7.0, 100 μL de GSH 10 mM, 100 μL de GR conteniendo 0.24



UI de enzima y 10  $\mu\text{L}$  de azida sódica 100 mM. Se mezcló por inversión.

- Luego de agregar 50  $\mu\text{L}$  de muestra, se incubó a 37 °C por 10 minutos.
  - Finalizada esta incubación se agregó 100  $\mu\text{L}$  de NADPH 3 mM.
  - La reacción se inició por agregado de 100  $\mu\text{L}$  de TBHP 12 mM y se registró la D.O a 340 nm en función del tiempo por 3 minutos en el espectrofotómetro GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer de doble haz (Sydney, Australia).
- A partir de los trazados cinéticos se calculó la pendiente ( $\Delta\text{DO}/\text{min}$ ). La actividad de la enzima se expresó como  $\mu\text{mol NADPH oxidado}/\text{mg proteína}\cdot\text{min}$ , siendo  $\varepsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

## 2.5. Glutación S-transferasa

### *Fundamento*

La enzima glutación-S-transferasa cataliza reacciones en las cuales el anión tiolato ( $\text{GS}^-$ ) participa como nucleófilo. Esto implica que cualquier compuesto que posea grupos electrofílicos puede ser potencialmente atacado. Existe por lo tanto, una extensa variedad de sustratos posibles para esta enzima. En el método de Habig et al. (1974), se recurre a la capacidad de la GST (glutación S-transferasa) para conjugar al 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) con glutación reducido (GSH) acompañado por un incremento en la absorbancia a 340 nm. La pendiente  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  es proporcional a la actividad de GST en la muestra:



### *Reactivos*

- Buffer fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.50-7.0.
- 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno (Sigma Co.) 20 mM en etanol.
- Glutación reducido (GSH, Sigma Co.) 20 mM en agua bidestilada.

- Buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 6.50.

#### *Procedimiento*

Es necesario contar con una celda de lectura termostaticada a 30 °C y cubetas de cuarzo.

- Se colocó en un tubo 800 µL de buffer fosfato de potasio, 50 µL de solución de CDNB 20 mM, 50 µL de solución de glutatión 20 mM, y 50 µL de buffer fosfato de sodio 10 mM.
- Se comenzó la medición de la D.O. en función del tiempo con el agregado de la alícuota adecuada de muestra y se registró la variación de la D.O. a 340 nm por 3 minutos en el espectrofotómetro GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

Se expresaron los resultados como actividad específica en términos de nanomoles de producto/mg de proteína.min, siendo  $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

## 2.6. Glutatión reductasa

### *Fundamento*

La glutatión reductasa es una flavoproteína NADPH-dependiente que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a reducido (GSH) a expensas de la oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup>:



Es por lo tanto de crucial importancia en la homeostasis del glutatión intracelular. Para determinarla se sigue la cinética de oxidación del NADPH a 340 nm (Carlberg y Mannervik, 1985).

### *Reactivos*

- Buffer fosfato de potasio 0.2 M, pH 7.0 con EDTA 2 mM.

- Buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7.0.
- GSSG (Sigma Co.) 20 mM en agua bidestilada.
- NADPH (Sigma Co.) 2 mM en buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7.0.

### *Procedimiento*

Es necesario contar con una celda de lectura termostatzada a 37 °C y utilizar cubetas de cuarzo.

- Se mezclaron 500  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato de potasio, con 50  $\mu\text{L}$  de solución de NADPH 2 mM, 50  $\mu\text{L}$  de solución de GSSG 20 mM y 350  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada. Se pre-incubó a 37 °C por 3 minutos.
- Se agregó 50  $\mu\text{L}$  de muestra, se mezcló por inversión, y se registró la cinética a 340 nm por 3 minutos en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

Se expresaron los resultados como actividad específica en términos de nanomoles de producto/mg de proteína.min, siendo  $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

## **2.7. Superóxido dismutasa (SOD)**

### *Fundamento*

El pirogalol se oxida rápidamente a pH alcalino para formar un cromógeno que absorbe luz a 420 nm. Los radicales superóxido que se generan a partir de  $\text{O}_2$  durante la autooxidación catalizan el aumento de la velocidad de la reacción. Así, la velocidad de formación del compuesto coloreado disminuye considerablemente en presencia de SOD (Heikkila et al., 1976). La metodología propuesta por Marklund y Marklund (1974) se basa en la inhibición de la oxidación espontánea del pirogalol que ocurre a velocidad constante a pH 8.80.

*Reactivos*

- Buffer Tris-cacodilato (Fluka, USA) 50 mM pH 8.80.
- Solución de pirogalol (Sigma Co. USA) 26 mM en HCl 10 mM.

*Procedimiento*

- Se mezclaron 1880  $\mu\text{L}$  de buffer Tris-cacodilato con 20  $\mu\text{L}$  de la muestra, 100  $\mu\text{L}$  de pirogalol 26 mM, se invirtió suavemente y se leyó la D.O. a 420 nm por 2 minutos en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

Es preciso obtener la curva de auto-oxidación omitiendo el agregado de la muestra. Con ésta se podrá calcular la velocidad de oxidación del pirogalol que se tomará como referencia ( $\Delta\text{Ref}$ ). La unidad enzimática se define como la que inhibe en un 50 % la autooxidación del pirogalol.

$[\Delta\text{SOD}/\Delta\text{Ref}].100 = \text{porcentaje de inhibición por minuto (PI.min)}$ .

$\text{PI}/50 = \text{unidades en la alícuota de la muestra (usualmente } 20 \mu\text{L)} = \text{UID}$ .

$\text{Actividad específica} = \text{Spa} = [\text{UID}/\text{mg de proteína}]$ .

### **3. Biomarcadores de daño oxidativo**

#### **3.1. TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)**

*Fundamento*

Los productos resultantes de la peroxidación lipídica son parámetros confiables para monitorear el daño oxidativo a los lípidos. El método propuesto por Yagi et al. (1979) consiste en la reacción entre el ácido tiobarbitúrico y productos de descomposición de especies lipídicas peroxidadas tales como el malondialdehído (MDA) en un medio ácido (pH 3.50). Luego de una etapa de calentamiento se produce por aducción un cromóforo rosado cuya absorbancia se determina a 532 nm.

### *Reactivos*

- SDS 8.10 % en agua bidestilada.
- Ácido acético al 10 % en agua bidestilada, pH 3.5.
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma Co. USA) 0.8 % en agua bidestilada (TBA).
- 1-Butanol (J.T. Baker, USA).
- Testigo: tetrametoxipropano (Sigma Co., USA) (TMP) como malondialdehído-bis-dimetil-acetal. Para la curva de calibración se preparan diluciones de entre 120 a 12000 pmol/tubo de reacción.

### *Procedimiento*

- Se mezcló suavemente una alícuota de la muestra con igual volumen de SDS al 8.10 %, 1.50 mL de ácido acético al 10 % pH 3.50 y 1.50 mL de solución de TBA al 0.8 %.
- Se agitó y se calentó 60 minutos a 95 °C.
- Se dejó enfriar completamente y se extrajo con 3.5 mL de 1-butanol agitando vigorosamente.
- Se dejó reposar 2 minutos y se centrifugó a 4000g por 10 minutos.
- Se aspiró la fase orgánica y se midió la D.O a 532 nm contra 1-butanol en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

## **3.2. DNA Laddering**

### *Fundamento*

Durante la muerte celular por apoptosis se produce una fragmentación controlada del DNA genómico catalizada por endonucleasas que efectúan cortes doble cadena en las regiones internucleosómicas dando fragmentos de tamaños uniformes (múltiplos de 180-200 pb). Cuando a ese DNA se lo siembra en geles de agarosa y se lo electroforeografía

se observa un patrón de fragmentación característico en forma de escalera denominado “ladder pattern” (Sambrook et al., 1989).

#### *Reactivos*

- Etanol absoluto.
- Proteinasa K 100 µg/mL (Qiagen, Texas, USA).
- RNAasa A (100 mg/mL) (Fermentas ENO531).
- DNeasy Blood and Tissue Kit. QIAGEN (CAT n° 69504 Texas, USA).
- Loading buffer 10 X: 0.25 % de azul de bromofenol, glicerol 30 % en agua libre de DNAsas.
- Agarosa (Sigma Co. USA).
- Bromuro de etidio 0.5 mg/mL.
- Buffer TAE 50 X (242 gr de Tris-base, 57.1 mL de ácido acético glacial, EDTA 0.5M)/L de agua bidestilada (pH 8.0).

#### *Procedimiento*

- Se purificó el DNA genómico de tejidos según instrucciones de DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen.
- El contenido de DNA de las muestras se cuantificó por medio de la lectura de la D.O. en espectrofotómetro a 260 nm con cubeta de cuarzo usando agua bidestilada como referencia, en un espectrofotómetro UV-Visible Ultraspec 2100 Pro, Amersham Biosciences (USA).
- Para la preparación de las muestras se ajustó la concentración de DNA a 2 µg/µL con agua libre de DNAsas, luego se mezcló 10 µg de DNA con 10 µL de loading buffer 2 X.
- Preparación del gel de agarosa 1.5 %: se pesaron 600 mg de agarosa y se disolvieron en 40 mL de buffer TAE 1X, agregando 1 µL de bomuro de etidio (0.5 µg/mL).

- Electroforesis: el gel obtenido se dispuso en la cuba electroforética y se completó el contenedor con buffer TAE 1X.
- Se sembraron las muestras en forma submarina usando micropipetas automáticas y tips libres de actividad DNAsica.
- En calles previamente identificadas se sembraron también alícuotas de un ladder 100 pb de referencia adquirido a PB-L Bio-lógicos, Universidad de Quilmes, Buenos Aires, Argentina.
- Se ajustó la fuente de poder a 4 v/cm y se dejó migrar por 4 horas.
- Para revelar las bandas de DNA se observó el gel en el transiluminador UV Hoefer Macrovue UV-20.
- La imagen se capturó y digitalizó mediante el software Kodak Digital Science 1D.

### 3.3. Carbonilos proteicos

#### *Fundamento*

Durante la oxidación de proteínas, las cadenas laterales de los aminoácidos son atacadas por especies reactivas formando grupos carbonilos. Reznick y Packer, en 1994 describieron una técnica para detectar estos grupos carbonilos a través de la reacción con la 2,4-dinitrofenilhidrazina que es capaz de formar difenilhidrazonas de color amarronado cuya D.O. se lee a 505 nm

#### *Reactivos*

- 2,4-Dinitrofenilhidrazina (Sigma Co. USA) 10 mM en HCl 2N (2,4-DNPH).
- NaOH 1N.
- HCl 2 N.
- Solución fisiológica.

- Testigo: Solución de piruvato de sodio *stock*: 5.2 mg de droga en 1 mL de agua bidestilada, la *solución de trabajo* se preparó diluyendo la anterior 20 veces con agua bidestilada (alícuotas de la curva entre 10 y 150  $\mu\text{L}$ ).

#### *Procedimiento*

- Se tomó una alícuota de la muestra y se llevó a 1.5 mL con solución fisiológica. Se hizo lo mismo con las alícuotas de los testigos y se rotuló como “blanco” al tubo que se le agregó solamente 1.5 mL de solución fisiológica.
- Se agregó a todos los tubos 1.5 mL de 2,4-DNPH 10 mM. Se agitó luego de cada agregado y se incubó en la oscuridad, a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Se agregó a cada tubo 4 mL de NaOH 1N y se agitó. Se dejó reposar durante 5 minutos y se leyó la D.O. a 505 nm antes de pasados los 15 minutos del agregado del álcali, contra el blanco de reacción en espectrofotómetro GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

## **4. Biomarcadores de metabolismo lipídico**

### **4.1. Composición de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido capilar (c-GLC)**

#### *Fundamento*

La composición de ácidos grasos se analizó mediante una primera etapa en la que se extrajeron los lípidos totales por la técnica de Folch (1957). Seguidamente se desarrolló el procedimiento de obtención de ésteres metílicos (EMAGs) destinados al análisis cromatográfico. La finalidad de este procedimiento fue bloquear el extremo carboxilato de los ácidos grasos, para anular la polaridad inherente a esta función y mejorar el coeficiente de partición aumentando el número de platos teóricos. Esto optimiza la interacción con los rellenos o fases estacionarias usualmente empleadas (Morrison y Smith, 1964).



*Reactivos*

- Reactivo de Folch: cloroformo:metanol (2:1).
- KOH al 10 % en etanol de 96°.
- Metanol calidad HPLC (J.T. Baker, USA).
- Hexano o éter de petróleo (J.T. Baker, USA).
- HCl concentrado.
- $\text{BF}_3$  al 14 % en metanol grado cromatográfico (Merk, Alemania).

*Procedimiento*

- Extracción de lípidos: se extrajeron los lípidos totales de los homogenatos tisulares o muestras de plasmas mediante el método de Folch y el extracto lipídico se secó bajo corriente de nitrógeno.
- Saponificación: se trató el residuo con KOH al 10 % en etanol 96° agregándole 0.5 mL de metanol anhidro para facilitar la subsecuente etapa de extracción. Se gaseó con nitrógeno, se tapó y calefaccionó a 85 °C por 30 minutos.
- Extracción: se extrajo con 3 mL de hexano en medio alcalino para descartar la fracción insaponificable. Luego se agregó 1 mL de HCl (c) agitando sobre agua helada y 3 mL de hexano. Se agitó vigorosamente 1 minuto y se centrifugó a baja velocidad para separar las fases. Se extrajo la fase etérea que se pasó a otro tubo. La extracción se repitió en idénticas condiciones. Se evaporaron las fases extraídas a seco bajo corriente de nitrógeno.
- Esterificación: se adicionó al residuo obtenido en la fase anterior, 1 mL de  $\text{BF}_3$  al 14 % en metanol. Luego de agitar se gaseó con nitrógeno antes de calefaccionar los tubos a 85 °C por una hora.
- Re-extracción: se agregó 2 mL de agua destilada y 4 mL de cloroformo, se agitó y centrifugó para separar las fases. La fase superior que contiene agua y metanol

se descartó. La fase inferior o clorofórmica contuvo los EMAGs. Fue necesario repetir el lavado con 2 mL de agua destilada dos veces más para asegurarse de retirar todo el resto de trifluoruro de boro y metanol que no hubieran reaccionado. La fase clorofórmica inferior debe quedar libre de agua. Para ello se la evaporó a seco bajo nitrógeno y se redisolvió el residuo con 1 mL de hexano, se la gaseó con N<sub>2</sub> y se conservó a – 20°C hasta su análisis.

- Siembra en c-GLC: las muestras se filtraron y se secaron bajo nitrógeno. El residuo se redisolvió en 100 µL de hexano filtrado. Se inyectaron 2 µL de muestra en el equipo.
- Los EMAGs se identificaron por comparación de los tiempos de retención relativos al ácido palmítico (16:0) o araquidónico (20:4 n-6) mediante el empleo de estándares comerciales puros.

#### *Sistema cromatográfico*

Columna: columna capilar OME (Supelco, Bellefonte PA) de 30 m x 0.25 ID, 0.25 mm film.

Temperatura máxima 250 °C.

Cromatógrafo: Hewlett Packard HP 6890 GC system.

Detección: ionización en llama a 230 °C.

## **4.2. Fraccionamiento de lípidos totales en polares y neutros**

### *Fundamento*

A partir del extracto de lípidos totales de la muestra obtenidos por la técnica de Folch (1957), se efectuó el fraccionamiento de las sub-facciones “polares” (fosfatados) y “neutros” o apolares

*Reactivos*

- Reactivo de Folch.
- Cloroformo:metanol (1:1).
- Cloroformo:metanol (1:2).
- Sulfato de sodio anhidro p.a.
- Acido silícico lavado y activado por secado a 120 °C por no menos de dos horas.

*Procedimiento*

- Se extrajeron los lípidos del material biológico por la técnica de Folch de la forma usual.
- Se particionó el extractivo usando 1:10 del volumen final en agua destilada o solución fisiológica. Se agitó bien y se dejó reposar. Se centrifugó y se descartó la fase superior.
- Se secó el extractivo. Para esto se colocó sobre un tubo limpio, un embudo con un cono de papel de filtro (Whatman N° 5) conteniendo una punta de espátula de sulfato de sodio anhidro, y se filtró el contenido de la fase clorofórmica del Folch (la inferior). Se lavó el tubo de origen dos veces con 1-2 mL de Folch agitando y vertiendo el lavado dentro del mismo embudo. Se gaseó con N<sub>2</sub> y se lo congeló hasta el fraccionamiento.
- Para fraccionar en neutros y polares se debió primero determinar la cantidad de lípido existente. Para esto, se taró un tubo, se vertió dentro el extractivo de Folch y se lo evaporó a seco bajo nitrógeno. Una vez llegado a peso constante bajo nitrógeno de 5 bandas se obtuvo la cantidad de lípido por diferencia gravimétrica.
- El residuo se disolvió en una cantidad apropiada de cloroformo tal que se

consiguiera una concentración de 1 mg de lípido por cada 1-2 mL de solvente.

- Se trasvasó a otro tubo una alícuota de esta solución y se le agregó agitando ácido silícico activado en proporción igual a 25 veces el peso del lípido a extraer.
- Se trasvasó la suspensión a un portafiltro Buchner y se hizo vacío para filtrar. Una vez completado el filtrado se aplicó sobre la superficie del silícico remanente tres porciones de cloroformo puro.
- Se desconectaron los kitsatos de la línea de vacío y se transvasó el contenido a un tubo limpio. Esta fracción correspondió a los **lípidos neutros**.
- Se reconectaron los kitsatos y se efectuó sobre el silícico remanente dos lavados con cloroformo:metanol (1:1), luego otros dos lavados con la mezcla cloroformo:metanol (1:2) y finalmente un solo lavado con metanol puro.
- Se desconectaron nuevamente los kitsatos y se trasvasó el contenido a un tubo limpio. Esta fracción correspondió a los **lípidos polares**.

La pureza de ambas fracciones se controla por determinación de fósforo inorgánico (Chen et al., 1956).

## 5. Biomarcadores química clínica

### 5.1. Hemoglobina glicosilada

Se utilizó el kit Hemoglobina A1C de Biosystems Reagents and Instruments (cromatografía de intercambio catiónico en microcolumnas descartables).

Para las siguientes determinaciones se usaron kits comerciales de Laboratorios Wiener (Rosario, Argentina), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los números de catálogo se indican entre paréntesis a continuación de los nombres de las determinaciones.

- 5.2. **Fructosamina** (Catálogo: 1009281)
- 5.3. **Glucemia** (Catálogo: 10009260)
- 5.4. **Colesterol total y de HDL-colesterol** (Catálogo: 1220102)
- 5.5. **Triacilglicéridos** (Catálogo: 1780107)
- 5.6.  **$\gamma$ -GT** (Catálogo: 1421404)
- 5.7. **Lactato deshidrogenasa** (Catálogo: 1521304)
- 5.8. **Fosfatasa alcalina** (Catálogo: 1361402)
- 5.9. **Lipasa** (Catálogo: 1009284)
- 5.10. **Amilasa pancreática** (Catálogo: 1021403)
- 5.11. **Transaminasas plasmáticas (TGO y TGP)** (Catálogo: 1751002 y 1761002)
- 5.12. **Colinesterasa** (Catálogo: 1241403)
- 5.13. **Albúmina** (Catálogo: 1009240)
- 5.14. **Creatinina plasmática** (Catálogo: 1260362)
- 5.15. **Uricemia** (Catálogo: 1840106)
- 5.16. **Uremia** (Catálogo: 1810057)
- 5.17. **Bilirrubina total y directa** (Catálogo: 1120005 y 1120006)

## **6. Biomarcadores de muerte celular**

### **6.1. Caspasa-3**

#### *Fundamento*

El ensayo se basa en la hidrólisis de un péptido sintético que oficia de sustrato selectivo de estas proteasas (acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilina o Ac-DEVD-pNA). Al actuar la caspasa-3, se libera la porción p-Nitroanilina (p-NA) que presenta un pico de absorción a 405 nm. La actividad de esta enzima se midió con CASP-3-Colorimetric Assay Kit (CASP-3-C, Sigma Co.)

*Reactivos*

- Buffer de homogenización: HEPES 50 mM pH 7.40, con el agregado de CHAPS 2.5 mM, ditioneitol (DTT) 5 mM y aprotinina 10 µg/mL
- Buffer de ensayo: HEPES 20 mM pH 7.40, CHAPS 0.1 %, DTT 5 mM y EDTA 2 mM.
- Inhibidor de caspasa-3 (Ac-DEVD-CHO) 2 mM en DMSO
- Sustrato de caspasa-3 (Ac-DEVD-p-NA) 20 mM en DMSO
- Caspasa-3 stock 100 µg/mL en buffer de ensayo. Antes de usar se diluyó una alícuota del stock a 5 µg/mL usando buffer de ensayo 1X con el agregado de 1 mg/mL de albúmina bovina.
- Standard de p-nitroanilina para la curva de calibración.

*Procedimiento*

- Se prepararon los extractos citosólicos por homogenización de 50 mg de tejido con 300 µL de buffer de homogenización. Se centrifugó el homogenato a 20000g por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para medir la actividad de caspasa-3 y de calpaínas (que se describe en la siguiente sección).
- Se colocaron 10 µL de muestra o del control positivo (caspasa-3) en dos tubos, y a uno de ellos se le agregó 10 µL de inhibidor de caspasa (con inhibidor).
- Se agregó buffer de ensayo c.s.p. 1 mL de volumen final.
- Se inició la reacción por el agregado de 10 µL de sustrato de caspasa-3 en todos los tubos, mezclando en shaker.
- Se incubó a 37 °C durante toda la noche. Se leyó la D.O. a 450 nm en cubetas de cuarzo en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

La actividad específica de caspasa-3, se calculó como µmoles de p-NA liberados/mg de

proteína mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Actividad } (\mu\text{mol de pNA liberados/mg de proteína}) = \frac{\text{D.O. x factor de dilución}}{\epsilon (10.5 \text{ mM}) \times v (\text{ml}) \times c (\text{mg/ml})}$$

Donde: v: volumen de muestra en mL y c: concentración de proteínas en mg/mL

## 6.1. Calpaínas

### *Fundamento*

El ensayo involucra la hidrólisis de la caseína ultra pura por la acción de las calpaínas, con posterior aislamiento de los fragmentos proteolíticos que se miden por absorbancia en el rango del UV a 280 nm. Regulando el nivel de calcio en el medio es posible seleccionar el subtipo de calpaína que se desea determinar (Botha et al., 2004).

### *Reactivos*

- Buffer de ensayo: Tris-acetato 100 mM pH 7.50 conteniendo 100 mM de KCl con: 5 mM de CaCl<sub>2</sub> (para determinar mili-calpaínas) o 500 μM de CaCl<sub>2</sub> (para determinar micro-calpaínas), ditiotreititol 5 mM y caseína pura 5 mg/mL (este sustrato se agregó el mismo día en que se realizó el ensayo), disueltos en agua ultrapura (Carlo Erba, Milán, Italia).
- Buffer para blanco: se preparó de igual forma que el buffer de ensayo omitiendo el agregado de CaCl<sub>2</sub> y adicionándole EDTA 15 mM.
- Precipitante: ácido tricloroacético al 5 % en agua ultrapura.
- Aprotinina (inhibidor de proteasas de serina) (Sigma Co. USA) agregado al buffer de homogenización en proporción 10 μg/mL.
- Muestra: se utilizó una muestra idéntica a la utilizada para el dosaje de la actividad de caspasa-3

### *Procedimiento*

- “Blanco”: a una alícuota apropiada de buffer para blanco (1 mL – x  $\mu$ L de muestra) se le agregaron 800  $\mu$ L de TCA al 5 % y la alícuota correspondiente de muestra (x  $\mu$ L entre 10 y 200  $\mu$ L dependiendo el material). Se mezcló por inversión y se centrifugó a 4000g por 15 minutos.
- “Muestra”: a una alícuota de muestra (igual a la utilizada en el tubo blanco respectivo) se le agregó buffer de ensayo c.s.p. 1 mL. Se mezcló por inversión.
- Se incubó 24 horas a 25 °C.
- Luego se agregaron 800  $\mu$ L de TCA al 5 % para provocar la precipitación de los péptidos no proteolizados por desnaturalización y se centrifugó a 4000g por 15 minutos.
- Se separó el sobrenadante por aspiración suave y se transfirió a un tubo limpio
- Se leyó la D.O. a 280 nm contra buffer blanco de reacción en cubetas de cuarzo en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

La actividad de calpaínas se expresó como mUI/mL.

### **6.3. Integridad de Membranas mitocondriales**

Obtención de la suspensión de mitocondrias

#### *Fundamento*

La suspensión de mitocondrias se obtuvo luego de la homogenización de los tejidos mediante centrifugación diferencial siguiendo las instrucciones del fabricante del kit comercial MITO-ISO 1 Kit (Sigma Co.).

#### *Reactivos*

- Buffer de extracción: HEPES 10 mM, pH 7.50, conteniendo manitol 200 mM, sacarosa 70 mM y 1 mM de EGTA.



- Buffer de homogenización: ídem buffer de extracción con el agregado de albúmina bovina delipidada en concentración 2 mg/mL.
- Buffer de almacenamiento: HEPES 10 mM pH 7.40, conteniendo 25 mM de sacarosa, 1 mM de ATP, 0.08 mM de ADP, 5 mM de succinato de sodio, 2 mM de  $K_2HPO_4$  y 1 mM de DTT.

### *Procedimiento*

Previo a la obtención de las suspensiones mitocondriales utilizadas en las determinaciones que se detallarán más adelante (integridad de membranas, contenido de cardiolipina, etc), se probaron dos protocolos de obtención de mitocondrias en los cuales las variables principales fueron la aceleración y el tiempo de centrifugado. Finalmente se optó por aquel protocolo que permitió la obtención de una suspensión mitocondrial más pura según lo indicaron las imágenes obtenidas al microscopio electrónico de transmisión.

El protocolo resultante según esta prueba previa es el que se detalla a continuación:

- Se cortaron trozos de 100 mg del tejido y se homogenizaron con 1000  $\mu$ L de buffer de homogenización, manteniendo el material en hielo.
- Se centrifugó el homogenato de cerebro a 600g por 5 minutos a 4 °C y el homogenato de hígado a 1000g por 5 minutos a 4°C.
- Se transfirieron los sobrenadantes a otros tubos y se centrifugaron a 11000g por 10 minutos a 4 °C (para homogenato de cerebro) o a 3500g por 10 minutos a 4°C (para homogenato de hígado).
- Este procedimineto se repitió una vez más y luego de la última centrifugación se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 80  $\mu$ L de buffer de almacenamiento. Así las mitocondrias aisladas y viables se utilizaron en los ensayos

de integridad de membranas que se describen a continuación y que se llevaron a cabo inmediatamente a la obtención de las mismas.

### Integridad de Membrana Mitocondrial Interna (MMI)

#### *Fundamento*

La integridad de la MMI se midió sobre mitocondrias frescas aisladas según el protocolo anterior, testeando el gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\Psi$ ). Se utilizó el colorante fluorescente JC-1, una carbocianina catiónica sintética denominada yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzoimidazol carbociánico, siguiendo el método de Reers et al. (1991). El potencial de membrana de la mitocondria energizada (negativo en el interior), promueve la *captación direccional* de JC-1 hacia la matriz y la formación de “J-agregados”. La fluorescencia emitida a 590 nm por los agregados de colorante resulta ser directamente proporcional al potencial transmembrana.

#### *Reactivos*

- Colorante JC-1 0.2 mg/mL en DMSO (Sigma Co. USA).
- Buffer de ensayo JC-1: 20 mM de MOPS, pH 7.50, conteniendo 110 mM de KCl, 10 mM de ATP, 10 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de succinato de sodio y 1 mM de EGTA.

#### *Procedimiento*

- Se midió la concentración de proteínas de la suspensión mitocondrial por el método de Lowry et al. (1951) y se hizo una dilución con buffer de almacenamiento hasta obtener una concentración proteica de 1 mg/mL. De esta dilución se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ L para el ensayo.
- En un tubo se agregó, 1.9 mL de buffer de ensayo JC-1, los 5  $\mu$ L de suspensión y se completó con buffer de almacenamiento c.s.p. 2 mL.

- Se inició la reacción con el agregado de 2  $\mu$ L de colorante JC-1 y se mezcló por inversión.
- Se incubó en oscuridad por 10 minutos para permitir la captación completa del colorante.
- Se midió la fluorescencia utilizando 5 nm de slit a 490 nm como longitud de onda de excitación y 7.2 nm de slip a 590 nm como longitud de onda de emisión en espectrofluorómetro SML AMINCO 8000C (CA, USA).
- Se calculó la fluorescencia emitida en la suspensión de mitocondrias refiriéndola a la concentración de proteínas (FLU/mg de proteína).

#### Integridad de Membrana Mitocondrial Externa (MME)

##### *Fundamento*

Se utilizó un ensayo colorimétrico donde se midió una disminución de la absorbancia del ferrocitocromo c a 550 nm causada por su oxidación a ferricitocromo c, catalizada por la citocromo c oxidasa. El procedimiento siguió el protocolo descrito en el Cytochrome c Oxidase Assay Kit (CYTOCOX1, Sigma Co.). La integridad de la MME se puso en evidencia al medir la actividad de la citocromo c oxidasa en presencia o ausencia del detergente, n-dodecil  $\beta$ -D-maltósido, uno de los pocos detergentes que permite el mantenimiento del dímero de citocromo c oxidasa en solución. Utilizamos a la relación entre la actividad con y sin el detergente como una medida de la integridad de la MME

##### *Reactivos*

- Buffer de ensayo: Tris-HCL 10 mM pH 7.0, conteniendo 120 mM de KCl.
- Buffer de dilución de enzima con 1 mM de n-dodecil  $\beta$ -D-maltósido: Tris-HCL 10 mM pH 7.0, conteniendo 250 mM de sacarosa y 61 mM de n-dodecil  $\beta$ -D-maltósido

- Solución de DTT (ditiotreitól) 0.1 M en agua ultrapura Carlo Erba (Milán, Italia).
- Solución sustrato de ferrocitocromo c 0.22 mM con el agregado de 5  $\mu$ L de DTT 0.1 M a una concentración final de 0.5 mM. El reactivo se mezcló y se dejó 15 minutos hasta su completa reducción que se controló mediante el seguimiento del cambio espectral.
- Control positivo de citocromo c oxidasa: se disolvió el vial siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### *Procedimiento*

La absorción del citocromo c a 550 nm se modifica con su estado de oxidación. El citocromo c se reduce con el DTT y es reoxidado por la actividad citocromo c oxidasa presente en la muestra.

- Se diluyeron dos muestras paralelas de la suspensión de mitocondrias a una concentración de 0.1-0.2 mg de proteínas/mL utilizando el buffer de dilución de enzimas (actividad citocromo c oxidasa en mitocondrias intactas), o con el buffer de dilución de enzimas adicionado con 1 mM de n-dodecil  $\beta$ -D-maltósido (actividad citocromo c oxidasa total)
- Las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se tomó una alícuota (de 1-2  $\mu$ g de proteína) de la suspensión mitocondrial (x  $\mu$ L de muestra) o de la solución de la enzima (control positivo) y se completó hasta 1.05 mL con buffer de dilución de enzima.
- La reacción se inició con el agregado de 50  $\mu$ L de ferrocitocromo c mezclando por inversión.
- Se registró la D.O. a 550 nm durante 2 minutos en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

Se calculó la actividad de la enzima (total y en mitocondrias intactas) en la muestra y luego la relación entre ellas para expresar los resultados como porcentaje de mitocondrias con MME intactas.

#### 6.4. Determinación cuantitativa de cardiolipina

##### *Fundamento*

El contenido mitocondrial de cardiolipina se determinó en suspensiones mitocondriales obtenidas por el método de aislamiento explicado antes. Se extrajeron los lípidos totales por el método de Folch et al. (1957) y se separaron a través de una cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). Las bandas se revelaron por medio de tres métodos diferentes: vapores de yodo, reactivo Coomasie Brilliant Blue R-250 (Nakamura y Handa, 1984) y por el procedimiento de charring (Kritchevsky et al., 1972). Una vez identificada la banda correspondiente a la cardiolipina (mediante comparación de su R<sub>f</sub> con el de un standard puro sembrado en la misma placa), se raspó la fase estacionaria de la placa y se la transvasó cuantitativamente a un tubo limpio libre de fosfatos. Se cuantificó el contenido de fósforo inorgánico por el método de Chen et al. (1956).

##### *Reactivos*

- Reactivo de Folch (cloroformo: metanol 2:1).
- Placas de HPTLC, pre-coated silicagel plates 10 x 20 cm de Whatman Schleicher and Schuell (Maidstone, England).
- Cloroformo calidad HPLC (J.T. Baker, USA).
- Metanol calidad HPLC (J.T. Baker, USA).
- Hidróxido de amonio 28 % calidad HPLC (Anedra, Argentina).
- Coomasie brilliant blue R-250 en metanol (Sigma Co. USA): coomasie brilliant

blue R-250 al 0.03 % en metanol al 30 % con NaCl 100 mM.

- Reactivo para charring:  $\text{FeCl}_3$  al 0.05 % en agua bidestilada con un 5 % de ácido sulfúrico concentrado.
- Standard de cardiolipina 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en reactivo de Folch (Sigma Co., USA).
- Ácido perclórico al 70 %.
- Solución testigo de  $\text{H}_2\text{PO}_4$  13.6 % en agua bidestilada.
- Solución A: molibdato de amonio al 0.43 %, en agua bidestilada con ácido sulfúrico al 2.7 %.
- Solución B: ascorbato al 10 % en agua bidestilada.
- Reactivo de color: se mezclaron las soluciones A y B en partes iguales 15 minutos antes de usar.

#### *Procedimiento*

- Se obtuvo la suspensión de mitocondrias como se indicó antes y se agregaron a 5 mL de reactivo de Folch.
- Se siguió el protocolo de extracción de lípidos totales según Folch et al. (1957).
- Una vez obtenidos los lípidos mitocondriales se evaporaron a seco y se redisolviéron en 30  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folch.
- Se sembraron en la zona de concentración de la placa de HPTLC 10  $\mu\text{L}$  de muestra (1/3 del contenido total de lípidos) junto con 20  $\mu\text{L}$  de un standard de cardiolipina 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a los fines de identificar el lípido.
- Se desarrolló la placa en una mini-cuba de vidrio saturada con la fase móvil: cloroformo/metanol/hidróxido de amonio (65/25/4) por aproximadamente una hora.
- El revelado se realizó mediante las 3 técnicas antes mencionadas:

*Revelado con Coomassie Brilliant Blue R-250:* se cubrió la placa con el colorante descrito en

“*Reactivos*” por 35 minutos, luego se decoloró con el mismo solvente del colorante pero sin el agregado de Coomassie. Se agregaron pequeñas porciones del decolorante agitando suavemente y descartándolas hasta que el fondo se aclaró y se observaron las bandas nítidamente.

*Revelado con iodo:* se colocó una punta de espátula de iodo metálico en el fondo de una cuba de desarrollo con tapa hermética (junta esmerilada). Una vez que los vapores de iodo saturaron la atmósfera de la cuba, se colocó la placa en el interior y se la extrajo cuando se lograron visualizar las bandas con claridad.

*Revelado por charring:* se sumergió la placa por dos segundos en el reactivo, se escurrió, y se calentó en estufa a 100 °C durante 30 minutos.

Se eligió el método de revelado por charring por obtenerse la mayor sensibilidad y por no interferir con el protocolo de cuantificación de fósforo por el método de Chen et al., (1956) realizado posteriormente.

- Se identificaron las bandas correspondientes a cardiolipina por comparación de los Rfs de las muestras con los del estándar puro sembrado en la misma placa.
- Se extrajo la fase estacionaria de las bandas que contenían la cardiolipina y se las colocó en tubos de vidrio libres de fosfato. Se les agregó 100 µL de ácido perclórico al 70 % y se los calentó tapados en un block térmico a 120 °C por 24 horas.
- Se enfrió y agregó a cada tubo 1.5 mL de reactivo de color. Luego de agitar se incubó en baño de agua a 45 °C por 20 minutos.
- Se midió la D.O. a 420 nm en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).
- La concentración de fósforo en la muestra se calculó utilizando una curva de

calibración obtenida con el testigo de  $\text{H}_2\text{PO}_4$  13.6 % (1  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$  de P) en diferentes alícuotas (20, 30, 40, 50, 80 y 100  $\mu\text{L}$ ).

Los resultados se expresaron como  $\mu\text{moles}$  de cardiolipina/mg de proteína mitocondrial considerando que 1 mol de cardiolipina contiene 2 moles de fosfato.

## 7. Cuantificación de proteínas totales

### 7.1. Método de Bradford

#### *Fundamento*

La unión del Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas provoca un cambio en el pico de absorción del colorante de 465 nm a 595 nm, de modo que determinando la D.O. a 595 nm contra un blanco de reactivo (sin proteína) se puede calcular el contenido de ésta en la muestra. Resulta un ensayo muy rápido y reproducible y el color es estable por una hora (Bradford, 1976).

#### *Reactivos*

- Reactivo de color: Coomassie Brilliant Blue G-250 0.01 % (p/v) en etanol 4.70 % y ácido fosfórico 8.50 % en agua bidestilada.
- Standard de albúmina bovina sérica (BSA; Sigma Co. USA) 1 mg/mL en agua bidestilada.

#### *Procedimiento*

- Se colocó en un tubo de vidrio una alícuota apropiada de BSA (1 mg/mL), o de muestra, completándola a 100  $\mu\text{L}$  con agua bidestilada.
- Se agregó 5 mL de reactivo de color, se mezcló y luego de incubar 2 minutos a temperatura ambiente para que se forme el complejo proteína-colorante, se leyó la D.O. a 595 nm contra blanco de reactivos en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).



## 7.2. Método de Lowry

### *Fundamento*

Se basa en el desarrollo de un cromóforo de color azul-violáceo que detecta grupos aromáticos derivados de los aminoácidos con el reactivo de Folin en medio fuertemente alcalino (Lowry et al., 1951). Se utilizó una adaptación (en versión microtécnica) que asegura la completa destrucción de las estructuras celulares antes de proceder a la colorimetría (McAteer y Douglas, 1979).

### *Reactivos*

- Solución fisiológica o PBS para efectuar las diluciones.
- Solución “A”: se disuelven 20 gr de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  junto con 4 gr de NaOH en un litro de agua bidestilada.
- Solución “B-1”: tartrato doble de Na y K al 2.7 % (p/v) agua bidestilada.
- Solución “B-2”:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1 % (p/v) en agua bidestilada.
- Solución “C” (digestora): se mezcló 1 mL de la solución “B-1” con 98 mL de solución “A”. Luego se añadió lentamente y agitando 1 mL de la solución “B-2”.
- Reactivo de Folin: se diluyó al medio el reactivo de Folin-Cicolteau con agua bidestilada.
- Solución testigo de BSA (albúmina sérica bovina): 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  usando como diluyente NaOH 0.1 N.

### *Procedimiento*

- Se colocaron en tubos de ensayo las alícuotas correspondientes al standard de BSA (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y de muestra. Se agregó reactivo “C” en c.s.p. 3 mL (al mismo tiempo se preparó un tubo “blanco” con 3 mL de reactivo “C”).
- Se agitó e incubó 15 minutos a 37 °C.
- Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin, se agitó y se dejó reposar a temperatura

ambiente 15 minutos para el desarrollo del color.

- La D.O. se midió a 750 nm contra blanco en GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 Spectrofotometer (Sydney, Australia).

## 8. Histopatología

### *Fundamento*

Se utilizó la técnica de tinción de rutina para observación en el microscopio óptico (hematoxilina-eosina) de cortes de hígado, riñón y corteza cerebral de rata.

### *Reactivos*

- Buffer fosfato sódico 50 mM con formol ultrapuro al 10 % (Merk, Alemania).
- Bálsamo de Canadá.
- Xilol.
- Alcohol 70°, 96° y 100°.
- Hematoxilina de Harris: solución comercial diluida 1:4 en agua bidestilada.
- Eosina amarilla al 1 % en agua bidestilada.
- Parafina de alto punto de fusión.

### *Procedimiento*

Se obtuvieron muestras representativas de tejido y se las procesó para la coloración con hematoxilina-eosina según el protocolo siguiente.

- Las muestras se fijaron en buffer fosfato sódico 50 mM con formol al 10 %.
- La deshidratación se consiguió mediante inmersión sucesiva en alcoholes de graduación creciente, 70°, 96° (dos veces), 100° (dos veces). Como líquido intermediario se utilizó xilol (dos pasajes).
- Se realizaron tres baños en parafinas de alto punto de fusión (56 a 58 °C). Los bloques de parafina fueron adosados a tacos de madera.

- A partir de cada taco se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  en micrótopo Minott (UK).
- La desparafinación y rehidratación es un paso imprescindible para la coloración. Se utilizaron para esto dos baños de xilol y de alcoholes de graduación decreciente hasta concluir en agua destilada.
- La coloración se realizó aplicando la técnica de hematoxilina de Harris y eosina amarilla en solución acuosa. Los cortes se colocaron en la solución de la hematoxilina de Harris durante 3 a 5 minutos, y se sumergieron en agua corriente para producir el virado del colorante. Luego fueron colocados en la solución de eosina amarilla por 1 minuto.
- Posteriormente se procedió a la deshidratación, aclarado y montaje con bálsamo de Canadá entre porta y cubreobjeto.
- Los cortes fueron observados al microscopio óptico Nikon Eclipse E200 utilizando el software Micrometris SE Premium para obtener las imágenes.

## Estadística

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA (análisis de varianza), empleando el software de *GB-STAT Professional Statistics Program* (versión 8.0) de Dynamic Microsystems Inc. (Silver Springs, MD., USA), seguido por test de Tukey de comparación múltiple. Las curvas de ajuste por mínimos cuadrados, correlación paramétrica y la graficación científica se efectuaron mediante *Sigma Plot Scientific Graphing Software* (version 8.0) de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO. USA). En todos los casos la hipótesis nula fue rechazada para un  $p < 0.05$  ó  $0.01$  que correspondió a diferencias *significativas* o *muy significativas* ( $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*, respectivamente).

## RESULTADOS

El lote de animales tratado con el vehículo (PEG-400) no mostró diferencias con el lote control (sin inyectar) para ninguna de las determinaciones realizadas, por lo que estos datos se omitirán a fin de simplificar la interpretación de los resultados.

En las muestras de plasma se determinaron biomarcadores de química clínica que se utilizan rutinariamente en humanos. Se compararon los valores obtenidos para los grupos tratados con el grupo control a fin de evaluar posibles efectos sistémicos del tratamiento experimental.

Entre estas determinaciones se encuentran aquellas destinadas a evaluar la función hepática. Para tal fin se midió la actividad de transaminasas (TGO y TGP), niveles de bilirrubina total y directa,  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GT), fosfatasa alcalina (FAL) y albúmina. Algunos de estos datos se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Actividad de transaminasas TGO y TGP y  $\gamma$ -GT hepáticas en plasma de animales control y tratados.

Tratamientos	Transaminasas (TGO) mUI/mL	Transaminasas (TGP) mUI/mL	$\gamma$ -GT UI/L
C	5.8 $\pm$ 1.5	6.2 $\pm$ 0.96	12.9 $\pm$ 1.5
Z	6.2 $\pm$ 2.5	6.8 $\pm$ 2.2	32.4 $\pm$ 3.6**
G	8.2 $\pm$ 2.4	7.8 $\pm$ 1.7	29.1 $\pm$ 1.9**
D	12.0 $\pm$ 1.6**	9.2 $\pm$ 1.5	35.8 $\pm$ 3.3**
ZG	7.5 $\pm$ 2.1	6.8 $\pm$ 2.4	33.5 $\pm$ 3.4**
ZD	6.8 $\pm$ 1.3	6.0 $\pm$ 1.5	36.7 $\pm$ 1.5**
GD	7.2 $\pm$ 2.6	10.0 $\pm$ 2.8	36.0 $\pm$ 2.2**
ZGD	12.0 $\pm$ 2.3**	11.5 $\pm$ 1.9**	37.1 $\pm$ 2.8**

Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \*\* ( $p < 0.01$ )

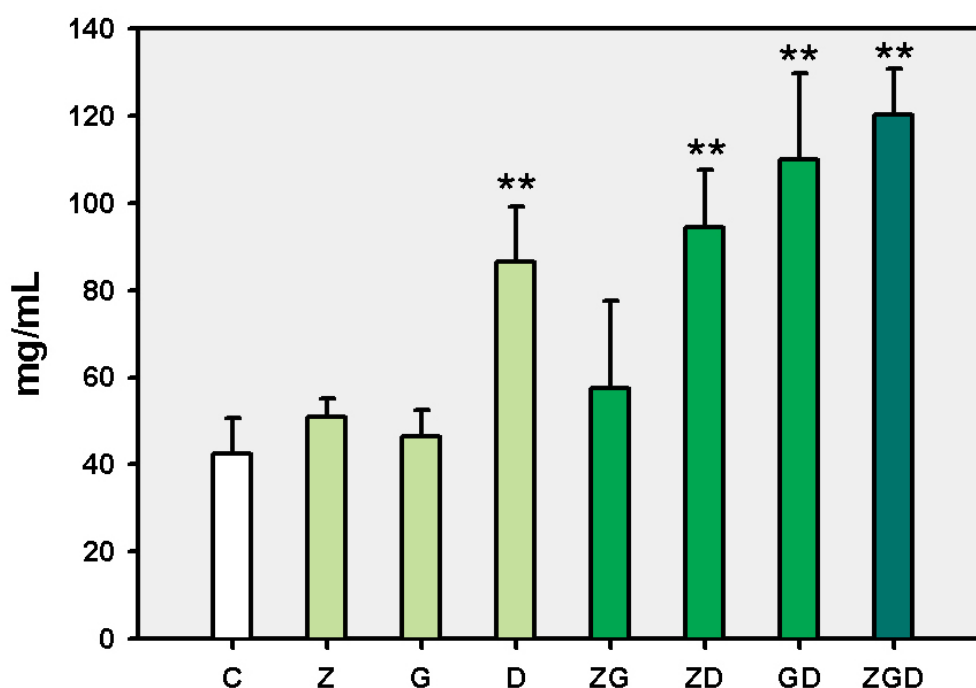
No se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de bilirrubina total y directa, albúmina y actividad de fosfatasa alcalina para ninguno de los lotes experimentales comparados con el control.

Sin embargo, se observaron diferencias significativas en las actividades de ambas transaminasas en el caso del tratamiento con la combinación de los tres plaguicidas, y una tendencia al aumento en los otros lotes experimentales. La actividad TGO también mostró aumentos significativos en el lote tratado con D. La actividad de la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GT) en plasma se incrementó en todos los lotes tratados en comparación con el lote de animales control. La actividad de esta enzima se encuentra influenciada por cualquier factor que afecte a las membranas celulares de los tejidos que la expresen (hígado, riñón, cerebro, vesículas seminales, páncreas y bazo). En el caso específico de las

alteraciones hepáticas, la actividad de  $\gamma$ -GT es indicadora confiable de lesión tóxica.

También se efectuaron determinaciones destinadas a la evaluación de la función renal mediante marcadores sistémicos tales como los niveles de creatinina plasmática, uremia y uricemia. Solo los niveles de creatinina plasmática mostraron diferencias significativas entre el control y los lotes tratados con D o alguna de sus combinaciones ZD, GD y ZGD (**Figura 7**).

**Figura 7.** Niveles de creatinina plasmática en animales control y tratados.



Los resultados se expresaron en mg de creatinina/mL de plasma como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \*\* ( $p < 0.01$ ).

Asimismo, se evaluaron en plasma algunos parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa y de la función pancreática tales como glucemia, fructosaminas, hemoglobina glicosilada (HbA1c), y las actividades de lipasa y amilasa. Trabajos previos de otros laboratorios demuestran alteraciones de la función pancreática atribuibles a

intoxicaciones agudas y crónicas con plaguicidas organofosforados (Kamath y Rajini, 2007; Rahimi y Abdollahi, 2007). Nuestros resultados señalan que la glucemia y la actividad de amilasa pancreática en plasma no sufrieron modificaciones significativas por efecto del tratamiento con los agroquímicos. Sin embargo, los niveles de HbA1c aumentaron en forma significativa en el grupo tratado con ZGD, mientras que los de fructosaminas lo hicieron en GD y ZGD. La actividad lipasa pancreática en plasma fue significativamente mayor en los lotes ZD y ZGD cuando se los comparó con el lote control (Tabla 7).

**Tabla 7.** Niveles de hemoglobina glicosilada, fructosaminas y actividad lipasa pancreática en plasmas de animales controles y tratados.

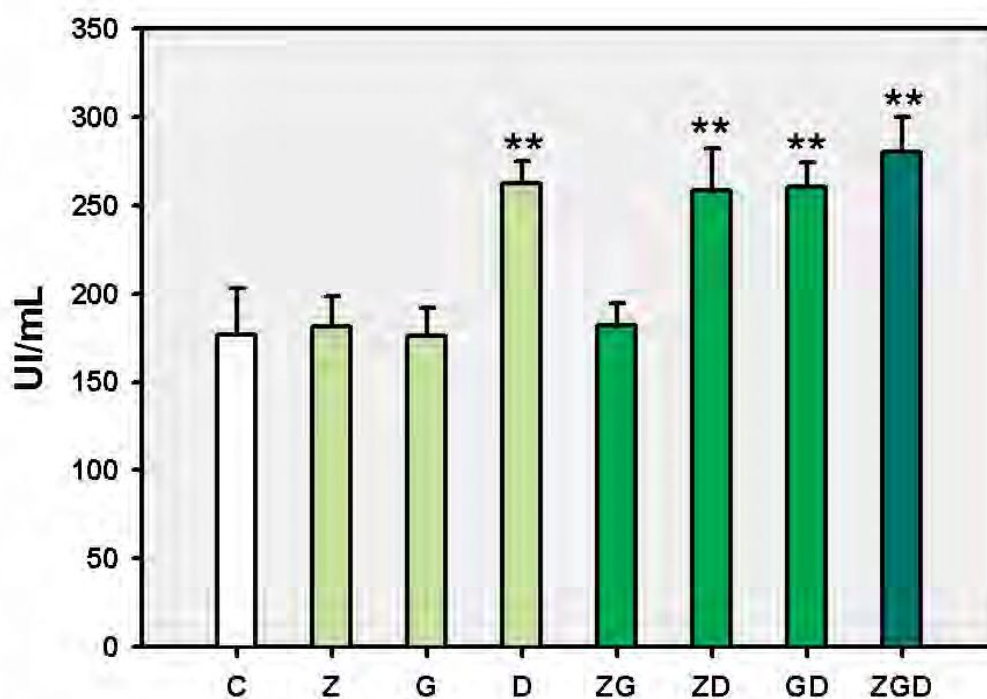
Tratamientos	Hemoglobina glicosilada (HbA1c, %)	Fructosamina mM (DMF)	Lipasa UI/L
<b>C</b>	3.6 ± 0.61	1.6 ± 0.50	39.0 ± 10.9
<b>Z</b>	5.2 ± 0.26	2.4 ± 0.26	40.5 ± 11.1
<b>G</b>	2.1 ± 0.91	0.9 ± 0.17	35.2 ± 10.6
<b>D</b>	3.6 ± 0.48	1.8 ± 0.22	73.5 ± 22.1
<b>ZG</b>	2.9 ± 0.35	2.2 ± 0.29	42.2 ± 12.1
<b>ZD</b>	2.5 ± 0.67	1.6 ± 0.59	<b>81.2 ± 21.1*</b>
<b>GD</b>	5.1 ± 0.29	<b>2.5 ± 0.36*</b>	67.2 ± 14.7
<b>ZGD</b>	<b>5.3 ± 0.59**</b>	<b>2.9 ± 0.22 **</b>	<b>88.8 ± 16.9**</b>

Los resultados se expresaron como medias ± SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes efectuados en plasma. DMF: desoximorfolinofructosa utilizado como standard. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \* (p<0.05) y \*\* (p<0.01).

También se evaluaron parámetros relacionados con el metabolismo de los lípidos plasmáticos a través de determinaciones de colesterol total, colesterol-HDL y triglicéridos. No se observaron diferencias significativas para ninguno de los grupos tratados en relación al control.

Otros biomarcadores asociados con la toxicidad de pesticidas que tienen importancia en la práctica clínica son la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH), que es la principal enzima marcadora de daño celular, y la actividad de la colinesterasa plasmática que es selectivamente inhibida por plaguicidas organofosforados (**Figura 8**).

**Figura 8.** Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en plasmas de animales controles y tratados.



Los resultados se expresaron en UI/mL de plasma como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \*\* ( $p < 0.01$ ).



La actividad LDH se incrementó en los grupos experimentales tratados con D o con mezclas en las que este insecticida estuvo presente. La actividad de colinesterasa plasmática resultó sin cambios significativos en los grupos tratados con respecto al control.

Como biomarcadores de estrés nitrativo se midieron nitratos y nitritos [NOx] que resultan ser los principales productos finales de la degradación del NO• y ONOO<sup>-</sup> (RNS) (Dawson y Dawson, 1996) en plasma, cerebro, hígado y riñón. Los resultados se muestran en forma comparativa en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Niveles plasmáticos de [NOx] (nitritos + nitratos) en plasma, cerebro, hígado y riñón de animales controles y tratados.

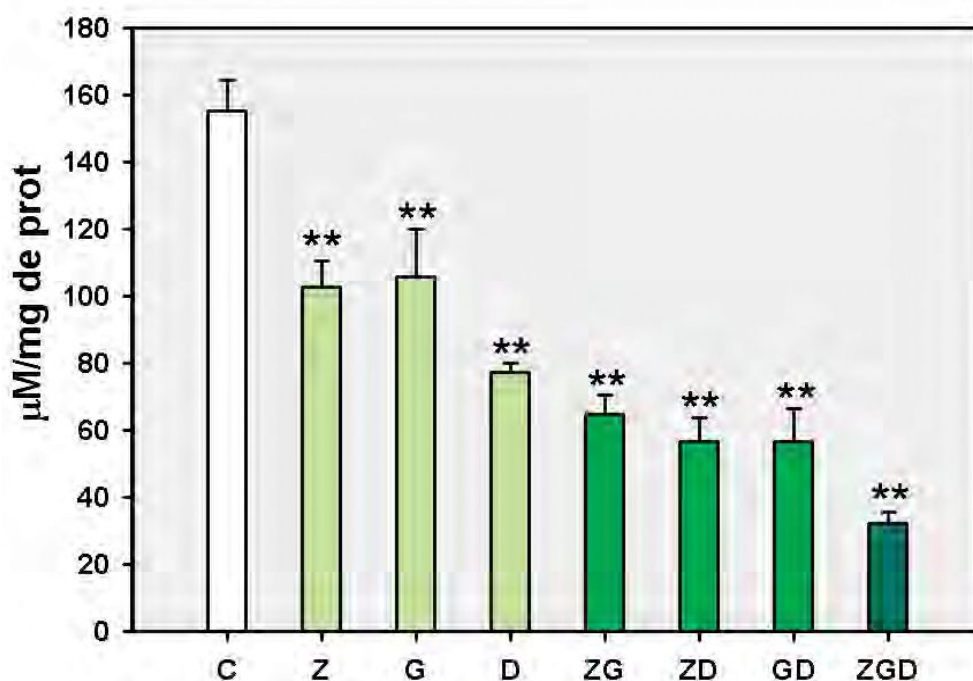
		[NOx] (μmol/mg de prot.)			
		Plasma	Cerebro	Hígado	Riñón
	<b>C</b>	0.6 ± 0.2	17.0 ± 0.9	1.6 ± 0.5	7.6 ± 0.8
	<b>Z</b>	21.1 ± 5.1**	22.2 ± 1.2**	3.2 ± 0.3	9.1 ± 0.7
	<b>G</b>	24.3 ± 4.3**	23.6 ± 2.1**	2.9 ± 0.4	7.9 ± 0.9
	<b>D</b>	22.7 ± 5.4**	25.8 ± 1.6**	4.2 ± 0.8**	12.8 ± 3.7
	<b>ZG</b>	19.3 ± 2.4**	24.5 ± 1.6**	1.9 ± 0.9	11.1 ± 2.5
	<b>ZD</b>	38.4 ± 7.9**	28.5 ± 2.8**	5.4 ± 0.2**	14.7 ± 2.1**
	<b>GD</b>	40.3 ± 5.3**	24.6 ± 0.7**	4.7 ± 1.0**	12.3 ± 1.3
	<b>ZGD</b>	51.2 ± 7.8**	31.5 ± 2.6**	7.6 ± 0.9**	17.6 ± 2.0**

Los resultados se expresaron en μmoles de nitritos/mg de proteínas como las medias ± SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \*\* (p<0.01).

El plasma y el homogenato de cerebro mostraron una producción significativamente mayor de RNS en todos los grupos tratados, mientras que en el hígado las diferencias más importantes se encontraron en aquellos grupos tratados con dimetoato (D) o con combinaciones en donde D estuvo presente. En el riñón los grupos con [NOx] significativamente elevados respecto al control fueron ZD y ZGD.

La capacidad reductora total del plasma se puede medir a través del ensayo FRAP descrito en la sección de materiales y métodos. Se trata de un evaluador del balance entre las especies oxidantes y reductoras presentes en la muestra. Medimos este biomarcador en homogenatos de hígado, riñón y cerebro (datos no mostrados) y obtuvimos resultados similares a los de la **Figura 9** para el plasma.

**Figura 9.** Capacidad antioxidante total del plasma (ensayo FRAP) en animales controles y tratados.



Los resultados se expresaron en  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína como las medias  $\pm$  SD (desví standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \*\* ( $p < 0.01$ ).

Se puso claramente en evidencia una pérdida de la capacidad antioxidante plasmática en todos los grupos tratados. Esta situación empeoró cuando los plaguicidas se administraron de a pares y aún más cuando se mezclaron los tres (ZGD).

El  $\alpha$ -tocoferol es el principal antioxidante liposoluble y sus niveles en plasma, hígado y cerebro indican el estado del sistema de defensa antioxidante dirigido hacia los propagadores de cadena de naturaleza hidrofóbica que afectan mayormente a biomembranas ricas en fosfolípidos con acilos insaturados. La **Tabla 9** muestra los resultados que obtuvimos al determinar este marcador en plasma y homogenatos tisulares.

**Tabla 9.** Niveles de  $\alpha$ -tocoferol en plasma, cerebro e hígado de animales controles y tratados.

$\alpha$ -Tocoferol (nmol/mg de prot.)				
		Plasma	Cerebro	Hígado
	<b>C</b>	2.9 $\pm$ 0.66	0.34 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.04
	<b>Z</b>	3.2 $\pm$ 0.10	<b>0.25 <math>\pm</math> 0.03**</b>	<b>0.51 <math>\pm</math> 0.07 **</b>
	<b>G</b>	2.7 $\pm$ 0.46	<b>0.24 <math>\pm</math> 0.02**</b>	<b>0.48 <math>\pm</math> 0.08 **</b>
	<b>D</b>	2.5 $\pm$ 0.91	<b>0.26 <math>\pm</math> 0.02**</b>	<b>0.40 <math>\pm</math> 0.05 **</b>
	<b>ZG</b>	3.1 $\pm$ 0.33	<b>0.22 <math>\pm</math> 0.02**</b>	<b>0.39 <math>\pm</math> 0.07 **</b>
	<b>ZD</b>	2.7 $\pm$ 0.18	<b>0.19 <math>\pm</math> 0.01**</b>	<b>0.39 <math>\pm</math> 0.06 **</b>
	<b>GD</b>	2.7 $\pm$ 0.40	<b>0.18 <math>\pm</math> 0.01**</b>	<b>0.34 <math>\pm</math> 0.07 **</b>
	<b>ZGD</b>	<b>1.5 <math>\pm</math> 0.84*</b>	<b>0.14 <math>\pm</math> 0.02**</b>	<b>0.29 <math>\pm</math> 0.03 **</b>

Los resultados se expresaron en nmol/mg de proteína para los diferentes tejidos como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \* (p<0.05) y \*\* (p<0.01).

El tratamiento provocó una disminución altamente significativa en los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en hígado y en cerebro comparados con los del control, que resultó aun más notable en el caso de los lotes tratados con los plaguicidas en combinación. En cuanto al plasma solo se observó una disminución significativa en el grupo tratado con los tres tóxicos en combinación.

A diferencia del  $\alpha$ -tocoferol, el glutatión reducido (GSH) es el principal antioxidante del compartimiento hidrosoluble. Se determinó glutatión total por la técnica espectrofotométrica cinética en plasma, cerebro, hígado y riñón. Los resultados se muestran en la **Tabla 10**.

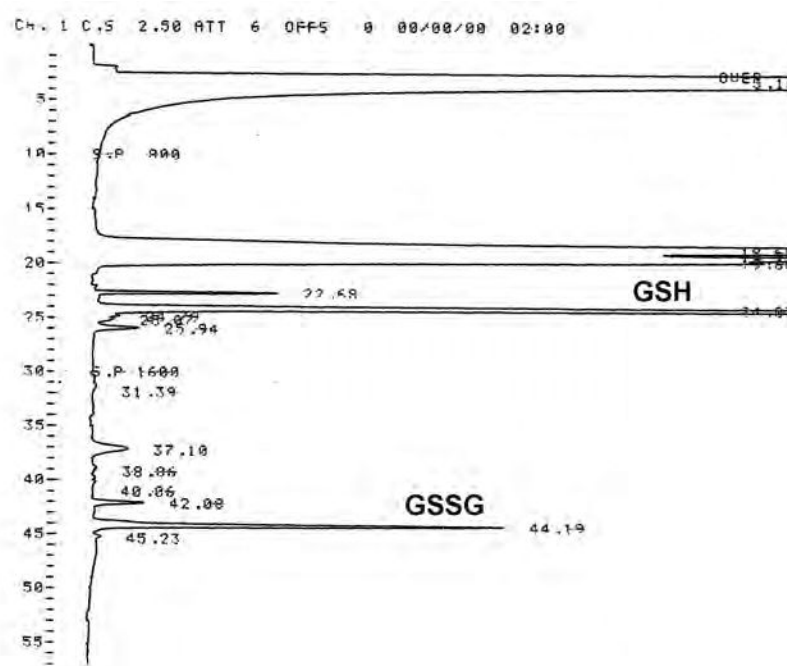
**Tabla 10.** Niveles de glutatión total en plasma, cerebro, hígado y riñón de animales controles y tratados.

Glutatión total (nmol/mg de prot.)					
		Plasma	Cerebro	Hígado	Riñón
	<b>C</b>	10.4 ± 0.98	7.8 ± 0.71	8.6 ± 1.40	23.6 ± 1.04
	<b>Z</b>	13.1 ± 0.86	11.2 ± 1.16	9.9 ± 0.93	21.8 ± 6.01
	<b>G</b>	17.4 ± 2.76**	10.6 ± 1.58	9.6 ± 1.69	22.1 ± 7.36
	<b>D</b>	18.1 ± 2.82**	11.6 ± 1.35	10.4 ± 1.84	21.9 ± 13.94
	<b>ZG</b>	15.7 ± 0.20**	7.7 ± 2.22	9.0 ± 2.20	25.8 ± 3.82
	<b>ZD</b>	18.4 ± 1.44**	7.9 ± 0.89	10.0 ± 1.40	31.6 ± 3.64
	<b>GD</b>	17.9 ± 0.93**	6.6 ± 1.66	10.5 ± 0.69	31.7 ± 7.89
	<b>ZGD</b>	19.7 ± 1.88**	5.9 ± 1.74	11.8 ± 1.31	36.2 ± 3.53

Los resultados se expresaron en nmol/mg de proteína para los diferentes tejidos como las medias ± SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \* (p<0.05) y \*\* (p<0.01).

Se observó un aumento significativo en los niveles de glutatión total en el plasma para todos los grupos tratados excepto Z. No se observaron diferencias en hígado, cerebro y riñón. Para definir cuál es el origen de esas diferencias se realizó la cuantificación de ambas especies de glutatión (oxidada y reducida) mediante la técnica de HPLC mencionada en la sección de materiales y métodos. Esta metodología, aunque muy laboriosa, es considerada internacionalmente como de referencia. El tipo de cromatogramas que se obtienen se puede ver en la **Figura 10**.

**Figura 10.** Cromatograma representativo obtenido por la técnica de HPLC para la determinación simultánea de glutatión reducido y oxidado en plasma.



Se indica como GSH a la señal correspondiente al glutatión reducido con tiempo de retención (Tr) de 24.07 min, mientras que con GSSG se indica la señal correspondiente al glutatión oxidado con Tr 44.19.

Esta técnica permite cuantificar de manera confiable ambas especies de glutatión en la misma corrida cromatográfica. De este modo fue como se obtuvieron los resultados mostrados en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** Niveles de GSH, GSSG, cociente GSH/GSSG y glutatión total en plasma de animales controles y tratados.

		GSH ( $\mu\text{M}$ )	GSSG ( $\mu\text{M}$ )	GSH/GSSG	GSH+GSSG ( $\mu\text{M}$ )
	<b>C</b>	1129.1 $\pm$ 59.9	128.1 $\pm$ 15.5	8.92 $\pm$ 1.3	1257.2 $\pm$ 62.5
	<b>Z</b>	2674.8 $\pm$ 194.5**	199.8 $\pm$ 28.0*	13.5 $\pm$ 1.8**	2874.7 $\pm$ 203**
	<b>G</b>	2723.2 $\pm$ 484.7**	233.8 $\pm$ 33.7**	11.7 $\pm$ 1.6	2957.0 $\pm$ 506**
	<b>D</b>	2723.2 $\pm$ 285.8**	229.3 $\pm$ 26.0**	11.7 $\pm$ 1.1	2913.4 $\pm$ 302**
	<b>ZG</b>	3478.9 $\pm$ 474.4**	264.1 $\pm$ 33.2**	13.2 $\pm$ 1.2**	3742.9 $\pm$ 499**
	<b>ZD</b>	3360.6 $\pm$ 363.7**	270.2 $\pm$ 26.7**	12.5 $\pm$ 1.4**	3630.8 $\pm$ 376**
	<b>GD</b>	3546.5 $\pm$ 148.2**	284.1 $\pm$ 30.7**	12.6 $\pm$ 1.6**	3830.6 $\pm$ 147**
	<b>ZGD</b>	3646.1 $\pm$ 229.6**	264.6 $\pm$ 13.0**	13.8 $\pm$ 1.6**	3910.8 $\pm$ 218**

Los resultados se expresaron en concentración  $\mu\text{M}$  para el plasma como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \*\* ( $p < 0.01$ ).

Estos resultados indican que en el plasma se incrementaron los niveles tanto de glutatión reducido como los de glutatión oxidado, y que el cociente entre ambas especies fue significativamente mayor en los grupos tratados con Z o con los plaguicidas en combinación. Por consiguiente, el aumento de glutatión reducido fue proporcionalmente mayor al de la especie oxidada. Los resultados correspondientes a homogenato de cerebro se muestran en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Niveles de GSH, GSSG, cociente GSH/GSSG y glutatión total en cerebro de animales controles y tratados.

		<b>GSH</b> (nmol/mg de proteínas)	<b>GSSG</b> (nmol/mg de proteínas)	<b>GSH/GSSG</b>	<b>GSH+GSSG</b> (nmol/mg de proteínas)
	<b>C</b>	12.7 ± 2.1	0.02 ± 0.004	685.0 ± 71.1	12.7 ± 2.1
	<b>Z</b>	15.3 ± 2.8	0.03 ± 0.005	532.9 ± 110.7	15.3 ± 2.8
	<b>G</b>	15.8 ± 2.8	0.04 ± 0.01	490.6 ± 170.7	15.8 ± 2.8
	<b>D</b>	15.2 ± 1.9	0.03 ± 0.005	485.2 ± 46.6	15.3 ± 1.9
	<b>ZG</b>	15.3 ± 2.4	0.03 ± 0.008	466.0 ± 36.1	15.3 ± 2.4
	<b>ZD</b>	16.0 ± 3.1	0.04 ± 0.01	<b>424.7 ± 108.0*</b>	16.0 ± 3.1
	<b>GD</b>	17.9 ± 5.2	0.04 ± 0.008	<b>450.9 ± 37.2*</b>	17.9 ± 5.2
	<b>ZGD</b>	14.9 ± 2.5	<b>0.05 ± 0.008**</b>	<b>326.4 ± 80.7**</b>	14.9 ± 2.5

Los resultados se expresaron en nmol/mg de proteínas para el homogenato de cerebro como las medias ± SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \* (p<0.05) y \*\* (p<0.01).

Observamos que aunque no se detectaron diferencias significativas en los niveles de GSH ni en los niveles de glutatión total, aumentó significativamente la concentración de GSSG en el caso del grupo tratado con la mezcla de los tres plaguicidas. El cociente GSH/GSSG mostró una disminución significativa en los grupos tratados con ZD, GD y ZGD, lo que indicaría un aumento de la proporción de la especie oxidada de glutatión sobre la reducida. El cociente GSH/GSSG se comporta en este tejido en forma opuesta a como lo hace en el plasma.

Teniendo en cuenta que el sistema antioxidante no enzimático se ve afectado en forma considerable por la administración de plaguicidas en dosis tan pequeñas, decidimos evaluar el efecto del tratamiento sobre la actividad de las enzimas antioxidantes. Se

midieron las actividades de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST) en homogenatos de hígado, cerebro y riñón. Los resultados se muestran en las **Tablas 13, 14 y 15** respectivamente.

**Tabla 13.** Actividades de enzimas del sistema de defensa antioxidante en homogenato de hígado de animales controles y tratados.

		SOD	CAT	GPx	GR	GST
	<b>C</b>	0.60 ± 0.08	8.60 ± 0.60	0.81 ± 0.07	82.7 ± 7.8	0.64 ± 0.08
	<b>Z</b>	<b>0.42 ± 0.06*</b>	9.60 ± 0.60	0.78 ± 0.05	63.2 ± 8.1	0.60 ± 0.07
	<b>G</b>	<b>0.30 ± 0.09**</b>	10.2 ± 1.60	0.84 ± 0.08	67.1 ± 14.1	0.60 ± 0.10
	<b>D</b>	0.46 ± 0.10	9.25 ± 0.70	0.81 ± 0.06	<b>56.2 ± 4.2**</b>	0.70 ± 0.05
	<b>ZG</b>	<b>0.42 ± 0.07*</b>	8.90 ± 0.60	0.81 ± 0.07	<b>60.2 ± 5.1*</b>	0.60 ± 0.07
	<b>ZD</b>	<b>0.42 ± 0.01*</b>	9.20 ± 0.10	0.81 ± 0.05	<b>59.6 ± 12.3*</b>	<b>0.50 ± 0.07*</b>
	<b>GD</b>	<b>0.39 ± 0.06**</b>	9.50 ± 0.40	0.80 ± 0.05	<b>54.3 ± 10.6**</b>	0.54 ± 0.04
	<b>ZGD</b>	<b>0.35 ± 0.04 **</b>	7.80 ± 0.90	0.80 ± 0.05	<b>53.4 ± 4.7**</b>	0.54 ± 0.09

Los resultados se expresaron en UI/mg prot. min para la actividad de SOD; min<sup>-1</sup>/mg prot. para la actividad de CAT; μmoles NADPH oxidado/mg prot. min para GPx; nmol producto/mg de prot. min para GR y μmoles de producto/mg de prot. min para GST. Las medidas se llevaron a cabo en homogenato de hígado y se tabularon como las medias ± SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \* (p<0.05) y \*\* (p<0.01).



**Tabla 14.** Actividades de enzimas del sistema de defensa antioxidante en homogenato de cerebro de animales controles y tratados.

	SOD	CAT	GPx	GR	GST
<b>C</b>	0.69 ± 0.05	4.3 ± 0.30	0.73 ± 0.08	24.2 ± 6.5	0.060 ± 0.19
<b>Z</b>	<b>0.42 ± 0.15**</b>	<b>10.6 ± 1.20**</b>	0.78 ± 0.04	25.5 ± 3.2	0.070 ± 0.20
<b>G</b>	<b>0.30 ± 0.01**</b>	<b>11.5 ± 1.70**</b>	0.78 ± 0.07	25.4 ± 1.5	0.060 ± 0.10
<b>D</b>	<b>0.44 ± 0.17**</b>	<b>10.3 ± 0.75**</b>	0.72 ± 0.04	28.3 ± 3.7	0.060 ± 0.12
<b>ZG</b>	<b>0.34 ± 0.06**</b>	<b>7.8 ± 1.10**</b>	0.73 ± 0.06	25.7 ± 2.9	0.070 ± 0.12
<b>ZD</b>	<b>0.31 ± 0.03**</b>	<b>7.3 ± 0.30**</b>	0.73 ± 0.07	31.9 ± 4.9	0.060 ± 0.06
<b>GD</b>	<b>0.37 ± 0.05**</b>	<b>7.6 ± 0.20**</b>	0.75 ± 0.09	26.9 ± 2.8	0.054 ± 0.11
<b>ZGD</b>	<b>0.25 ± 0.02**</b>	3.4 ± 0.20	0.70 ± 0.06	27.6 ± 2.9	0.050 ± 0.03

Los resultados se expresaron en UI/mg prot.min para la actividad de SOD; min<sup>-1</sup>/mg prot. para la actividad de CAT; µmoles NADPH oxidado/mg prot.min para GPx; nmol producto/mg de prot.min para GR y µmoles de producto/mg de prot.min para GST. Las medidas se llevaron a cabo en homogenato de cerebro y se tabularon como las medias ± SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \* (p<0.05) y \*\* (p<0.01).

**Tabla 15.** Actividades de enzimas del sistema de defensa antioxidante en homogenato de riñón de animales controles y tratados.

	SOD	CAT	GPx	GR	GST
<b>C</b>	0.43 ± 0.01	5.23 ± 0.86	1.15 ± 0.05	211.6 ± 15.9	0.11 ± 0.02
<b>Z</b>	0.51 ± 0.15	<b>7.92 ± 0.47**</b>	1.24 ± 0.14	256.1 ± 28.3	0.13 ± 0.01
<b>G</b>	0.70 ± 0.10	6.23 ± 0.95	1.15 ± 0.17	228.2 ± 23.1	0.12 ± 0.02
<b>D</b>	0.44 ± 0.10	<b>6.95 ± 0.82*</b>	1.26 ± 0.13	227.5 ± 19.6	0.14 ± 0.01
<b>ZG</b>	0.65 ± 0.24	6.57 ± 0.40	1.16 ± 0.13	211.8 ± 18.2	0.12 ± 0.03
<b>ZD</b>	0.36 ± 0.17	5.87 ± 0.76	1.15 ± 0.12	214.1 ± 7.7	0.12 ± 0.01
<b>GD</b>	0.29 ± 0.10	<b>7.68 ± 0.60**</b>	1.12 ± 0.10	198.7 ± 3.2	0.10 ± 0.02
<b>ZGD</b>	0.30 ± 0.15	<b>7.19 ± 0.81*</b>	1.05 ± 0.11	205.5 ± 13.2	0.10 ± 0.05

Los resultados se expresaron en UI/mg prot.min para la actividad de SOD; min<sup>-1</sup>/mg prot. para la actividad de CAT; µmoles NADPH oxidado/mg prot.min para GPx; nmol producto/mg de prot.min para GR y µmoles de producto/mg de prot.min para GST. Las medidas se llevaron a cabo en homogenato de riñón y se tabularon como las medias ± SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \* (p<0.05) y \*\* (p<0.01).

En todos los tejidos estudiados se observó una disminución significativa de la actividad de SOD en los lotes tratados con las mezclas de agroquímicos si se las compara con el control. Estas diferencias no alcanzaron a ser significativas en el caso del riñón. Por otro lado, tanto en el cerebro como en el hígado, también los tratamientos con monodrogas provocaron disminuciones significativas en la actividad de esta enzima.

La actividad de catalasa (CAT) se observó aumentada en cerebro y riñón. En este último órgano el aumento fue significativamente más importante en los grupos tratados con Z, D y combinaciones de plaguicidas. Sin embargo, específicamente en el cerebro la actividad de CAT aumentó 1.5 veces en los grupos tratados con monodrogas, 0.75 veces

para ZG, ZD y GD, y no se diferenció del control en el caso del grupo tratado con los tres agroquímicos en combinación. La glutatión reductasa (GR) mostró una disminución significativa de su actividad en el hígado para los lotes tratados con dimetoato solo o con combinaciones de los tóxicos.

Respecto de la actividad GPx y GST, no se observaron cambios significativos en ninguno de los tejidos estudiados para ninguno de los grupos experimentales.

Luego de efectuar las mediciones de biomarcadores de estrés oxidativo y los relacionados al sistema de defensa antioxidante, se volvió evidente la presencia de un desbalance entre ambos en favor de la generación de pro-oxidantes y por tanto surgió la necesidad de analizar los eventuales daños que esta alteración del equilibrio redox podría haber causado sobre la integridad de las biomacromoléculas. Por esta razón se midieron TBARS como biomarcadores de daño oxidativo a lípidos en plasma y homogenatos de hígado, cerebro y riñón. Los resultados (expresados como nmoles de malondialdehído; MDA/mg de proteínas) se presentan a continuación en la **Tabla 16**.

**Tabla 16.** Niveles de TBARS en plasma, cerebro, hígado y riñón de animales controles y tratados.

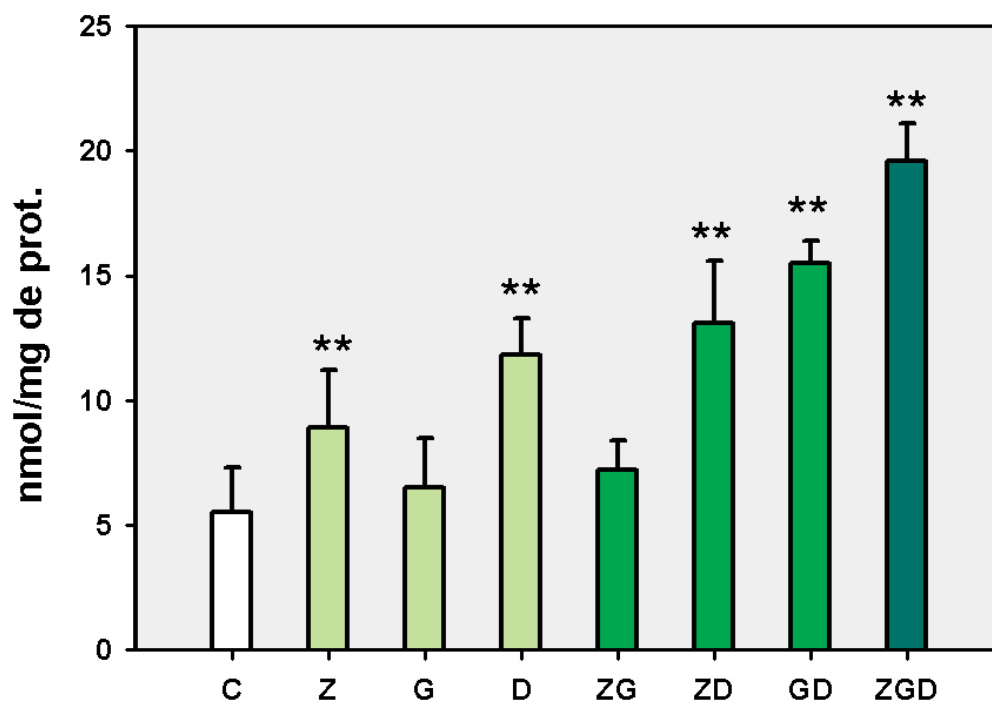
TBARS (nmol MDA/mg de prot.)					
		Plasma	Cerebro	Hígado	Riñón
	<b>C</b>	2.1 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.0	1.4 ± 0.1
	<b>Z</b>	3.2 ± 0.2	1.9 ± 0.1**	1.0 ± 0.0	2.9 ± 0.2**
	<b>G</b>	3.9 ± 0.2**	2.2 ± 0.2**	1.4 ± 0.1**	2.9 ± 0.6**
	<b>D</b>	5.9 ± 0.3**	3.0 ± 0.3**	1.1 ± 0.1	3.4 ± 0.3**
	<b>ZG</b>	6.3 ± 0.2**	2.3 ± 0.1**	1.8 ± 0.4**	3.1 ± 0.3**
	<b>ZD</b>	7.4 ± 0.4**	3.1 ± 0.2**	2.0 ± 0.3**	3.8 ± 0.5**
	<b>GD</b>	8.1 ± 1.2**	2.9 ± 0.2**	2.4 ± 0.2**	3.8 ± 0.6**
	<b>ZGD</b>	11.6 ± 0.6**	4.2 ± 0.4**	3.2 ± 0.5**	6.4 ± 0.8**

Los resultados se expresaron en nmol de MDA/mg de proteínas para los diferentes tejidos como las medias ± SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \*\* ( $p < 0.01$ ).

El aumento en los niveles de MDA en los grupos tratados fue significativo para todos los tejidos estudiados y resultó ser mayor al 50 % del valor observado en el lote control para el caso de los grupos tratados con monodrogas. Si se comparan estos últimos, con los que recibieron dos, o los tres agroquímicos, se encuentra que los porcentajes de cambio estuvieron en el orden del 50 % y del 150 % respectivamente.

Los carbonilos proteicos (PCOs) se determinaron como biomarcadores del daño oxidativo a proteínas. Los PCOs se midieron en el plasma como tejido representativo del impacto sistémico del OS sobre las proteínas de varios órganos, aparatos y sistemas (Figura 11).

**Figura 11.** Niveles de carbonilos proteicos (PCOs) en plasma de animales controles y tratados.



Los resultados se expresaron en nmol/mg de proteínas en plasma como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \*\* ( $p < 0.01$ ).

La oxidación de proteínas aumentó significativamente en todos los grupos experimentales excepto en el grupo tratado con G y ZG, en donde los aumentos no alcanzaron la significación estadística. La oxidación de proteínas resultó más severa en el caso de los grupos tratados con mezclas de plaguicidas. En el grupo ZGD los carbonilos en proteínas aumentaron 2.5 veces con respecto al control.

Considerando en conjunto los resultados hasta aquí mostrados, resulta evidente que el estrés oxidativo fue lo suficientemente severo como para provocar daño a biomacromoléculas como los lípidos y las proteínas.

Se evaluó la composición de ácidos grasos de lípidos polares y neutros en el

plasma, y de lípidos totales en hígado y cerebro, buscando investigar si la situación de estrés oxidativo era suficientemente intensa como para reflejarse en estos datos composicionales. A pesar de lo supuesto, no encontramos diferencias estadísticamente significativas respecto del control en ninguno de los tejidos estudiados (datos no mostrados).

Como siguiente objetivo nos propusimos evaluar si los efectos de los tratamientos con plaguicidas observados a las cinco semanas fueron debidos: al estrés oxidativo acumulativo, o al resultado de un equilibrio entre el daño generado y la inducción del sistema de defensa endógeno. Con este fin, se repitió el mismo experimento sacrificando a los animales a las dos semanas (tiempo I) y a las 5 semanas (tiempo II) de tratamiento.

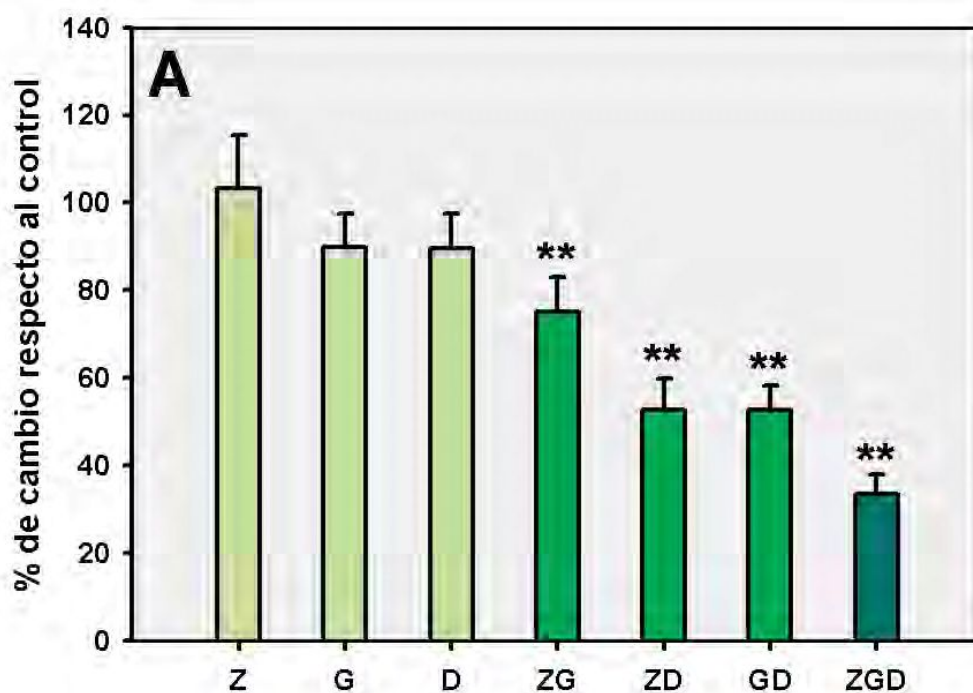
Tal como se hizo anteriormente, se determinaron parámetros vinculados al sistema de defensa antioxidante y al daño oxidativo a macromoléculas. La actividad de las enzimas antioxidantes glutatión-dependientes y de CAT mostraron una mayor actividad (cercana al 20 %) a las dos semanas de tratamiento respecto a la que se observó hacia el final del período de intoxicación, mientras que la SOD mostró un comportamiento más ambiguo que no nos permitió sacar conclusiones definitivas. En cuanto a los peróxidos lipídicos, se observó que eran también mayores a las dos semanas de tratamiento. Los resultados de la determinación de TBARS al tiempo II fueron similares (en relación a las diferencias con respecto al control) a los ya mostrados.

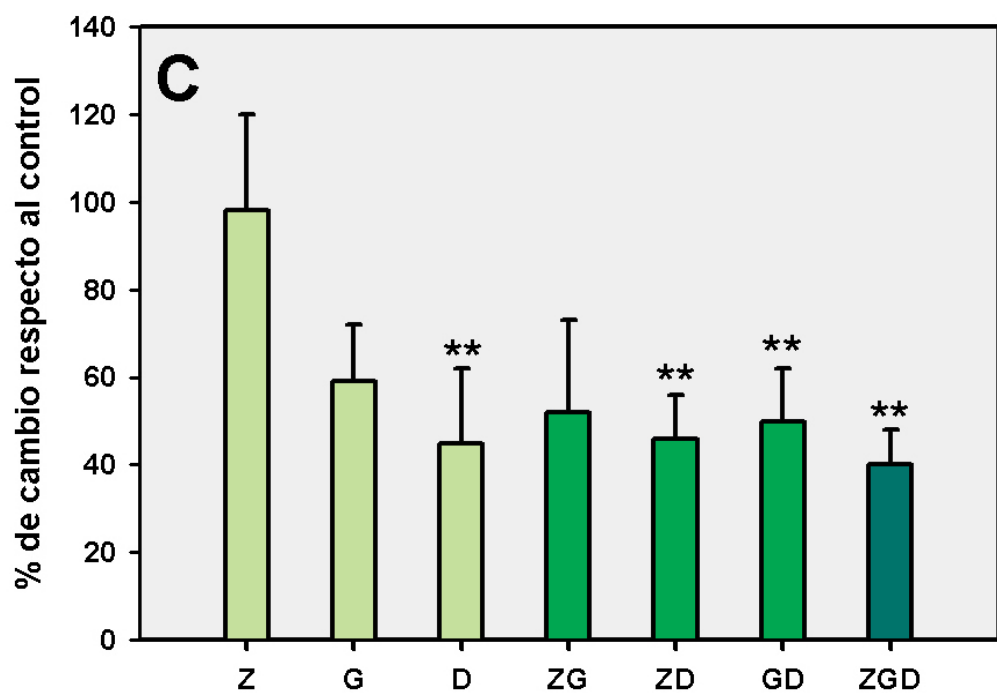
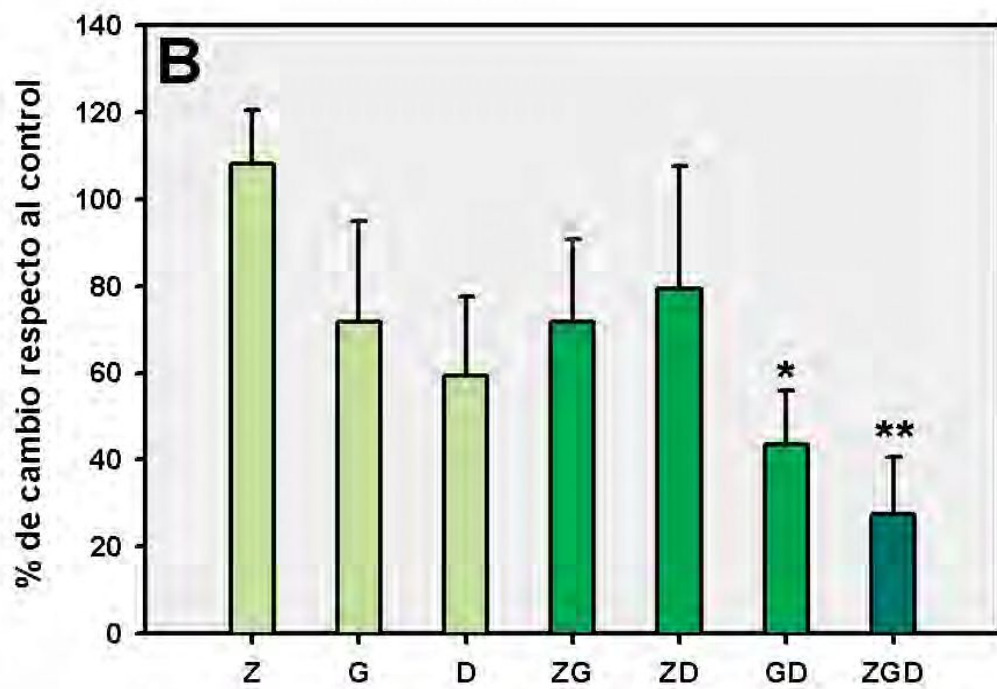
Teniendo en cuenta las alteraciones observadas para el balance redox en estos tejidos, surgió la inquietud de evaluar si el estrés y el daño oxidativo provocados por la administración de agroquímicos resultaban lo suficientemente severos como para desencadenar eventos de muerte celular. Según reseñamos en la parte introductoria, la mitocondria orquesta los procesos desencadenantes de la muerte celular por apoptosis. De modo que la integridad de sus membranas es un evaluador confiable de su funcionalidad

y del papel desempeñado, al menos en la ruta de muerte celular redox-dependiente.

Por esta razón, medimos la integridad de la membrana interna (MMI) en mitocondrias extraídas de hígado (**Figura 12 A**) y de dos regiones del cerebro. Se evaluaron específicamente sustancia nigra (SN) y corteza cerebral (CC) inmediatamente adyacente a la SN (**Figuras 12 B y C** respectivamente). Los resultados se expresaron como porcentajes de MMI intactas con respecto al control.

**Figura 12.** Integridad de membrana interna (MMI) en mitocondrias de hígado (**A**), sustancia nigra (**B**) y corteza cerebral (**C**) de animales controles y tratados.





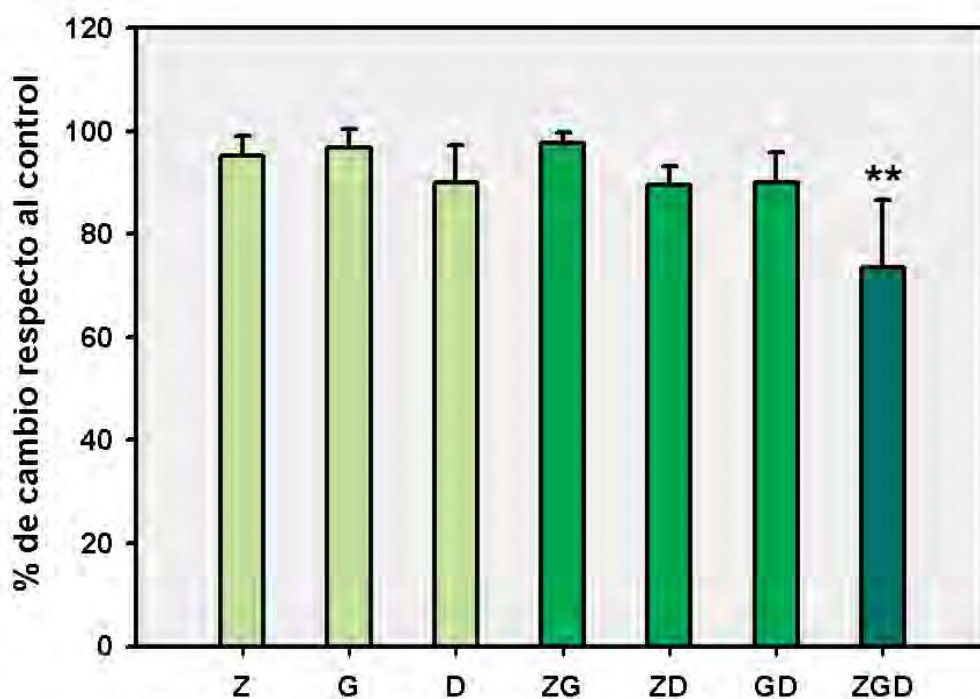
Los resultados se expresaron como en porcentaje de cambio con respecto al control (no mostrado) en términos de medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ).



Observamos que el tratamiento con agroquímicos provocó una disminución del potencial de MMI expresado como porcentaje de membranas intactas (la integridad de la membrana tiene relación directa con el potencial), siendo esta disminución significativa en los grupos tratados con las combinaciones de drogas. Estas mediciones sugieren que, en especial en el hígado, podría darse una aditividad de efectos; sin embargo, todos los tejidos estudiados fueron afectados.

La integridad de la MME también se expresó como porcentaje de MME intactas respecto al control (**Figura 13**). Solo se vio alterada significativamente en el grupo tratado con los tres plaguicidas (tratamiento más agresivo) en las mitocondrias de la sustancia nigra que es el tejido más sensible de entre los estudiados.

**Figura 13.** Integridad de membrana externa (MME) en mitocondrias de sustancia nigra de animales controles y tratados.



Los resultados se expresaron en porcentaje de cambio respecto al control como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas respecto del control están indicados con \*\* ( $p < 0.01$ ).

La liberación de proteínas mitocondriales como el citocromo c parece ser el principal evento desencadenante de la cascada pro-apoptótica. El citocromo c (Cyto c) está asociado en la MMI al fosfolípido aniónico cardiolipina (CL). De modo que supusimos que los niveles de CL se podrían correlacionar con los niveles de Cyto c. Teniendo en cuenta que en todos los tejidos estudiados está alterada la permeabilidad de la MMI pero no así la MME, medimos el contenido mitocondrial de cardiolipina (**Tabla 17**).

**Tabla 17.** Niveles de cardiolipina (CL) en mitocondrias de hígado, corteza cerebral y sustancia nigra de animales controles y tratados.

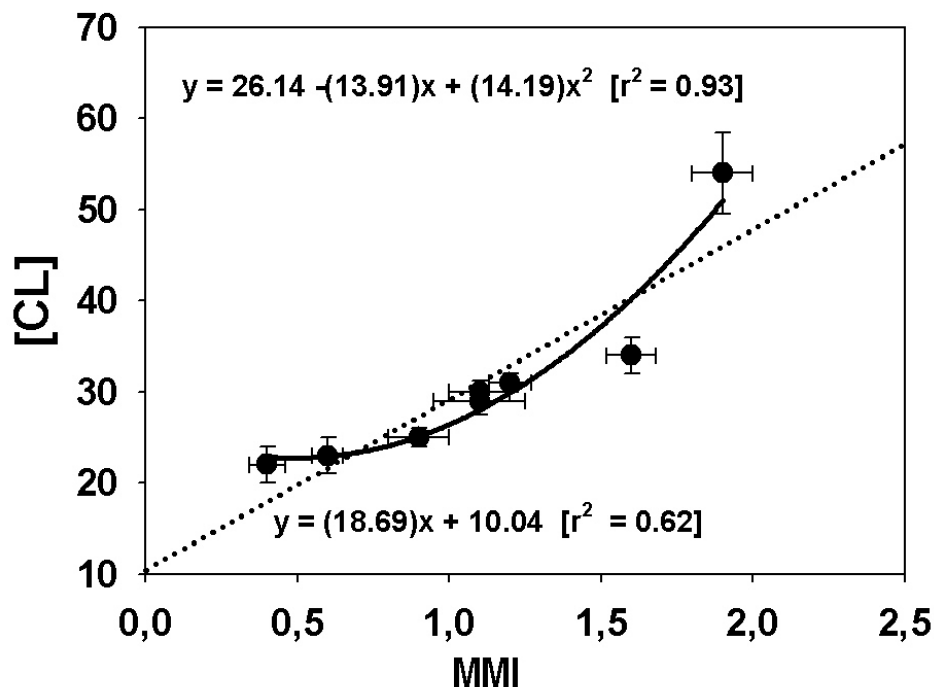
CARDIOLIPINA ( $\mu\text{mol CL/mg de PM}$ )				
		Hígado	Sustancia Nigra	Corteza
	<b>C</b>	39.3 $\pm$ 2.0	54.4 $\pm$ 10.8	87.9 $\pm$ 23.8
	<b>Z</b>	29.5 $\pm$ 4.2	31.0 $\pm$ 4.8**	46.8 $\pm$ 7.0**
	<b>G</b>	29.6 $\pm$ 5.0	29.1 $\pm$ 3.6**	36.6 $\pm$ 1.9**
	<b>D</b>	34.4 $\pm$ 5.7	34.3 $\pm$ 2.3**	43.5 $\pm$ 0.8**
	<b>ZG</b>	27.2 $\pm$ 2.2**	30.6 $\pm$ 3.7**	38.9 $\pm$ 3.7**
	<b>ZD</b>	24.5 $\pm$ 3.5**	24.6 $\pm$ 3.5**	32.1 $\pm$ 11.6**
	<b>GD</b>	29.9 $\pm$ 0.9**	22.7 $\pm$ 5.2**	29.0 $\pm$ 7.6**
	<b>ZGD</b>	24.3 $\pm$ 3.6**	22.1 $\pm$ 3.8**	32.9 $\pm$ 7.8**

Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de cardiolipina/mg de proteína mitocondrial (PM) para los diferentes tejidos como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \*\* ( $p < 0.01$ ).

Los niveles de cardiolipina en mitocondrias de hígado disminuyeron significativamente (alrededor de un 30 %) en los grupos de animales tratados con las

combinaciones de agrotóxicos. En cambio, en las mitocondrias de ambas regiones cerebrales los niveles de cardiolipina llegaron a ser un 60 % menores que los encontrados en el grupo control, esta disminución se observó en todos los lotes experimentales, aún en los tratados con monodrogas. Se evidenció entonces una clara dependencia entre la disminución de los niveles de cardiolipina mitocondrial y la disminución en el potencial de la membrana mitocondrial interna que resultó seguir un comportamiento casi lineal o directamente proporcional (**Figura 14**). Sin embargo, el análisis estadístico de esta dependencia mostró que se ajustó mejor a una función polinomial cuadrática con un ( $r^2=0.93$ ), que a una lineal ( $r^2=0.62$ ).

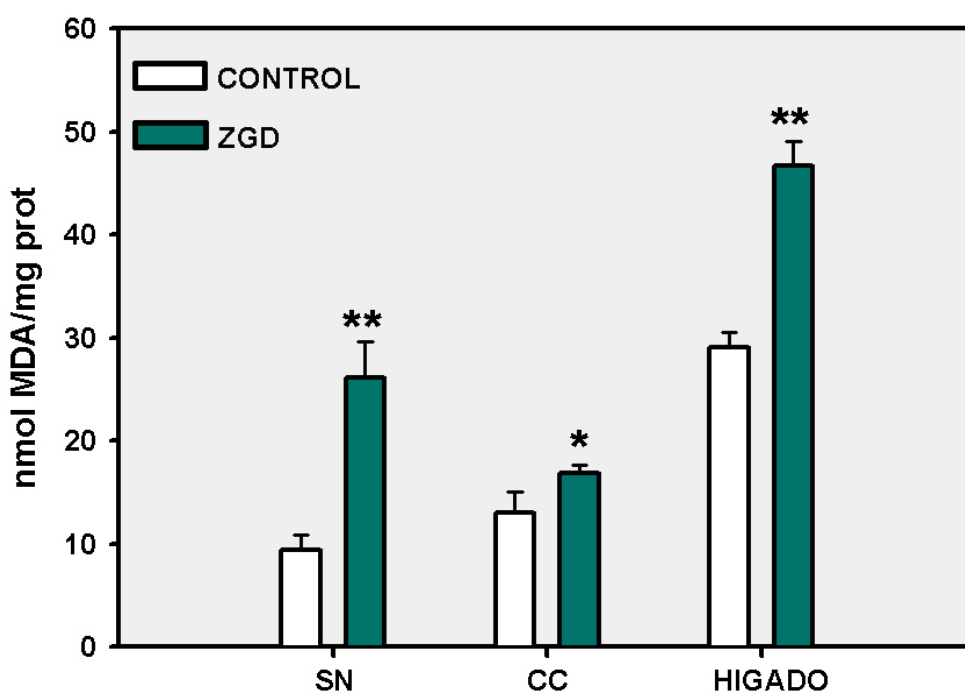
**Figura 14.** Correlación entre la disminución de los niveles de cardiolipina (CL) en la mitocondria y la disminución del potencial de membrana mitocondrial interna (MMI).



Correlaciones paramétricas lineales y no lineales entre el contenido mitocondrial de cardiolipina (CL) y el potencial de MMI. Los datos fueron procesados electrónicamente usando Sigma Plot Statistical Software (8.0) de Sigma Co. (St. Louis, MO). La regresión lineal se realizó por el método de mínimos cuadrados mientras que la no lineal se ajustó mediante una ecuación tipo polinomio cuadrático de la forma  $y = a - b.x + c.x^2$ .

La cardiolipina mitocondrial es un fosfolípido aniónico que posee cuatro residuos de ácidos grasos con un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). De modo que resultaba altamente probable que la peroxidación de estos PUFAs cause la disminución observada en los niveles de CL mitocondrial. Para contrastar esta hipótesis operacional se midieron dos parámetros asociados: la producción de TBARS y la cantidad/calidad de acilos contenidos en la CL. Los niveles de TBARS en las mitocondrias de hígado y cerebro de animales control y de animales tratados con la combinación de los tres pesticidas se muestran en la **Figura 15**.

**Figura 15.** Niveles de TBARS en mitocondrias de sustancia nigra, corteza e hígado de animales controles y tratados con la mezcla ZGD.

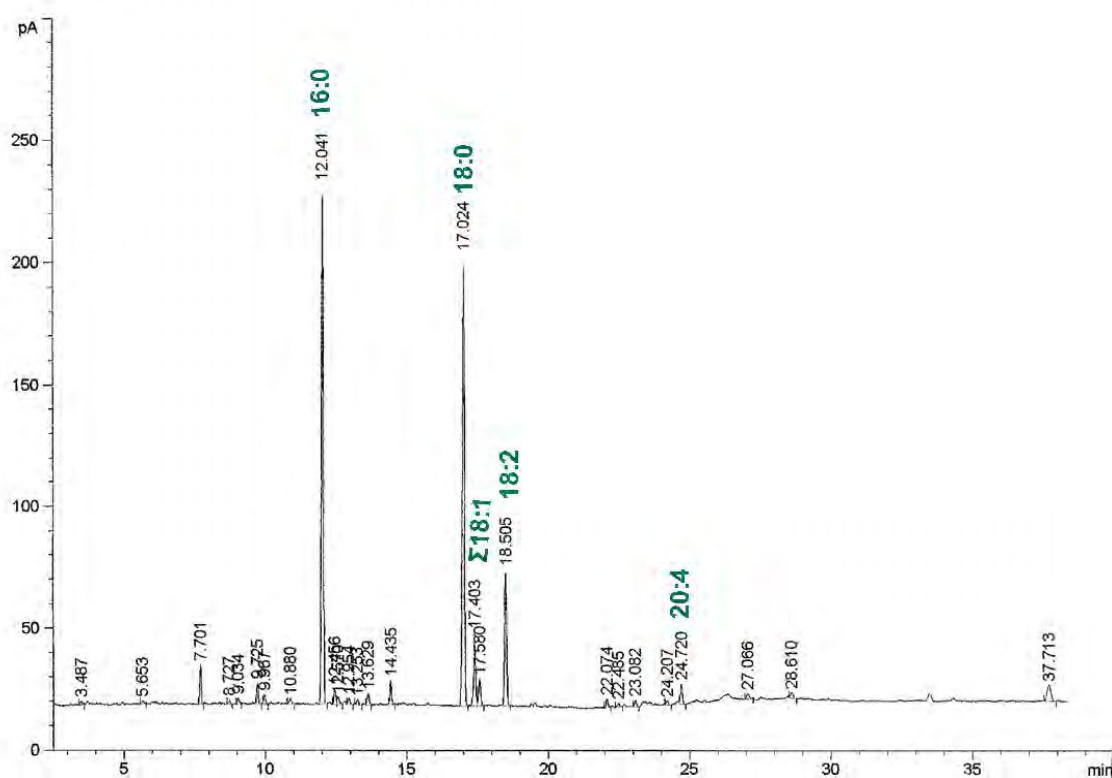


Los resultados se expresaron en nmol de MDA/mg de proteínas para los diferentes tejidos como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ).

En los tres tejidos aumentaron significativamente los niveles de peróxidos lipídicos mitocondriales por el tratamiento con la combinación de los agroquímicos.

Por otro lado, se sabe que la composición de ácidos grasos de la cardiolipina varía según del tejido que se trate. Nosotros encontramos que en el hígado la composición de ácidos grasos de la cardiolipina fue rica en ácidos grasos saturados (16:0, 18:0) y contuvo cantidades significativas de ácido oleico (18:1) y poliinsaturados como el 18:2 y 20:4. En este caso el índice de insaturación calculado fue de  $30.1 \pm 5.8$  (**Figura 16**).

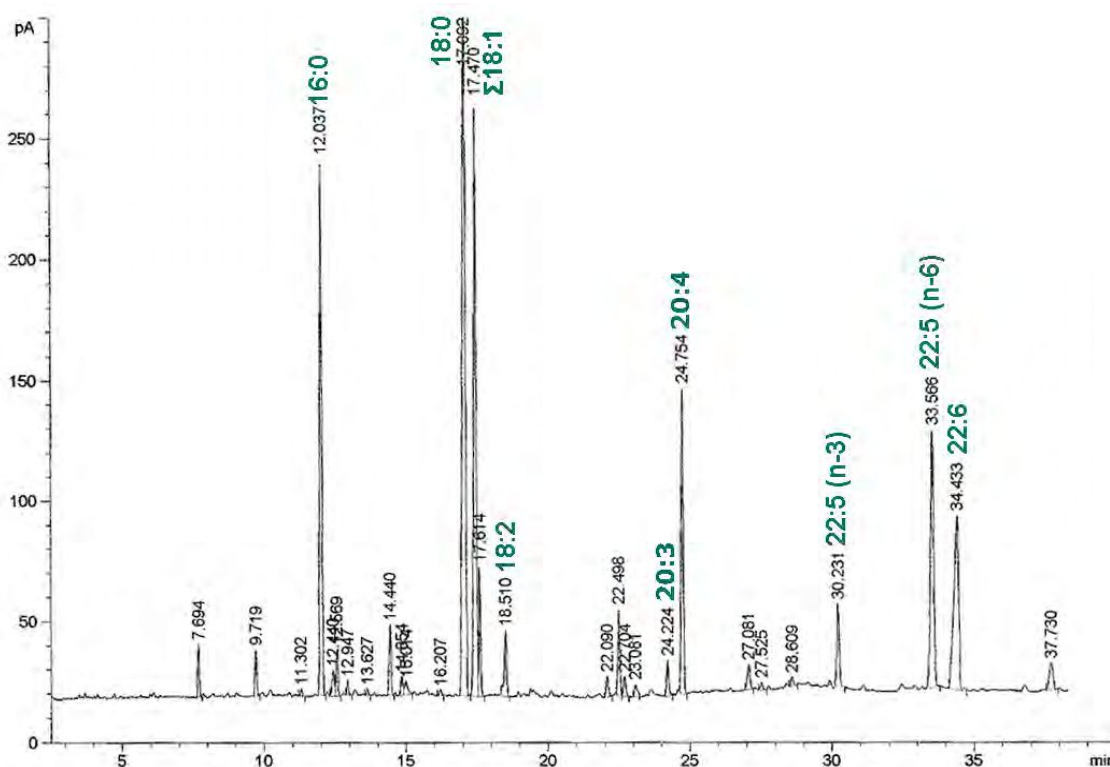
**Figura 16.** Perfil cromatográfico representativo de composición de ácidos grasos de cardiolipina (CL) mitocondrial de hígado control.



En la figura se muestra un perfil cromatográfico representativo de EMAGs (ésteres metílicos de los ácidos grasos) de la cardiolipina de hígado control. En verde se indican las señales correspondientes a 16:0, 18:0, 18:1 ( $\Sigma n-7 + n-9$ ), 18:2 y 20:4.

Contrariamente a lo observado en hígado, el cerebro mostró un perfil muy diferente en cuanto a la composición de ácidos grasos de la CL. El análisis demostró que es rica en ácidos grasos saturados (16:0, 18:0), 18:1 y poliinsaturados como el 18:2 y 20:4 tal como se observó en el hígado; sin embargo, mostró una mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena como los 22:5 (n-3), 22:5 (n-6) y 22:6, (Figura 17) alcanzando un índice de insaturación de  $135.8 \pm 18.4$  (significativamente más alto –casi cinco veces- respecto al mostrado por el hígado). De allí que las moléculas de CL de cerebro resultaran más fácilmente peroxidables.

**Figura 17.** Perfil cromatográfico de composición de ácidos grasos de cardioplipina (CL) de cerebro.



En la figura se muestra un perfil cromatográfico representativo para EMAGs (ésteres metílicos de ácidos grasos) constituyentes de la cardioplipina de cerebro. En verde se indican las señales correspondientes a 16:0, 18:0, 18:1 ( $\Sigma$  n-7 + n-9), 18:2, 20:3, 20:4, 22:5 (n-3), 22:5 (n-6) y 22:6.

Estos resultados son muy interesantes, pues tanto la alteración del potencial de MMI como la disminución en los niveles de CL están descritas en la literatura como desencadenantes de la liberación del Cyto c al citosol y la inducción de la cascada de señales que llevan a la muerte celular por apoptosis.

En virtud de estos hallazgos, medimos la actividad de caspasa-3 que es la principal caspasa efectora en la ruta de muerte celular programada usando homogenatos de sustancia nigra, corteza e hígado. Sin embargo y de manera inesperada, la actividad de esta enzima no cambió en forma significativa para los lotes experimentales con respecto al control (datos no mostrados).

Entonces se decidió investigar otra vía proteolítica involucrada en la cascada pro-apoptótica que se debe a la activación de las calpaínas. Medimos las actividades de mili y micro-calpaínas en sustancia nigra, corteza e hígado. Obtuvimos diferencias significativas en la actividad de mili-calpaínas que resultó mayor para todos los grupos experimentales en el caso de la sustancia nigra (aumentos cercanos al 50 %) y la corteza (aumentos cercanos al 10 %), respecto del control. En el caso del hígado no se observaron diferencias significativas (**Tabla 18**).

**Tabla 18.** Actividad de milicalpaínas en hígado, corteza cerebral y sustancia nigra de animales controles y tratados

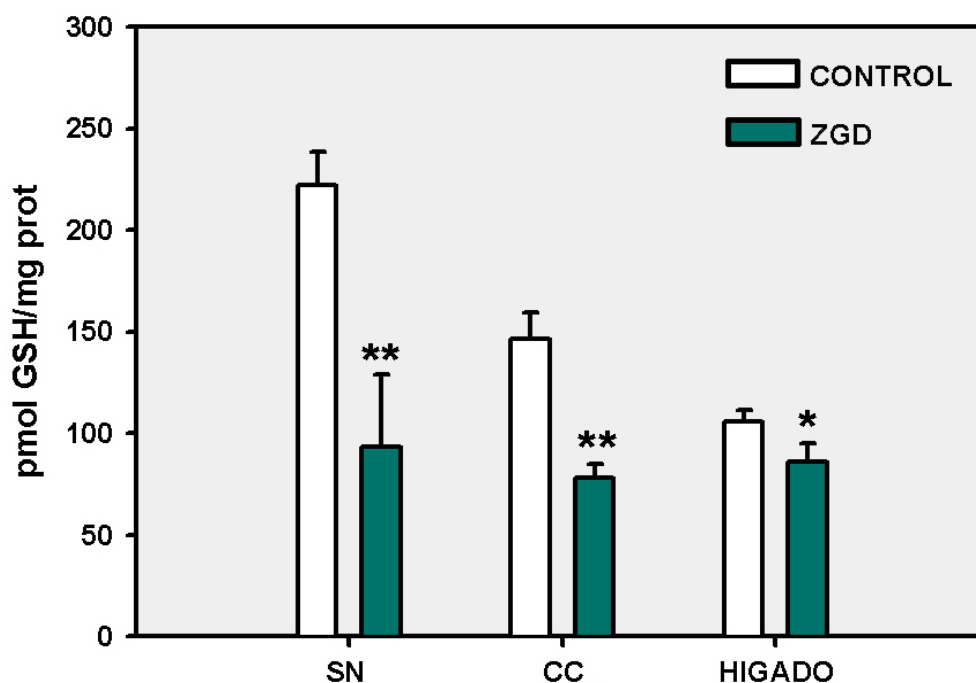
Milicalpaínas (mUI/mL)				
		Hígado	Corteza cerebral	Sustancia nigra
	<b>C</b>	9.2 ± 0.30	3.6 ± 0.26	0.9 ± 0.09
	<b>Z</b>	9.0 ± 0.14	<b>4.3 ± 0.05**</b>	<b>1.1 ± 0.01**</b>
	<b>G</b>	8.4 ± 0.08	<b>4.4 ± 0.20**</b>	<b>1.2 ± 0.05**</b>
	<b>D</b>	9.7 ± 0.70	<b>4.0 ± 0.10*</b>	<b>1.4 ± 0.09**</b>
	<b>ZG</b>	10.4 ± 0.40	3.9 ± 0.01	<b>1.2 ± 0.06**</b>
	<b>ZD</b>	9.9 ± 0.41	<b>4.0 ± 0.04**</b>	<b>1.4 ± 0.04**</b>
	<b>GD</b>	10.0 ± 0.14	<b>4.0 ± 0.12**</b>	<b>1.4 ± 0.07**</b>
	<b>ZGD</b>	10.2 ± 1.32	<b>4.0 ± 0.04*</b>	<b>1.6 ± 0.04**</b>

Los resultados se expresaron en mUI/mL para los diferentes tejidos como las medias ± SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ).

Es bien sabido que la activación de la vía de las caspasas depende del estado energético y del estado redox de la célula (en realidad casi sinónimos en cuanto uno es función del otro). Como una estimación del status redox celular determinamos el contenido de glutatión reducido en las mitocondrias de sustancia nigra, corteza e hígado obteniendo los resultados que se muestran en la **Figura 18**.



**Figura 18.** Niveles de glutatión total en mitocondrias de sustancia nigra, corteza cerebral e hígado en animales controles y tratados con ZGD.



Los resultados se expresan en pmol GSH/mg de proteínas para los diferentes tejidos como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados con \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ).

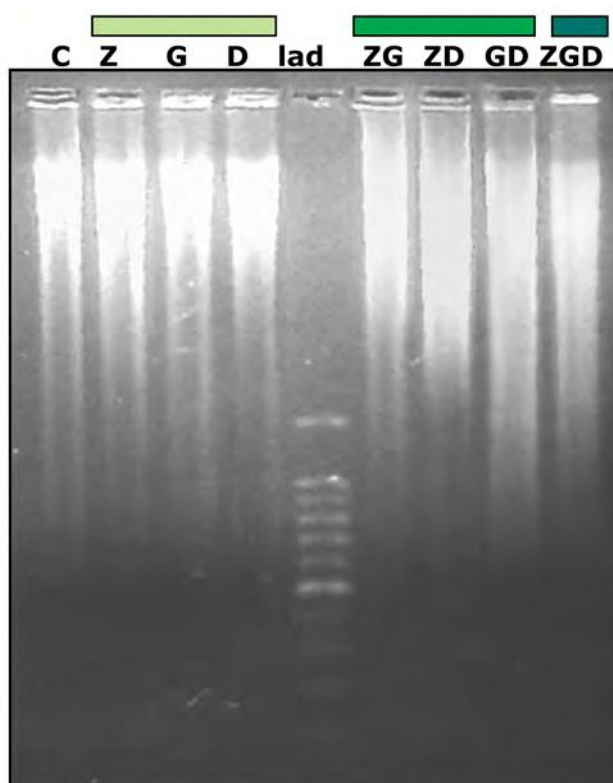
En todos los tejidos el nivel de glutatión del grupo tratado con la mezcla de los tres plaguicidas fue significativamente menor que para el control. De modo que, el equilibrio redox de la mitocondria se encontró desplazado hacia la oxidación, siendo aparentemente las mitocondrias del hígado las menos perjudicadas.

La técnica de *laddering* de DNA permite evaluar por electroforesis en gel de agarosa el patrón de fragmentación del DNA genómico. Si esta fragmentación ocurre mediante una endonucleasa específica, la doble hebra se cliva en regiones internucleosómicas generando fragmentos múltiples de 200 pb. Ha sido demostrado que estas endonucleasas se activan en la cascada apoptótica corriente abajo. Por el contrario, el clivaje del material genético en

forma aleatoria (*ad-random*) caracteriza a la muerte celular por necrosis o necrobiosis.

En nuestro sistema experimental observamos claramente que se produjo fragmentación del DNA extraído del hígado y que resultó ser más severa si se combinaban los agrotóxicos. Sin embargo, no fue posible observar el patrón de *laddering* característico de la muerte celular programada.

**Figura 19.** Patrón de fragmentación del DNA genómico en hígado por electroforesis en gel de agarosa.



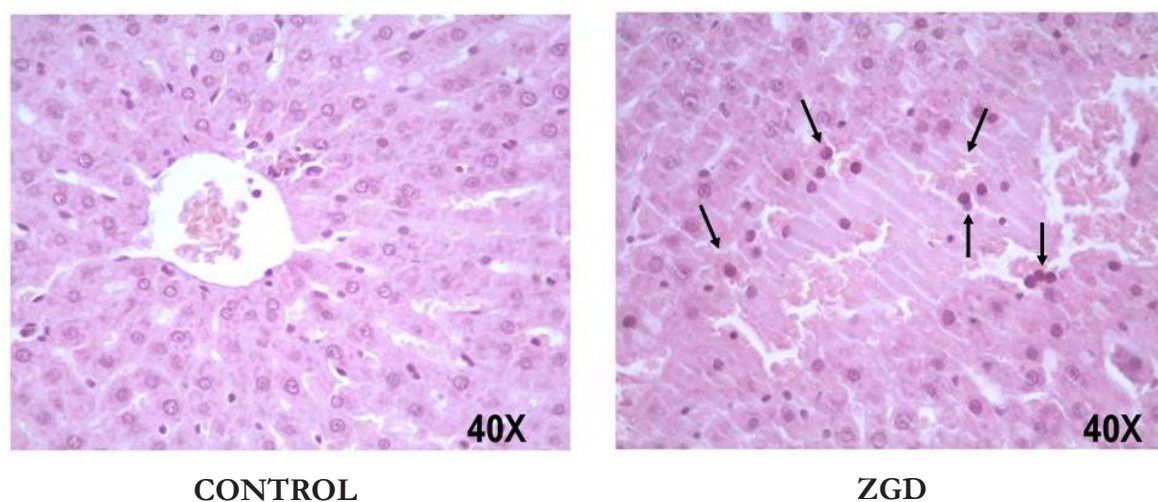
De izquierda a derecha: C, grupo control, expuestos a Z, G y D solos, lad: ladder 100 pb, expuestos a ZG, ZD, GD y ZGD. Los animales fueron tratados según lo descrito en la sección materiales y métodos.

El estrés oxidativo generado por el tratamiento con los agroquímicos provocó oxidación de lípidos, proteínas y alteración de la estructura del DNA, que podrían inducir la muerte de las células. Estos resultados llevaron al estudio de la integridad tisular desde el punto de vista histológico mediante microscopía óptica. Para esto, se colorearon cortes

de hígado, riñón y cerebro de animales controles y tratados con la mezcla de los tres agroquímicos (Z, G y D) mediante la técnica de hematoxilina-eosina.

En la **Figura 20** se muestra en forma comparativa imágenes obtenidas de cortes de hígado provenientes de animales control (izquierda) y tratados con ZGD (derecha). En esta última, se observaron pequeñas zonas hemorrágicas con desorganización de los cordones celulares, presencia de hepatocitos con núcleos aparentemente alterados con cromatina densa y citoplasma claro y desorganizado (flechas), mientras que los cortes provenientes de animales controles mostraron una arquitectura tisular normal.

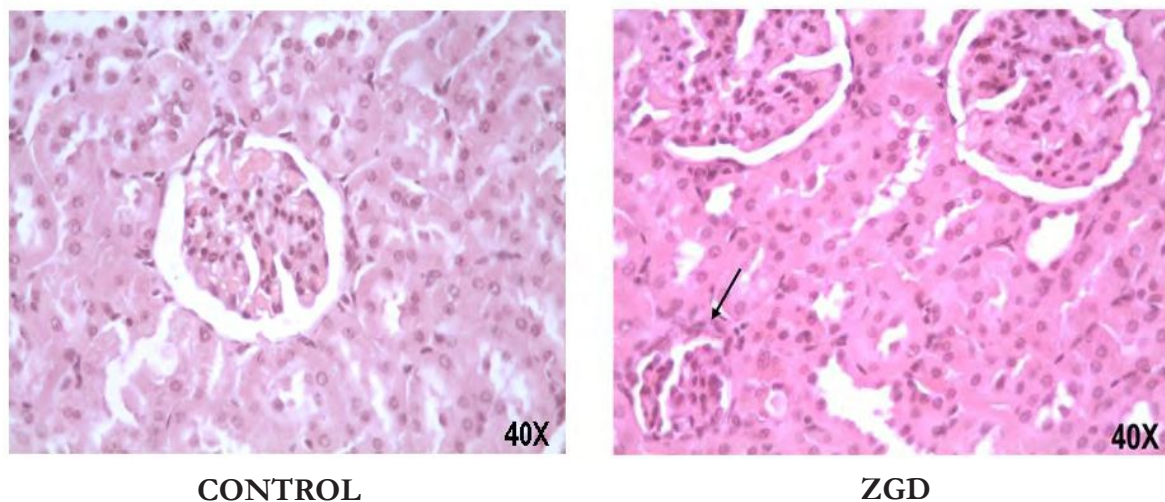
**Figura 20.** Cortes de hígado control (izquierda) y tratado con ZGD (derecha) teñidos con hematoxilina-eosina.



A la izquierda con una magnificación de 40X corte de hígado de animales control, se observa una vena central que recibe las terminaciones de los sinusoides que la rodean, todos de arquitectura normal. En la foto derecha (40X) se observa una zona con desorganización tisular y presencia de núcleos picnóticos (flechas) con citoplasmas mas claros.

En cuanto al riñón (**Figura 21**; izquierda control, derecha ZGD), se observaron pequeñas zonas desorganizadas con algunos glomérulos colapsados (flecha) en los cortes de animales tratados, mientras que la arquitectura tisular es normal en los cortes provenientes de animales control.

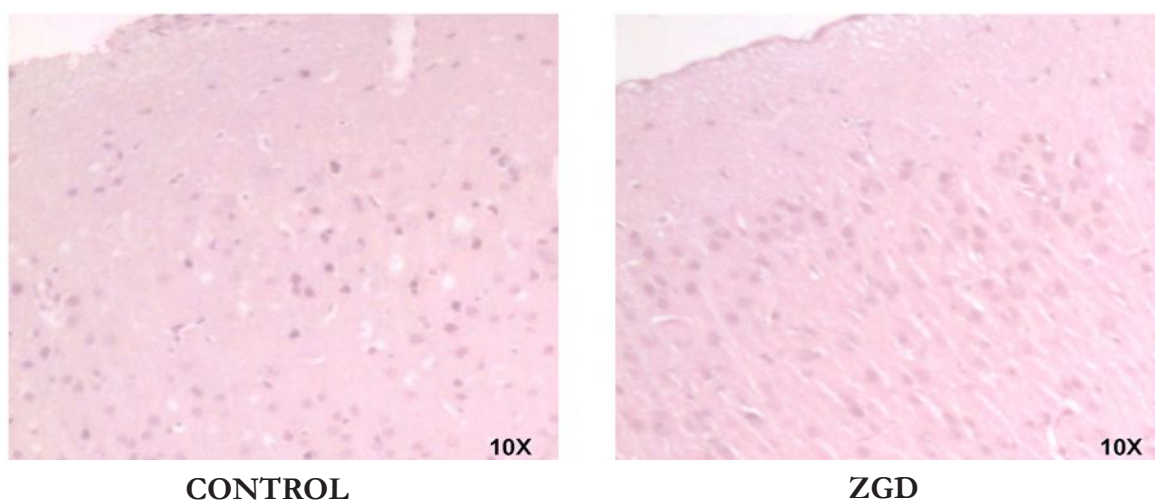
**Figura 21.** Cortes de riñón control (izquierda) y tratado con ZGD (derecha) teñidos con hematoxilina-eosina.



A la izquierda con una magnificación de 40X corte de riñón de animales control, se observa un glomérulo y su tejido adyacente, de arquitectura normal. En la foto derecha (40X) se observa una zona (superior) con glomérulos normales y la presencia de un glomérulo colapsado (flecha) en el sector inferior izquierdo de la foto.

La **Figura 22**, muestra los resultados obtenidos para corteza cerebral en ambos grupos de animales. No se observan diferencias en la morfología tisular entre los grupos.

**Figura 22.** Cortes de corteza cerebral control (izquierda) y tratado con ZGD (derecha) teñidos con hematoxilina-eosina.



A la izquierda con una magnificación de 10X, se observa corteza cerebral de animales control, no mostraron diferencias con la foto derecha (10X) indicando ausencia de alteraciones tisulares debidas al tratamiento con los agroquímicos.

## DISCUSIÓN

Las células han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante integrales para prevenir la formación de cantidades excesivas de radicales libres y especies activas limitando así sus efectos deletéreos (De Zwart et al., 1999). Cuando estos mecanismos resultan insuficientes se genera una condición denominada estrés oxidativo, que se observa frecuentemente en varios modelos de intoxicación por agroquímicos (Dawson et al., 2002). Existen numerosos estudios que se han focalizado en los efectos de plaguicidas especialmente en intoxicaciones agudas con dosis cercanas a la  $DL_{50}$ . Sin embargo, no se ha prestado la suficiente atención a la administración simultánea de agroquímicos en dosis consideradas bajas ( $1/50$  a  $1/250$  de  $DL_{50}$ ) tales como las que se investigaron en este trabajo. El modelo experimental planteado resulta interesante para evaluar de manera algo mas cercana, la situación real de la exposición humana a dosis

bajas de xenobióticos presentes en el ambiente como residuos en alimentos, agua y aire (Sivapiriya et al., 2006).

De manera que el progreso de investigaciones en este campo podría contribuir a dilucidar el verdadero rol que desempeña la exposición a residuos de plaguicidas (o agroquímicos en general) en la etiología de enfermedades humanas, especialmente las de tipo neurodegenerativo como la enfermedad de Parkinson (PD).

Otros laboratorios informaron efectos causados por la administración combinada de pesticidas (Hazarika et al., 2003; Rehman et al., 2006; Kirby et al., 2001; Calviello et al., 2006; Altuntas et al., 2003; Giray et al., 2001). Sin embargo, no hay estudios previos sobre los efectos de una exposición sub-crónica a dosis bajas de tres de los plaguicidas más utilizados en nuestro medio y en el resto del mundo tal, como los aquí investigados.

Hasta el momento, no se han establecido los mecanismos por los cuales estos plaguicidas provocan toxicidad en mamíferos. Algunos autores como Sharma et al. (2005b) y Sivapiriya et al. (2006) demostraron un aumento de la actividad del sistema CYP (citocromos P450) hepático en ratas intoxicadas por 30 días con dosis de D similares a las utilizadas en este trabajo. Por otra parte, en ratas tratadas con glifosato y sus formulaciones comerciales, Hietanen et al. (1983) reportaron una disminución en el nivel de las actividades CYP y monooxigenasa hepática, mientras que Daruich et al. (2001) observaron un aumento de la actividad glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. Mientras tanto, Peixoto (2005) demostró que ese mismo herbicida (G) es capaz de funcionar como desacoplante de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Por otro lado, Fitsanakis et al. (2002) evaluaron la toxicidad de ditiocarbamatos -entre ellos el zineb- observando que específicamente en las neuronas catecolaminérgicas provoca inhibición de la actividad dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, tirosina hidroxilasa y cataliza la oxidación incompleta de dopamina y noradrenalina.



En la sección de resultados hemos visto cómo la administración de plaguicidas incrementa los niveles de peróxidos lipídicos en todos los tejidos evidenciada por un aumento en la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Las mezclas o asociaciones de drogas provocaron aumentos aún más pronunciados en los niveles de TBARS demostrando un efecto mayor sobre la peroxidación y daño a lípidos que coincide con lo reportado por Banerjee et al. (1999). Al menos en hígado y en plasma, se observó un efecto aditivo evidente. Como mencionamos en la introducción de este capítulo, la peroxidación lipídica en órganos como el cerebro es todavía más peligrosa que en hígado y riñón, por la elevada sensibilidad a los insultos oxidantes que demuestran tener los tejidos constituyentes del SNC (Dringen, 2000; Abuja y Albertini, 2001; Desport y Couratier, 2002).

En nuestro modelo experimental también se observa daño oxidativo a proteínas plasmáticas. La administración de plaguicidas provocó un aumento de proteínas oxidadas que resulta ser más importante en los esquemas de administración combinada de agroquímicos. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los que se demostró que varios pesticidas (incluyendo organofosforados) inducen la producción de ROS y causan la oxidación de proteínas en plasma y otros tejidos (Beuret et al., 2005; John et al., 2001; Sharma et al., 2005a; Sharma et al., 2005b; Mahaboob Khan et al., 2005). Pueden producirse muchos tipos diferentes de modificaciones oxidativas en las proteínas debido a la acción directa de ROS-RNS o indirectamente por acción de otros productos oxidados (principalmente peróxidos lipídicos). Los grupos carbonilos que se forman por oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos (Dalle-Donne et al., 2003a), son considerados mejores biomarcadores de daño que los productos de peroxidación lipídica. Esto se basa en que su formación es rápida, circulan en la sangre por períodos de tiempo más prolongados, y su estabilidad durante el almacenamiento de las muestras es de alrededor

de 10 años a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los carbonilos proteicos son los biomarcadores más usados para ponderar el daño oxidativo a proteínas y son considerados como una excelente opción de *screening* para la evaluación del daño oxidativo en poblaciones expuestas (Dalle-Donne et al., 2006).

A juzgar por los niveles plasmáticos de los biomarcadores que estudiamos, la exposición a dosis bajas de los agroquímicos investigados causa un innegable efecto oxidativo sobre los lípidos y las proteínas que se refleja a nivel sistémico. El daño es también evidente en todos los tejidos estudiados y esto sugiere que se puedan producir alteraciones en su funcionalidad. Se podrían ver afectados especialmente aquellos tejidos con capacidades de defensa y reparación reducidas, como lo es el caso del cerebro (o el SNC en general).

El incremento en los niveles de las RNS resultó evidente en los grupos tratados para todos los tejidos; sin embargo, en el cerebro los aumentos de [NOx] mostraron una clara correlación con la asociación de agroquímicos, pues aumentaron un 40 % en los tratados con monodrogas y un 80 % en ZGD.

Por otro lado, en el plasma los aumentos de [NOx] reflejan el impacto sistémico de la intoxicación con los plaguicidas sobre la producción de RNS. La acumulación de RNS, que es notable también en el resto de los tejidos, genera una situación de riesgo para la integridad funcional de las células y puede explicar los efectos deletéreos observados en lípidos y proteínas.

Tal como hemos dicho la superproducción de  $\text{NO}^{\bullet}$  resulta ser un inductor de la apoptosis. En cuanto al mecanismo íntimo de este efecto, se ha visto que niveles altos de  $\text{NO}^{\bullet}$  promueven la liberación de citocromo c de la mitocondria que conduce a la activación de las caspasas 3 y 9 (Brookes et al., 2000; Heales et al., 1999; Dawson y Dawson 1996; Cassina y Radi 2007; Byung-Min et al., 2002), además inhibe complejos I, II, III y



IV de la cadena de transporte de electrones afectando la producción de ATP (Bolaños et al., 1994; Navarro y Boveris, 2008; Moro et al., 2005; Heales et al., 1999; Poderoso et al., 1996; Peuchen et al., 1997; Jackson et al., 2002). El  $\text{NO}^{\bullet}$  también reacciona con  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para formar el radical peroxinitrito el cual es altamente reactivo y responsable del daño nitrativo a macromoléculas (Navarro y Boveris, 2008; Heales et al., 1999; Singh y Dikshit, 2007; Dawson y Dawson, 1996). También es capaz de causar el incremento de la liberación de Fe con la consiguiente estimulación de las reacciones tipo Fenton, provoca la nitrosilación de factores que regulan las señales apoptóticas, y desaminación del DNA; todos estos mecanismos conducen a la estimulación de la muerte celular por necrosis o apoptosis dependiendo de la intensidad de la noxa (Dawson y Dawson, 1994; Murray et al., 2003).

En las neuronas el  $\text{NO}^{\bullet}$  puede ser producido por activación de la isoforma “n” (neuronal) de la óxido nítrico sintasa (nNOS), y en una proporción significativamente mayor por las células gliales (especialmente los astrocitos) donde se activa la expresión de la isoforma inducible de la NOS (iNOS). La inducción de esta última se asocia con varias enfermedades neurológicas. Específicamente, se ha demostrado una producción excesiva de  $\text{NO}^{\bullet}$  proveniente de la glia en la enfermedad de Parkinson (Peuchen et al., 1997; Dawson y Dawson, 1996; Navarro y Boveris, 2008; Micheli, 1998) a pesar de no verse una gliosis tan intensa como la observada en otras entidades neurodegenerativas.

La nNOS está codificada en el cromosoma humano 12q (sector 12q24.2) y revela una compleja organización de diversidades alélicas y estructurales (Hall et al., 1994). Peculiarmente, esta enzima no solo produce  $\text{NO}^{\bullet}$  sino también radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . La producción simultánea de ambas especies químicas constituye un serio peligro para la integridad neuronal ya que se hace más probable la activación de las rutas de muerte celular programada (Virág et al., 2003). Por esta causa, una gran cantidad de señales

controlan la actividad de la nNOS, siendo la mayoría de ellas atenuadoras, tales como las desencadenadas por proteínas quinasas  $\text{Ca}^{++}$ —calmodulina dependientes, y c-AMP. Todas las neuronas nNOS (+) se caracterizan por ser bastante insensibles al efecto deletéreo del  $\text{ONOO}^-$ , por lo que sobreviven aún en condiciones de elevado estrés oxidativo-nitrativo. Esto constituye una característica única y diferencial respecto a otros tejidos (como el hepático) en donde este mecanismo de sobrevida estaría inactivo, y los daños a DNA (y otras biomoléculas) serían más factibles aún que en ciertas regiones del cerebro. Este tema es controversial y merece ser estudiado con mayor detalle. También se sabe que todas las neuronas nNOS (+) colocalizan con actividad de NADPH-diaforasa y la mayoría -sobre todo en bulbo olfatorio y estriado- con somatostatina, neuropéptido Y y GABA (Rushlow et al., 1995; Garside et al., 1997). Las neuronas que rodean a las nNOS (+) son predominantemente eferentes espinosas gabaérgicas y ricas en guanilatociclasa (el blanco típico del  $\text{NO}^*$ ). A su vez, las neuronas tirosina-hidroxilasa (+) o dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia nigra (SNpc) no demuestran ser inmunoreactivas para nNOS; por lo que pueden ser significativamente dañadas por el  $\text{NO}^*$  generado en gran cantidad por el estriado, que es la principal proyección de la SNpc (Micheli, 1998). En consecuencia, las terminales dopaminérgicas son un blanco selectivo para el  $\text{NO}^*$  proveniente de fuentes vecinas. Estas morirían primero y luego lo harían los cuerpos neuronales dopaminérgicos de la SNpc. Es importante comentar que muchas enfermedades neurodegenerativas cursan con gliosis reaccional y que en esta condición las células de la glía se comportan como macrófagos activados que producen abundante  $\text{NO}^*$  ya que son (+) para iNOS (Moncada y Higgs, 1993; Shergill et al., 1996). Desde su introducción en las actividades agropecuarias, los agroquímicos se consideran xenobióticos pro-activadores de la glía.

Al presente se desconoce en detalle el mecanismo por el cual algunas neuronas

NOS (+) suelen ser resistentes a la muerte por ataque nitrativo. Sin embargo, parece probable que ellas formen cantidades muy bajas o insignificantes de peroxinitrito debido a que una actividad sobre-expresada de Mn-SOD mantendría los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  muy bajos y por consiguiente no se formarían cantidades neurotóxicas de  $ONOO^-$  (Virág et al., 2003). Uno de los efectos neurotóxicos más conocidos del  $ONOO^-$  es la nitración de receptores tirosinquinasa que los inhabilita para ser fosforilados por factores neurotróficos específicos. Esto impide la transducción de sus señales y en consecuencia las neuronas inician el programa de muerte celular o apoptosis (Jenner y Olanow, 1996).

La superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) constituyen las principales enzimas del SDA (McCord y Fridovich, 1969) y su actividad debería aumentar como respuesta al aumento de ROS/RNS. Sin embargo, en el caso de la SOD observamos que la actividad estuvo significativamente disminuida en los animales tratados, especialmente en aquellos expuestos a la combinación de los tres agroquímicos. En el hígado por ejemplo la inhibición llegó a ser del 40 %, mientras que en el cerebro de más del 60 %.

Las actividades de SOD y CAT son inhibidas por oxígeno singlete y por radicales peroxilo (Escobar et al., 1996; Patel et al., 2006). En nuestro sistema experimental hemos demostrado la formación de radicales peroxilo derivados de la oxidación de los PUFAs, por lo que sería válido adjudicar la disminución de la actividad de las enzimas a la inactivación por peróxidos, al menos para la SOD, pues la catalasa presenta un comportamiento ambiguo.

En cerebro, la actividad de CAT por exposición a monodrogas evidencia un aumento de 1.5 veces el valor mostrado por el grupo control. La combinación de pesticidas de a dos provoca también un aumento de la actividad aunque menos pronunciado (0.75 veces el valor del control) y con la combinación de Z, G y D observamos una aparente “normalización” de la actividad de la enzima. En el hígado no se obtienen diferencias

significativas en la actividad de CAT en ninguno de los grupos, aunque al igual que en el riñón, se observa la misma tendencia respecto de esta aparente “normalización” de la actividad. En el trabajo de Escobar et al. (1996) se menciona que la SOD y la CAT tendrían una sensibilidad diferencial frente a los radicales peroxilo. La CAT requiere un número de interacciones proteína/radical para volverse inactiva significativamente mayor al que requiere la SOD. Así se podría explicar porqué la SOD muestra inhibición de su actividad en todos los grupos tratados, mientras que la CAT solo parece inhibirse en el grupo ZGD, en donde como sabemos la agresión oxidativa es máxima. Además, otros laboratorios describen efectos inhibitorios sobre CAT ejercidos por grandes cantidades de radicales tales como  $\text{ONOO}^-$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  que actuarían dañando e inactivando el sitio activo de la enzima (Franceschutti et al., 1996; Tabatabaie y Floyd, 1994; Radi et al., 1991; Kono y Fridovich, 1982).

También hemos demostrado que la actividad de glutatión reductasa disminuye significativamente en el hígado de los animales tratados con combinaciones de pesticidas (inhibición de más del 30 %). Esta enzima es crucial para la reposición de GSH a partir de GSSG. La evidencia cinética y espectroscópica obtenida por Francescutti et al. (1996), indica que la afinidad por el sustrato y la capacidad de recambio es alterada por exposición a  $\text{ONOO}^-$ , y se supone que la cadena lateral de tirosina presente en el sitio de unión al GSSG sería el sitio *target* para la modificación por esta RNS.

La actividad de otras enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión transferasa (GST) parecen no verse afectadas en las condiciones de nuestro modelo experimental. La GPx es especialmente sensible a la acumulación de ROS/RNS y a modificaciones del entorno redox. Estas condiciones podrían alterar el estado oxidativo del átomo de selenio ubicado en el sitio activo de la enzima, el derivado oxidado de este elemento es incapaz de catalizar la reacción (Halliwell y Gutteridge 1999; Patel et al.,

2006). Tampoco encontramos cambios significativos (al menos a nivel de la actividad medible *in vitro*) de la GST, a pesar de que esta enzima suele estar involucrada en las reacciones de fase II durante la detoxificación de xenobióticos.

Numerosos autores han propuesto que la relación entre la actividad de las enzimas antioxidantes es muy compleja y a veces poco predecible dependiendo, entre otras variables, de la especie animal, el sexo, la edad, el tóxico inductor de OS y la dosis y vía de aplicación o exposición (Kono y Fridovich, 1982; Slaughter et al., 2003; Sobocanec et al., 2008; Banerjee et al., 1999). En un trabajo de Seth et al. (2001) se demostró un aumento en la actividad de SOD, GPx, GST, GR y CAT, al tratar animales durante 30 días con organofosforados (Propoxur®) en dosis 1/20 de la DL<sub>50</sub>. El autor atribuye este efecto a una inducción de la biosíntesis de las enzimas, como mecanismo adaptativo frente al estrés oxidativo provocado por la administración del pesticida. Las complicadas relaciones -aparentemente únicas- para cada modelo experimental entre los niveles de especies reactivas y la actividad medible o demostrable de las enzimas del SDA, podrían aclararse mediante el estudio de la expresión de los mRNAs que codifican a estas proteínas (Northern-blot) y el análisis de sus tasas de traducción (Western-blot). Estos resultados permitirían analizar si se trata de inducciones o represiones a nivel genómico, o por el contrario, de activaciones o inhibiciones de proteínas ya sintetizadas. Los resultados de este trabajo sugieren que estas determinaciones podrían abrir un nuevo campo de investigación tendiente a dilucidar este importante aspecto mecanístico.

El incremento de la generación de ROS/RNS *in vivo* puede llevar a la depleción de uno o más antioxidantes. Sin embargo, en nuestro sistema experimental observamos que los niveles de glutatión total aumentan en el plasma de animales expuestos a los tóxicos. El glutatión reducido tiene múltiples funciones biológicas tales como ser cofactor de enzimas, prevenir la oxidación de tioles proteicos, ser detoxificante de xenobióticos y

*scavenger* de OH<sup>•</sup>, HOCl, ONOO<sup>-</sup>, RO<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup>, y <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Halliwell y Gutteridge, 1999). El aumento en los niveles de glutatión total en el plasma podría explicarse si se examina en detalle y de manera confiable la contribución de la especie oxidada y la reducida. Mediante la técnica de referencia (HPLC) descrita en la sección materiales y métodos cuantificamos por separado GSH y GSSG. En plasma, los niveles de GSH aumentaron a más del doble en los tratamientos con monodrogas y a más del triple en las combinaciones de dos y tres plaguicidas, mientras que los niveles de GSSG aumentaron mucho menos (proporcionalmente cerca del doble en los tratamientos con Z, G o D solos, o al doble con la combinación de 2 o los 3 tóxicos). Así es como el cociente GSH/GSSG mostró un incremento de 1.5 veces los valores del control para los grupos tratados con las mezclas de plaguicidas. Este incremento en los niveles de GSH respecto de GSSG en plasma podría deberse a un mecanismo compensatorio llevado a cabo por el hígado que es el principal productor y exportador del tripéptido (Lauterburg et al., 1984; Anderson y Meister, 1980). Esta explicación coincide con sugerencias realizadas previamente por otros autores (Sharma et al., 2005a) y podría ser consecuencia de la inducción de la  $\gamma$ -glutamyl-cisteinil sintetasa, enzima que controla la velocidad de biosíntesis del glutatión (Peuchen et al., 1997; Dringen, 2000; Dringen, 2005). De hecho, la determinación de la actividad de esta enzima en sustancia nigra ha sido propuesta como un marcador temprano de la enfermedad de Parkinson (Sian et al., 1994).

En el cerebro los niveles de glutatión total medidos por la técnica espectrofotométrica no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, cuando se evaluó la contribución de cada una de las especies de glutatión se vio que los niveles de GSH no se modificaron significativamente en ninguno de los grupos tratados, mientras que sí aumentaron los niveles de GSSG. De este modo, el cociente GSH/GSSG mostró una clara disminución en todos los lotes tratados que resultó estadísticamente significativa en el caso de los

grupos tratados con ZD, GD y ZGD. Las neuronas tienen una concentración baja de glutatión (en relación a otras células) que incluso disminuye gradualmente durante el desarrollo neuronal. En cambio, en la glia los niveles de este antioxidante son mayores y sostenidos, de hecho son estas células las encargadas de reponer los niveles de glutatión en las neuronas (Peuchen et al., 1997).

El plasma recibe el aporte de glutatión sintetizado por el hígado, explicando por que el recambio resultó más rápido. Estas particularidades se tornan aún más importantes al considerarse que la pérdida de GSH parece ser un evento temprano y crucial en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (Peuchen et al., 1997).

El otro antioxidante de bajo peso molecular con gran importancia en la defensa antioxidante es el  $\alpha$ -tocoferol que inhibe la cadena de peroxidación lipídica (Catalá, 2007; Sies et al., 1992). Observamos que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado y cerebro disminuyó progresivamente, en una clara dependencia con la asociación de sustancias tóxicas. En cambio, en el plasma solo se observó una disminución significativa en el lote tratado con los tres plaguicidas. Los niveles de este antioxidante en el plasma dependen de la absorción dietaria (vía quilomicrones) o de lo exportado en las VLDL biosintetizadas en el hígado (Gilgun-Sherki et al., 2001). Los tejidos toman este antioxidante del plasma y en algunos de ellos, como los eritrocitos y el bazo, el reemplazo del  $\alpha$ -tocoferol *viejo* por el *nuevo* es muy rápido. Sin embargo, en otros tejidos como el cerebro, el recambio es mucho más lento (Ingold et al., 1987; Burton y Traber, 1990; Cadenas y Packer, 2002). Estas diferencias en la cinética de almacenamiento y utilización del tocoferol podrían justificar nuestros hallazgos.

Describir el estado redox de una muestra es una tarea difícil si se considera la evaluación de un solo biomarcador. El ensayo FRAP permite establecer la capacidad antioxidante total y provee un panorama global o promedial de las variaciones

individuales de cada uno de los antioxidantes y prooxidantes presentes en la muestra. Se requiere el tratamiento previo de las muestras con uricasa para destruir el ácido úrico, dado que de otra manera resultaría ser el principal contribuyente del poder reductor total enmascarando variaciones en los niveles de antioxidantes minoritarios (Benzie y Strain, 1996). Los resultados obtenidos para el ensayo FRAP en plasmas mostraron una notable disminución de la capacidad antioxidante en todos los grupos experimentales en comparación con el grupo control y más importante aún, esta condición se agravó en aquellos lotes tratados con combinaciones de agroquímicos.

Asimismo, observamos un incremento en la actividad plasmática de dos enzimas utilizadas frecuentemente como marcadores de daño celular: LDH y  $\gamma$ -GT. Los resultados nos indicaron claramente que la administración asociada de agroquímicos provoca daño tisular, incluso a bajas dosis como las empleadas en este trabajo. La actividad  $\gamma$ -GT resulta especialmente interesante pues es un marcador sensible de daño hepato-celular en caso de agresión tóxica. Todos los grupos tratados con agroquímicos, solos o en combinación, mostraron incrementos en la actividad de esta enzima que varió entre un 120 y un 186 % por sobre los valores control. Últimamente, la actividad de esta enzima se está relacionando con el estrés oxidativo. Se sabe que cumple un rol central en la homeostasis del glutatión al catalizar el paso inicial en la degradación extracelular que provee los metabolitos necesarios para su resíntesis hepática (ciclo del gamma-glutamilo). Además existen evidencias que vinculan la actividad de esta enzima con la generación de ROS/RNS, especialmente en presencia de hierro y otros metales de transición (Takahashi et al., 1997). Lim et al. (2004) encontraron una correlación inversa entre los niveles de antioxidantes y la actividad  $\gamma$ -GT en suero, e incluso, sugirieron que la actividad de esta enzima podría ser de utilidad como biomarcador temprano de estrés oxidativo.

También observamos un aumento en la actividad de las transaminasas TGO y



TGP aunque solo para el lote tratado con la combinación de los tres agroquímicos (ZGD) lo que indicaría que los xenobióticos en combinación son capaces de provocar daño hepático leve. Resulta interesante señalar que ambas actividades mostraron incremento, cuando en realidad en cuadros de hepatotoxicidad leve solo lo hace la TGP. La actividad de TGO es bilocular y de mayor actividad específica en mitocondrias, lo que nos lleva a especular que este hallazgo se relaciona directamente con el daño a la integridad mitocondrial demostrado por otros métodos.

Por otra parte, los niveles aumentados de creatinina plasmática en los grupos tratados reflejan una alteración en la capacidad de filtración renal. Con los datos disponibles no nos es posible especular sobre el mecanismo por el cual se establece este daño, pero probablemente se deba al impacto de los radicales y especies reactivas no radicalarias en la cápsula de Bowman (especialmente debido a la carbonilación de las delicadas estructuras proteicas ultrafiltrantes que la constituyen, o incluso al daño de los componentes lipídicos asociados a las biomembranas). En este sentido, sería muy interesante iniciar una línea de trabajo en la que se investiguen detalladamente mediante técnicas inmunocitoquímicas *in situ* (ELISA sándwich, o similar), la generación de derivados carbonilados y la producción de aldehídos de cadena corta o lipoperóxidos, en cortes finos de riñón de animales tratados con los agrotóxicos.

Al evaluar la actividad de enzimas pancreáticas en plasma observamos aumentada la actividad lipasa en los grupos ZD y ZGD. Además para el grupo ZGD las concentraciones de hemoglobinas glicosiladas y fructosaminas fueron más altas que para el control. Esto sugiere que los agrotóxicos en combinación producen hiperglucemia sostenida, o al menos hiperglucemia posprandial no fisiológica, la cual sería responsable de la glicosilación no enzimática de proteínas plasmáticas. Se sabe que las fructosaminas son un biomarcador que promedia la concentración sanguínea de glucosa durante - al

menos - las últimas tres semanas (Misciagna et al., 2004), y que resulta aún mas confiable que la determinación de las mismas hemoglobinas glicosiladas (HbA1c) (Lapolla et al., 2004). Estos resultados coinciden con numerosa evidencia experimental que señala alteraciones de las funciones bioquímicas y endocrinas del páncreas atribuibles a la intoxicación aguda y crónica con plaguicidas organofosforados (OPs) (Kamath y Rajini, 2007; Rahimi y Abdollahi, 2007).

No hemos visto que se modificara significativamente la actividad colinesterasa plasmática en los grupos tratados con D, a pesar de que este insecticida del grupo de los OPs es un inhibidor específico para esta enzima. Este resultado avala el modelo experimental de intoxicación sub-clínica y sub-signológica empleado en este trabajo.

En síntesis, los resultados demuestran que el estrés y daño oxidativo es más evidente en el caso de mezclas de tóxicos, los cuales aún en dosis bajas provocan incremento de la peroxidación de lípidos, de la carbonilación de restos de aminoácidos de las proteínas, formación de RNS, y disminución sustancial de antioxidantes de bajo peso molecular como el  $\alpha$ -tocoferol, con importantes alteraciones en el cociente GSH/GSSG particulares para cada tejido investigado.

Como se mencionó en la sección resultados, con el objetivo de evaluar si el tratamiento con los agroquímicos a lo largo de las cinco semanas provocó un daño acumulativo o, por el contrario, se trató de un efecto compensatorio o autolimitado en virtud de la activación selectiva de mecanismos de defensa antioxidante, se repitió el mismo experimento sacrificando a los animales a las dos (tiempo I) y a las cinco semanas (tiempo II) de tratamiento.

Las enzimas antioxidantes glutatión-dependientes y la CAT mostraron una actividad mayor (cercana al 20 %) a las dos semanas de tratamiento respecto a la observada al final del período de intoxicación, mientras que la SOD mostró un comportamiento

más ambiguo. Esto indicaría un mecanismo de tipo adaptativo que podría deberse a la inducción de la expresión de las enzimas involucradas en la respuesta antioxidante en las primeras semanas de tratamiento. Esta hipótesis concuerda con los niveles de peróxidos lipídicos, pues hemos observado que los niveles de MDA fueron mayores a las dos semanas de tratamiento que a las cinco. El aumento en la actividad de estas enzimas podría neutralizar, solo en parte, las especies activas que se producen por el tratamiento con los agrotóxicos y de esta manera disminuir -aunque no neutralizar totalmente- el daño oxidativo a las macromoléculas (lípidos por ejemplo). Sin embargo, la verificación de esta suposición requeriría de un muestreo frecuente para análisis mediante técnicas como Northern- y Western-blot en forma seriada durante un período prolongado, y con la determinación simultánea de las actividades biológicas en todos los homogenatos tisulares.

Teniendo en cuenta las alteraciones observadas en el balance redox en los tejidos estudiados, surgió la inquietud de evaluar si el estrés y el daño oxidativo provocado por la administración de agroquímicos resultaba lo suficientemente severo como para desencadenar eventos de muerte celular. Como mencionamos antes, el estrés oxidativo ha sido ampliamente implicado en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer entre muchas otras (Halliwell y Gutteridge, 1999; Stewart y Heales, 2003; Chong et al., 2005). Además, la pérdida de la función mitocondrial ha sido también asociada a estas enfermedades humanas, tal vez por ser el cerebro particularmente dependiente de la energía producida por la mitocondria para desarrollar sus funciones (Pope et al., 2008). En esta serie de experimentos aplicamos el mismo modelo experimental analizando los efectos del tratamiento en hígado y en dos regiones cerebrales, sustancia nigra (zona implicada en la patogénesis de la PD) y corteza cerebral inmediatamente adyacente.

Durante la última década, el rol de la mitocondria en el proceso de muerte celular por apoptosis ha sido foco de numerosas investigaciones. El potencial de membrana mitocondrial interna ( $\Delta\Psi$ ) se altera durante este proceso y muchas proteínas mitocondriales se liberan al citosol durante los eventos iniciales de la apoptosis, de este modo, la mitocondria orquesta las fases desencadenantes de la muerte celular programada (Ricci et al., 2003; Von Ahsen et al., 2000; Jackson et al., 2002). En nuestro sistema experimental demostramos alteraciones en la integridad de la membrana mitocondrial interna con disminución del potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) para todos los tejidos estudiados y para todos los grupos tratados. Sin embargo, la integridad de la membrana mitocondrial externa solo se mostró alterada en el tejido más sensible al estrés oxidativo (SN) y en el grupo tratado con la mezcla de los tres plaguicidas (tratamiento más agresivo). Estos resultados coinciden con los de otros estudios que demuestran que la vía apoptótica puede iniciarse sin disrupción de la membrana mitocondrial externa (Petrosillo et al., 2003; Von Ahsen et al., 2000).

La liberación del citocromo c (Cyto c) de la mitocondria ha sido señalado como el evento central en la inducción de la cascada apoptótica (Petrosillo et al., 2003; Jackson et al., 2002). El mecanismo por medio del cual ocurre esta liberación no está dilucidado por completo aún, pero evidencias irrefutables indican que estaría mediado por ROS (Fernández-Checa, 2003). El Cyto c en la mitocondria permanece unido al fosfolípido ácido cardiolipina (CL). Como hemos ya mencionado, este glicerolípido es muy abundante en la membrana mitocondrial interna y resulta indispensable no solo para la función del Cyto c, sino también para la mayoría de los complejos respiratorios mitocondriales (Iverson y Orrenius, 2004; Shidoji et al., 1999). La unión de Cyto c a la CL es muy estrecha, aparentemente irreversible y estequiométrica (Paradies et al., 2000; Paradies et al., 2002; Pfeiffer et al., 2003). A diferencia de otros fosfolípidos, la

CL es dimérica con cuatro cadenas de ácidos grasos esterificados y se halla ubicada en la MMI cercana al sitio de mayor producción de ROS (Jackson et al., 2002). Además es particularmente rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y como consecuencia resulta altamente susceptible al ataque oxidativo. El grado de insaturación de la CL se mantiene gracias a un proceso de remodelación constante que involucra a la mitocondria y al retículo endoplásmico (Esposti, 2002; Van der Berg et al., 1993; Hatch et al., 1993; Schlame y Rüstow, 1990; Jackson et al., 2002). Se ha visto que las disminuciones en el contenido de CL dan lugar a la liberación de Cyto c de la mitocondria durante el inicio de la muerte por apoptosis, debido al daño oxidativo o a la alteración de la vía biosintética (Petrosillo et al., 2001; Shidoji et al., 1999). De hecho muchos autores han establecido una correlación lineal significativa entre la disminución de los niveles de CL y la liberación de Cyto c (Petrosillo et al., 2003; Petrosillo et al., 2001; Ostrander et al., 2001; McMillin y Dowhan, 2002; Ott et al., 2002). En nuestro trabajo demostramos que la concentración de CL disminuye significativamente en las mitocondrias de hígado y cerebro para todos los grupos tratados en comparación con el control, siendo más significativa en el cerebro (60 % respecto al valor control en ambas regiones, sustancia nigra y corteza) que en el hígado (aproximadamente 30 % de disminución con respecto al valor control). Estos resultados pueden explicarse por el análisis de la composición de las cadenas acilo de la CL de hígado y de cerebro. En tejidos como el hígado, riñón, corazón y músculo esquelético, la forma predominante de la CL es la tetralinoleoil-CL [CL-(18:2n-6)<sub>4</sub>], conteniendo además grandes porcentajes de ácidos grasos saturados (16:0, 18:0) y 20:4 con un índice de insaturación bajo ( $30.1 \pm 5.8$ ). Por el contrario hemos probado que la CL de cerebro contiene especies moleculares más peroxidables tales como 20:4 n-6, 22:5 n-3 y n-6 y 22:6 n-3, con un índice de insaturación mucho mayor de  $135.8 \pm 18.4$ . Estos resultados coinciden con evidencia experimental previa generada en otros grupos

de trabajo (Kagan et al., 2006; Bayir et al., 2007), y podrían ser la razón por la cual la CL de cerebro es más susceptible a la peroxidación. El análisis de la formación de peróxidos lipídicos en las mitocondrias de estos tejidos dio como resultado mayores niveles de MDA en las mitocondrias provenientes de animales tratados con la combinación de las tres drogas, sugiriendo así, que la peroxidación podría estar involucrada en la disminución de los niveles mitocondriales del fosfolípido. Estos resultados también coinciden con lo hallado por otros autores (Shidoji et al., 1999; Petrosillo et al., 2001; Sen et al., 2006; Kirkland et al., 2002; Petrosillo et al., 2009).

Según este escenario, la alteración de la integridad de la MMI podría llevar a la liberación de proteínas mitocondriales al citosol y activar cascadas de proteasas inductoras de apoptosis, razón por la cual esperábamos un aumento de la actividad de caspasa-3 (enzima efectora de la cascada apoptótica). Sin embargo, no observamos cambios significativos en la actividad de esta enzima en ninguno de los tejidos estudiados. En contraste, pudimos comprobar un aumento en la actividad de las mili-calpaínas en ambas regiones cerebrales, especialmente en los grupos tratados con mezclas de agroquímicos.

Durante estos últimos años numerosos indicios sugieren que varios mecanismos de muerte celular, así como también la interrelación entre ellos, contribuyen a la neurodegeneración (Artal-Sanz y Tavernarakis, 2005). La gran similitud entre los sustratos de las caspasas y de las calpaínas incrementan las posibilidades de que ambas familias de proteasas contribuyan a la pérdida de neuronas característica de los desórdenes neurodegenerativos (Raynaud y Marcilhac, 2006).

Se ha demostrado que las caspasas son capaces de regular la actividad de las calpaínas modificando la actividad de calpastatina (inhibidor endógeno de las calpaínas) mediante proteólisis. Varios estudios recientes también sugieren que las calpaínas pueden clivar caspasas endógenas tales como las caspasas -3, -7, -8 y -9. Existen numerosas (y

complejas) relaciones entre ambas familias de proteasas, pero los mecanismos exactos permanecen poco claros aún (Chong et al., 2005; Chen et al., 2006; Chua et al., 2000; Wang et al., 1998; Bizat et al., 2003a). En el SNC estos dos sistemas proteolíticos podrían ser interdependientes, dificultando aún más la interpretación de sus interacciones (Samantaray et al., 2007). En nuestro modelo experimental es probable que las calpaínas hayan interferido con la activación de las caspasas por clivaje de las iniciadoras o efectoras. Por otra parte, la activación predominante de las calpaínas en lugar de las caspasas coincide con lo reportado por otros autores en modelos de injuria crónica tanto *in vivo* como *in vitro* (Bizat et al., 2003a; Bizat et al., 2003b; Galas et al., 2004).

Los niveles de ATP (Eguchi et al., 1997) y el estado redox celular (Orrenius, 2004) parecen ser factores determinantes en la activación de las vías dependientes de caspasas y en el desarrollo del proceso apoptótico (Chandra et al., 2000). En este sentido, nosotros observamos que los niveles mitocondriales de GSH son menores en los grupos tratados con la combinación de los tres plaguicidas que en el control tanto en hígado como en ambas regiones cerebrales. El grupo liderado por Orrenius (2004) indicó que una gran variedad de tóxicos pueden influenciar la velocidad de apoptosis incrementando los niveles de GSSG. Asimismo, el glutatión oxidado puede inhibir la proteólisis y activación de la caspasa-3, sugiriendo que su actividad dependería del mantenimiento del estado redox de los tioles (Orrenius, 2004). Recientemente se demostró que el peróxido de hidrógeno suprime tanto la activación como la actividad de las caspasas, posiblemente a través de la modulación del estado redox celular y de la oxidación de los residuos de cisteína de estas enzimas (Chandra et al., 2000). A estos hechos debe agregársele que en presencia de  $\text{NO}^{\bullet}$  se generan grupos S-nitrosilados (Choi et al., 2002).

Observamos que el tratamiento con plaguicidas (especialmente en aquellos grupos que reciben mezclas) induce la fragmentación del DNA el cual es uno de los principales

criterios utilizados para definir el tipo de muerte celular (Bortner et al., 1995). El patrón de *laddering* que caracteriza la activación de la vía apoptótica es difícil de detectar y en nuestro caso observamos en todos los tejidos analizados evidencia de fragmentación, siendo más notable en el hígado que en el cerebro. En el hígado justamente la actividad de caspasa-3, mili- y micro- calpaínas no se modificó. Para explicar este hallazgo deberíamos considerar el papel de este órgano en el proceso de neutralización de la noxa, pues el hígado es el tejido blanco que recibe en primera instancia a los tóxicos y seguramente debe estar en contacto con cantidades mayores que el cerebro. Resultados previos de otros laboratorios demuestran que la activación de calpaínas está involucrada en la fragmentación del DNA (Rami et al., 2000). Sin embargo nos inclinamos a pensar que los cambios en la fragmentación del DNA en el hígado podrían sugerir un efecto directo de los agrotóxicos en lugar de una acción indirecta que involucre una activación previa de las calpaínas. En suma, resulta indudable que el DNA se daña por el tratamiento experimental; sin embargo, estos resultados merecen una investigación más detallada porque -al menos en el hígado- el patrón de fragmentación del DNA podría ocurrir por una combinación de factores diferentes a la activación de las calpaínas o de las caspasas (Griffiths et al., 2002), e incluso podría deberse en cierta medida a necrosis además de apoptosis. Este último punto de vista estaría sustentado por las imágenes obtenidas a partir de los cortes histológicos de hígado observados al microscopio óptico. En especial por la presencia de lesiones focales donde pudieron observarse células con núcleos picnóticos y citoplasmas claros y desorganizados sugiriendo alteración de la arquitectura celular. Esto a su vez coincide con el aumento de la actividad plasmática de transaminasas y  $\gamma$ -GT en el grupo tratado con la mezcla de los tres agroquímicos. Otros autores como Benedetti et al. (2004) han encontrado alteraciones hepáticas en ratas tratadas con glifosato, aunque en dosis mas elevadas como 1/100 y 1/10 de la  $DL_{50}$ . Caglar y Kolankaya (2008) también



encontraron lesiones focales en secciones de tejido hepático con dosis similares a las utilizadas por Benedetti y colaboradores. Ambos grupos hallaron deposición de fibras de colágeno tipo III al utilizar las concentraciones más altas de este agroquímico (10 veces menores a la  $DL_{50}$ ). Por otro lado, Sayim (2007) y Sharma et al. (2005b) encontraron que la administración de dimetoato en dosis muy similares a las utilizadas en este trabajo producían infiltración de células mononucleares, congestión y daño hepatocelular, con vacuolización del citoplasma y degeneración nuclear. Al presente, no están disponibles trabajos que evalúen el efecto de zineb sobre el tejido hepático.

Teniendo en cuenta los datos bibliográficos y los resultados obtenidos, podríamos sugerir que para las dosis de agroquímicos utilizadas y para el tiempo de tratamiento de los animales implementado en este trabajo, las lesiones se deberían principalmente a la presencia de D en las mezclas.

El daño tisular se observó a nivel del hígado y del riñón, pero con la técnica convencional utilizada no se evidenció alteración alguna en el tejido cerebral. Esto podría explicar la ausencia de daño al DNA en ambas regiones cerebrales, tomando fuerza la hipótesis que plantea que este tejido recibe una dosis de agroquímicos muy inferior a la que reciben el hígado y el riñón ambos encargados del metabolismo y la eliminación de los xenobióticos.

## CONCLUSIONES PARCIALES

En síntesis los resultados presentados en este capítulo demuestran que:

- El estrés oxidativo y el daño desencadenado es más evidente en el caso del tratamiento combinado con agroquímicos.
- Los agroquímicos investigados generan incremento de la peroxidación de lípidos, carbonilación de restos de aminoácidos de proteínas, formación suprafisiológica de nitritos y disminución sustancial de antioxidantes de bajo peso molecular como el  $\alpha$ -tocoferol con oxidación concomitante de GSH.
- El estrés y daño oxidativo generados por los agrotóxicos es suficiente para activar vías de muerte celular.
- El daño oxidativo es mayor para la región del cerebro implicada en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (SN).

- La condición de estrés oxidativo inducida por los agroquímicos podría ser responsable de la activación de las calpaínas en lugar de las caspasas contribuyendo al descubrimiento de una señal de muerte activada por este tipo de noxas.

Estos resultados serían útiles para clarificar el rol de los pesticidas, y de los agroquímicos en general, en la etiología de enfermedades neurodegenerativas humanas y podrían ser relevantes en la identificación de posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de dolencias en cuya etiología se sospeche la intervención de xenobióticos como los aquí investigados.

## **CAPÍTULO II**

**Efecto protector del ácido lipoico  
frente al estrés oxidativo asociado a la  
administración de agroquímicos.**

## INTRODUCCIÓN

Tal como quedó demostrado en el Capítulo I de este trabajo de tesis, el tratamiento de ratas Wistar machos con mezclas de plaguicidas provoca un desbalance en el sistema redox a nivel sistémico. El objetivo ahora será evaluar el posible efecto antioxidante o protector del ácido lipoico (LA).

Desde el punto de vista de su posible uso terapéutico, el ácido lipoico cumple con varias de las características de un antioxidante “ideal”: (a) se absorbe con la dieta rápidamente, (b) se convierte en las células de todos los tejidos en su forma más activa (ácido dihidrolipoico, DHLA), (c) puede desempeñar una variedad de acciones como antioxidante incluyendo la interacción con otros antioxidantes tanto en el compartimiento celular acuoso como en el lipídico, y (d) tiene baja toxicidad (Packer y Tritschler, 1996; Holmquist et al., 2007).

Los antioxidantes que se acumulan en el cerebro y en el tejido neuronal son candidatos a ser utilizados en la terapia de aquellos desórdenes neurológicos en los que está involucrado el estrés oxidativo (Packer et al., 1995). Varios autores han demostrado que el ácido lipoico es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica (Panigrahi, et al., 1996; Packer et al., 1997; Seaton et al., 1996; Gilgun-Sherki et al., 2001), no como LA sino como DHLA (Chng, et al., 2008).

Tanto la forma oxidada del ácido lipoico como la reducida muestran propiedades antioxidantes *in vitro* pues neutralizan  $RO_2^{\cdot}$ , HOCl,  $OH^{\cdot}$ , ONOOH,  $O_2^{\cdot-}$  (sólo DHLA) y oxígeno singlete. Además pueden unir Fe y Cu transformándolos en formas poco reactivas desde el punto de vista de la generación de ROS. Tal como ya mencionamos en la parte introductoria general, el ácido dihidrolipoico (DHLA) es un agente reductor muy poderoso ( $E^0$  -0.32 V para la cupla DHLA/ácido lipoico) que puede reducir GSSG a GSH ( $E^0$  -0.24 V) (Holmquist et al., 2007), dihidroascorbato a ascorbato y regenerar  $\alpha$ -tocoferol a partir del radical tocoferilo directamente o a través del ascorbato (Kagan et al., 1992). Además, se ha visto que la administración de ácido lipoico revierte algunos de los efectos producidos por la deficiencia de  $\alpha$ -tocoferol y vitamina C en roedores (Rosenberg y Culik, 1959). El ácido dihidrolipoico es capaz de reciclar la mayoría de los restantes antioxidantes celulares, tales como tioredoxina y ubiquinol (Packer et al., 1997; Han et al., 1995; Marangon et al., 1999), además de mejorar las actividades antioxidantes de las enzimas del sistema de defensa como la CAT, SOD, GPx, GST, glucosa-6-P deshidrogenasa (Arivazhagan et al., 2000) (**Figura 23**).

**Figura 23.** Vías de regeneración de  $\alpha$ -tocoferol y otros antioxidantes oxidados, por el ácido lipoico.

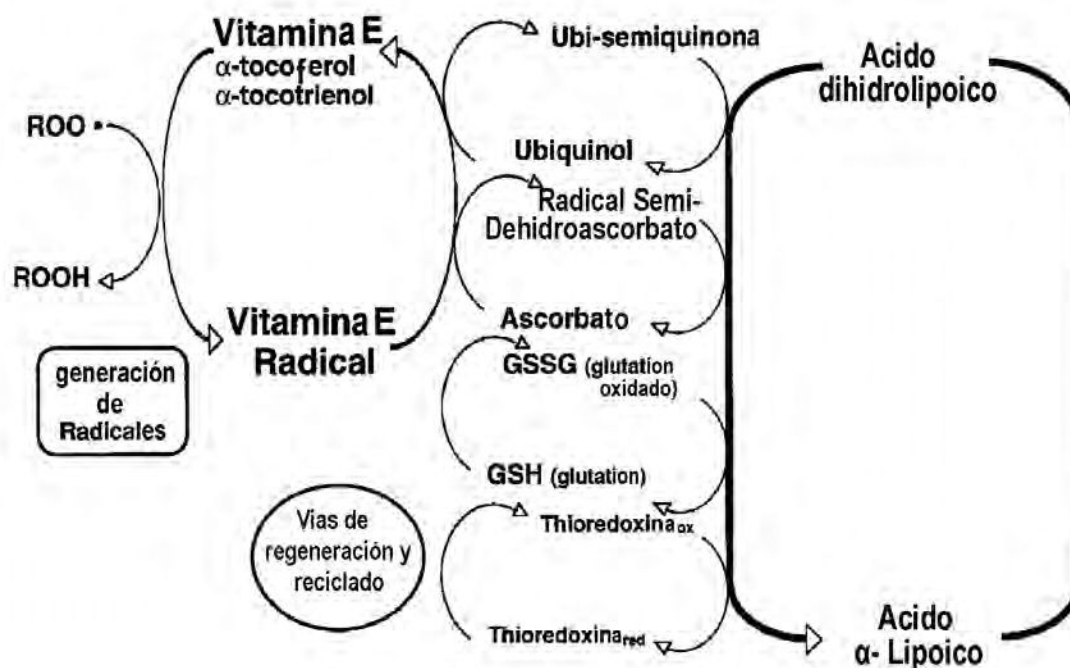


Figura tomada de Packer et al., 1997. Muestra la capacidad del DHLA para regenerar antioxidantes tanto en el compartimiento lipofílico como en el hidrofílico.

Cremer et al., en 2006 realizaron un estudio de seguridad a largo plazo del consumo de ácido  $\alpha$ -lipoico en ratas de la cepa Spargue-Dawley. Les administraron ácido lipoico en diferentes dosis (20, 60 y 180 mg/Kg de peso corporal), durante un total de dos años y determinaron parámetros hematológicos y bioquímicos en plasma y orina, realizaron necropsia completa que incluyó la observación de la superficie corporal externa y de las cavidades abdominal, torácica y craneal, además de exámenes histológicos exhaustivos de órganos internos, tanto a los 12 como a los 24 meses de tratamiento. No observaron efectos adversos con dosis de 20 y 60 mg/Kg de peso, tampoco potencial carcinogénico para ninguna de las dosis utilizadas. El único efecto relacionado con el tratamiento resultó ser una disminución de la ganancia de peso corporal en las ratas tratadas con 180

mg/Kg de peso. Esta observación puede ser atribuida al efecto anti-obesidad del ácido lipoico reportado previamente por Kim et al., en 2004; ya que no se debió a toxicidad sistémica o a alguna otra enfermedad metabólica causada por el tratamiento (Cremer et al., 2006).

Los numerosos trabajos que indican tanto su bioseguridad como sus capacidades antioxidantes, lo convierten en un candidato óptimo para su uso como suplemento dietario. Por estas razones hemos decidido utilizarlo para evaluar su capacidad en la prevención o reversión de los daños provocados por la administración sub-crónica de agrotóxicos.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Esquema de tratamiento

Reproduciendo las condiciones descritas en los protocolos anteriores, se utilizaron ratas Wistar machos de  $190 \pm 20$  gr libres de patógenos, adaptados al ambiente del bioterio una semana antes de comenzar el tratamiento. Durante el desarrollo del experimento se mantuvo a los animales en condiciones controladas de temperatura ( $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3$ ) e iluminación, con un foto-período normal de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Las ratas fueron alimentadas con Purina Chow provista por Ganave Co. (Santa Fe, Argentina) y agua *ad libitum*, evaluadas clínicamente (Moser et al., 2006) y pesadas todas las semanas a lo largo del experimento. Se trataron 10 lotes de animales, cada uno integrado por 4 ratas.

El experimento consistió en dos fases de tratamiento. Se eligió como tratado

(T) al grupo ZGD (mezcla de los tres agroquímicos) que mostró, según los resultados del Capítulo I, ser el tratamiento más agresivo y por otra parte el que representaba de forma más realista la situación de intoxicación sub-clínica con mezclas de múltiples agrotóxicos.

El objetivo de la **FASE I** fue evaluar el efecto protector del ácido lipoico administrado en dosis de 50 y 100 mg/Kg de peso, sobre el daño oxidativo a lípidos y proteínas tisulares provocados por la administración sub-crónica de zineb (Z), glifosato (G) y dimetoato (D), según lo ya detallado. Los grupos fueron tratados por 5 semanas, los llamaremos "I". A continuación explicaremos en detalle el protocolo experimental que se siguió y lo resumiremos luego en la **Tabla 19**.

Grupo **CONTROL I (C I)**: los animales no fueron inyectados y se sacrificaron a las 5 semanas de iniciado el experimento.

Grupo **LIPOICO 50 mg/Kg de peso corporal (CL 50)**: se trataron con LA 50 mg/Kg de peso corporal disuelto en solución fisiológica con 0.5 % de NaOH, por vía i.p. 5 veces por semana durante 5 semanas, y se sacrificaron al finalizar ese período.

Grupo **LIPOICO 100 mg/Kg de peso corporal I (CL 100 I)**: se trataron con LA 100 mg/Kg de peso corporal disuelto en solución fisiológica con 0.5 % de NaOH i.p., 5 veces por semana por 5 semanas y se sacrificaron al finalizar ese período.

Grupo **TRATADO I (T I)**: se trataron con la mezcla de plaguicidas preparada en el momento de la inyección disuelta en PEG-400 como vehículo y conformada por 15 mg/Kg de peso corporal (pc) de zineb (Z), 10 mg/Kg de pc de glifosato (G) y 15 mg/Kg de pc de dimetoato (D) i.p., 3 veces por semana por 5 semanas, sacrificando los animales al finalizar ese período.

Grupo **TRATADO + LIPOICO 50 mg/Kg de peso corporal (TL 50)**: se trataron con la misma mezcla de agroquímicos que la descrita para el grupo T I y con el mismo

esquema de inyección pero se inyectó simultáneamente LA 50 mg/Kg de peso corporal disuelto en solución fisiológica con 0.5 % de NaOH, i.p. 5 veces por semana por 5 semanas. Los animales se sacrificaron al finalizar ese período.

Grupo **TRATADO + LIPOCO 100 mg/Kg de peso I (TL 100 I)**: los animales se trataron en forma idéntica a la descrita para el grupo anterior (TL 50) solo que la dosis de LA fue de 100 mg en lugar de 50 mg/Kg de peso corporal.

**Tabla 19.** Resumen de lotes experimentales: dosis de drogas empleadas y tratamiento en **FASE I.**

<b>LOTES EXPERIMENTALES</b>	<b>TRATAMIENTO</b>
Control I ( <b>C I</b> )	Sin inyección intraperitoneal
Lipoico 50 ( <b>CL50</b> )	i.p. 50 mg/Kg de LA 5 veces por semana
Lipoico 100 I ( <b>CL100 I</b> )	i.p. 100 mg/Kg de LA 5 veces por semana
Tratado I ( <b>T I</b> )	i.p. $\Sigma$ [15 mg/Kg Z + 10 mg/Kg G + 15 mg/Kg D] 3 veces por semana
Tratado + Lipoico 50 ( <b>TL50</b> )	i.p. $\Sigma$ [15 mg/Kg Z + 10 mg/Kg G + 15 mg/Kg D] 3 veces por semana + 50 mg/Kg de LA 5 veces por semana
Tratado + Lipoico 100 I ( <b>TL100 I</b> )	i.p. $\Sigma$ [15 mg/Kg Z + 10 mg/Kg G + 15 mg/Kg D] 3 veces por semana + 100 mg/Kg de LA 5 veces por semana

Los animales fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) cuidando de no lesionar órganos de la cavidad abdominal empleando jeringas descartables apirógenas, esterilizadas y agujas atraumáticas (BD 0.30x13 30G ½). El régimen de inyección fue de 3 o 5 veces por semana durante un total de 5 semanas según se tratara de la mezcla de agroquímicos o de LA, respectivamente.

El objetivo de la **FASE II** fue evaluar si luego del cese de la exposición a los agrotóxicos el ácido lipoico era capaz de restablecer el balance redox y generar las condiciones adecuadas para la reparación del daño oxidativo instaurado. En esta fase solo se utilizó la dosis más alta de LA (100 mg/Kg de peso). Los grupos fueron tratados por 10 semanas, los llamaremos "II".

A continuación explicaremos en detalle el protocolo de tratamiento que resumiremos más adelante en la **Tabla 20**.

Grupo **CONTROL II (C II)**: los animales no se inyectaron y se sacrificaron a las 10 semanas de iniciado el experimento.

Grupo **LIPOICO 100 mg/kg de peso corporal II (CL 100 II)**: las ratas se trataron con LA 100 mg/Kg de peso corporal disuelto en solución fisiológica con 0.5 % de NaOH, i.p. 5 veces por semana por 10 semanas, y se sacrificaron al finalizar ese período.

Grupo **TRATADO II (T II)**: los animales se trataron con la mezcla de agroquímicos preparada en el momento de la inyección y disuelta en PEG-400 como vehículo a razón de 15mg/Kg de peso corporal (pc) de zineb (Z), 10 mg/Kg de pc de glifosato (G) y 15 mg/Kg de pc de dimetoato (D), i.p. 3 veces por semana por 5 semanas. Transcurrido este tiempo, los animales permanecieron sin ser inyectados hasta cumplidas las 10 semanas, momento en el que fueron sacrificados.

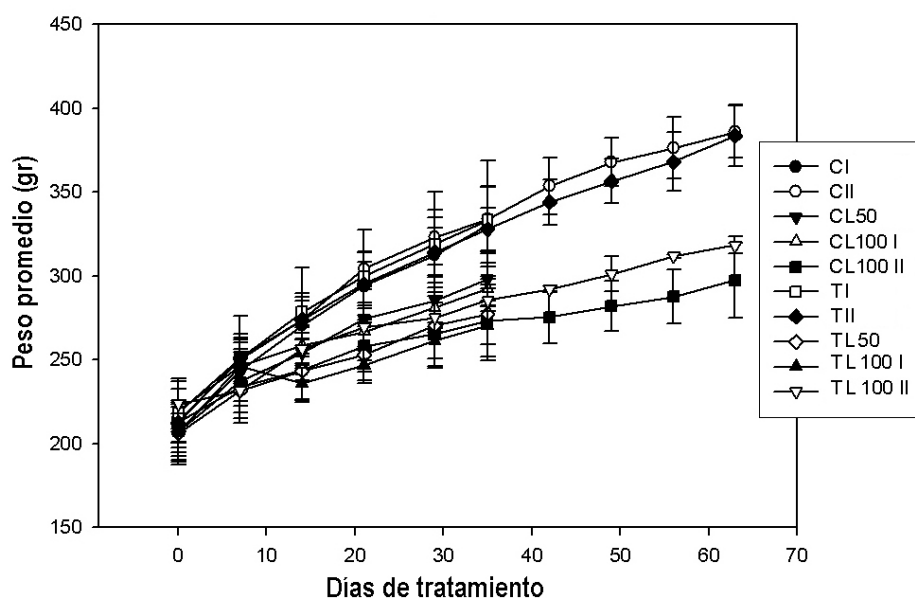
Grupo **TRATADO + LIPOCO 100 mg/Kg de peso corporal II (TL 100 II)**: las ratas se trataron con la misma mezcla de agroquímicos que el grupo T II por vía i.p. 3 veces por semana durante 5 semanas, y al mismo tiempo con ácido lipoico 100 mg/Kg de peso corporal disuelto en solución fisiológica con 0.5 % de NaOH, i.p. 5 veces por semana por 10 semanas. Se sacrificaron al finalizar ese período.

**Tabla 20.** Resumen de lotes experimentales: dosis de drogas empleadas y tratamiento en **FASE II.**

LOTES EXPERIMENTALES	TRATAMIENTO
Control II ( <b>C II</b> )	Sin inyección intraperitoneal
Lipoico 100 II ( <b>CL100 II</b> )	i.p. 100 mg/Kg de LA 5 veces por semana
Tratado II ( <b>T II</b> )	i.p. $\Sigma$ [15 mg/Kg Z + 10 mg/Kg G+ 15 mg/Kg D] 3 veces por semana
Tratado + Lipoico 100 II ( <b>TL100 II</b> )	i.p. $\Sigma$ [15 mg/Kg Z + 10 mg/Kg G+ 15 mg/Kg D] 3 veces por semana + 100 mg/Kg de LA 5 veces por semana

Los animales fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) cuidando de no lesionar órganos de la cavidad abdominal empleando jeringas descartables apirógenas, esterilizadas y agujas atraumáticas (BD 0.30x13 30G ½). El régimen de inyección fue de 3 o 5 veces por semana (agrotóxicos o LA respectivamente) durante las primeras 5 semanas. Durante las siguientes 5 semanas solo se inyectó LA 5 veces por semana en las dosis indicadas.

Estudios previos de otros laboratorios han establecido dosis, tiempos de exposición y vías de administración similares a los aquí empleados como modelo válido para simular una intoxicación sub-crónica. (John et al., 2001; Nielsen et al., 2006; Bolognesi y Morasso, 2000; Patel et al., 2006; Sivapiriya et al., 2006; Cremer et al., 2006; Arivazhagan et al., 2000; Prahalathan et al., 2006; Shila et al., 2005). Los animales fueron alimentados y tratados de acuerdo con estándares internacionales (Reeves et al., 1993). Se llevó una curva de crecimiento para cada animal dentro de cada lote de modo de mantener la proporción de la inyección en forma equivalente al peso corporal y controlar la evolución de este parámetro durante el tratamiento experimental (**Figura 24**).

**Figura 24.** Evolución del peso corporal en los lotes experimentales.

Los animales se pesaron al inicio de cada semana del experimento. El gráfico muestra la evolución del peso corporal en función de los días del tratamiento para todos los grupos experimentales.

### Colección de muestras

Finalizado el período de exposición de 5 (**Fase I**) o 10 (**Fase II**) semanas según corresponda, los animales fueron sacrificados por decapitación rápida con guillotina y se colectaron las muestras que se detallan a continuación.

### Hígado

Se tomaron muestras representativas de hígado, que se homogenizaron sobre lecho de hielo, empleando buffer fosfato de sodio 140 mM, pH 7.40, con EDTA sódico 6 mM, en una proporción de 3 ml de buffer por cada gramo de tejido. El homogenato resultante se utilizó para las determinaciones de daño oxidativo.

### Cerebro

Una vez obtenidos los cerebros, se disectaron las regiones de sustancia nigra (SN)

y corteza (CC) de localización contigua a la SN siguiendo lo indicado en el Atlas Paxinos & Watson (1998). Se homogenizaron sobre lecho de hielo con buffer fosfato de sodio 140 mM pH 7.40, adicionado con EDTA sódico 6 mM. El homogenato resultante se utilizó para las determinaciones de daño oxidativo.

## **Riñón**

Los riñones se extrajeron, decapsularon, y se homogenizaron sobre lecho de hielo con buffer fosfato de sodio 140 mM, pH 7.40, adicionado con EDTA sódico 6 mM, en una proporción de 3 ml de buffer por cada gramo de tejido. Los homogenatos se utilizaron en la determinación de los biomarcadores de daño oxidativo.

## **Determinaciones**

### **1. Biomarcadores de daño oxidativo**

#### **1.1. TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico)**

#### **1.2. Carbonilos proteicos**

### **2. Proteínas totales por el método de Bradford**

Técnicas ya descritas en la sección metodológica del Capítulo I.

## **Estadística**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el desvío estándar (DS) y se analizaron estadísticamente mediante ANOVA (análisis de varianza), empleando el software de *GB-STAT Professional Statistics Program* (version 8.0) de Dynamic Microsystems Inc. (Silver Springs, MD., USA), seguido por test de Tukey de comparación múltiple. La graficación científica se efectuó mediante *Sigma Plot Scientific Graphing Software* (version 8.0) de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO. USA). En todos los casos la hipótesis nula fue rechazada

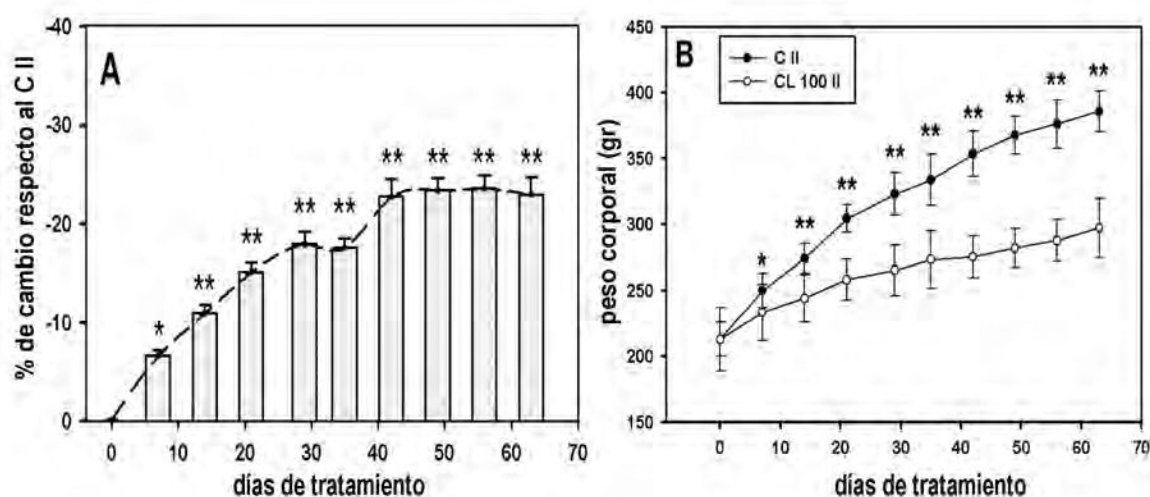
para un  $p < 0.05$  ó  $0.01$  que correspondieron a diferencias *significativas* o *muy significativas*, respectivamente. A fin de simplificar la presentación y comparación de resultados, se los expresó como porcentaje de cambio respecto al control  $[(X-C).100]/C$  siendo X el lote testado y C el lote control. En todos los casos se mantuvo la desviación estándar como medida de dispersión.



## RESULTADOS

Los lotes tratados con 100 mg/Kg de peso de ácido lipoico mostraron una disminución significativa de la ganancia de peso corporal (**Figura 25**). Se registró una caída de entre el 10 y el 20 % a partir del día 14 que se mantuvo constante desde el día 40 hasta el final del tratamiento (**Figura 25 A**). Una diferencia de idéntica magnitud se observó para los grupos tratados (T vs TL100 II). Cuando se aplicó la dosis de ácido lipoico de 50 mg/Kg de peso, se observaron diferencias en la ganancia de peso corporal menores al 8 %, tanto en los grupos controles como en los tratados con la mezcla de los plaguicidas (datos no mostrados).

**Figura 25.** Diferencias en la ganancia de peso corporal entre lotes experimentales. (A) Representa el porcentaje de disminución del peso corporal para el grupo CL100 II respecto al C II y (B) representa la evolución de la ganancia de peso en ambos grupos.



Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes. Los valores con diferencias significativas respecto al C II están indicados como \*( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ).

En ambas fases del experimento evaluamos marcadores de daño oxidativo a lípidos (TBARS) y a proteínas (PCOs) por considerar que estas determinaciones reflejan fehacientemente el desbalance entre especies pro-oxidantes y antioxidantes en los tejidos (Halliwell y Gutteridge, 1999; Dalle-Donne et al., 2006). Será la alteración en la integridad de estas macromoléculas la que finalmente afecte a las funciones celulares (Dalle-Donne et al., 2003a).

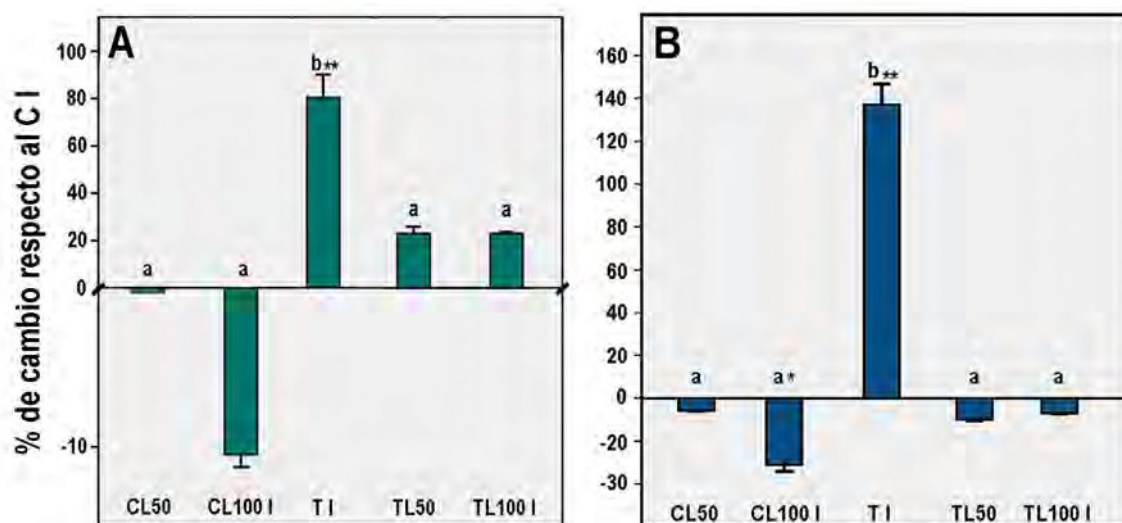
La primera parte del experimento (**FASE I**) consistió en evaluar si la ya reportada capacidad antioxidante del ácido lipoico, era capaz de evitar el daño a lípidos y proteínas provocado por la intoxicación sub-crónica con la mezcla de los tres agrotóxicos (zineb, glifosato y dimetoato) en las 5 semanas de tratamiento, administrándolo en dosis de 50 y 100 mg/Kg de peso en forma conjunta con la noxa.

Medimos el daño oxidativo a lípidos por la técnica de TBARS en hígado, riñón y

en forma diferencial, en la sustancia nigra y en la corteza cerebral adyacente. Tal como observamos en el Capítulo I, la administración de los tóxicos en forma combinada provocó peroxidación lipídica siendo el tejido más afectado el cerebro. En la **Figura 26** (A y B) observamos un aumento de los niveles de MDA en el grupo tratado (T I) con respecto al control (C I) que resultó más importante para la sustancia nigra, zona cerebral implicada en la patogénesis de PD (136 %), que en la región de la corteza cerebral (80 %).

Cuando se trató a los animales solo con ácido lipoico (CL50 y CL100 I) se observó una disminución en la formación basal de peróxidos lipídicos de entre el 15 y el 20 % independientemente de la dosis administrada. En los animales tratados con los agroquímicos y LA en forma conjunta (TL50 y TL100 I) observamos que en ambas regiones cerebrales los niveles de peróxidos lipídicos fueron significativamente ( $p < 0.01$ ) menores en comparación con el grupo tratado (T I) hasta alcanzar niveles que no mostraron diferencias significativas respecto al control (C I) ni al control tratado con LA (CL50 y CL100 I).

**Figura 26.** Niveles de TBARS en homogenatos de corteza cerebral (A) y sustancia nigra (B).

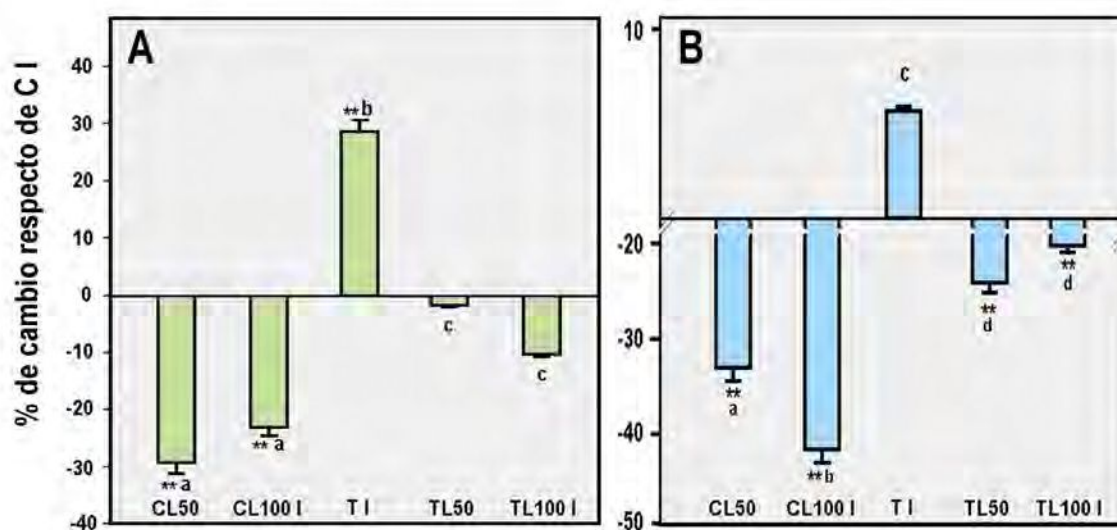


Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes en porcentaje de cambio con respecto al control (C I) en corteza (A) y sustancia nigra (B). Los valores con diferencias significativas con respecto al CI (no mostrado) están indicados como \*( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ). Letras diferentes implican diferencias significativas entre lotes experimentales ( $p < 0.01$ ). CL50: tratado i.p. con LA 50 mg/Kg de peso; CL100 I: tratado i.p. con LA 100 mg/Kg de peso; T I: tratado i.p. con Z+G+D; TL50: tratado i.p. con Z+G+D y LA 50 mg/Kg de peso; TL100 I: tratado i.p. con Z+G+D y LA 100 mg/Kg de peso corporal.

El ácido lipoico administrado en forma simultánea con los tóxicos mostró una notable capacidad para prevenir el daño a los lípidos, aunque este efecto no aparentó ser dosis-dependiente, al menos para este biomarcador y en este tejido.

En el caso del hígado, los niveles de TBARS del grupo T I no resultaron ser significativamente diferentes al control (C I), mientras que en el riñón fueron un 30 % mayores. De manera interesante, en estos tejidos, al igual que en ambas zonas del cerebro, el ácido lipoico administrado en forma simultánea con los agrotóxicos mostró una notable capacidad para prevenir el daño peroxidativo a los lípidos (**Figura 27** A y B).

**Figura 27.** Niveles de TBARS en homogenatos de riñón (A) e hígado (B).

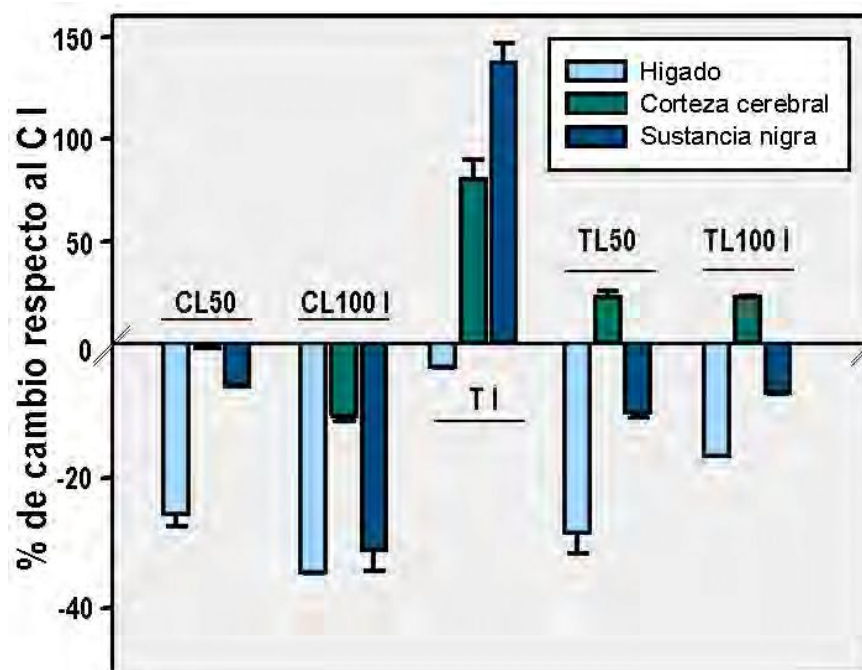


Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes en porcentaje de cambio con respecto al control (C I) en riñón (A) e hígado (B). Los valores con diferencias significativas respecto al CI (no mostrado) están indicados como \*( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ). Letras diferentes implican diferencias significativas entre los lotes experimentales ( $p < 0.01$ ). CL50: tratado i.p. con LA 50 mg/Kg de peso; CL100 I: tratado i.p. con LA 100 mg/Kg de peso; T I: tratado i.p. con Z+G+D; TL50: tratado i.p. con Z+G+D y LA 50 mg/Kg de peso; TL100 I: tratado i.p. con Z+G+D y LA 100 mg/Kg de peso corporal.

Tanto en riñón como en hígado (y a diferencia del cerebro) el antioxidante redujo la formación basal de peróxidos lipídicos en forma estadísticamente significativa.

Al analizar la **Figura 28**, donde se graficaron los niveles de MDA en hígado, corteza y sustancia nigra en forma comparativa expresados como porcentaje de cambio respecto al lote control (C I), resulta evidente la mayor sensibilidad de las regiones cerebrales a la administración combinada de agrotóxicos. Además, quedó claro que en el hígado y en la sustancia nigra el grupo tratado simultáneamente con los agrotóxicos y el antioxidante alcanzó niveles de peróxidos comparables a los del grupo tratado solamente con el antioxidante (CL 50 y CL 100 I).

**Figura 28.** Niveles de TBARS en homogenatos de hígado, corteza cerebral y sustancia nigra, representados en forma comparativa como porcentajes de cambio con respecto al control (C I).

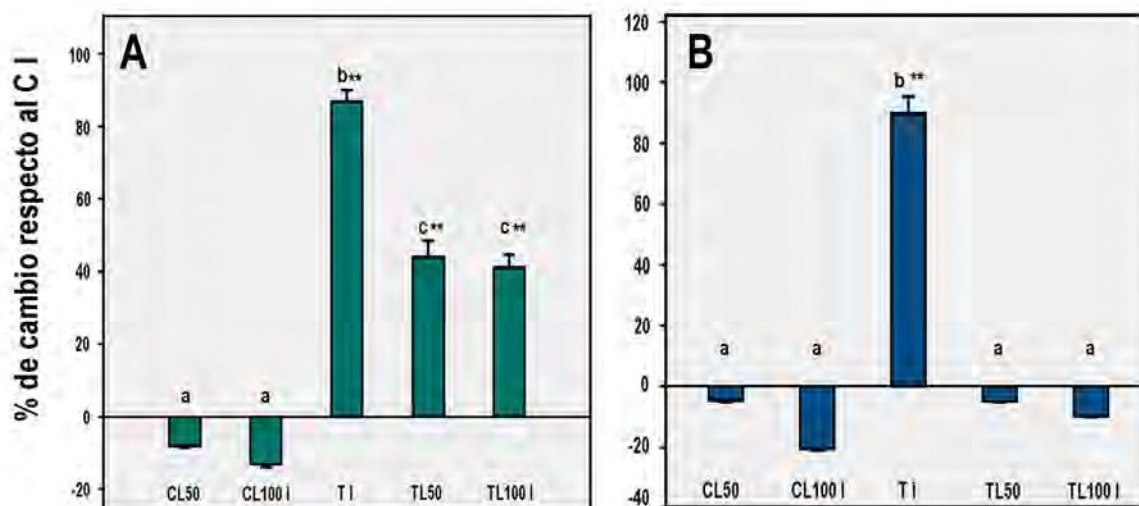


Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes en porcentajes de cambio con respecto al control (C I, no mostrado) en hígado, corteza y sustancia nigra. CL50: tratado i.p. con LA 50 mg/Kg de peso; CL100 I: tratado i.p. con LA 100 mg/Kg de peso; T I: tratado i.p. con Z+G+D; TL50: tratado i.p. con Z+G+D y LA 50 mg/Kg de peso; TL100 I: tratado i.p. con Z+G+D y LA 100 mg/Kg de peso corporal.

Cuando medimos los carbonilos proteicos como biomarcadores de daño a proteínas observamos algo similar a lo que ocurrió con la determinación de los TBARS.

El tratamiento con los agroquímicos provocó oxidación de proteínas en todos los tejidos estudiados, siendo las diferencias altamente significativas en el caso de las dos regiones cerebrales (**Figura 29** A y B) con porcentajes de cambio respecto al control (C I) de entre el 80 y el 100 %.

**Figura 29.** Niveles de carbonilos proteicos (PCOs) en homogenatos de corteza cerebral (A) y sustancia nigra (B).

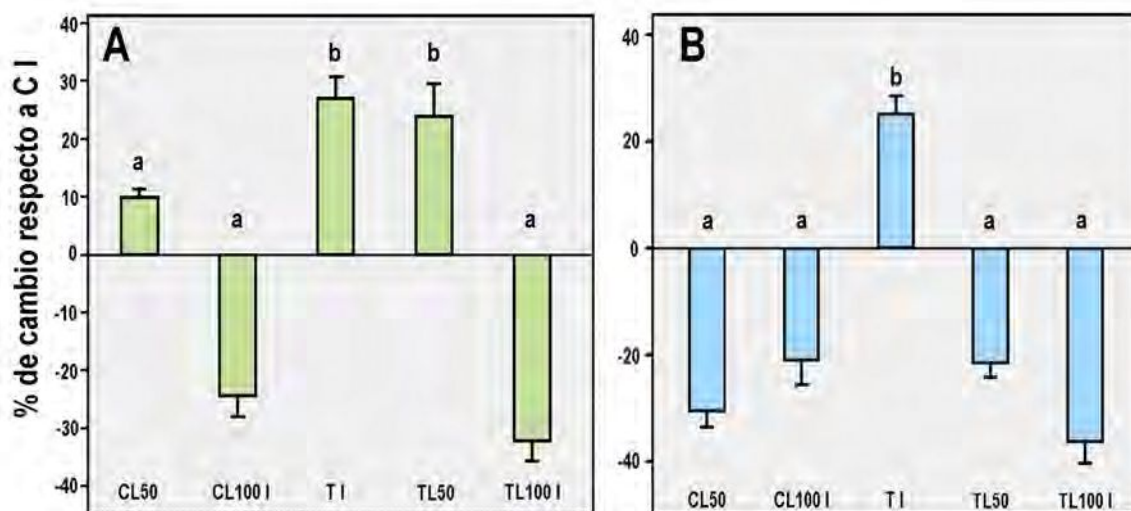


Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes en porcentaje de cambio respecto al control (C I) en corteza (A) y sustancia nigra (B). Los valores con diferencias significativas con respecto al CI (no mostrado) están indicados como \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ). Letras diferentes implican diferencias significativas entre lotes experimentales ( $p < 0.01$ ). CL50: tratado i.p. con LA 50 mg/Kg de peso; CL100 I: tratado i.p. con LA 100 mg/Kg de peso; T I: tratado i.p. con Z+G+D; TL50: tratado i.p. con Z+G+D y LA 50 mg/Kg de peso; TL100 I: tratado i.p. con Z+G+D y LA 100 mg/Kg de peso corporal.

Al igual que ocurrió con la formación de peróxidos lipídicos, la administración de LA disminuyó la oxidación basal de proteínas, logrando valores aún menores que los del control sin tratar para este parámetro. En sustancia nigra, cuando se combinó el tratamiento con plaguicidas con el de ácido lipoico se observó que para ambas dosis (TL50 y TL100 I) la formación de PCOs fue significativamente menor en comparación con el lote tratado ( $p < 0.01$ ), obteniéndose valores comparables -e incluso menores- a los basales. El mismo efecto protector se observó para la corteza cerebral aunque la disminución no resultó tan pronunciada como para SN (no alcanzó a ser indistinguible estadísticamente de los valores basales). En el hígado y en el riñón se observaron tendencias similares (Figuras 30 A y B).



**Figura 30.** Niveles de carbonilos proteicos (PCOs) en homogenatos de riñón (A) e hígado (B).



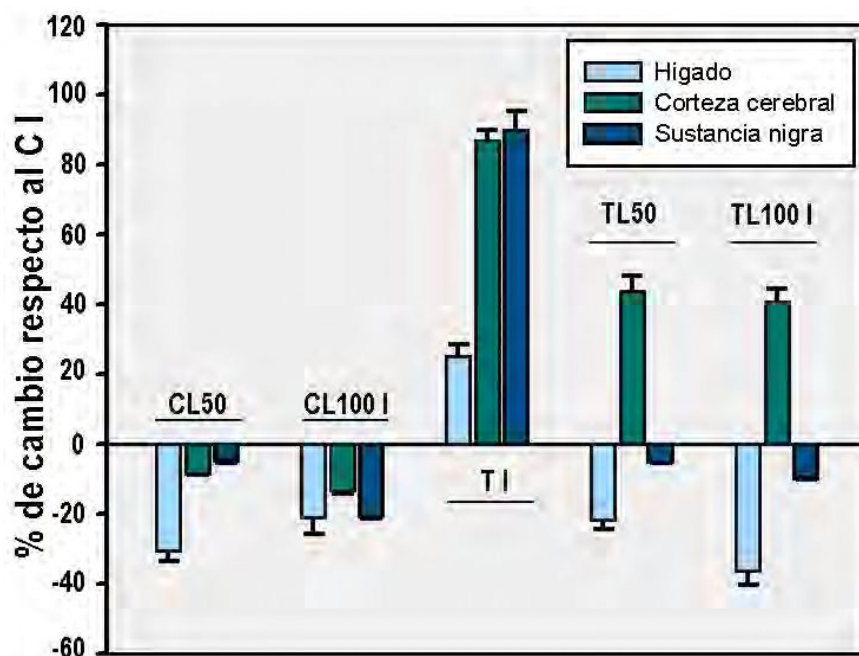
Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes expresados como porcentaje de cambio con respecto al control (C I) para riñón (A) e hígado (B). Letras diferentes implican diferencias significativas entre los lotes experimentales ( $p < 0.01$ ). CL50: tratado i.p. con LA 50 mg/Kg de peso; CL100 I: tratado i.p. con LA 100 mg/Kg de peso; T I: tratado i.p. con Z+G+D; TL50: tratado i.p. con Z+G+D y LA 50 mg/Kg de peso; TL100 I: tratado i.p. con Z+G+D y LA 100 mg/Kg de peso corporal.

En hígado y en riñón se observó un patrón similar al que se obtuvo para la determinación de TBARS. La administración del antioxidante disminuyó los niveles de proteínas oxidadas con respecto a los niveles basales observados para el control (C I). Cuando la administración de la noxa se combinó con la del antioxidante, se obtuvo una respuesta similar a los grupos en los que se administró solo el antioxidante.

Los niveles de PCOs en SN, CC e hígado se compararon, haciéndose evidente que los niveles de proteínas oxidadas estos tejidos son diferentes entre sí, y demostrándose nuevamente la mayor sensibilidad de ambas regiones del cerebro al insulto oxidativo (**Figura 31**).



**Figura 31.** Niveles de carbonilos proteicos en homogenatos de hígado, corteza cerebral y sustancia nigra, representados en forma comparativa como porcentajes de cambio respecto al control.



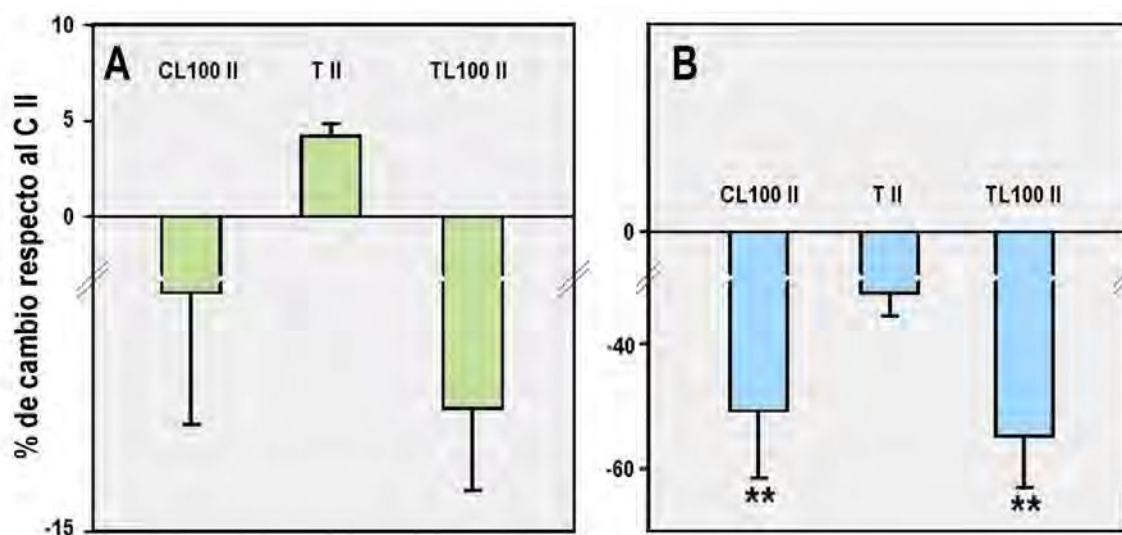
Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes como porcentajes de cambio con respecto al control (C I) en hígado, corteza y sustancia nigra. CL50: tratado i.p. con LA 50 mg/Kg de peso; CL100 I: tratado i.p. con LA 100 mg/Kg de peso; T I: tratado i.p. con Z+G+D; TL50: tratado i.p. con Z+G+D y LA 50 mg/Kg de peso; TL100 I: tratado i.p. con Z+G+D y LA 100 mg/Kg de peso corporal.

Comparando los tres tejidos, el efecto antioxidante protector del ácido lipoico resultó ser mayor en sustancia nigra e hígado que en corteza cerebral. En este último, si bien los niveles de PCOs en TL50 y TL100 I fueron menores a los observados en ausencia del antioxidante (T I), no alcanzaron a los niveles control (C I).

El objetivo de la **FASE II** fue evaluar si luego del cese de la exposición a los agrotóxicos, era necesario administrar ácido lipoico para restablecer el balance redox y generar las condiciones adecuadas para la reparación del daño oxidativo. En esta fase solo se utilizó la dosis más alta de LA con el fin de simplificar el protocolo experimental siendo que aún a esta dosis no se describen efectos indeseables del antioxidante.

En ambas regiones cerebrales, sustancia nigra y corteza, no se observaron diferencias significativas en los niveles de MDA para los grupos CL100 II, T II y TL100 II respecto al C II (datos no mostrados), lo que indicaría que la interrupción de la exposición a agrotóxicos por 5 semanas sería suficiente *per se* para recomponer el daño oxidativo sobre los lípidos. En la **Figura 32** se muestran resultados representativos para hígado y riñón.

**Figura 32.** Niveles de TBARS en homogenatos de riñón (A) e hígado (B) luego de la interrupción del tratamiento con agroquímicos con o sin la administración simultánea de LA.



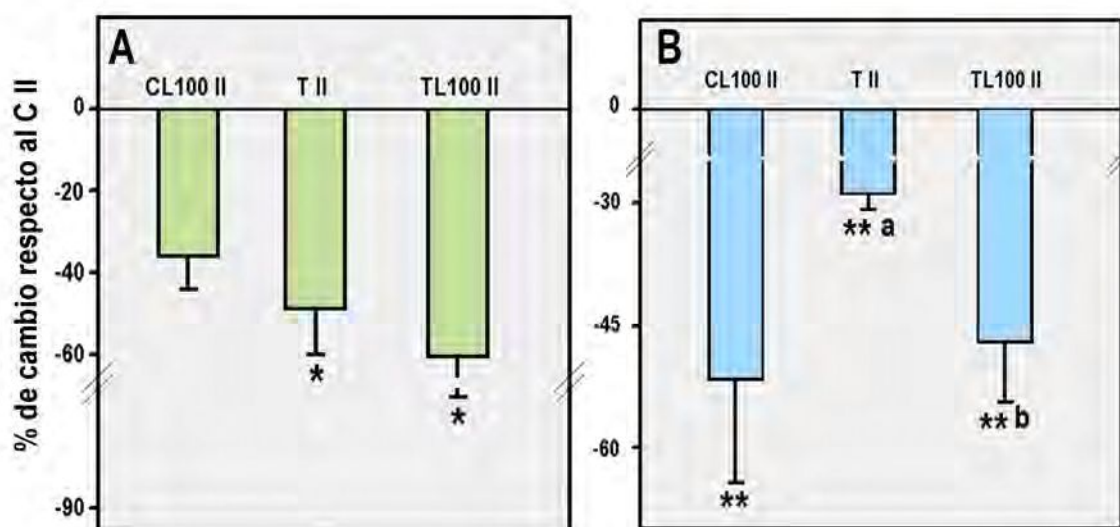
Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes en porcentajes de cambio con respecto al control (C II) en riñón (A) e hígado (B). Los valores con diferencias significativas respecto de C II (no mostrado) están indicados como \*\* ( $p < 0.01$ ). CL100 II: tratado i.p. con LA 100 mg/Kg de peso por 10 semanas; T II: tratado i.p. con Z+G+D por 5 semanas; TL100 II: tratado i.p. con Z+G+D por 5 semanas y LA 100 mg/Kg de peso por 10 semanas.

En ambos tejidos (hígado y riñón) el grupo control tratado con el antioxidante mostró niveles de peróxidos lipídicos por debajo del grupo control sin tratar, adjudicándole al LA un efecto protector sobre la peroxidación lipídica en situaciones basales. El grupo T II no mostró diferencias significativas respecto al control sugiriendo que el daño

oxidativo producido en las primeras 5 semanas de intoxicación puede revertirse durante las siguientes 5 semanas de cese (*wash-out*) del tratamiento. En estos tejidos, el lote tratado con el antioxidante y con la noxa presenta un comportamiento singular. Se observó una disminución significativa de los niveles de peróxidos lipídicos que resultaron ser incluso menores a los del lote control tratado con antioxidante (CL100 II). Podríamos atribuir estas diferencias a la sumatoria del efecto del ácido lipoico administrado, más el producido por el resto de los antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos que podrían haberse inducido durante el período de exposición a los tóxicos.

Al analizar los efectos de esta segunda fase experimental sobre los productos de oxidación de las proteínas en ambas regiones cerebrales observamos que, al igual que ocurría con los niveles de peróxidos lipídicos, no se vieron diferencias significativas para CL100 II, TII y TL100 II respecto del C II (datos no mostrados). Este resultado indicaría que el cese de la exposición a plaguicidas por 5 semanas también sería suficiente para recomponer el daño oxidativo sobre las proteínas, sin observarse diferencias atribuibles a la administración del antioxidante. Los resultados obtenidos para hígado y riñón se muestran en la **Figura 33**.

**Figura 33.** Niveles de carbonilos proteicos en homogenatos de riñón (A) e hígado (B).



Los resultados se expresaron como las medias  $\pm$  SD (desvío standard) de cuatro ensayos independientes en porcentajes de cambio con respecto al control (C II) en riñón (A) e hígado (B). Los valores con diferencias significativas respecto al C II (no mostrado) están indicados como \* ( $p < 0.05$ ) y \*\* ( $p < 0.01$ ). CL100 II: tratado i.p. con LA 100 mg/Kg de peso por 10 semanas; T II: tratado i.p. con Z+G+D por 5 semanas; TL100 II: tratado i.p. con Z+G+D por 5 semanas y LA 100 mg/Kg de peso corporal por 10 semanas.

Tanto en hígado como en riñón se observó una disminución de los niveles de proteínas oxidadas por la administración de lipoato durante 10 semanas en comparación con los valores basales. Asimismo, comparando el grupo T II con TL100 II observamos que en el primero los niveles de proteínas oxidadas se normalizaron y fueron incluso significativamente menores a los niveles del lote control, mientras que en el grupo tratado con los agroquímicos y el antioxidante los niveles de PCOs resultaron aún menores. Este hallazgo constituyó una situación similar a la que mencionamos para el caso de los peróxidos lipídicos.

## DISCUSIÓN

Como se comentó en la sección de resultados, los lotes tratados con ácido lipoico 100 mg/Kg mostraron una disminución significativa de la ganancia de peso corporal. Esto podría deberse al ya documentado efecto anti-obesidad del ácido lipoico también observado por Cremer et al. (2006) y por Kim et al. (2004). Las disminuciones en la ganancia de peso respecto al lote control fueron de entre el 10 y el 30 % a partir del día 14 de tratamiento manteniéndose constante desde el día 40 hasta el final del experimento. Una diferencia de similar magnitud se obtuvo para los grupos tratados (I vs TL100 II), de modo que la comparación entre los grupos para el resto de los parámetros resultó válida a pesar de observarse este efecto sobre el índice de masa corporal. Cuando se aplicó la dosis de ácido lipoico de 50 mg/Kg de peso, se observaron diferencias en la ganancia de peso corporal menores al 8 %, tanto en los grupos controles como en los

tratados con la mezcla de los plaguicidas (datos no mostrados).

En ambas fases del experimento evaluamos el daño oxidativo a lípidos y a proteínas por considerar a estas macromoléculas vitales para la funcionalidad de las células (Dalle-Donne et al., 2003a; Halliwell y Gutteridge, 1999).

La primera parte del experimento consistió en evaluar si la ya reportada capacidad antioxidante del ácido lipoico era capaz de prevenir el daño a lípidos y proteínas causado por la intoxicación sub-crónica con la mezcla de los tres agroquímicos (zineb, glifosato y dimetoato) durante las 5 semanas de tratamiento. El LA se administró en dosis de 50 mg/Kg y 100 mg/Kg de peso corporal en forma simultánea a la noxa, evaluándose así efectos dependientes de la dosis.

En todos los tejidos estudiados, el daño oxidativo a lípidos y a proteínas aumentó en el grupo tratado con la mezcla de los agrotóxicos en comparación con el grupo control, este aumento fue mas pronunciado en el cerebro (especialmente en la sustancia nigra). Confirmando los resultados obtenidos en el Capítulo I de este trabajo de tesis.

Cuando se trató a los animales solo con ácido lipoico (CL50 y CL100 I) se observó una disminución de la formación basal de peróxidos lipídicos de entre el 10 y el 20 % en todos los tejidos estudiados. Este hecho resulta interesante por su posible correlato clínico siendo que el lipoato se prescribe en situaciones patológicas (Packer et al., 1995; González-Pérez y González-Castaneda, 2006). Este antioxidante también podría ser empleado como preventivo en condiciones en donde se sospeche incremento de la formación de radicales libres (situaciones aún sub-clínicas, exposición involuntaria en trabajadores, deportistas de elite, convalecencia o recuperación post-quirúrgica, y otras). No sabemos de la existencia de trabajos que demuestren la disminución de la producción basal de especies radicalarias bajo la administración de lipoato, por lo que nuestros hallazgos cobrarían importancia al sugerir la realización de estudios de mayor

profundidad en el uso de este antioxidante de conducta anfifílica.

Cuando se administró en forma conjunta ácido lipoico y la mezcla de los agroquímicos tanto en corteza como en sustancia nigra, se observaron niveles de peróxidos lipídicos significativamente menores a los del grupo tratado. Este efecto permitió alcanzar niveles que no mostraron diferencias significativas con respecto al control. Los resultados indican que la administración del antioxidante reduciría la peroxidación de lípidos, previniendo por completo el daño generado por los agrotóxicos en ambas regiones cerebrales. Al comparar estos resultados vemos que el ácido lipoico parece ser más efectivo como antioxidante en la sustancia nigra, en donde los niveles de peróxidos lipídicos llegaron a ser aún menores que los encontrados en la situación basal. Este hecho es también relevante a la hora de considerar al lipoato como un candidato posible para proteger a las neuronas dopaminérgicas del daño oxidativo y frenar señales de muerte redox-dependientes (Jenner, 1998; Singh y Dikshit, 2007). Justamente, la sustancia nigra es la región del SNC involucrada en la etiopatogenia del mal de Parkinson (Fearnley y Lees, 1991; Micheli, 1998) y se ha sugerido repetidas veces que existe una asociación casuística-epidemiológica y también fenomenológica (experimental) entre la incidencia de esta patología y los polucionantes ambientales como los que estudiamos en este trabajo (Paolini et al., 2004; Di Monte, 2003; Le Couteur et al., 1999).

En riñón e hígado el antioxidante redujo la formación basal de peróxidos en forma significativa. Esto también resulta relevante a la hora de considerar la fisiología particular que caracteriza a ambos tejidos. Probablemente, y debido a la función crucial que ambos desempeñan en la detoxificación y en la eliminación de xenobióticos provenientes del entorno, estos tejidos tengan una mayor predisposición a la oxidación de sus macromoléculas. Al mismo tiempo, ambos tejidos poseen un stock de defensas antioxidantes mucho más importante que el SNC, esta diferencia explicaría por qué en

presencia de la agresión tóxica no se observaron aumentos tan marcados de lipoperóxidos como los que se observaron en ambas regiones del cerebro. Teniendo en cuenta la respuesta a la administración combinada del antioxidante y de la noxa, en hígado se observa una respuesta similar a los grupos en los que se ha aplicado solo el antioxidante. Esto puede ser interpretado como un reflejo del efecto antioxidante del ácido lipoico sumado al de los antioxidantes endógenos, considerándose además el hecho de ser el hígado el órgano que recibe la mayor concentración de LA cuando este es administrado (como en nuestro caso) por vía i.p.

Tal como observamos en el Capítulo I, el tratamiento con los agroquímicos también provocó oxidación de proteínas en todos los tejidos estudiados, siendo las diferencias significativas con respecto al lote control. Nuevamente encontramos una mayor sensibilidad de ambas regiones cerebrales (cambios de entre el 80 y el 100 %) en comparación con el hígado y el riñón, donde el aumento del porcentaje de proteínas oxidadas en el grupo tratado (TI) es del orden del 20 al 30 % para ambos tejidos. Las cifras resultan más que importantes a la hora de considerar las consecuencias fisiológicas que acarrea este tipo de daño (Dalle-Donne et al., 2003a; Dean et al., 1997).

Al igual que ocurre con la formación de peróxidos lipídicos, la administración de LA disminuye la oxidación basal de proteínas mejorando incluso el valor del lote control para este parámetro. Cuando se combinó el tratamiento con agroquímicos con el de ácido lipoico en sustancia nigra se observó, para ambas dosis del antioxidante, que la formación de PCOs fue significativamente menor respecto al lote tratado. Los valores fueron comparables e incluso menores a los basales. Este mismo resultado se observó cuando estudiamos la corteza cerebral aunque la disminución no resultó tan pronunciada. Los datos obtenidos apoyan la especulación sobre un efecto protector más notable sobre la región de la sustancia nigra en comparación con la corteza, tal



como lo vimos para el caso de los lípidos peroxidados. Al mismo tiempo sugiere un efecto adaptativo a la noxa, probablemente de origen genómico por sobre-expresión de algunos genes involucrados en el sistema de defensa antioxidante. Esta hipótesis abre un interesante panorama de investigación sobre los mecanismos subyacentes de control de la expresión de proteínas que intervienen en la absorción, distribución y almacenamiento de antioxidantes exógenos, en la biosíntesis y utilización de los endógenos, y en la actividad final de enzimas del sistema de defensa, que merecería ser estudiado en profundidad.

En homogenatos de hígado y riñón de animales tratados en forma concomitante con la noxa y el ácido lipoico vemos una disminución significativa de los niveles de proteínas oxidadas que alcanzó a los niveles de PCOs del grupo control tratado solo con el antioxidante. Esto es compatible con un posible efecto aditivo (o sumatorio) entre las defensas antioxidantes endógenas de ambos tejidos y el ácido lipoico.

En ninguna de las determinaciones realizadas y para ninguno de los tejidos estudiados se observó que el efecto antioxidante del LA dependa de la dosis administrada. De estos resultados concluimos que la administración de lipoato estuvo por encima de los niveles de biodisponibilidad y que quizás sería efectivo a dosis aún menores que las empleadas en este estudio para las condiciones de nuestro protocolo experimental. Como un dato de referencia, y a los fines comparativos, en humanos se recomienda una dosis de 10 mg/Kg de peso corporal en el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas que cursan con trastornos del sistema de defensa antioxidante o estrés oxidativo (Bustamante et al., 1998; Maczurek et al., 2008; Ziegler et al., 1999; Ziegler y Gries, 1997). Nuestras dosis (50 y 100 mg/Kg de peso corporal en ratas) resultan ser entre 5 y 10 veces mayores a la dosis empleadas en humanos, aunque es necesario tener en cuenta que existe un problema extrapolativo debido a que en el caso de los animales se empleó la vía i.p. mientras que en humanos usualmente se lo administra en forma

oral. Como la vía i.p. asegura una mayor biodisponibilidad que la vía oral, podría resultar entonces que las dosis administradas a las ratas estén aún por encima de las calculadas.

En la **FASE II** del experimento, el objetivo fue evaluar si luego del cese de la exposición a los agrotóxicos, el ácido lipoico era necesario para reestablecer el balance redox y generar las condiciones adecuadas para la reparación del daño oxidativo, o dicho de otra forma, las defensas antioxidantes endógenas eran capaces/suficientes para restaurar los efectos causados por los agroquímicos.

Cuando analizamos ambos biomarcadores de daño oxidativo en sustancia nigra y corteza cerebral, no observamos diferencias significativas entre los grupos CL100 II, T II y TL100 II y el lote control (C II). Esto indicaría que el cese (*wash-out*) de la exposición a agrotóxicos por 5 semanas sería suficiente para recomponer los daños pro-oxidativos sobre los lípidos y las proteínas. Esta conclusión coincidiría con nuestra idea previa sobre la posible respuesta de los sistemas de defensa durante la exposición a la noxa, que muy probablemente se deba a readaptaciones en la tasa de expresión de ciertos genes. Es decir, es probable que al suprimirse la intoxicación muchos mecanismos de defensa se encuentren sobre-expresados desdibujando así la contribución antioxidante del lipoato.

En hígado y riñón el grupo control tratado con antioxidante mantuvo niveles de peróxidos lipídicos por debajo del grupo control sin tratar. Este resultado indica un efecto protector del LA sobre la peroxidación en situaciones basales a lo largo del período estudiado. Resulta interesante, sobre todo desde una perspectiva clínica, que el lipoato actúe como un eficiente scavenger de especies radicalarias y sea capaz de disminuir el daño oxidativo en condiciones basales (lote control). Su administración a humanos como agente preventivo podría estar sustentada por este hecho.

El grupo T II no mostró diferencias significativas respecto del control sugiriendo que el daño oxidativo producido en las primeras 5 semanas de intoxicación puede

revertirse durante las siguientes 5 semanas de cese de tratamiento. Otra vez observamos que no parece ser necesaria o indispensable la administración del ácido lipoico. Un comportamiento singular se observa en el lote tratado con el antioxidante y la noxa, pues se observó una disminución significativa de los niveles de peróxidos lipídicos que resultó ser menor a los niveles medidos en el control, e incluso menores a los del lote control tratado con antioxidante. Podríamos atribuir estas diferencias a la sumatoria de efectos del ácido lipoico administrado y del resto de los antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos que podrían haberse inducido durante la exposición a los agrotóxicos.

No obstante lo dicho en función de los resultados experimentales, cabe señalar que el *wash-out* de la noxa es una situación altamente improbable en la vida real en donde la exposición a residuos de agrotóxicos no solo es constante sino que todo indica que va en peligroso aumento. Por lo tanto y atendiendo a lo antes dicho, la suplementación con antioxidantes (sobre todo de naturaleza anfifílica) sigue siendo una estrategia muy considerada no solo como recurso terapéutico o paliativo, sino también como preventivo (González-Pérez y González-Castaneda, 2006)

## CONCLUSIONES PARCIALES

Estos resultados podrían indicar que el ácido lipoico previene del estrés y subsecuente daño pro-oxidativo a moléculas cruciales como lípidos y proteínas cuando es administrado conjuntamente con la noxa. Asimismo, el antioxidante es capaz de generar un entorno adecuado para el desarrollo de los procesos de reparación de los daños inducidos por el estrés oxidativo cuando la noxa cesa, aunque esto también ocurre si se eliminan los propios generadores de OS, situación poco probable en la vida real.

Esto permitiría concluir que:

- El ácido lipoico es un excelente antioxidante con importantes propiedades a nivel del SNC (especialmente sobre la sustancia nigra, sector implicado en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y de demostrada sensibilidad al estrés oxidativo).

- Es de activa competencia en la protección tanto del compartimiento acuoso (proteínas) como del hidrofóbico (lípidos).
- Podría ser utilizado en forma concomitante a la exposición a generadores de estrés como agente preventivo por haber demostrado significativa atenuación de los biomarcadores específicos de daño en condiciones basales.

## **CAPÍTULO III**

**Detección de plaguicidas o sus residuos.**

## INTRODUCCIÓN

La presencia de agroquímicos como residuos en los alimentos resulta inevitable teniendo en cuenta que son utilizados durante las etapas de producción, elaboración y comercialización. Esta situación constituye un problema muy grave para la salud de las comunidades. Las exigencias internacionales en materia alimentaria son cada vez mayores con una clara tendencia a fomentar la circulación de alimentos seguros y saludables. La legislación en los países desarrollados se torna cada vez más estricta en procura de ejecutar políticas que aseguren el bienestar de los ciudadanos con un nivel elevado de protección de la vida y la salud.

A modo de ejemplo, en el año 2002 la Unión Europea creó -entre otras medidas- el Sistema de Alerta Rápido para Alimentos y Piensos (RASFF, 2002, *Rapid Alert System for Food and Feed*). A través de este sistema se establece la formación de una red de estados

*miembro* que obliga, entre otras cosas, a la notificación inmediata (al resto de los integrantes) de cualquier incidente de contaminación indicando lote, cargamento o *container* en el que se detecten contaminantes por encima de los LMR admitidos en la normativa y que impliquen riesgos directos o indirectos para la salud. El LMR es la máxima concentración de residuos de un plaguicida que legalmente puede contener un producto destinado al consumo humano (expresado como mg de plaguicida/kg de material alimenticio). Estos límites son establecidos por las diferentes agencias internacionales (OMS, comisión *ad-hoc* de la Unión Europea; *Environmental Protection Agency*, EPA, EE.UU; *Pest Management Regulatory Agency*, Canadá; *Pesticide Safety Directorate*, Reino Unido; entre otros), mediante protocolos relativamente estandarizados que suelen denominarse “*Procesos de evaluación de riesgo*”. La presencia de niveles excedidos a los LMR es motivo de rechazo de mercadería en puertos internacionales. Estos excesos pueden deberse principalmente a aplicación de dosis inadecuadas en el momento del cultivo, del almacenamiento, o a multi-aplicaciones previo al despacho de la mercadería a puerto o a industria. La efectividad de los controles requiere el desarrollo de regulaciones cualitativas y cuantitativas que contemplen las relaciones entre residuos de agroquímicos y los factores que condicionan su nivel, como ser: a) propiedades físicas y químicas de los compuestos, b) condiciones de aplicación (dosis, frecuencia, etc.), c) condiciones climáticas, d) particularidades estructurales y químicas de los sitios u objetos de tratamiento.

Esta tendencia hacia la protección de la vida y la salud de la población, lleva a la elaboración de sistemas que garanticen la no comercialización de alimentos que no sean seguros con el propósito de consolidar la confianza de los consumidores. Lamentablemente Latinoamérica no cuenta con un organismo de supervisión de esta naturaleza.

En Argentina, la agricultura moderna responde a modelos económicos de



rentabilidad, que implican el empleo de técnicas y agroquímicos para aumentar o garantizar los rendimientos en la producción. A pesar de algunas limitantes, el control químico continuará siendo una de las técnicas más utilizadas a mediano plazo para disminuir los daños generados por las explosiones demográficas de plagas. Sin embargo, su uso no puede ser anárquico, es preciso conocer con exactitud y objetividad su evolución en el ambiente de modo de disminuir el impacto que provoque esta práctica agrotécnica. El concepto de *agricultura sustentable*, implica un conjunto de sistemas de producción con pocos insumos y un manejo integrado de las plagas y las enfermedades. Esta modalidad posee creciente importancia en nuestro país promoviendo la innovación y el mejoramiento de la producción agrícola. Se da así prioridad a métodos ecológicamente más seguros, minimizando los efectos no deseados del uso de agroquímicos y poniendo énfasis en la protección del ambiente y de la salud humana (*IOBC, International Organization for Biological Control*; Ricca, 2004).

En este trabajo de tesis se analizaron los efectos producidos por la administración de tres plaguicidas zineb, glifosato y dimetoato, que encabezan las listas de agroquímicos más usados en nuestro país y en el resto del mundo. De modo que se plantea como objetivo de este capítulo la detección de cada uno de estos tóxicos en muestras provenientes de los animales tratados según se detalló en el Capítulo I y en muestras de plasma de fumigadores profesionales según lo que se describirá en el Capítulo IV. Al mismo tiempo, se intentó detectarlos en alimentos de origen vegetal comercializados en nuestro medio en donde no se implementan los controles establecidos por los organismos oficiales para detectar de manera apropiada los niveles de contaminación.

Existen múltiples técnicas para detectar e incluso cuantificar estos agrotóxicos en muestras biológicas. Las más sensibles y específicas resultan ser aquellas que utilizan métodos de referencia como la cromatografía gaseosa o líquida acoplada a espectrómetros

de masa. La principal desventaja de estas metodologías es que el equipamiento tiene un elevado costo (Hori et al., 2003; Abdullah et al., 1995; Tarbah, 2001).

En la Unión Europea, la legislación establece la detección de residuos en agua destinada para consumo humano y en los commodities como frutas, hortalizas y legumbres en general, aunque debido a la proliferación de agroquímicos en general en la cadena alimentaria, su presencia también es monitoreada en productos de origen animal (Stalikas y Konidari, 2001). Para asegurar la inocuidad de los alimentos es necesario considerar todos los aspectos de la cadena de producción alimentaria desde la producción primaria pasando por la producción de piensos para animales, hasta la venta o el suministro de alimentos al consumidor. Todas estas etapas tienen el potencial de influir en la seguridad alimentaria.

En el año 2000, Sawaya et al. condujeron un estudio en Kuwait para estimar la ingesta de pesticidas, midiendo los niveles de organofosforados en 139 alimentos que constituían los más consumidos en la población. En 25 alimentos se detectaron pesticidas y en uno de ellos el nivel superó los límites máximos de residuos (LMRs) permitidos según FAO/OMS (regulación 1993). No existen registros de esta magnitud en nuestro país, o bien no tenemos acceso a este tipo de análisis en forma sencilla por tratarse de información para uso clasificado. Al respecto, el INTA, el Ministerio de Salud (Nacional o Provincial), y el SENASA, son los entes de regulación e implementación del control de residuos agrotóxicos. Sin embargo, los análisis no son de divulgación (masiva) obligatoria, y la legislación vigente circunscribe su aplicación a ámbitos muy precisos. Como ejemplo podemos citar la determinación de agroquímicos realizada por el INTA (Castelar) en granos de soja en silos destinada a embarque para exportación (puertos de Buenos Aires y de Bahía Blanca) en donde se detectó la presencia de cipermetrina, metilcloropirifós, DDVP, fenitrotión, malatión, endosulfán y glifosato (Dirección de

Mercados Agroalimentarios de la SAGPyA. Documentos SPS/2007, SPS/2008). Muchos de estos compuestos son de uso prohibido y justifican el rechazo del embarque y su incineración. Sin embargo, no siempre se realizan los controles apropiados y el producto no es descartado en origen sino en destino causando serios daños al sistema productivo. Lamentablemente a nivel de circulación interna los controles pueden ser completamente obviados, lo que claramente alerta sobre el riesgo para la salud comunitaria más allá de los posibles daños económicos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Colección de muestras**

#### **Hígado y plasma de animales tratados.**

Finalizado el período de exposición de 5 semanas (tal como se describió en Capítulo I), los animales fueron sacrificados por decapitación rápida con guillotina y se colectaron muestras de sangre entera en tubos cónicos de plástico con heparina a razón de 10 UI/mL de sangre. Las muestras se agitaron por inversión para evitar la coagulación y se centrifugaron en el punto máximo de la centrífuga de mesa Rolco HR-55 (Bs. As., Argentina) por 10 minutos. Se separó el plasma y se almacenó en ultrafreezer a -70 °C para realizar la detección de los agroquímicos.

También se extrajeron los hígados que se homogenizaron con buffer fosfato de sodio pH 7.40, (140 mM) en frío, con la adición de EDTA disódico 6 mM, en una

proporción de 3 ml de buffer por cada gramo de tejido, el homogenato se almacenó a -70 °C hasta su utilización.

### **Plasmas de fumigadores profesionales y personas control.**

Se obtuvieron muestras de sangre entera (por punción de la vena radial) que se anticoaguló con heparina (10 UI/mL de sangre). Las muestras fueron centrifugadas 15 min a 2500g para obtener plasmas que se almacenaron -20 °C hasta su análisis.

### **Alimentos**

Se tomaron muestras de frutas y hortalizas comercializadas en verdulerías de nuestra ciudad. Se utilizaron cáscaras de naranjas, uvas, ciruelas, morrón y porotos de soja. Las muestras se dividieron en dos mitades, una de ellas fue lavada exhaustivamente y la segunda se homogeneizó sin previo lavado en buffer fosfato de sodio pH 7.40, 140 mM en frío. Se centrifugaron los homogenatos obtenidos a 3000 rpm por 10 minutos y se almacenó el sobrenadante a -20 °C hasta su análisis.

## **Determinaciones**

### **1. Detección de glifosato**

#### *Fundamento*

El método empleado permite determinar simultáneamente glifosato y glufosinato mediante cromatografía líquida acoplada a detector de masas. Es necesaria una derivatización previa con el reactivo FMOC-Cl (9-flourenil metil cloroformato) de acuerdo al método de Hori et al. (2002). Este reactivo reacciona con los grupos amino y posee un residuo no polar fluorescente. El complejo glifosato-FMOC se forma rápidamente en condiciones alcalinas (Stalikas y Konidari, 2001).

*Reactivos*

- Acetona calidad HPLC.
- Buffer borato al 5 %.
- FMOC-Cl (9-fluorenil metil cloroformato) 2 mM.
- Ácido fosfórico 2 % v/v.
- Fase móvil: acetato de amonio 50 mM, pH 5.50.

*Procedimiento*

- Se mezclaron 500 µL de plasma con igual volumen de acetona y se centrifugó la muestra hasta conseguir una fase superior traslúcida que se pasó a un nuevo tubo.
- Se incubaron 0.5 mL de muestra con 150 µL de buffer borato al 5 % y 150 µL de FMOC-Cl 2 mM por 24 horas en la oscuridad a 40 °C. La reacción se detuvo por el agregado de 150 µL de ácido fosfórico al 2 % (v/v). Las muestras así derivatizadas se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.
- Alícuotas apropiadas de estas muestras derivatizadas se inyectaron en el cromatógrafo.

HPLC: Agilent 7890A GC system de Agilent Technologies, (CA, USA).

Flujo de fase móvil: 0.5 mL/min.

Programa de elusión: 90 % de fase móvil en acetonitrilo al 50 % por 10 minutos, seguido de la fase móvil pura hasta los 20 minutos de corrida.

Detector: Agilent 1100 Diode Array Detector System ajustado a 206 nm.

Columna: Inertsil Ph-3 GL de Science, (Tokio), 250 x 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula.

Temperatura de corrida: 35 °C.

La confirmación de la señal de glifosato fue llevada a cabo mediante un análisis

de espectrometría de masa usando un LC/MSD VL Ionizing Detector de Agilent Tec., seteado en el modo de operación electrospray/SIM (modo de ión selectivo).

Los coeficientes de variación intra- e inter- ensayo fueron del 5 y 7 % respectivamente. La recuperación de la técnica analítica completa fue determinada por el método de fortificación de la muestra y alcanzó el  $88 \pm 4$  %.

## 2. Detección de dimetoato

### *Fundamento*

Se realizó un método de extracción para organofosforados seguido de la separación y revelado del dimetoato por cromatografía en capa fina, según la técnica de Tewari y Harpalani (1976).

### *Reactivos*

- Sulfato de sodio anhidro.
- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  3 M en agua bidestilada.
- Ácido sulfúrico 0.1 N.
- Acetona calidad HPLC.
- Cloroformo calidad HPLC.
- Dietil éter calidad HPLC.
- Metanol calidad HPLC.
- Cloruro de paladio ( $\text{PdCl}_2$ ) 0.5 % en HCl 0.1 N.
- Standard de dimetoato: 100 mg/ml en acetona.

### *Procedimiento*

- Se tomaron 2 mL de homogenato de tejido, de alimentos o plasma y se mezclaron con 2 gr de sulfato de sodio anhidro en un tubo cónico de plástico y se agitó.
- Se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos, y se succionó la fase intermedia que se

pasó a un segundo tubo cónico. Al primero se le adicionaron 2 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  3 M y se lo centrifugó nuevamente a 5000 rpm 10 minutos.

- Se colectaron las fases acuosas y se volvieron a centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo de vidrio.
- Se agregaron 190  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 0.1 N y 940  $\mu\text{L}$  de acetona. La mezcla se calentó en baño de agua a 70 °C por dos horas. Se agregaron 940  $\mu\text{L}$  más de acetona y se centrifugó a baja velocidad. La fase superior se pasó a otro tubo.
- El extracto acetónico se diluyó con 2.1 mL de agua bidestilada, y se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de solución saturada de sulfato de sodio.
- Se extrajo 3 veces con porciones de 1 mL de cloroformo. Los extractos clorofórmicos se combinaron y se lavaron con 1 mL de agua bidestilada. Luego de descartar la fase acuosa superior, el extracto se pasó por un embudo con papel Whattman conteniendo 3 gr de sulfato de sodio anhidro.
- El extracto clorofórmico resultante se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en 100  $\mu\text{L}$  de acetona para su almacenamiento a -20°C.
- Previo a sembrar de la placa cromatográfica se evaporaron las muestras a sequedad, se redisolviéron en 30  $\mu\text{L}$  de acetona y se sembraron 10  $\mu\text{L}$ . Paralelamente se sembraron 10  $\mu\text{L}$  de diferentes diluciones la solución standard de dimetoato.

Cromatografía en capa fina (TLC):

Fase estacionaria: placas de silicagel G de vidrio activadas a 120 °C por 30 minutos.

Fase móvil: dietiléter/metanol (3/1)

Volumen de siembra: 10  $\mu\text{L}$

Revelado: la placa se roció con una solución de cloruro de paladio 0.5 % en HCl 0.1 N, luego de secarla se llevó a estufa a 80 °C por 20 minutos. Las manchas amarillas se intensificaron durante el calentamiento.



La intensidad de las bandas de las muestras y de las diferentes concentraciones del standard fue analizado mediante Kodak Digital Science 1D, obteniendo por interpolación en esta curva los  $\mu\text{g}$  de DMT/siembra.

### 3. Detección de zineb

#### *Fundamento*

Empleamos el método de Malik y Rao (1991) basado en la determinación del Zn (II) presente en el zineb, convirtiéndolo en un complejo con difenilcarbazona que presenta un pico máximo de absorción a 520 nm en un medio de pH 9.0-10.0. La presencia de piridina permite una óptima extracción del complejo a través de la formación de aductos. El método tiene un límite de detección de 0.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### *Reactivos*

- Solución stock de zineb 1 mg/mL en NaOH 0.5 M.
- Difenilcarbazona 3 mg/mL en etanol absoluto.
- Solución de piridina 50 mg/mL en agua bidestilada.
- Solución buffer: 100 mL de solución de ácido bórico 0.2 M se mezcló con igual volumen de KCl 0.2 M. Se ajustó el pH a 9.0 con NaOH 0.2 M y se diluyó con agua c.s.p. 500 mL.
- Acetato de etilo calidad HPLC.
- Cloroformo.

#### *Procedimiento*

Tratamiento de muestras biológicas: Mezclamos 5 mL de muestra (plasma u homogenatos) con 8 mL de cloroformo. La extracción se realizó 3 veces y se reunieron los extractivos que se evaporaron a sequedad. El residuo se disolvió en NaOH 0.5 M. Las soluciones de aspecto opalescente se filtraron por papel Whattman lavando el filtro

2 veces con 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.5 M.

Curva standard: realizamos diluciones seriadas de una solución patrón de zineb 1 mg/mL de droga pura usando NaOH 0.5 M como solvente de manera de obtener concentraciones de zineb de en el rango de 10 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (soluciones de trabajo).

- En sendos tubos rotulados se tomaron 0.2 mL de las diferentes soluciones standard de zineb y 0.2 mL de la muestra previamente extraída.
- Se agregó a cada tubo 1 mL de la solución de piridina seguidos por 1.5 mL de solución buffer.
- Después de agitar se adicionaron 0.5 mL de solución de difenilcarbazona de 3 mg/mL. Seguidamente, agregamos 8 mL de acetato de etilo mezclando vigorosamente durante 5 minutos. Tras separar la fase orgánica, se hizo una segunda extracción con 5 mL del solvente.
- Medimos la D.O. a 540 nm contra blanco de reactivos preparado en condiciones idénticas pero omitiendo el agregado de la alícuota de muestra.

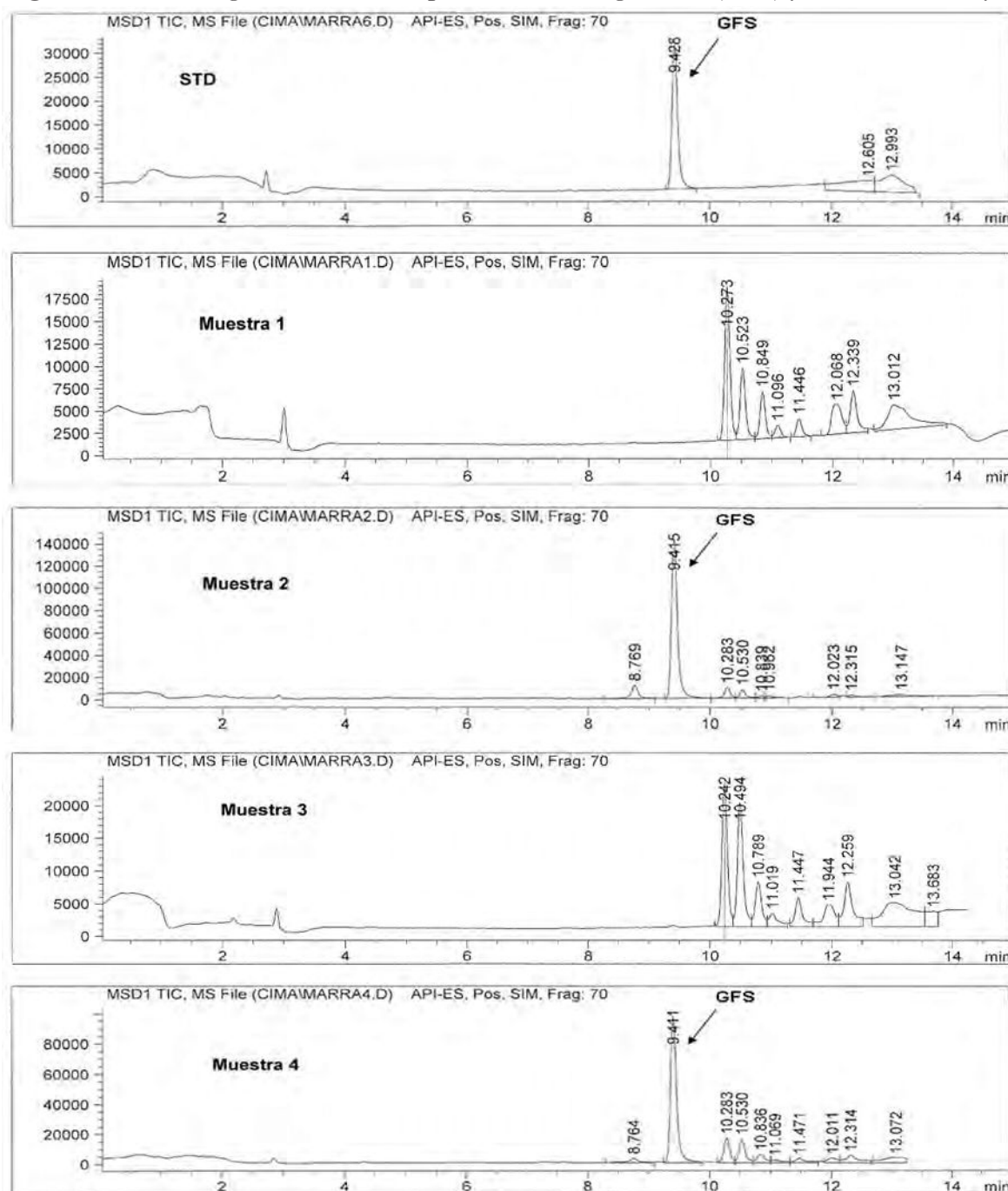
## RESULTADOS

La determinación de **glifosato** se realizó en las muestras que se detallan seguidamente.

- Muestras 1 y 3: plasma de ratas control (sin inyección i.p.) de aproximadamente 300 gr de peso obtenidos de experimentos de idéntico protocolo pero realizados en momentos diferentes.
- Muestra 2: plasma de animales tratados con glifosato disuelto en polietilenglicol-400 en una dosis de 10 mg/Kg de peso corporal inyectados i.p. cada tres días, por 5 semanas, según esquema experimental descrito en el Capítulo I.
- Muestra 4: plasma de animales tratados con una mezcla de agroquímicos preparada en el momento de la inyección con PEG-400 como vehículo a razón de 15 mg/Kg de peso de zineb, 10 mg/Kg de peso de glifosato y 15 mg/Kg de peso de dimetoato, inyectados i.p. 3 veces por semana por 5 semanas.

Para cada una de ellas se llevó a cabo el protocolo de detección de glifosato mencionado antes y se obtuvieron los siguientes cromatogramas (**Figura 34**).

**Figura 34.** Cromatogramas obtenidos para standard de glifosato (STD) y muestras 1, 2, 3 y 4.



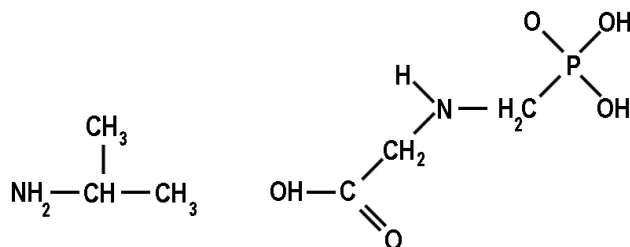
En los cromatogramas que corresponden a las muestras 2 y 4 y al standard (STD) se observa la presencia de la señal correspondiente al glifosato (indicada como GFS). Su identidad se confirmó por comparación con el tiempo de retención (9.4 min) de la señal en la muestra con el standard puro.

Comparando los cromatogramas del estándar (STD) con aquellos obtenidos para la muestras podemos ver que en las muestras 1 y 3 (controles) no se observa la señal correspondiente al glifosato ni a ninguno de sus metabolitos, mientras que en las muestras 2 y 4 se encontraron 0.69 µg de glifosato/mL de muestra y 0.45 µg de glifosato/mL de muestra, respectivamente.

Estos datos corresponden a 19 y 13 ng de herbicida/mg de proteína plasmática, lo cual a su vez equivale a concentraciones de 4 y 2.7 µM, respectivamente.

Resulta importante señalar que en los espectros de masa obtenidos se observaron patrones muy diferentes entre las muestras provenientes de animales tratados (2 y 4) respecto de los controles (1 y 3). El glifosato es similar estructuralmente a los aminoácidos formadores de proteínas presentes en los mamíferos. Estos últimos pueden reaccionar con el agente derivatizante a través de su grupo amino (**Figura 35**).

**Figura 35.** Estructura química de glifosato.



El nombre químico del glifosato es N-(fosfonometil) glicina (PM=167) y el de la forma técnica más común, la sal isopropilamínica de la N-(fosfonometil) glicina.

De modo que en el mismo cromatograma se observan señales para algunos aminoácidos séricos que también se derivatizaron por el tratamiento con FMOC-Cl.

La determinación de **dimetoato** se realizó en las muestras que se detallan a continuación:

- Muestra 1: homogenato de hígado de ratas control (sin inyección i.p.) de aproximadamente 300 gr de peso obtenidos de experimentos idénticos a los descritos en la parte experimental del Capítulo I.
- Muestra 2: homogenato de hígado de animales tratados con dimetoato disuelto en polietilenglicol-400 en una dosis de 15 mg de droga/Kg de peso corporal, cada tres días por 5 semanas, según protocolo de intoxicación descrito en el Capítulo I.
- Muestra 3: homogenatos de cáscaras de naranjas, uvas, ciruelas, morrón y porotos de soja, previamente centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos.

La curva de calibración se preparó con diluciones seriadas (**Tabla 21**) de una solución madre de droga pura conteniendo 100 mg/mL en acetona.

**Tabla 21.** Diluciones de dimetoato utilizadas en la curva standard

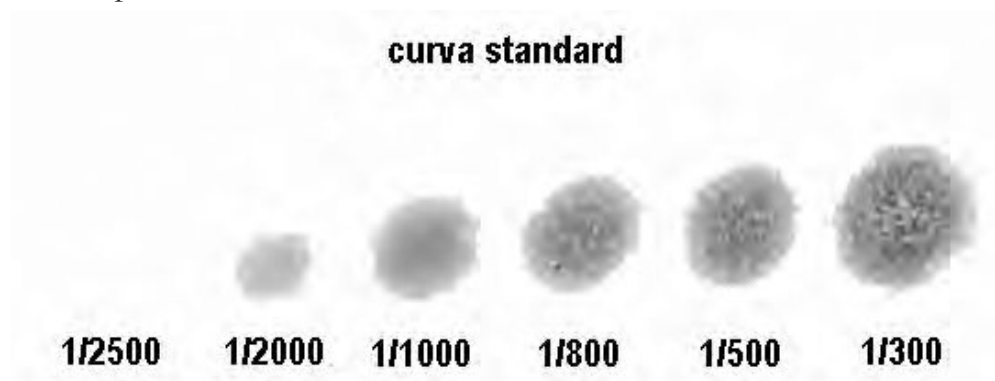
Tubo	Dilución de solución madre 100 mg/mL	μL de solución madre	μL de acetona	μg de dimetoato/siembra
1	1/300	40	80	3.33
2	1/500	20	80	2.00
3	1/700	15	90	1.40
4	1/800	15	105	1.25
5	1/1000	10	90	1.00
6	1/1500	10	140	0.67
7	1/2000	5	95	0.50
8	1/2500	5	120	0.40

Se sembraron 10 μL tanto de las muestras procesadas según el protocolo descrito, como de las diluciones del estándar. En algunos casos, se procesaron cantidades de muestra mayores a las indicadas (8 mL de homogenatos tisulares) al solo efecto de

alcanzar los límites de detección del método. Luego de sembrar la placa, se la reveló y se cuantificó el dimetoato presente mediante el software Kodak Digital Science 1D (USA).

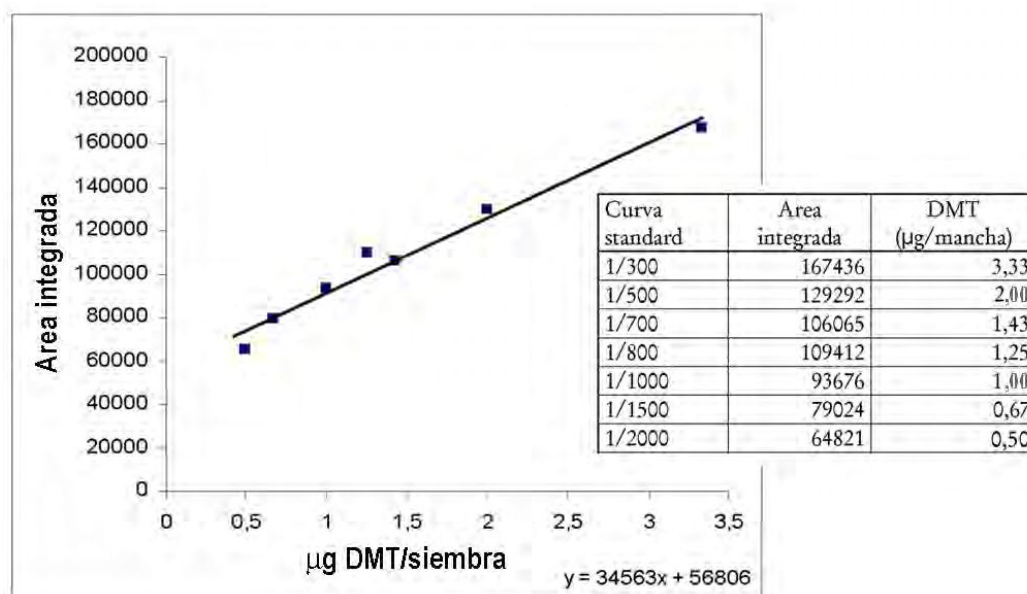
A continuación se muestra la imagen representativa de una placa de TLC donde se sembraron algunas de las alícuotas de las diluciones de la solución patrón de dimetoato (**Figura 36**) y seguidamente una curva de calibración también representativa (**Figura 37**)

**Figura 36.** Placa de TLC representativa, sembrada con 10  $\mu$ L de las alícuotas de las diluciones del patrón de dimetoato.



La figura proviene de un scaneo de la placa de TLC obtenida luego de la siembra, desarrollo y revelado de 10  $\mu$ l de las distintas diluciones de dimetoato.

Figura 37. Curva de calibración para la determinación de dimetoato



Los resultados que obtuvimos no demuestran presencia de dimetoato en la muestra número 1. Sin embargo, el análisis de la muestra número 2 arrojó los siguientes resultados:

Muestra 2 de homogenato de hígado: 20,10 ng/mg de proteínas.

En cuanto a los homogenizados de alimentos solo se detectó la presencia de dimetoato en las cáscaras de uva (que no fueron lavadas previo a la homogenización) en una concentración de 2.1 µg de D/gr de producto. En la muestra que se homogenizó luego del lavado exhaustivo no fue posible detectar la presencia del pesticida.

En cuanto a la detección espectrofotométrica de **zineb** mediante espectrofotometría se utilizaron las siguientes muestras:

- Muestra 1: pool de plasmas de ratas control (sin inyección i.p.) de aproximadamente 300 gr de peso obtenidos de experimentos idénticos a los descritos en el Capítulo I.



- Muestra 2: pool de plasmas provenientes de animales tratados con zineb disuelto en polietilenglicol-400 por inyección i.p. de 15 mg/Kg de peso corporal cada tres días, por 5 semanas, según protocolo de intoxicación descrito en el Capítulo I.
- Muestra 3: pool de plasmas de personas consideradas controles experimentales (no expuestas a agroquímicos) obtenidos durante el análisis de muestras de fumigadores de la zona de producción de cítricos de Concordia (Entre Ríos). Las características de las muestras se describirán en el Capítulo IV de este trabajo de tesis.
- Muestra 4: pool de plasmas de fumigadores provenientes de la zona de producción de cítricos de Entre Ríos. Las características de las muestras se describirán en el Capítulo IV de este trabajo de tesis.
- Muestra 5: homogenatos de cáscaras de naranjas, uvas, ciruelas, morrón y porotos de soja, previamente centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos.

La curva standard se preparó con diluciones seriadas de la solución madre de 1 mg/mL en NaOH 0.5 M según la **Tabla 22**.

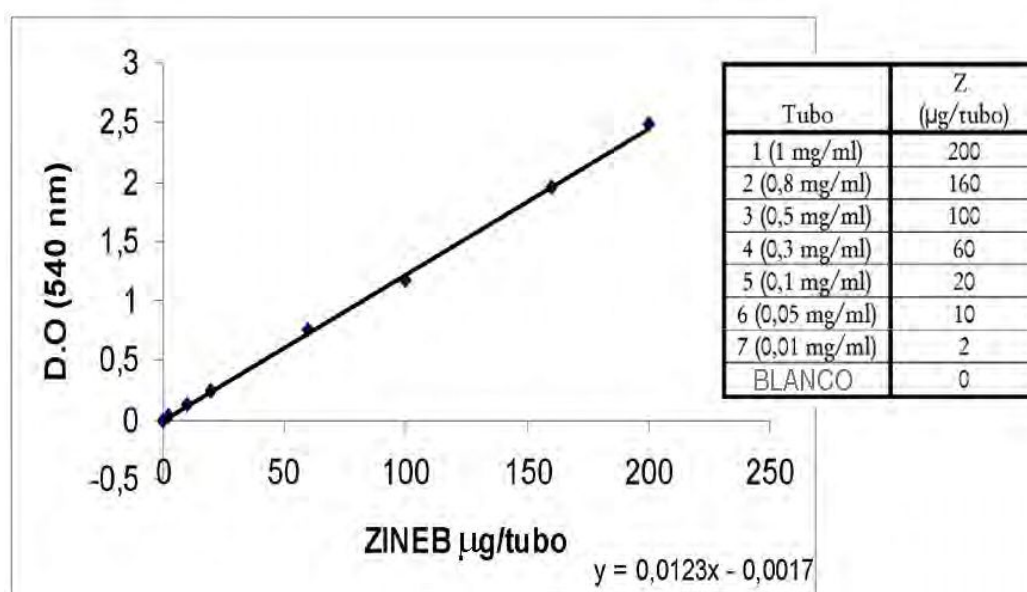
**Tabla 22.** Diluciones efectuadas en la curva de calibración para la determinación de zineb.

Tubo	Concentración de zineb (mg/mL)	μL de stándard utilizado
1	1	200
2	0.8	200
3	0.5	200
4	0.3	200
5	0.1	200
6	0.05	200
7	0.01	200

De los extractos provenientes de las muestras disueltas en NaOH 0.5 M como solvente, se utilizaron alícuotas de 200  $\mu$ L para llevar a cabo la técnica espectrofotométrica.

Una curva de calibración representativa se muestra en la **Figura 38**.

**Figura 38.** Curva de calibración para la determinación de zineb



Interpolando los valores de D.O. de las muestras obtuvimos los resultados que se muestran en la **Tabla 23**.

**Tabla 23.** Concentración de zineb en las muestras analizadas

Muestra	D.O. (540 nm)	Z ( $\mu$ g/tubo)	Z ( $\mu$ g/mL de plasma)	Z (mM)
1	0,0595	4,8	2,4	1.1
2	0,1414	11,5	5,7	2.9
3	0,0661	5,4	2,7	1.4
4	0,1378	11,2	5,6	2.9

Las concentraciones de zineb en las muestras de animales tratados o personas expuestas duplican los valores observados en los respectivos controles que oficiaron de “blancos”.

No se detectó la presencia de zineb en ninguna de las muestras de los alimentos que hemos analizado.

## DISCUSIÓN

La presencia de agroquímicos en el plasma o en los tejidos de los animales tratados evidencia su distribución sistémica luego de la inyección i.p., y su llegada a cualquiera de los órganos estudiados. Respecto a las muestras de plasmas correspondientes a los fumigadores profesionales, los niveles de zineb encontrados también demuestran la distribución sistémica del micomicida absorbido probablemente por vía dérmica o inhalatoria (las más frecuentes durante exposición laboral a agroquímicos). Esto podría confirmar que la etiología de las alteraciones que se observaron en los biomarcadores analizados en este trabajo se relaciona con presencia de estas sustancias tóxicas o sus metabolitos.

Comparando la concentración de los agroquímicos estimadas según estas técnicas observamos que la concentración de zineb en las muestras es 10 veces mayor a

las concentraciones de los otros agroquímicos aplicados en dosis similares. Esto podría deberse a que esta técnica detecta concentración de Zn (II), por lo que cuantifica el Zn proveniente del zineb y el que no proviene del micomicida.

En el caso de los residuos de agroquímicos en los alimentos de consumo diario para humanos, numerosos grupos de investigación han puesto a punto técnicas que permiten realizar la extracción y posterior cuantificación de estas sustancias en muestras como agua (Abdullah et al., 1995) y jugos de frutas (Khrolenko y Wiczorek, 2005). Las técnicas que se utilizan en este trabajo, si bien no son consideradas de referencia pueden resultar suficientes como para poder establecer la presencia de los agrotóxicos. No sería aconsejable comparar los resultados con las concentraciones establecidas para los correspondientes LMRs. Hemos detectado la presencia de D en muestras de uvas que fueron homogeneizadas sin previo lavado; sin embargo, los niveles de este pesticida se vuelven indetectables cuando se analizan uvas lavadas indicando la importancia crucial que tiene el lavado escrupuloso de los alimentos antes de ser consumidos.

Se sabe muy poco acerca de la bioacumulación de estos tres agroquímicos a pesar de ser tan ampliamente utilizados en todo el mundo. No obstante, el hecho de ser relativamente solubles en agua les permite persistir en suelo y en agua con valores de movilidad y escorrentía o deriva que dependen de las características del suelo o de efectos de matriz. De todos modos este parámetro está determinado por múltiples factores como la composición química del terreno sembrado, el régimen de lluvias, la flora microbiana, etc. De modo que la cantidad bioacumulada en los productos a consumir es tan incierta que debe ser necesariamente determinada mediante técnicas analíticas de referencia. En nuestro sistema experimental, las ratas poseían en circulación concentraciones importantes de los agrotóxicos aún luego de haber pasado más de 24 horas de la última inyección i.p. lo que sugiere que existe bioacumulación, al menos en

tejidos de mamíferos expuestos sub-crónicamente.

Resulta importante señalar que durante la determinación de glifosato, se observó que los espectros de masa de las muestras provenientes de animales tratados evidenciaron patrones muy diferentes a los de las muestras de animales sin tratar. Como mencionábamos en la sección de resultados, el glifosato es similar estructuralmente a los aminoácidos formadores de proteínas presentes en los mamíferos. Estos compuestos pueden reaccionar con el agente derivatizante a través de sus grupos amino y por lo tanto los productos de derivatización pueden observarse como señales en el mismo espectro. Las diferencias mencionadas en el perfil espectral nos permiten especular que la intoxicación por glifosato podría alterar la composición o estructura química de los aminoácidos e incluso su proporción en el pool sérico, lo que resulta un hallazgo inédito en este trabajo de tesis. Resulta entonces de interés poder establecer que tipo de modificaciones ocurren sobre estos compuestos y adjudicar estos cambios al mecanismo de acción tóxica del glifosato, del que se conoce muy poco en mamíferos.

Entre los pesticidas estudiados el glifosato es el de más reciente introducción en el mercado, el más utilizado mundialmente y del que se ignora más información. La bioacumulación de este herbicida puede resultar un problema de gran importancia para los humanos. Existen investigaciones que demuestran que el glifosato puede ser absorbido por las plantas y concentrarse en las regiones que se utilizan como alimento para humanos y animales (forraje sobre todo). De hecho, se han hallado vestigios de la droga y de su metabolito (el AMPA) en la soja transgénica. Sin embargo, estos vestigios no superan los límites máximos permitidos hasta el presente. También se los ha hallado en alimentos elaborados en base a la leguminosa. Además, determinaciones hechas en USA ponen en evidencia la presencia de glifosato en frutillas, moras, frambuesas, lechugas, zanahoria y cebada, pero también en músculo de cerdos alimentados con

piensos derivados de cereales y leguminosas tratados con el herbicida.

La aplicación de este agroquímico tiene un gran impacto sobre el ecosistema. Se vio que favorece el crecimiento de hongos patógenos. Como resultado, estos hongos predominan en ambientes no usuales y liberan sus toxinas (micotoxinas) que resultan perjudiciales para muchas otras formas de vida incluyendo al hombre. Uno de los géneros de hongos que tiende a aumentar en presencia de glifosato es el género *Fusarium*. En Estados Unidos se ha observado que la utilización cada vez mayor de glifosato en la soja transgénica, incrementó los problemas derivados de su micotoxina en alimentos destinados para consumo humano.

No se tienen claros muchos datos de relevancia que involucran al herbicida y su uso, por ejemplo la vida media en el suelo la cual es un parámetro indispensable para evaluar el impacto de cada aplicación. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos ha reportado que la vida media del glifosato en el suelo es de 60 días. Sin embargo, esta misma agencia añade que en estudios de campo los residuos se encuentran a menudo al año siguiente.

Teniendo en cuenta la escasa información disponible acerca del comportamiento de este agrotóxico y su masiva utilización, resulta alarmante pensar que la intoxicación crónica (subclínica) con este herbicida puede ser un hecho cotidiano que sin dudas merece estudios más exhaustivos.

Estas cuestiones relacionadas con el glifosato, también son aplicables a otros agroquímicos por lo que la evaluación del riesgo de exposición a plaguicidas o a sus residuos resulta una tarea muy compleja. Este escenario se complica aún más si se tiene en cuenta que en agua y alimentos se presentan como mezclas complejas de efectos inciertos.

En Argentina se ha llevado a cabo durante las campañas oficiales 2006 y 2007 un monitoreo de residuos de agroquímicos en general. El muestreo se basó en “las buenas

prácticas” recomendadas por el Standard Internacional ISO 950-1979. Se realizó sobre granos almacenados con destino a exportación, tanto al ingreso (terminal), como al egreso (cinta de embarque) de los principales puertos. Los resultados arrojaron concentraciones de glifosato del orden de 0,02-0,07 mg/g en el poroto (almacenado en silos), se detectaron trazas no dosables en harinas de soja, pero no se lo halló en aceites. Cuando se estudiaron productos frescos (frutas para exportación principalmente) el dimetoato se halló siempre en cantidades vestigiales en cáscaras de cítricos provenientes de ciertas cuencas productivas, mientras que en otras no se lo detectó en ningún lote analizado. La presencia de dimetoato estuvo siempre asociada a la de cipermetrinas y en algunos casos también a la de paratión. Esto indica un uso vinculado o determinado por factores regionales que quizás estén conectados a cuestiones climáticas (condicionamiento de las plagas) y/o malas prácticas agropecuarias. En los casos positivos las concentraciones de dimetoato llegaron a ser detectables para ciertos lotes de naranjas en el límite permitido (SAGYPA, 2007). Lamentablemente, no contamos con datos ciertos (oficiales) sobre las determinaciones de zineb o compuestos vinculados como el maneb que es otro micostático tópico muy utilizado en numerosos tipos de cultivo.



## **CONCLUSIONES PARCIALES**

La presencia de los agroquímicos en el plasma o en los tejidos de los animales tratados evidencia la distribución sistémica de estos compuestos luego de la inyección intraperitoneal. Esto permite adjudicar los cambios observados a mecanismos de daño provocado por los agroquímicos administrados.

A su vez, debido a que fueron detectados los tres plaguicidas investigados se pueden inferir como ciertas las conclusiones referidas a sus efectos aditivos o causados por asociación.

La detección de agroquímicos como residuos en los alimentos mediante técnicas analíticas cuantitativas resulta indispensable para asegurar la inocuidad de los alimentos para consumo humano y animal. Permitirá además establecer normas para el buen uso de los plaguicidas.

## **CAPÍTULO IV**

**Biomarcadores de estrés oxidativo y  
defensa antioxidante en la evaluación  
de riesgo en poblaciones humanas  
expuestas a agroquímicos.**

## INTRODUCCIÓN

En regiones de nuestro país en donde se producen frutas y verduras, se utilizan agroquímicos (fungicidas, insecticidas, herbicidas, acaricidas, nematocidas, etc.) para eliminar plagas que atentan contra la productividad y la calidad de los alimentos. Estas sustancias son aplicadas por fumigadores profesionales que realizan trabajos de fumigación *estacionales*, adoptando la modalidad “golondrina”, es decir, fumigan varios tipos de plantaciones viajando por diferentes lugares del país. Esto resulta en una exposición a pesticidas variada tanto en cantidad como en calidad durante todo el año.

Actualmente, el estado de salud de estas personas es controlado por una batería de ensayos clínicos de rutina que no siempre son lo suficientemente sensibles y específicos como para demostrar, de manera precisa, el grado de intoxicación. Evaluar los riesgos reales para la salud de fumigadores profesionales podría evitar los efectos perjudiciales de

esta actividad prolongada en el tiempo, y concientizar a las empresas a fin de brindar un marco de protección más eficiente a sus empleados. Al mismo tiempo, alentaría la creación de normas que regulen en forma estricta este tipo de actividades, especialmente aquellas cuestiones relacionadas con la toxicidad, el uso de la indumentaria adecuada, el correcto desecho de los recipientes contenedores, entre muchísimas otras cuestiones (Bhalli et al., 2009). De esta manera, se podrían obtener los beneficios de la aplicación de los agroquímicos evitando los efectos adversos sobre la salud humana y el medioambiente.

Para llevar adelante esta parte del trabajo obtuvimos muestras de fumigadores de una finca cercana a la ciudad de Concordia (Entre Ríos) especializada en el cultivo de cítricos, en el marco de un procedimiento de evaluación del estado de salud de estos trabajadores por una aseguradora de riesgos de trabajo. En el momento de la colección de las muestras los pacientes firmaron un consentimiento informado que permitió realizar determinaciones de laboratorio, además de una serie de estudios clínicos y de diagnóstico complementarios. Los pesticidas utilizados por estos fumigadores son del grupo de los organofosforados, carbamatos, ditiocarbamatos y piretroides, además de los formulados a base de cobre (oxicloruro de cobre, sulfato de cobre, carbonato básico de cobre, sulfato cuprocálcico, etc.).

Paralelamente a este grupo de fumigadores se seleccionaron personas sanas y de edades similares a las del grupo investigado, que habitan en la misma región pero que nunca estuvieron expuestas a sustancias agroquímicas en sus ámbitos laborales, para conformar de esta manera el grupo control.

En la selección de los integrantes para ambos grupos experimentales se siguieron los siguientes criterios de exclusión:

- Neoplasias en curso (se admitieron solo aquellos en los cuales se superó una enfermedad sin recidiva en los últimos 10 años).

- Enfermedades degenerativas osteoarticulares.
- Patologías autoinmunes de cualquier tipo.
- Infecciones agudas o crónicas fúngicas, virales o bacterianas (sífilis, HIV, hepatitis virales de cualquier tipo, tuberculosis, micosis sistémicas, bronquitis, infección herpética, etc.).
- Infestaciones de cualquier etiología (Chagas, leishmaniasis, paludismo, toxoplasmosis, parasitosis intestinales).
- Pacientes con asma o hiperérgicos/alérgicos de cualquier grado.
- Dislipémicos que requirieran tratamiento hipolipemiante farmacológico.
- Enfermedades neurodegenerativas en cualquier estado evolutivo (aun incipiente) y familiares directos (hermanos, hijos) de pacientes con enfermedades neurodegenerativas diagnosticadas.
- Enfisemáticos.
- Desnutridos o malnutridos.
- Receptores de transplantes de cualquier tejido u órgano sin importar la magnitud o tipo de implante.
- Cardiopatías bajo tratamiento farmacológico (con especial atención al empleo de drogas hipotensoras generadoras de análogos de óxido nítrico, por ejemplo dinitrato de isosorbide o nitroprusiatis).
- Varones con varicocele o con hiperplasia prostática benigna.
- Pacientes en período post-quirúrgico de cualquier intervención.
- Pacientes con endocrinopatías de cualquier etiología con o sin tratamiento.
- Deportistas de elite o profesionales de cualquier rama del deporte.
- Empleados de industrias de la pintura, plásticos, lubricantes, productos farmacológicos, curtiembre, tintorerías, refinerías o cualquier actividad afín con

estas exposiciones.

- Mujeres con enfermedad poliquística de mama u ovario. Mujeres dismenorreicas o bajo tratamiento anticonceptivo farmacológico.
- Pacientes con consumo habitual de psicofármacos de cualquier tipo.
- Pacientes vacunados recientemente contra cualquier antígeno.
- Convalecientes de trauma físico de cualquier tipo.
- Pacientes edematosos o febriles sin diagnóstico cierto.
- Personas clínicamente sanas que consumen preparaciones magistrales de cualquier tipo tales como tisanas, formulaciones vitamínicas, suplementos antioxidantes, etc.
- Personas que consumen esteroides de tipo anabólico o anti-inflamatorios esteroides o no esteroides en forma habitual.
- Personas que siguen dietas extremas, vegetarianos, macrobióticos, etc.
- Fumadores excesivos (más de 10 cigarrillos diarios).
- Alcohólicos (más de 3 copas de vino diarias).
- Adictos a cualquier droga.
- Gestantes en cualquier período, y mujeres en el post-parto hasta los 6 meses del alumbramiento.

Finalmente, en nuestro estudio se incluyeron 54 muestras que cumplían las condiciones citadas antes, de las cuales 23 correspondieron a personas control con edades promedio de  $25 \pm 5$  años, con un 43 % de mujeres y un 69 % de fumadores. El grupo de fumigadores, fue de 31 personas con un promedio de edad de  $26 \pm 5$  años de los cuales un 39 % fueron mujeres y un 48 % fumadores.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Colección de muestras.**

Se obtuvieron muestras de sangre entera (por punción de la vena radial) que se anticoaguló con heparina (10 UI/ml de sangre). Las muestras fueron centrifugadas 15 min a 2500g para obtener plasmas que se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Además de las determinaciones rutinarias de laboratorio requeridas por la aseguradora de riesgos de trabajo, se efectuaron determinaciones relacionadas con el estado oxidativo tal como se describió en el Capítulo I para los experimentos con animales.

## **Determinaciones**

### **1. Biomarcadores de química clínica**

Se utilizaron kits de Wiener Laboratorios (los números de catálogo se indican en la sección correspondiente del Capítulo I), para realizar las siguientes determinaciones (todas las actividades enzimáticas se ensayaron en plasma, libre de elementos figurados):

- 1.1. Fosfatasa Alcalina (FAL)**
- 1.2. Bilirrubina total**
- 1.3. Albúmina**
- 1.4. Transaminasa glutámico oxalacética (TGO)**
- 1.5. Transaminasa glutámico pirúvica (TGP)**
- 1.6.  $\gamma$ -Glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GT)**
- 1.7. Glucemia**
- 1.8. Amilasa**
- 1.9. Fructosaminas**
- 1.10. Uremia**
- 1.11. Creatininemia**
- 1.12. Uricemia**
- 1.13. Hemoglobinemia**
- 1.14. Colinesterasa**
- 1.15. Proteínas plasmáticas totales**
- 1.16. Lactato deshidrogenasa (LDH)**

### **2. Hemograma**



### 3. Biomarcadores de estrés oxidativo.

#### 3.1. Nitritos y nitratos [NO<sub>x</sub>].

#### 3.2. Poder reductor plasmático total FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

(3.1 y 3.2 técnicas ya descritas en la sección metodológica del Capítulo I).

#### 3.3. Concentración de cobre [Cu] plasmático.

##### *Fundamento*

La medición de Cu se realizó según el método de Berkovitch et al. (2003). La muestra se mineralizó por calentamiento en presencia de una mezcla de ácidos fuertes oxidantes y posteriormente se diluyó, filtró, y analizó mediante espectrofotometría de llama.

##### *Reactivos*

- HNO<sub>3</sub> concentrado de alta pureza.
- HClO<sub>4</sub>.
- Agua ultrapura (18 mΩ cm, Carlo Erba, Italia).
- Solución standard de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en HNO<sub>3</sub> 0.5 N.

##### *Procedimiento*

- Se mineralizaron 100 μL de muestra con una mezcla de HNO<sub>3</sub> (c) y 1 mL de HClO<sub>4</sub>, calentando a 120 °C por 60 minutos en block térmico.
- El digesto se enfrió y se diluyó con agua ultrapura (18mΩ.cm). Se ultrafiltró a través de una membrana Millipore de 0.22 μm (Milli-Q Purification System, de Millipore, CA, USA).
- El ultrafiltrado fue aspirado directamente por el espectrómetro de llama Perkin-Elmer 1100 B Spectrophotometer, equipado con una lámpara catódica Perkin-Elmer (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA) con un ancho de espectro de 1 nm.

- La calibración se realizó con una solución standard de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  en  $\text{HNO}_3$  0.5 N (Merck, Darmstad, Alemania).
- Todas las mediciones se realizaron en el modo *alto de pico* (324.7 nm). Los coeficientes de variación intra- e inter- ensayo fueron del 15.5 y 6.0 %, respectivamente.

#### **4. Biomarcadores de sistema de defensa antioxidante.**

##### **4.1. Glutación total por espectrofotometría cinética**

##### **4.2. Vitámeros E.**

(4.1 y 4.2 técnicas ya descritas en la sección metodológica del Capítulo I).

#### **5. Concentración de proteínas secuestradoras de metales.**

##### **5.1. Ceruloplasmina**

###### *Fundamento*

El método empleado fue descrito en detalle por Martínez-Subiela et al. (2004). Las muestras se analizaron mediante un ensayo cinético aprovechando la propiedad de oxidasa que ejerce la ceruloplasmina (CRP) sobre ciertos sustratos como la p-fenilendiamina la cual se transforma en un cromógeno (D.O. máx. a 550 nm) cuya velocidad de aparición es proporcional a la concentración de ceruloplasmina.

###### *Reactivos*

- Buffer acético/acetato 1.36 M, pH 6.10 en agua bidestilada.
- Reactivo: clorhidrato de p-fenilendiamina (Sigma Chem. Co.) en 25 mL de buffer acético/acetato 1.36; pH 6.10.
- Ceruloplasmina pura (bovina o humana, de Sigma C2026 ó C4519 con actividad entre 30 y 60 U de CRP-oxidasa/mg en buffer de reacción).

### *Procedimiento*

La determinación se llevó a cabo en cubetas de vidrio termostalizadas a 37 °C.

- Se adicionó a 400 µL de buffer acético/acetato pH 6.10, 100 µL de reactivo y se incubó la mezcla a 37 °C.
- La reacción se inició por el agregado de 25 µL de plasma, se invirtió la cubeta para mezclar y se registró la variación de la D.O. a 505 nm por 3 minutos.

La pendiente ( $\Delta DO/\text{min}$  a 550 nm) se utilizó para calcular la concentración de ceruloplasmina por comparación con una curva de calibración efectuada con la proteína pura.

## **5.2. Metalotioneínas.**

### *Fundamento*

Se determinó el contenido total de metalotioneínas utilizando el método de saturación por  $\text{Ag}^+$  de Bienengraber et al., (1995). Esta metodología aprovecha la elevada afinidad existente entre  $\text{Ag}^+$  y las metalotioneínas.

### *Reactivos*

- Solución de trabajo de  $\text{Ag}^+$  20 µg/mL (se preparó a partir de  $\text{AgNO}_3$  Merck ultrapura).
- Buffer glicina 0.5 M, pH 8.50.
- KCl 1.15 % en agua bidestilada.
- Buffer Tris-HCl 30 mM pH 8.0.
- Hemolizado de glóbulos rojos: se obtuvo a partir de sangre heparinizada que se lavó con 20 mL de KCl 1.15 %, se centrifugó a 500g 5 min y se descartó el sobrenadante. Luego se repitió el lavado y al pellet se lo trató con 15 mL de buffer Tris-HCl 30 mM pH 8.0. Después de incubarlo a temperatura ambiente por 10

minutos, se lo centrifugó a 8000g 10 minutos. El sobrenadante es el hemolizado que se utilizó en la reacción.

- $\text{HNO}_3$  al 3 %.

#### *Procedimiento*

- Se centrifugó el plasma 15 minutos a 5000g, y se empleó el sobrenadante.
- A 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se le agregó 700  $\mu\text{L}$  de buffer glicina y se mezcló.
- En otro tubo llamado “blanco de reactivos” se colocaron 800  $\mu\text{L}$  de buffer glicina.
- Se agregó a todos los tubos 500  $\mu\text{L}$  de la solución de  $\text{Ag}^+$  y se los incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A esta mezcla se le agregó una cantidad fija de hemolizado de glóbulos rojos (100  $\mu\text{L}$ ).
- Se incubó 2 minutos a 100 °C y se centrifugó a 1200g por 7 minutos.
- Sin retirar el precipitado, se agregaron otros 100  $\mu\text{L}$  del hemolizado y se repitió el paso anterior (calentamiento y centrifugación).
- Se aspiró el sobrenadante, se lo trasvasó a otro tubo, y se lo volvió a centrifugar a 1500g por 5 minutos.
- Se aspiró el sobrenadante límpido y se lo transfirió a un tubo de vidrio con tapa a rosca. Se acidificó con  $\text{HNO}_3$  al 3 % en proporción de 500  $\mu\text{L}$  de ácido por 1.5 mL de sobrenadante. Se mantuvo en frío y en la oscuridad hasta la cuantificación de ión  $\text{Ag}^+$  mediante absorción atómica (espectrómetro Avanta Ultra Z de GBC Scientific Equipment, Hampshire, IL, USA).

Para el cálculo se consideró que la estequiometría de  $\text{Ag}^+$ -metalotioneína es 17 g-at. Ag por mol de proteínas (Zelazowsky et al., 1989).

## 6. Biomarcadores de daño oxidativo.

### 6.1. TBARS (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico).

### 6.2. Carbonilos proteicos.

(6.1 y 6.2 técnicas ya descritas en la sección metodológica del Capítulo I).

## Estadística

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA (análisis de varianza), empleando el software de *GB-STAT Professional Statistics Program* (versión 8.0) de Dynamic Microsystems Inc. (Silver Springs, MD., USA), seguido por test de Tukey. La graficación científica se efectuó mediante *Sigma Plot Scientific Graphing Software* (versión 8.0) de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO. USA). En todos los casos la hipótesis nula fue rechazada para los niveles 0.05 ó 0.01 que correspondieron a diferencias *significativas* o *muy significativas*, respectivamente ( $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*).

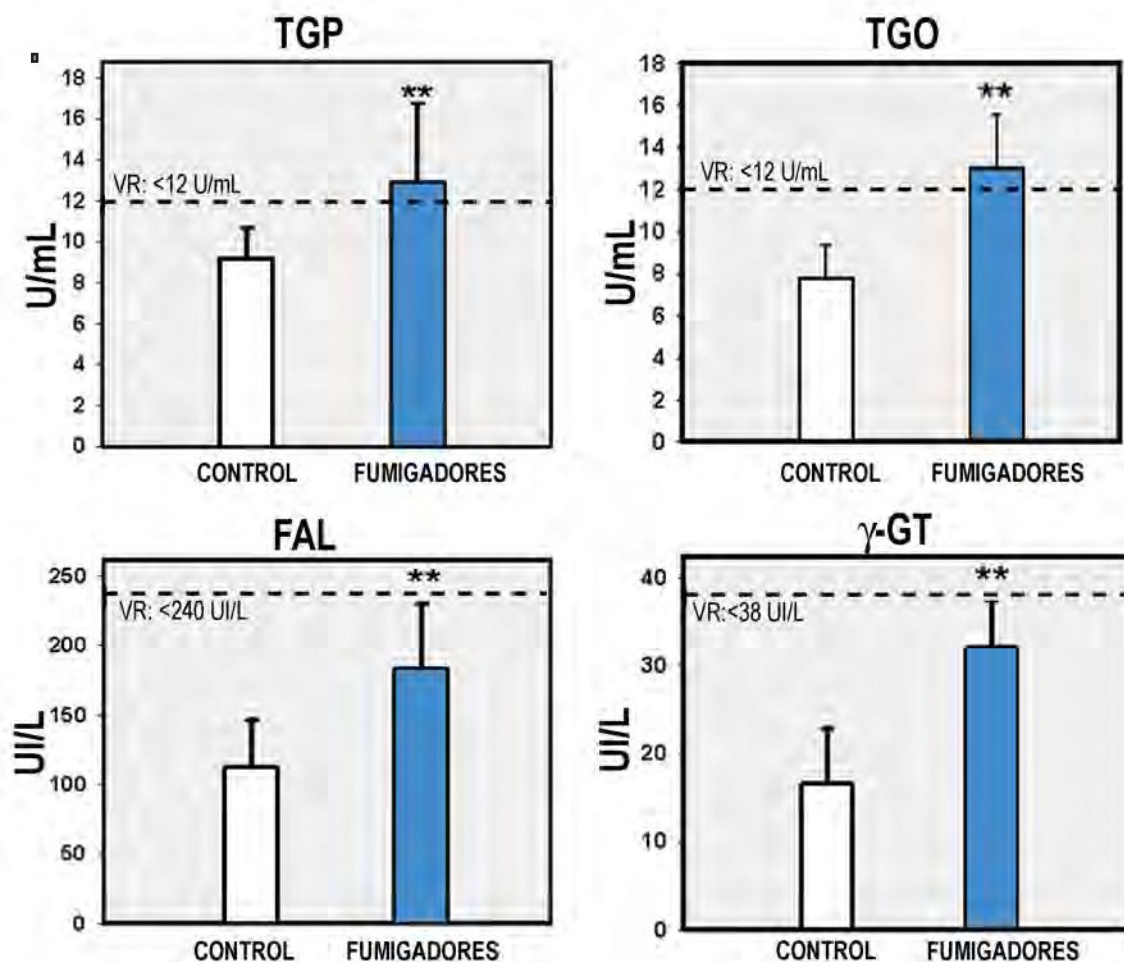
## RESULTADOS

Según se describió antes, ambos grupos experimentales tienen proporciones similares de sexo y edades. Sin embargo, varían significativamente en el porcentaje de fumadores en cada uno de ellos. Por este motivo, los resultados relacionados con el estrés oxidativo y el sistema de defensa antioxidante se analizaron para cada grupo teniendo en cuenta dos subgrupos, *fumadores* y *no fumadores*. Esta separación resulta necesaria por el documentado efecto del cigarrillo como inductor de estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1999). El humo del cigarrillo es una mezcla muy compleja de agentes tóxicos muchos de los cuales son, por sí mismos, radicales libres.

Entre las determinaciones realizadas se encontraron aquellas destinadas a evaluar la función hepática a través de la actividad de enzimas como transaminasas (TGO y TGP),  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GT) y fosfatasa alcalina (FAL) (**Figura 39**), y los

niveles de albúmina y bilirrubina total en plasma (Figura 40).

**Figura 39.** Actividad plasmática de TGO, TGP,  $\gamma$ -GT y FAL en controles y fumigadores.

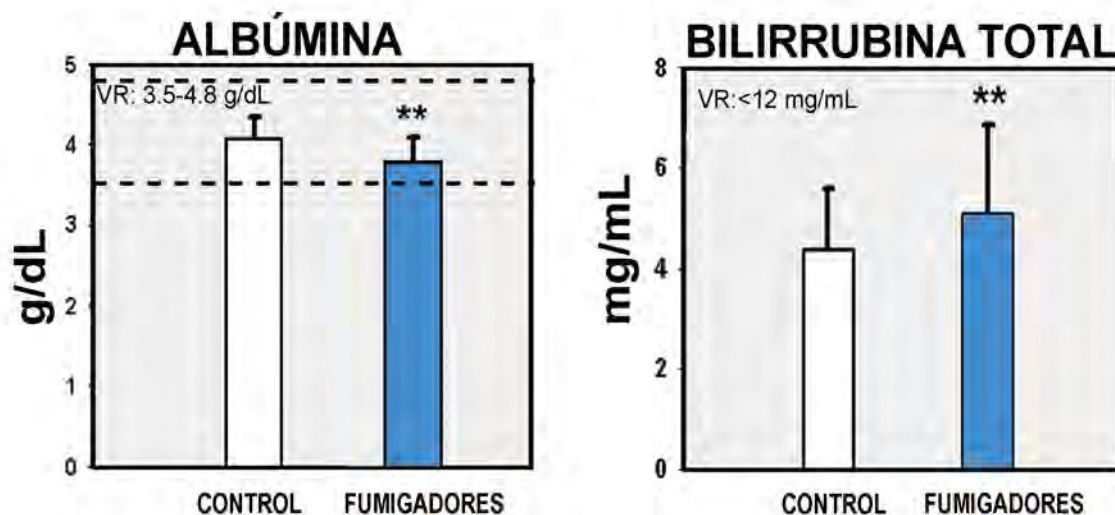


Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) en UI/mL para la actividad de transaminasas y U/L para actividad de FAL y  $\gamma$ -GT. La línea punteada indica el valor de referencia establecido para la población. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como \*\* ( $p < 0.01$ ).

Estos resultados indican que la exposición laboral a agroquímicos provocó alteraciones hepáticas elevando la actividad de ambas transaminasas, FAL y  $\gamma$ -GT en el plasma. En cuanto a la concentración plasmática de albúmina y bilirrubina total, se observó un incremento altamente significativo en la concentración de bilirrubina total

y una disminución, también estadísticamente significativa, de los niveles de albúmina plasmática (**Figura 40**).

**Figura 40.** Concentración de albúmina y bilirrubina total en plasmas de controles y fumigadores.



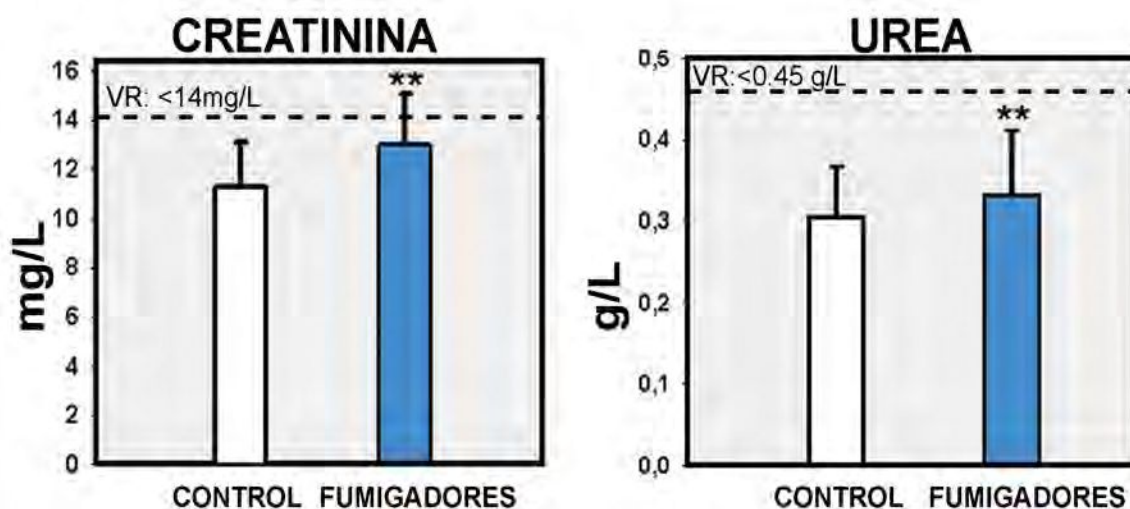
Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) en mg/mL para bilirrubina y g/dL para la concentración de albúmina. La línea punteada indica el valor de referencia establecido para la población. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como \*\* ( $p < 0.01$ ).

En todas las determinaciones relacionadas a la función hepática se observaron diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre el grupo de fumigadores y el grupo control; sin embargo, en ninguno de los casos los valores para el grupo de fumigadores alcanzaron los rangos de referencia (línea punteada) utilizados para el diagnóstico clínico en la población.

Por otra parte, la función renal fue estimada mediante la evaluación de los niveles plasmáticos de creatinina, uremia y uricemia (**Figura 41**).



**Figura 41.** Niveles de urea y creatinina plasmática en grupos controles y fumigadores.

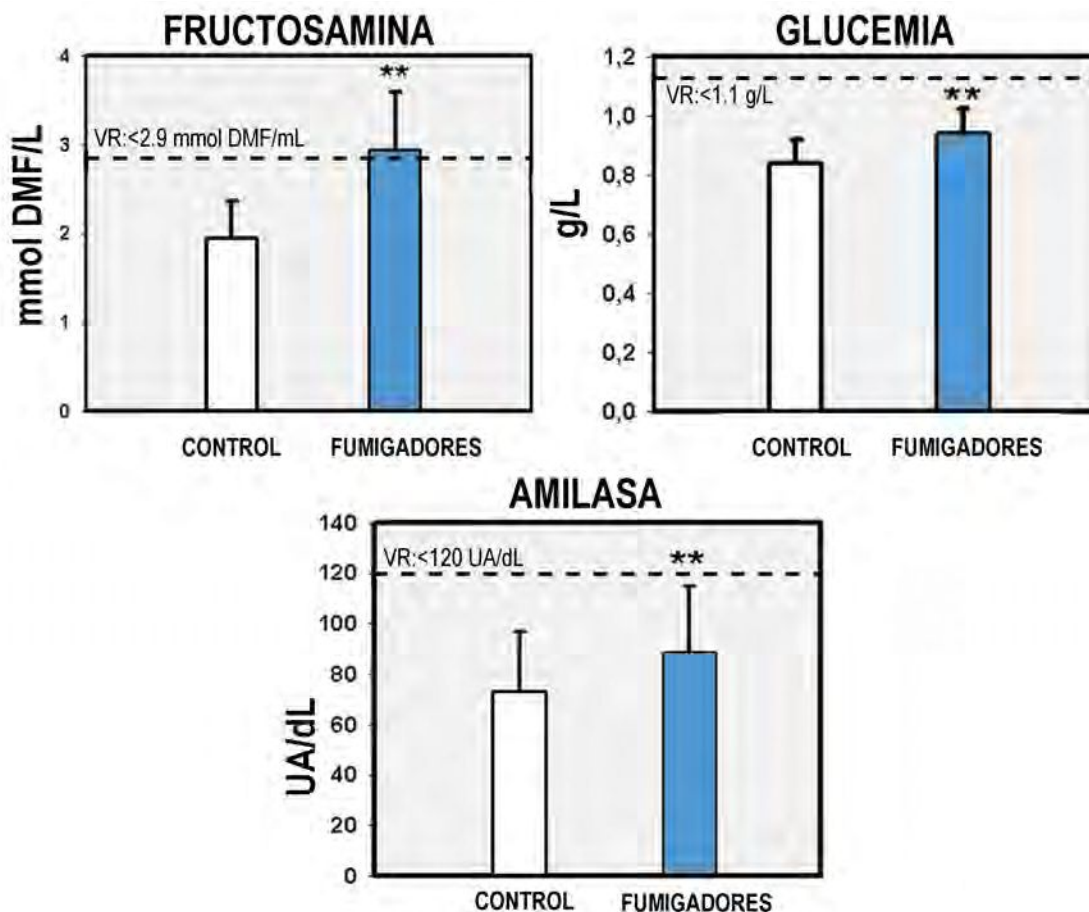


Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) en mg/L para la concentración de creatinina y g/L para la de urea plasmática. La línea punteada indica el valor de referencia establecido para la población. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como \*\* ( $p < 0.01$ ).

En la evaluación de estos resultados se observó algo similar a lo que ocurre con los parámetros de la función hepática. El grupo de los fumigadores presentó valores significativamente diferentes a los del grupo control aunque estos no alcanzaron los límites de referencia que establecen su significación clínica. Los niveles de ácido úrico en plasmas de fumigadores no resultaron diferentes a los del grupo control (datos no mostrados).

También evaluamos en estas personas, parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa y la función pancreática tales como glucemia, fructosaminas y amilasa plasmática (**Figura 42**). Evidencia experimental previa señala alteraciones de la función pancreática atribuibles a la intoxicación aguda y crónica con pesticidas organofosforados (Kamath y Rajini, 2007; Rahimi y Abdollahi, 2007).

**Figura 42.** Actividad de amilasa pancreática y concentración de glucosa y fructosaminas en plasmas de controles y fumigadores.



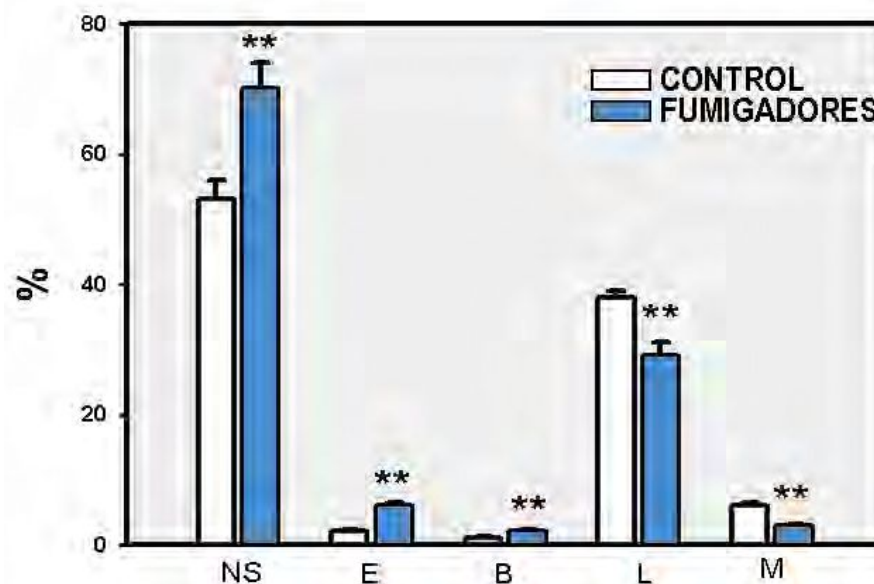
Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) en g/L para la glucemia, mmol de DMF/L para los niveles de fructosaminas y UA/dL para la actividad de amilasa pancreática en plasma. DMF: desoximorfolinofructosa utilizado como standard. La línea punteada indica el valor de referencia establecido para la población. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como \*\* ( $p < 0.01$ ).

También en este caso se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales que no fueron suficientes para sobrepasar los límites de la significación clínica.

En todos los casos se estudió el perfil hematológico básico. El contenido de hemoglobina, y los recuentos de glóbulos rojos y blancos no mostraron diferencias significativas en relación al control. En cambio, sí se observaron diferencias en la

composición porcentual de la fórmula leucocitaria entre ambos grupos (**Figura 43**).

**Figura 43.** Fórmula leucocitaria relativa en controles y fumigadores.

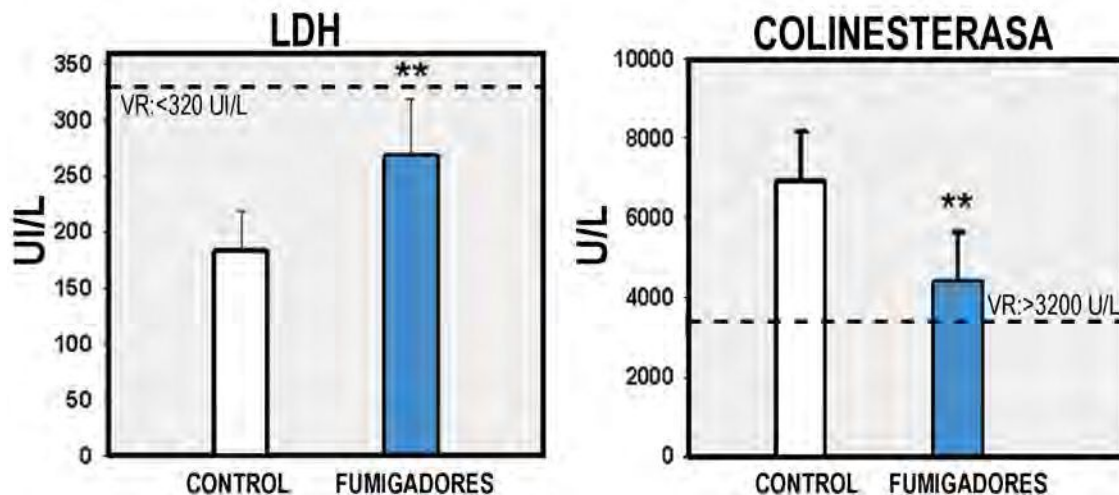


Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard). NS: neutrófilos segmentados, E: eosinófilos, B: basófilos, L: linfocitos y M: monocitos. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como \*\* ( $p < 0.01$ ).

Se observó un aumento significativo del recuento relativo de neutrófilos segmentados, eosinófilos y basófilos, concomitantemente con una disminución de linfocitos y monocitos.

Por último, evaluamos biomarcadores enzimáticos periféricos que se encuentran relacionados con la toxicidad por plaguicidas, tales como la actividad de lactato deshidrogenasa (principal enzima marcadora de daño celular) y la actividad de colinesterasa plasmática (principal enzima inhibida por organofosforados, y de gran utilidad en la evaluación de personas que sufren intoxicaciones -sobre todo agudas- con pesticidas) (**Figura 44**).

**Figura 44.** Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) y de colinesterasa plasmática en grupos control y fumigadores.



Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) para las actividades plasmáticas de LDH y colinesterasa en UI/L. La línea punteada indica el valor de referencia establecido para la población. Los valores con diferencias significativas respecto al control están indicados como \*\* ( $p < 0.01$ ).

La actividad de colinesterasa plasmática (pseudo-colinesterasa o butirilcolinesterasa) se encontró disminuida significativamente en el grupo de los fumigadores respecto al control, lo que indica que estas personas se exponen a pesticidas del grupo de los organofosforados, piretroides y carbamatos capaces de disminuir la actividad de esta enzima. Respecto de la actividad plasmática de LDH, el aumento observado en el grupo de fumigadores podría responder a una alteración de la permeabilidad de la membrana celular de modo que esta enzima (distribuida en forma ubicua en numerosos tejidos) se vuelque a la circulación general.

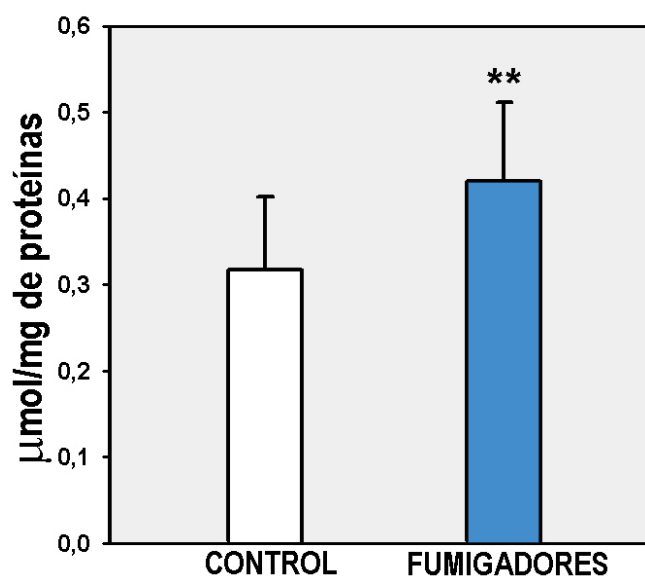
Hemos visto que en todas las determinaciones de química clínica que se realizaron hubo diferencias significativas entre el grupo control y el de los fumigadores. Sin embargo, su significado clínico es discutible pues no sobrepasaron los valores correspondientes a los límites de referencia. Estas determinaciones no tendrían en teoría la capacidad de identificar intoxicaciones sub-clínicas. Esto nos condujo a la necesidad de introducir

otros biomarcadores, más sensibles y específicos, que permitieran detectar a pacientes con una intoxicación libre de síntomas. Este tipo de cuadro es el que se debería expresar como consecuencia de una exposición a concentraciones inciertas –aunque bajas- de plaguicidas durante un largo período de tiempo. El hallazgo de una herramienta clínica sería útil para evitar el desarrollo de patologías vinculadas a este tipo de exposición, así como también, para generar estrategias de bioseguridad ambiental, seguridad laboral, prevención, y eventual tratamiento de las personas expuestas.

Teniendo en cuenta la gran cantidad de bibliografía que relaciona la exposición a agroquímicos y el desarrollo de estrés oxidativo (señalada también en los Capítulos I y II de este trabajo de tesis) se llevaron a cabo determinaciones relacionadas con el estado redox en los plasmas de estos pacientes. Se subdividió a cada grupo de estudio en dos subgrupos: fumadores y no fumadores. Se analizaron los resultados y se observó que el consumo de cigarrillos modificó los niveles de todos los biomarcadores estudiados en una proporción no muy significativa que solo contribuía entre un 10 y un 15 % a la diferencia total entre ambos grupos.

En la **Figura 45** se muestran los resultados obtenidos en la determinación de nitratos y nitritos ( $[\text{NO}_x]$ ), principales productos de degradación del  $\text{NO}^*$  y  $\text{ONOO}^-$  (RNS), en muestras de plasmas de fumigadores y controles.

**Figura 45.** Niveles de [NOx] plasmáticos en controles y fumigadores.

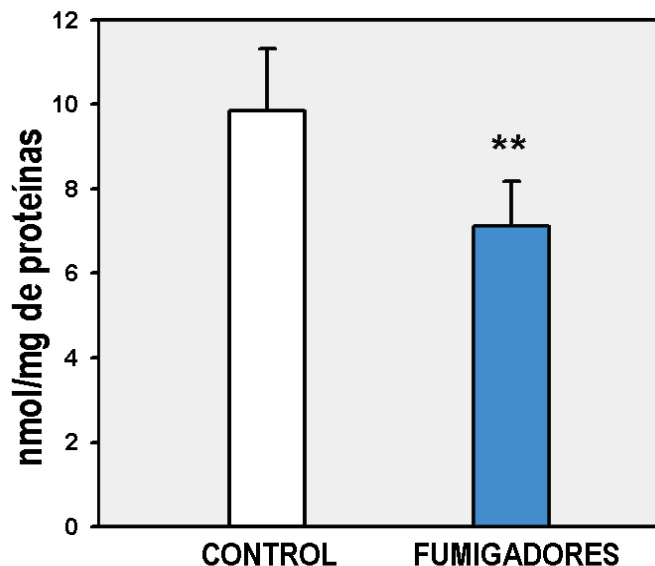


Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) para niveles plasmáticos de [NOx] como  $\mu\text{mol/mg}$  de proteínas. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como  $**p < 0.01$

La población expuesta presentó un aumento en la concentración de nitritos plasmáticos en comparación con el lote control que fue de aproximadamente el 30 %.

También determinamos la capacidad reductora total del plasma a través del ensayo FRAP. Ya se explicó que esta determinación permite evaluar globalmente el balance entre especies pro-oxidantes y reductoras presentes en el plasma. En nuestro caso se utilizaron muestras de plasma previamente tratadas con uricasa a fin de restar la contribución del ácido úrico al poder reductor total (Benzie y Strain, 1996). De esta forma, no fue necesario efectuar correcciones por el contenido individual de urato en cada muestra. Los resultados aparecen en la **Figura 46**.

**Figura 46.** Capacidad antioxidante plasmática total (ensayo FRAP) en individuos controles y fumigadores.



Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) para la capacidad antioxidante plasmática en nmol/mg de proteínas. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como \*\* $p < 0.01$ .

Se observaron diferencias significativas entre el grupo de fumigadores y el grupo control. La contribución mayoritaria a la reducción del FRAP plasmático en el grupo expuesto es atribuible a la exposición a los agroquímicos, pues solo un pequeño porcentaje sería adjudicable al hábito de fumar. Para sustentar esta conclusión se puede hacer un sencillo cálculo de ponderación entre variables que resulta en el siguiente ajuste:

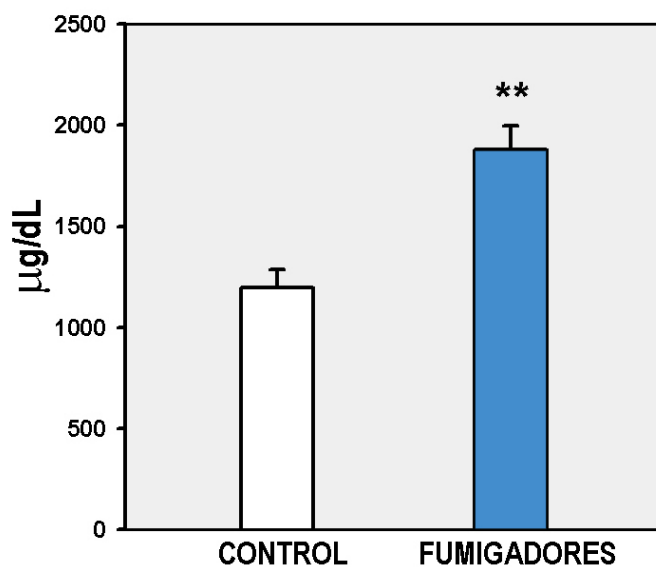
$$\{[TF - (CF)^2 / CNF].100\} / TF$$

Donde T indica expuesto, C, control, F, fumador y NF no fumador. Esta ponderación resulta en una disminución del FRAP igual al 22 % en la población expuesta, aún considerando la influencia del hábito de fumar.

Por otra parte, se sabe fehacientemente que el cobre es un elemento esencial para la actividad de muchas enzimas, incluso para aquellas involucradas en el sistema de defensa antioxidante tales como es la CuZn-SOD. Sin embargo, en estado libre

el Cu es capaz de catalizar la reacción de formación de radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno o de anión superóxido. Como vimos en la introducción de este trabajo, el radical hidroxilo es altamente reactivo y puede reaccionar rápidamente con cualquiera de las macromoléculas celulares provocando daño oxidativo. Por esta razón es que se reconoce al Cu y a otros iones de metales de transición, como inductores de la formación de radicales libres vía reacciones tipo Fenton o Haber-Weiss. En nuestro estudio determinamos el contenido total de Cu plasmático mediante absorción atómica en ambos grupos experimentales obteniendo los resultados que se muestran en la **Figura 47**.

**Figura 47.** Niveles de cobre plasmático total en voluntarios controles y en fumigadores profesionales.



Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) para concentraciones plasmáticas de cobre en  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . Los valores con diferencias significativas respecto del control están indicados como \*\* $p < 0.01$ .

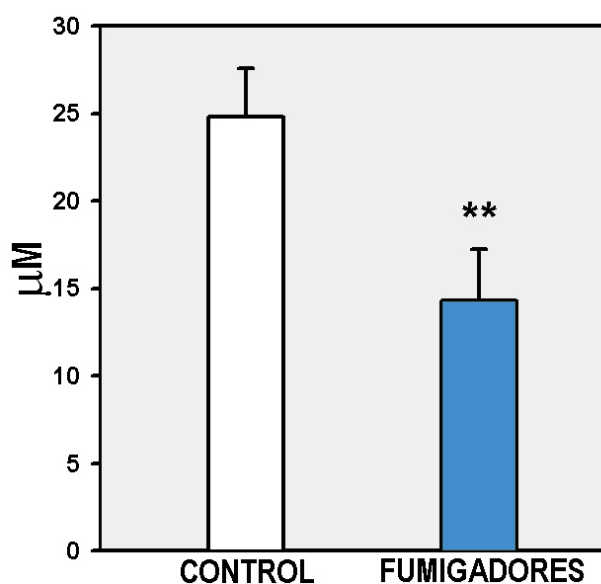
Observamos que el grupo de fumigadores tiene niveles de cobre en plasma más elevados que aquellas personas que no han tenido contacto con los agroquímicos. La diferencia entre los valores para ambos grupos es de alrededor del 50 %. La contribución



del consumo de cigarrillo a las diferencias totales entre los dos grupos es en este caso, despreciable.

El  $\alpha$ -tocoferol plasmático también se determinó como un biomarcador no enzimático del status antioxidante del plasma. Como ya se ha dicho, se trata del principal componente antioxidante lipofílico de los tejidos incluyendo la sangre periférica. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 48**.

**Figura 48.** Niveles de  $\alpha$ -tocoferol en controles y fumigadores.



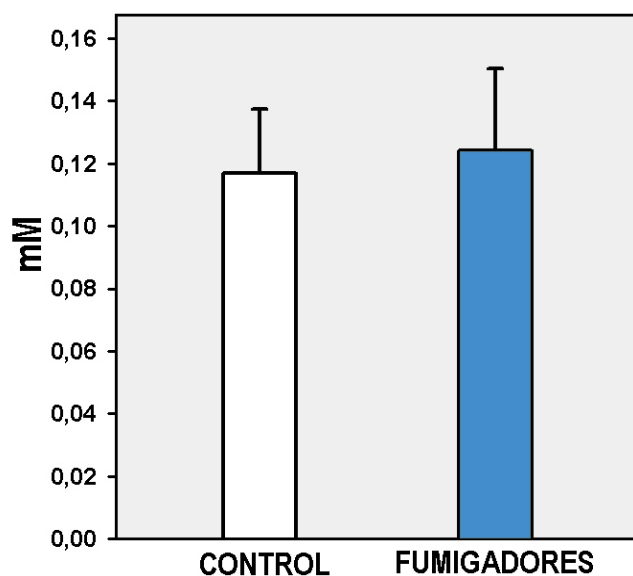
Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) para los niveles de  $\alpha$ -tocoferol expresados en  $\mu\text{M}$ . Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como  $**p < 0.01$

Observamos una disminución significativa de los niveles de  $\alpha$ -tocoferol plasmático en el grupo de los fumigadores con respecto al grupo control. Además los fumadores presentaron valores del antioxidante menores que los no fumadores, aunque también en este caso la contribución debida al consumo del cigarrillo para la diferencia total entre los dos grupos fue despreciable.

Tal como se comentó en la parte introductoria, el glutatión reducido (GSH)

es el principal antioxidante hidrosoluble de origen endógeno. Hemos determinado la concentración de glutatión total (GSH + GSSG) por la técnica espectrofotométrica cinética de reciclado en muestras de plasmas obteniéndose los resultados mostrados en la **Figura 49**.

**Figura 49.** Niveles de glutatión total en plasmas de controles y fumigadores.

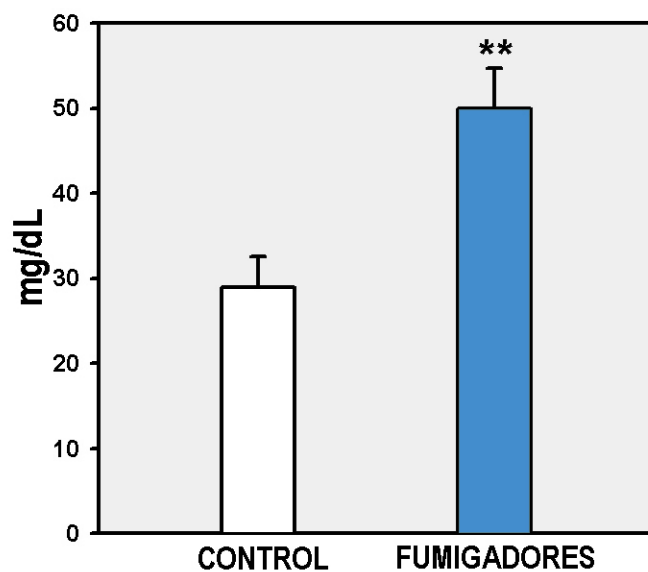


Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) para los niveles plasmáticos de glutatión en concentración mM.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de glutatión total entre ambos grupos.

La ceruloplasmina y las metalotioneínas son proteínas que actúan como quelantes de iones metálicos evitando que estos, al estado libre, puedan catalizar la producción de especies reactivas (especialmente radical hidroxilo). Por consiguiente, ambas son consideradas proteínas con importantes funciones antioxidantes. En nuestro trabajo hemos determinado la concentración de ceruloplasmina en el plasma de los controles y fumigadores obteniendo los resultados que se muestran en la **Figura 50**.

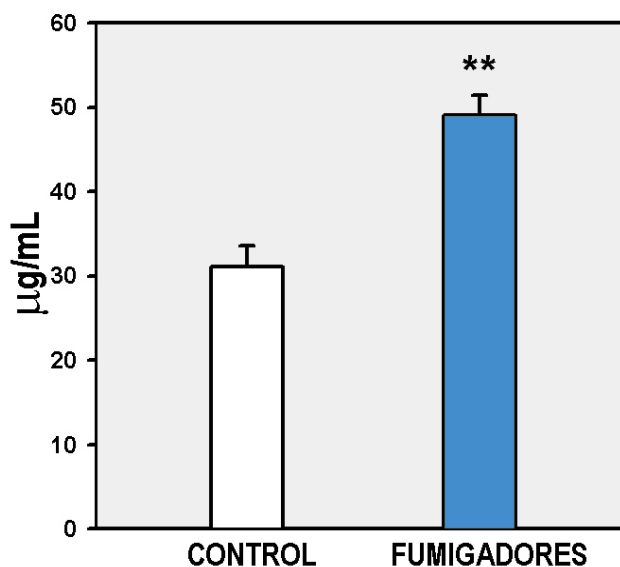
**Figura 50.** Niveles de ceruloplasmina en plasmas de controles y fumigadores.



Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) para la concentración plasmática de ceruloplasmina en mg/dL. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como  $**p < 0.01$

Los niveles de ceruloplasmina están aumentados en más de un 70 % en los plasmas de los fumigadores. Los niveles de metalotioneínas en plasma también aumentaron un 60 % en fumigadores por sobre el valor de los controles (**Figura 51**). El aumento de la concentración de estas proteínas antioxidantes fue independiente del consumo de cigarrillos.

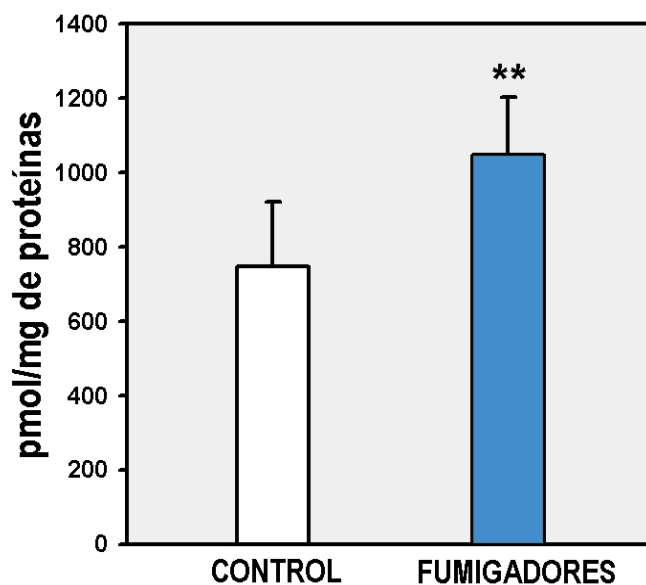
**Figura 51.** Niveles de metalotioneínas (MTs) en plasma de controles y fumigadores.



Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) para la concentración plasmática de metalotioneínas (MTs) en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como  $**p < 0.01$ .

Según lo observado, el aumento del estrés oxidativo, acompañado de una disminución de la capacidad antioxidante podría causar un desbalance entre pro-oxidantes/antioxidantes en favor de los primeros y provocar daño oxidativo a los componentes celulares. En efecto, los niveles de TBARS en plasma demostraron daño oxidativo a lípidos circulantes, pues observamos un incremento de MDA que es el producto final de la degradación oxidativa de los PUFAs (**Figura 52**).

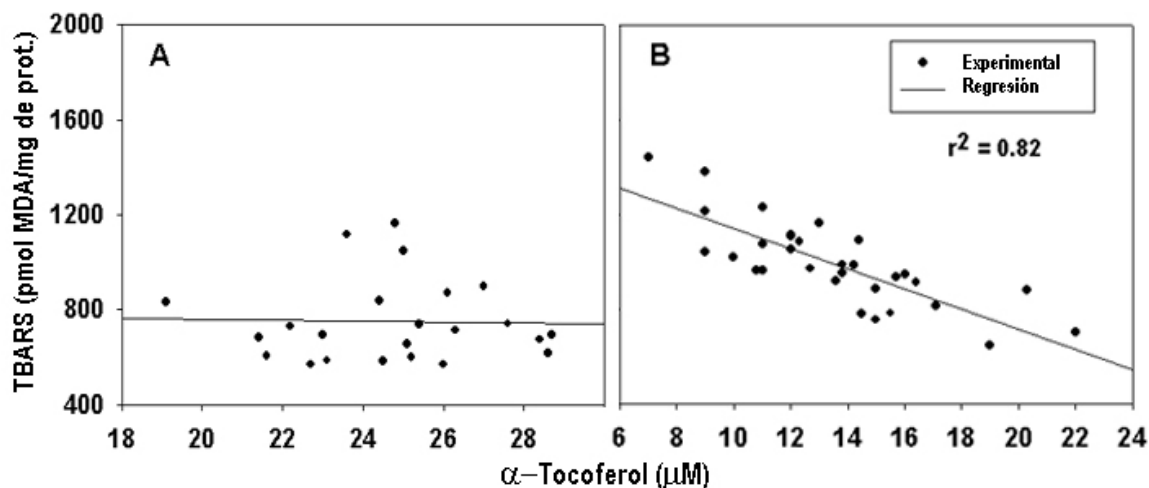
**Figura 52.** Niveles de TBARS en plasma de controles y fumigadores.



Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) para los niveles plasmáticos de TBARS en pmol/mg de proteínas. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como \*\*  $p < 0.01$ .

Los niveles de peróxidos lipídicos en los plasmas de los profesionales expuestos a agroquímicos resultaron mucho mayores que los obtenidos en el grupo control (50 %). Además los LPO se correlacionaron en forma lineal con la disminución de los niveles de  $\alpha$ -tocoferol ( $r^2 = 0.82$ ) (Figura 53 A), mientras que en el grupo control no se observó dependencia entre estas variables (Figura 53 B).

**Figura 53.** Correlación lineal entre la concentración de lipoperóxidos y  $\alpha$ -tocoferol en plasmas de controles (A) y fumigadores (B).

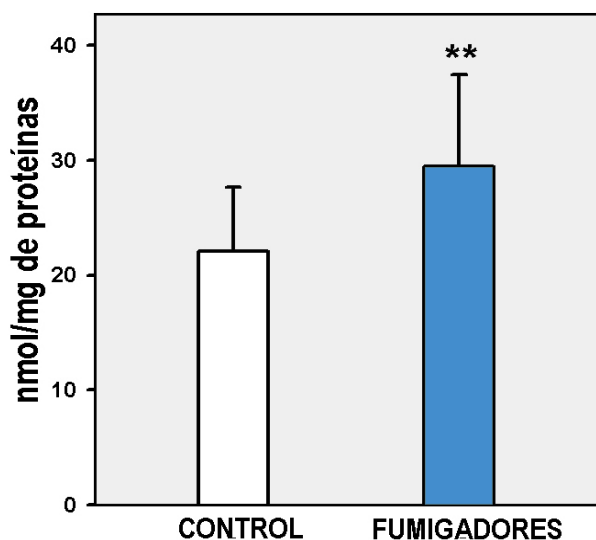


Correlaciones paramétricas lineales entre los niveles de lipoperóxidos y  $\alpha$ -tocoferol en plasma. Los datos fueron procesados electrónicamente usando Sigma Plot Statistical Software (8.0) de Sigma Co. (St. Louis, MO). La regresión lineal se realizó por el método de mínimos cuadrados.

Como marcadores de daño a proteínas se determinaron los carbonilos proteicos.

Los resultados obtenidos aparecen en la **Figura 54**.

**Figura 54.** Niveles plasmáticos de carbonilos proteicos de controles y fumigadores.



Los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SD (desvío standard) para los niveles plasmáticos de carbonilos proteicos en nmol/mg de proteínas. Los valores con diferencias significativas con respecto al control están indicados como  $**p < 0.01$ .

Se observó, en forma similar a lo que ocurrió con los valores de peróxidos lipídicos, que en el caso de los trabajadores expuestos a agroquímicos se produjo un aumento muy significativo (del 37 %) en los valores de los productos de oxidación proteica.

## DISCUSIÓN

A partir de los resultados mostrados en este capítulo, surge como interrogante la real utilidad clínica de las determinaciones de laboratorio de *rutina* como evaluadores confiables del estado de salud de personas en contacto con pesticidas o agroquímicos en general a través de su labor profesional. Esto se podría extender, no solo a los fumigadores profesionales que fueron objeto de nuestro estudio, sino también a los que se hallan involucrados en la fabricación industrial, transporte y manipuleo de estas sustancias.

Los parámetros que evalúan función hepática en el plasma de los fumigadores demuestran que la exposición de estas personas a los agroquímicos en forma crónica altera la función de este órgano que es crucial -por ejemplo- para la detoxificación de xenobióticos. Es posible que este efecto se agrave al prolongar la exposición en el tiempo, sobre todo teniendo en cuenta que se trata de personas muy jóvenes ( $26 \pm 5$



años). Numerosos trabajos demuestran un claro aumento de alteraciones debidas a la exposición a plaguicidas en función del tiempo (Singh et al., 2007; Sosan et al., 2008; Bhalli et al., 2009). Sería de gran utilidad entonces, intensificar las medidas de protección de estos trabajadores para evitar consecuencias mayores en el futuro.

Dentro de las enzimas cuya actividad usamos para evaluar la función hepática se encuentra la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GT). La actividad de esta enzima se relaciona con el estrés oxidativo en varias formas que han sido detalladas previamente. En síntesis, se sabe que cumple un rol central en la homeostasis del glutatión al catalizar el paso inicial en la degradación extracelular y que provee los metabolitos necesarios para su resíntesis hepática. Además existen evidencias que vinculan la actividad de esta enzima con la generación de ROS/RNS, especialmente en presencia de hierro y otros metales de transición (Takahashi et al., 1997). Lim et al. (2004) encontraron una correlación inversa entre los niveles de antioxidantes y la actividad  $\gamma$ -GT en suero, e incluso sugieren que la actividad de esta enzima podría ser de utilidad como biomarcador temprano de estrés oxidativo, idea que hemos investigado en este trabajo. En nuestro caso la actividad de  $\gamma$ -GT parecería ser de hecho el biomarcador más sensible, pues se modifica en un 95 % respecto al control mientras que el resto de las enzimas muestran cambios cercanos al 50 %. Notablemente, esta enzima no está incluida en los protocolos de evaluación químico-clínica que usualmente se implementan en el *screening* de funcionalismo hepático dentro de grandes poblaciones. De nuestro trabajo surge como primera recomendación la de sugerir se emplee este biomarcador en forma sistemática cuando se sospeche de noxa pro-oxidativa.

En cuanto a la funcionalidad del riñón, vemos que la exposición a agroquímicos en forma crónica produciría alteraciones en este órgano. Por lo que preservar su integridad en el tiempo permitiría, por ejemplo, una eliminación eficaz de los metabolitos tóxicos.

Numerosa evidencia experimental señala alteraciones de las funciones bioquímicas y endócrinas del páncreas atribuibles a la intoxicación aguda y crónica con pesticidas organofosforados (OPs) (Kamath y Rajini, 2007; Rahimi y Abdollahi, 2007). La hiperglucemia ha sido reportada como uno de los efectos adversos de la intoxicación con OPs. Se ha visto que la alteración de la homeostasis de la glucosa puede ocurrir por múltiples mecanismos incluyendo estrés fisiológico, estrés oxidativo-nitrativo, inhibición de la paraoxonasa, inhibición de la colinesterasa, estimulación de la glándula adrenal y alteración del metabolismo hepático del triptofano, entre otros (Kamath y Rajini, 2007; Abdollahi et al., 2004; Rahimi y Abdollahi, 2007; Gilon y Henquin, 2001). La hiperglucemia sostenida resulta en la glicosilación no-enzimática de proteínas plasmáticas (fructosaminas) en las muestras de fumigadores. Las fructosaminas están significativamente elevadas (más del 50 % respecto al control) indicando que estas personas tienen hiperglucemia durante períodos de tiempo prolongados. Se sabe que las fructosaminas son un biomarcador que promedia la concentración sanguínea de la glucosa durante -al menos- las últimas tres semanas (Misciagna et al., 2004), y que resulta aún mas confiable que la determinación de hemoglobinas glicosiladas (HbA1c) y equivalente en valor predictivo a la albúmina glicosilada (Paroni et al., 2007; Yamaguchi et al., 2005; Lapolla et al., 2004). Esta situación muy probablemente no se ponga en evidencia mediante la determinación de la glucemia en el ayuno. Resulta además interesante señalar que existe una conexión cada vez más clara entre la glicosilación no enzimática de proteínas y el estrés oxidativo. Los productos de glicosilación están íntimamente asociados al incremento del nivel de lipoperóxidos (Sathiyapriya et al., 2006 y 2007; Mohan Kumar et al., 2004). Mas aún, se ha reportado una correlación positiva entre la disminución del status antioxidante plasmático, la peroxidación de LDL, y el nivel de glicosilación proteica (Willems et al., 1998). Estas conclusiones sobre la utilidad clínica de las fructosaminas son válidas incluso si se recalculan nuestros

resultados en términos relativos a la proteína total o al nivel de albúmina plasmática que tenga cada paciente (Hartland et al., 2000). Además, la pancreatitis aguda es una complicación muy común en las intoxicaciones con altas dosis de OPs. A pesar que no se conoce el mecanismo subyacente, se piensa que podría estar involucrada la obstrucción de los conductos pancreáticos y/o el incremento de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Kamath y Rajini, 2007; Rahimi y Abdollahi, 2007; Sevillano et al., 2003).

Según nuestros resultados, la función pancreática de los fumigadores profesionales estaría alterada mostrando un leve incremento en los niveles de glucosa plasmática que se correlaciona con el incremento de la concentración de fructosaminas. Además, la amilasa pancreática tiene una actividad mayor en el plasma de los fumigadores. Al igual que lo observado en hígado y riñón, estas alteraciones incipientes podrían agravarse al prolongarse la exposición en el tiempo. Por otro lado, existe evidencia previa sobre el papel de la glicosilación proteica en el establecimiento de estrés oxidativo y la etiopatogénesis del fallo renal (Selvaraj et al., 2008).

En cuanto a las diferencias encontradas en la fórmula leucocitaria relativa, observamos un aumento significativo en el porcentaje de neutrófilos segmentados, basófilos y eosinófilos en forma concomitante con una disminución del porcentaje de linfocitos y monocitos. Esta observación podría relacionarse muy probablemente con procesos de inflamación tisular causados por la presencia de plaguicidas y/o sus metabolitos. Esta suposición está basada en el tipo de consecuencias que se sabe provocan los compuestos organofosforados sobre múltiples vías de señalización intercelular que incluyen las que tiene que ver con linfoquinas o citoquinas (Wardle et al., 2008). Sin embargo, para confirmar esta hipótesis se requerirían estudios adicionales.

Lo dicho hasta aquí nos permite hacer una reflexión importante. Si se analizaran solo los parámetros de laboratorio considerados *rutinarios*, ninguna de las determinaciones

realizadas llamaría la atención como señal de efecto adverso causado por los agroquímicos, pues todas ellas se sitúan dentro del rango de referencia establecido para la población general. Las diferencias estadísticamente significativas que nosotros encontramos al hacer el análisis de los resultados serían interpretadas en la práctica clínica como *no* significativas, y el trabajador estaría en consecuencia habilitado para continuar manipulando los agroquímicos de la misma forma en que lo venía haciendo usualmente.

Una de las determinaciones que se incluyen en esta batería de estudios y que sí tiene relación directa con la intoxicación por pesticidas (sobre todo con organofosforados, piretroides y carbamatos) es la actividad colinesterasa (Remor et al., 2009; Lotti, 1995; Singh et al., 2007). La acetilcolinesterasa (AChE) cataliza la degradación de la acetilcolina en la sinapsis neuromuscular funcionando como freno de la transmisión a nivel postsináptico, por lo que su inhibición provocará un incremento del tono de señalización colinérgica (Rahimi y Abdollahi, 2006). La isoforma de colinesterasa presente en los eritrocitos también se inhibe por este tipo de pesticidas por lo que su actividad es reflejo de la actividad AChE neuronal, aunque esta estimación depende de la farmacocinética del inhibidor (He, 1999). La colinesterasa plasmática (pseudo-colinesterasa o butirilcolinesterasa, BChE) resulta ser más sensible a los inhibidores y pone en evidencia los efectos de exposiciones más recientes en comparación con la AChE eritrocitaria (Remor et al., 2008; Lotti, 1995; Kamel y Hoppin, 2004; He, 1999). De modo que ambas isoformas (plasmática y eritrocitaria) son utilizadas como biomarcadores de exposición por ser el blanco de inhibición de los pesticidas antes mencionados (Banerjee et al., 1999; Remor et al., 2009; Hernández et al., 2005; López et al., 2007).

Knudsen y Hansen (2007) reportaron que inhibiciones de la actividad colinesterasa eritrocitaria que se encuentren entre un 50 y un 60 % provocan síntomas considerados leves como dolor de cabeza, debilidad muscular, mareos, náuseas y salivación profusa

con un período de convalecencia de 1 a 3 días. Con inhibiciones del 60-90 % se presentan síntomas moderados que se revierten en pocas semanas y se caracterizan por vómitos, diarrea, temblores, transpiración, dificultades para caminar, dolor en el pecho y cianosis de mucosas. Mientras que ante inhibiciones severas (90-100 %) el pronóstico es de muerte por falla cardíaca. Teniendo en cuenta esto, se han establecido niveles de inhibición para la intervención médica. Algunos países desarrollados como Suecia establecen que un paciente con un valor de inhibición del 25 % debe evitar la exposición a pesticidas OPs por 14 días.

En nuestro caso, la actividad colinesterasa de plasma resultó francamente disminuida (37 %) en el grupo de fumigadores. Nuestros datos concuerdan con los reportados por Hernández et al. (2005) que encontró un porcentaje de inhibición en fumigadores de alrededor del 40 %. Sin embargo, estos resultados no alcanzaron el límite inferior del rango de referencia sugerido para nuestra población. Este aspecto es quizás el que nos resulta más alarmante considerando que se trataría no solo de una manifestación sub-clínica sino también sub-signológica. He (1999) sostiene que se debe hacer un seguimiento temporal tomando muestras para determinación de actividad colinesterasa a intervalos regulares post-exposición. Un aumento en la actividad de la enzima indicaría una recuperación a partir de la exposición inicial al OP. Esta estrategia podría sugerirse como la más acertada para ser implementada en el control clínico-sanitario de los fumigadores profesionales.

Teniendo en cuenta los resultados disponibles, ni la actividad colinesterasa ni ninguno de los otros parámetros medidos rutinariamente, resultan útiles para evaluar a un profesional vinculado con la aplicación (y probablemente el manejo o la fabricación industrial) de agroquímicos. Al menos al compararlos con los niveles de referencia establecidos en la actualidad.

Ha sido reiteradamente demostrado el rol de los plaguicidas como generadores

de estrés oxidativo (Paolini et al., 2004; Di Monte, 2003; Nielsen et al., 2006; Testa et al., 2005; Beard, 2006; Kanthasamy et al., 2005; Migliore y Coppedé, 2008; Hatcher et al., 2008; Prakasam et al., 2001; López et al., 2007). También ya hemos mencionado que existe suficiente evidencia experimental sobre el papel del estrés oxidativo inducido por xenobióticos en la etiopatogenia de múltiples patologías (Jenner, 1998; Pope et al., 2008; Honig y Rosenberg, 2000; Gorman et al., 1996; Heales et al., 1999, Singh y Dikshit, 2007; Zhou et al., 2004; Wang et al., 2006, Gu et al., 1998). Esta asociación siempre existe más allá de la posible discusión sobre su rol específicamente causativo (etiológico) o de su aparición como respuesta a la evolución del proceso patológico en sí mismo.

Entonces, y de acuerdo con lo antes mencionado, utilizar en la clínica un parámetro que evalúe el estrés oxidativo, también podría ser de gran utilidad para detectar una intoxicación sub-clínica (o sub-signológica, a juzgar por estudios convencionales) causada por pesticidas o agroquímicos en general en poblaciones especialmente expuestas tal como la que resultó motivo de nuestro estudio.

El porcentaje de pacientes fumadores en ambos grupos, control y fumigadores, fue del 69 y 48 %, respectivamente. Estos porcentajes fueron lo suficientemente diferentes como para que cada parámetro relacionado al estrés oxidativo se analizara en subgrupos según el hábito de fumar. Mencionamos antes que el daño causado por el humo del cigarrillo puede ocurrir mediante múltiples mecanismos:

- El  $\text{RO}_2\cdot$  y los óxidos del nitrógeno estimulan la peroxidación lipídica y la oxidación del DNA.
- Los aldehídos presentes, especialmente la acroleína, causan depleción de GSH.
- Las hidroquinonas y quinonas de la fase particulada generan  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- El humo del cigarrillo resulta irritante para las mucosas lo que conduce a activación de macrófagos y subsecuente producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y posiblemente  $\text{NO}\cdot$ .

- El humo del cigarrillo contiene hierro. También es capaz de provocar la liberación del hierro unido a la ferritina en el pulmón provocando condiciones favorables para la formación del OH<sup>•</sup> vía reacciones tipo Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Hemos observado que el hábito de fumar altera los valores de muchos de los parámetros medidos, pero en ningún caso llegó a aportar más del 15 % a la diferencia entre el grupo control y el de los fumigadores. Este hecho nos permitió atribuir las variaciones observadas a la exposición a agroquímicos.

Cuando evaluamos un biomarcador de formación de especies reactivas del nitrógeno, como lo es el nivel de nitritos y nitratos ([NO<sub>x</sub>]), encontramos concentraciones significativamente mayores de [NO<sub>x</sub>] en el plasma de los fumigadores. Sabemos que los RNS en exceso tienen la capacidad de provocar daño oxidativo en las macromoléculas celulares, fundamentalmente mediante la generación de peroxinitrito el cual puede inhibir la cadena transportadora de electrones mitocondrial, y generar muchos otros efectos deletéreos (Bolaños et al., 1994; Navarro y Boveris, 2008; Moro et al., 2005; Heales et al., 1999; Poderoso et al., 1996; Peuchen et al., 1997; Jackson et al., 2002). La determinación de [NO<sub>x</sub>] en plasma es una reacción colorimétrica muy simple de realizar, rápida y poco costosa, por lo que podría transformarse fácilmente en una de las determinaciones de rutina de un laboratorio de química clínica (Tsikas, 2006).

Observamos también que los fumigadores tienen una capacidad antioxidante plasmática mucho menor que la de las personas que oficiaron de controles. Es decir, que en el caso de los fumigadores el equilibrio entre antioxidantes y pro-oxidantes está desplazado hacia la formación de estos últimos. El ensayo FRAP (previo tratamiento de la muestra con uricasa) también podría ser un biomarcador útil (a pesar de su inespecificidad) tal como lo han sugerido para el caso de patologías neurodegenerativas,

Abuja y Albertini (2001) entre otros.

Como ya se ha dicho, el cobre es un elemento esencial para la actividad de muchas enzimas incluso para las involucradas en el sistema de defensa antioxidante como es la CuZn-SOD y para la respiración celular. Normalmente se encuentra unido a proteínas quelantes como la ceruloplasmina, metalotioneínas y otras. Esto se relaciona con que al estado libre (iónico) es capaz de catalizar la reacción de formación de radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno o anión superóxido, descomponer peróxidos lipídicos, catalizar reacciones de autooxidación (ej: de ascorbato) y es muy efectivo para causar daño al DNA y estimular la peroxidación de las LDL (Halliwell y Gutteridge, 1999; Abuja y Albertini, 2001). Los fumigadores tienen niveles de cobre plasmático más elevados (cerca de un 50 %) que las personas del grupo control. Esto podría deberse a la utilización de pesticidas a base de Cu en la fumigación de este tipo de cultivos como lo son el caldo bordelés (a base de sulfato cúprico) utilizado como fungicida para tratar *Alternaria alternata pv citri* en naranjas, mandarinas, limones y pomelos (CASAFE, 2007).

La sangre humana contiene entre 20 y 40 mg/dL de ceruloplasmina que mantiene unido aproximadamente al 90 % del cobre plasmático. La concentración de ceruloplasmina en fumigadores alcanzó a ser un 70 % mayor que en los controles. Se podría sospechar entonces que esta elevación de la ceruloplasmina circulante se deba a una respuesta adaptativa del hígado, que aumentaría la síntesis de esta proteína frente al aumento en los niveles plasmáticos de Cu. En este sentido nuestros resultados coinciden con lo encontrado por Prakasam et al., (2001). También podrían ser debidos a una respuesta al cuadro inflamatorio desencadenado en algunos tejidos blanco por la exposición a los agroquímicos. Esto no solo se sustenta en reportes previos sobre el rol de la ceruloplasmina como reactante de fase aguda o crónica (Johnson et al., 1992; Linder y Hazegh-Azam, 1996; De luigi et al, 2001; Emerit et al, 2004), sino que también



concuera con las alteraciones que hemos hallado en la fórmula leucocitaria. Por supuesto, ambas cuestiones pueden concurrir para justificar el incremento que observamos en la concentración de ceruloplasmina.

Las metalotioneínas son proteínas pequeñas (6-7 KDa) capaces de unir entre 5 y 7 iones metálicos entre los que se encuentra el Cu, Ag, Zn, etc., permitiendo así almacenarlos en una forma no tóxica (Coyle et al., 2002; Halliwell y Gutteridge, 1999). De modo similar a lo que ocurre con la concentración de ceruloplasmina, los niveles de metalotioneínas son mayores en los plasmas de fumigadores (mas del 60 %) comparado con los valores del grupo control. Este aumento podría explicarse por una inducción de la síntesis de estas proteínas en respuesta al aumento de Cu plasmático (y quizás de otros metales de transición que no fueron medidos en este trabajo) (Coyle et al., 2002). Por otro lado, hay evidencia previa que señala que el estrés oxidativo *per se* induce la síntesis de metalotioneínas (Kondoh et al., 2001), mientras que en otro tipo de noxas que provocan neurodegeneración la sobreexpresión de metalotioneínas es un fenómeno ampliamente documentado (Mocchegiani et al, 2005; Zatta et al, 2008).

Los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol estuvieron severamente afectados por la exposición a agroquímicos (disminuyeron un 40 %). El  $\alpha$ -tocoferol es el principal antioxidante liposoluble que se adquiere de la dieta y una concentración disminuida en el plasma implica un aumento en la fragilidad de las membranas celulares (principalmente de eritrocitos) y un aumento de la peroxidación de los lípidos de las lipoproteínas plasmáticas (LDLs oxidadas), entre muchos otros efectos (Burton y Traber, 1990; Halliwell y Gutteridge, 1999; Cadenas y Packer, 2002). La peroxidación de lípidos plasmáticos que observamos en estos trabajadores se correlacionó negativamente ( $r^2=0.82$ ) con la disminución de los niveles de  $\alpha$ -tocoferol. Como se explicó en la introducción de este trabajo, la peroxidación de los lípidos consiste en una cadena de reacciones en la que los

radicales lipídicos recién generados tienen la reactividad suficiente para generar especies radicalarias (y no radicalarias) nuevas a partir de ácidos grasos adyacentes. Además pueden atacar oxidativamente a proteínas del entorno de reacción o remotas. Aunque últimamente se le han reconocido varias funciones biológicas, el papel central del  $\alpha$ -tocoferol es el de funcionar como un antioxidante frenando esta cadena de oxidaciones. Los productos de la peroxidación lipídica se descomponen luego dando lugar a compuestos como el MDA. Los resultados demuestran un aumento significativo en los niveles de MDA en los plasmas de los fumigadores con respecto al grupo control. Esto indica que la exposición a agroquímicos aumenta la producción de especies oxidantes que resultan ser suficientes por sí mismas para provocar daño a los lípidos de las membranas y lipoproteínas plasmáticas.

Los niveles de GSH muestran un aumento en el grupo de fumigadores que no es estadísticamente significativo. La técnica utilizada midió glutatión total (GSH+GSSG). Podría ocurrir que realmente las concentraciones de glutatión plasmático se modifiquen levemente tal como lo sugieren nuestros datos. O, alternativamente y lo que es más probable, que disminuya el glutatión reducido plasmático porque es utilizado por la glutatión-S-transferasa (para conjugar y eliminar xenobióticos), o incluso por la glutatión peroxidasa (para reducir lipoperóxidos). Esta disminución sería compensada por una producción y exportación aumentada de glutatión por parte del hígado (Banerjee et al., 1999), sobre todo teniendo en cuenta que los pacientes del grupo fumigadores están expuestos por largos períodos a estos tóxicos. Sin embargo, para considerar estas hipótesis resultaría necesario determinar ambas especies de glutatión simultáneamente.

El daño oxidativo a proteínas se analizó por la técnica de carbonilos proteicos. Los niveles de PCOs en el plasma de los fumigadores aumentan en forma significativa en comparación con los valores obtenidos en el grupo control. La carbonilación de restos de aminoácidos de las proteínas puede resultar en pérdida de la función biológica

o en catabolismo aumentado, entre otros efectos. De manera similar a lo que ocurre con los niveles de peróxidos lipídicos, este aumento indica que la exposición a plaguicidas provoca una sobreproducción de especies oxidantes lo suficientemente severa como para causar daño en las macromoléculas proteicas.

## **CONCLUSIONES PARCIALES**

En resumen, la exposición laboral a agroquímicos aumenta la producción de especies reactivas, el consumo de antioxidantes y -como resultado de este desbalance- la oxidación de moléculas vitales para la célula. Sin duda estos efectos traerán consecuencias adversas para la salud a corto o a largo plazo, dependiendo de la continuidad y la intensidad de la exposición de estos trabajadores. La detección de una intoxicación subclínica por plaguicidas podría ser útil para implementar medidas que mejoren la salud de los fumigadores. Dentro de estas medidas, algunas podrían ser farmacoterapéuticas como, por ejemplo, el empleo de suplementos dietarios antioxidantes que balanceen la producción de radicales libres. Otras serían normativas tales como el establecimiento y cumplimiento de instrucciones estrictas para la protección primaria de estos trabajadores (Kamel y Hoppin, 2004; McConnell y Hruska, 1993). También sería razonable pensar en

la introducción de alguno de los marcadores de estado redox en la rutina de exámenes de química clínica. La mayoría, sino todas, las determinaciones implementadas en nuestro trabajo son de relativamente fácil ejecución en laboratorios de mediana complejidad, y además cumplen con los estándares internacionales sobre lo que debe ser considerado un biomarcador “no invasivo” en patologías humanas (De Zwart et al, 1999).

Creemos que existe una disociación entre los hallazgos experimentales de la investigación clínica y la aplicación de mediciones que estimen estrés oxidativo por más de un motivo:

- Muchos procesos analíticos no son adecuados para la práctica de rutina por ser lentos y costosos (equipos o reactivos).
- Existen importantes diferencias en los procedimientos analíticos para el mismo parámetro en diferentes laboratorios.
- No están disponibles comercialmente en forma masiva, reactivos certificados y controlados para parámetros de estrés oxidativo o antioxidantes.
- La experiencia en estos métodos es escasa, especialmente en el procesamiento de gran número de muestras.
- La imposibilidad de establecer un intervalo de referencia común aceptable, en parte, porque se utiliza más de un método para evaluar el mismo parámetro oxidativo.
- Muchas veces hay desacuerdos en la literatura científica sobre la importancia y la interpretación de los resultados de un parámetro oxidativo en particular en una determinada enfermedad.

Esta situación podría (y debería) cambiar en el futuro por el bien de los pacientes, ya que el interés en este tema continúa aumentando y la investigación básica no deja de demostrar la importancia del estrés oxidativo en muchas enfermedades humanas (Abuja

y Albertini, 2001; Dalle-Donne et al., 2006).

Otro problema en la evaluación de los efectos de un xenobiótico u otros agentes (exposición a radiaciones, mutaciones génicas adquiridas o congénitas) sobre la producción de radicales libres y el sistema de defensa antioxidante es que no es posible utilizar un biomarcador “universal” (Abuja y Albertini, 2001; Mayne, 2003) que defina fehacientemente la situación redox. Es preciso contar con una batería de determinaciones (tales como las realizadas en este trabajo) para poder describir acertadamente la producción de especies reactivas, el estado de las defensas antioxidantes, y el daño a componentes celulares (membranas, DNA y proteínas) (De Zwart et al., 1999).

Como conclusión podemos señalar la gran importancia de renovar los esfuerzos destinados a actualizar los protocolos de diagnóstico clínico pudiendo prevenir el desarrollo de patologías y detectando eventos sub-clínicos como los aquí investigados.

## **CONCLUSIÓN**

La presencia de polucionantes ambientales en alimentos, agua y aire es una preocupación constante para el mundo entero. La evaluación del riesgo de exposición a contaminantes ambientales en general, esta sufriendo en esta última década un profundo reenfoque hacia la evaluación de los efectos causados por exposiciones prolongadas a dosis bajas de mezclas complejas de compuestos (Fitsanakis et al., 2002).

Los plaguicidas y agroquímicos en general (incluyendo a los fertilizantes y texturadores de suelos) están incluidos en el grupo de contaminantes ambientales por numerosas razones como:

- Uso negligente por usuarios inexpertos ó con bajo nivel de alfabetización. Uso de indumentaria inadecuada.
- Persistencia en el ambiente, y acumulación en los sistemas vivos. Estos datos se desconocen para muchos de los agroquímicos utilizados y resultan de gran importancia a la hora de definir las dosis a utilizar (Krieger, 1995; Claver et al.,



2006).

- Uso difundido en cocktails de agroquímicos de toxicidad incierta.
- Aumento sostenido en las ventas de estos productos a nivel mundial. Por ejemplo, el glifosato, considerado “indispensable” para el control de ciertas plagas, constituye un ejemplo de agroquímico del que se conoce muy poco, existiendo fuertes controversias respecto de sus mecanismos tóxicos, el valor de su  $DL_{50}$ , el tiempo de persistencia en el ambiente (CASAFE, 2007; Huerga y San Juan, 2004), etc.
- La preocupación se acrecienta en países como la Argentina, en donde no hay certeza del cumplimiento de la legislación vigente, los controles de residuos en productos alimenticios comercializados son deficientes, ni existe un adecuado control de los problemas de salud derivados de la exposición crónica a bajas dosis.

Así es como, para obtener los beneficios de la aplicación de los plaguicidas, sin que se produzcan efectos adversos en la salud humana y en el ambiente, es preciso contar con un esquema integral de gestión en el que intervengan diversos actores (las autoridades gubernamentales, la industria, los formuladores, los obreros, los comerciantes, los asesores, los aplicadores, los consumidores, el sector académico-científico y la sociedad en general). En dicho esquema deben distinguirse las acciones a realizar previas al registro de los plaguicidas y las necesarias en las fases ulteriores de su ciclo de vida integral. También se identifican diversos instrumentos que pueden permitir el logro de los objetivos mediante la difusión de información (etiquetado, hojas de seguridad), educación y capacitación, monitoreo ambiental y biológico, establecimiento de regulaciones, empleo de instrumentos económicos, entre otros. La exposición a agroquímicos es un problema de muy difícil solución que resulta aún mas serio en países en desarrollo y con controles deficientes (Sawaya et al., 2000) por lo que en general no se es muy optimista en relación a este acuciante problema sanitario-ecológico.

En este trabajo se pudo probar la hipótesis planteada. La asociación de agroquímicos suministrados en forma sub-crónica y en bajas dosis a ratas Wistar, resultó un modelo útil para el estudio de los daños ocasionados por plaguicidas y sus mezclas al sistema de defensa antioxidante tanto en tejidos depuradores (hígado y riñón) como en tejidos blanco (SNC). Los resultados contribuyen al conocimiento de los mecanismos involucrados en la toxicidad de estas noxas en forma combinada, de lo que se sabe muy poco hasta el momento y resulta un punto de partida indispensable a la hora de evaluar el riesgo real en la población expuesta a bajas o altas dosis, en forma aguda ó crónica.

Diariamente estamos sometidos a una exposición mínima y prolongada que involucra a *varios pesticidas simultáneamente*. Sería imposible reproducir fielmente todas las condiciones del entorno para un individuo particular en una cierta región del planeta, pero nos acercarnos a un modelo más confiable estudiando los efectos de la intoxicación individual y combinada producida por los agroquímicos de uso más frecuente en nuestro medio (Cory-Slechta, 2005; Di Monte, 2003).

Estos resultados también fueron útiles para clarificar el posible rol de los plaguicidas, y de los agroquímicos en general, en la etiología de enfermedades neurodegenerativas humanas y en otras, teniendo en cuenta que fue el SNC el órgano más afectado por la exposición (sobre todo la sustancia nigra que es la zona implicada en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson).

Paralelamente a la obtención del modelo de intoxicación se probó que el ácido lipoico (LA) previno el estrés y daño oxidativo cuando fue administrado conjuntamente a la noxa generando un entorno adecuado para el desarrollo de los procesos de reparación de los daños inducidos por el estrés oxidativo. Esto permitiría concluir que el ácido lipoico es un excelente antioxidante con importantes propiedades a nivel del SNC (especialmente sobre la sustancia nigra) y que podría ser utilizado en forma concomitante o preventiva

en cuadros de exposición involuntaria a generadores de estrés oxidativo.

La puesta a punto de las técnicas de detección de plaguicidas o sus residuos en muestras provenientes de animales tratados y humanos expuestos, permitieron evaluar la distribución sistémica y la llegada (y persistencia) de los tóxicos a los tejidos. También permitieron detectar la presencia en alimentos de consumo regional, lo que constituye el punto de partida para el establecimiento del riesgo real de exposición de la población.

Por último, teniendo en cuenta las dificultades que existen en la actualidad para diagnosticar intoxicaciones sub-clínicas con agrotóxicos debidas a exposición a dosis bajas por períodos prolongados de tiempo, planteamos la utilidad de introducir biomarcadores de estrés oxidativo en los protocolos de determinaciones realizadas rutinariamente en los laboratorios de química clínica. Esto se podría extender, no solo a los fumigadores profesionales que fueron objeto de nuestro estudio, sino también a los que se hallan involucrados en la fabricación industrial, transporte y manipuleo de estas sustancias. La detección de una intoxicación sub-clínica por plaguicidas podría ser de utilidad para implementar medidas que mejoren la salud de los fumigadores como el empleo de suplementos dietarios antioxidantes que balanceen la producción de radicales libres. Otras medidas serían normativas, tales como el establecimiento y cumplimiento de instrucciones estrictas para la protección primaria de estos trabajadores (Kamel y Hoppin, 2004; McConnell y Hruska, 1993). Renovar los esfuerzos destinados a actualizar los protocolos de diagnóstico clínico podría prevenir el desarrollo de patologías, detectando eventos sub-clínicos como los aquí investigados, y causando un impacto positivo en la disminución de la incidencia de enfermedades asociadas.

De manera que el progreso de investigaciones, como las realizadas en este trabajo, podría contribuir a dilucidar el verdadero rol que desempeña la exposición a residuos de pesticidas (o agroquímicos en general) en la etiología de enfermedades humanas, especialmente las de tipo neurodegenerativo como la enfermedad de Parkinson (PD).

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abdollahi, M., Donyavi, M., Pournourmohammadi, S., Saadat, M., 2004. Hyperglycaemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Phys.* 137, 343-347.
- Abdullah, M.P., Daud, J., Hong, K.S., Yew, C.H., 1995. Improved method for the determination of glyphosate in water. *J. Chromatogr. A* 697, 363-369.
- Abuja, P.M., Albertini, R., 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* 306, 1-17.
- Adrain, C., Martin, S.J., 2001. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci.* 26, 390-397.
- Aebi, H., 1984. Oxygen radicals in biological systems. Eds. Lester Packer; Academic Press, Orlando, Florida. USA. pp 121-126.
- Aldridge, J.E., Gibbons, J.A., Flaherty, M.M., Kreider, M.L., Romano, J.A., Levin, E.D., 2003. Heterogeneity of toxicant response: Sources of human variability. *Toxicol. Sci.* 76, 3-20.

- Altuntas, I., Delibas, N., Doguc, D.K., Ozmen, S., Gultekin, F., 2003. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. *Toxicol. In Vitro* 17, 153-157.
- Anderson, M.E., Meister, A., 1980. Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J. Biol. Chem.* 255, 9530-9533.
- Arivazhagan, P., Thilakavathy, T., Panneerselvam, C., 2000. Antioxidant lipoate and tissue antioxidants in aged rats. *J.Nutr. Biochem.* 11, 122-127.
- Artal-Sanz, M., Tavernarakis, N., 2005. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death in neurodegeneration. *FEBS Lett.* 579, 3287-3296.
- Aschner, N., 2000. Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environ. Health. Persp.* 108, 429-432.
- Bagnati, M., Bordone, R., Perugini, C., Cau, C., Albano, E., Bellomo, G., 1998. Cu(I) availability paradoxically antagonizes antioxidant consumption and lipid peroxidation during the initiation phase of copper-induced LDL oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 235-240.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T., Chakraborty, A.K., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. *Toxicol Lett.* 107, 33-47.
- Barlow, B.K., Lee, D.W., Cory-Slechta, D.A., Opanashuk, L.A., 2005. Modulation of antioxidant defense system by the environmental pesticide Maneb in dopaminergic cells. *Neurotoxicology* 26, 63-75.
- Bayir, H., Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Viner, R., Ritov, V., Amoscato, A.A., Zhao, Q., Zhang, X.J., Janesko-Feldman, K.L., Alexander, H., Basova, L.V., Clark, R.S.B., Kochanek, P.M., Kagan, V.A., 2007. Selective early cardiolipin peroxidation after traumatic brain injury: An oxidative lipidomic analysis. *Ann. Neurol.* 62, 154-169.
- Beard, J., Australian rural health research collaboration, 2006. *Sci. Total Environ.* 355, 78-89.

- Beda, N., Nedospasov, A., 2005. A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric Oxide* 13, 93-97.
- Benedetti, A.L., Vituri, C.L., Trentin, A.G., Dominguez, M.A.C., Alvarez-Silva, M., 2004. The effects of sub-chronic exposure to the herbicide Glyphosate-Biocarb. *Toxicol. Lett.* 153, 227-232.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 238, 70-76.
- Berkovitch, M., Heyman, E., Afriat, R., Matz-Khromchenko, Avgil, M., Greenberg, R., Zimmerman, D.R., Berman, S., Weissgarten, J., 2003. Copper and zinc blood levels among children with nonorganic failure to thrive. *Clin. Nutr.* 22, 183-186.
- Beuret, C.J., Zirulnik, F., Giménez, M.S., 2005. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod. Toxicol.* 19, 501-504.
- Bhalli, J.A., Ali, T., Asi, M.R., Khalid, Z.M., Ceppi, M., Khan, Q.M., 2009. DNA damage in Pakistani agricultural workers exposed to mixtures of pesticides. *Environ. Mol. Mutat.* 50, 37-45.
- Bienengräber, M., Forderkuntz, S., Klein, D., Summer, K.H., 1995. Determination of Cu-containing metallothionein: comparison of Ag saturation assay, thiomolybdate assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal. Biochem.* 228, 69-73.
- Bizat, N., Hermel, J.M., Boyer, F., Jacquard, C., Créminon, C., Ouary, S., Escartin, C., Krajewski, S., Hantraye, P., Brouillet, E., 2003a. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: Implications in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 23, 5020-5030.
- Bizat, N., Hermel, J.M., Humbert, S., Jacquard, C., Créminon, C., Escartin, C., Saudou, F., Krajewski, S., Hantraye, P., Brouillet, E., 2003b. In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration. *J. Biol. Chem.* 278, 43245-43253.

- Bolaños, J.P., Peuchen, S., Heales, S.J.R., Land, J.M., Clark, J.B., 1994. Nitric-oxide mediates inhibition of mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 63, 910-916.
- Bolognesi, C., Morasso, G., 2000. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. *Trends Food Sci. Tech.* 11, 182-187.
- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B.E., Cidlowski, J.A., 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 5, 21-26.
- Botha, N., Gehringer, M.M., Downing, T.G., van de Venter, M., Shephard, E.G., 2004. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells. *Toxicon* 43, 85-92.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brookes, P.S., Padilla Salinas, E., Darley-USmar, K., Eiserich, J.P., Freeman, B.A., Darley-USmar, V.M., Anderson, P.G., 2000. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release, *J. Biol. Chem.* 275, 20474-20479.
- Buettner, G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 535-543.
- Burton, G.W., Traber, M.G., 1990. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.* 10, 357-382.
- Bush, A.I., Curtain, C.C., 2008. Twenty years of metallo-neurobiology: where to now?. *Eur. Biophys. J.* 37, 241-245.
- Bustamante, J., Lodge, J.K., Marcocci, L., Tritschler, H.J., Packer, L., Rihn, B.H., 1998.  $\alpha$ -Lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1023-1039.
- Buttriss, J.L., Diplock, A.T., 1984. High-performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues. *Method Enzymol.* 105, 131-138.



- Byung-Min, C., Hyun-Ock, P., Seon, H.J., Young-Myeong, K., Hun-Taeg, C., 2002. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 116-126.
- Cadenas, E., Packer, L., Handbook of antioxidants. Second Edition. Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 99-108.
- Caglar, S., Kolankaya, D., 2008. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 57-62.
- Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tudesco, B., Maggiano, N., Serrín, S., Wolf, F.I., Palozza, P., 2006. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol. Appl. Pharm.* 211, 87-96.
- Carlberg, E., Mannervik, A., 1985. Glutathione Reductase. *Method Enzymol.* 113, 484-495.
- CASAFE (Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes) 2007. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina.
- Cassina, A., Radi, R., 2007. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 309-316.
- Catalá, A., 2007. The ability of melatonin to counteract lipid peroxidation in biological membranes. *Curr. Mol. Med.* 7, 638-649.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S., 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 323-333.
- Chang, D.T.W., Reynolds, I.J., 2006. Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons. *Prog. Neurobiol.* 80, 241-268.
- Chen, M.J., Yap, Y.M., Choy, M.S., Koh, C.H., Seet, S.J., Duan, W., Whiteman, M., Cheung, N.S., 2006. Early induction of calpains in rotenone-mediated neuronal apoptosis. *Neurosc. Lett.* 397, 69-73.

- Chen, P.S., Toribara, T.Y., Warner, H., 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 28, 1756-1758.
- Chng, H.T., New, L.S., Neo, A.H., Goh, C.W., Browne, E.R., Chan, E.C.Y., 2008. Distribution study of orally administered lipoic acid in rat brain tissues. *Brain Res.* 1251, 80-86.
- Choi, B.M., Pae, H.O., Jang, S.I., Kim, Y.M., Chung, H.T., 2002. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 116-126.
- Chong, Z.Z., Li, F., Maiese, K., 2005. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog. Neurobiol.* 75, 207-246.
- Chua, B.T., Guo, K., Li, P., 2000. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J. Biol. Chem.* 275, 5131-5135.
- Claver, A., Ormad, P., Rodriguez, L., Ovelleiro, J.L., 2006. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere* 64, 1437-1443.
- Colton, C.A., Gilbert, D.L., 1987. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* 223, 284-288.
- Cory-Slechta, D.C., 2005. Studying toxicants as single chemicals: does this strategy adequately identify neurotoxic risk?. *Neurotoxicology* 26, 491-510.
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., Rofe, A.M., 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 627-647.
- Cremer, D.R., Rabeler, R., Roberts, A., Lynch, B., 2006. Long-term safety of  $\alpha$ -lipoic acid (ALA) consumption: a 2-year study. *Regul. Toxicol. Pharm.* 46, 193-201.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2003a. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* 9, 169-176.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003b. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 329, 23-38.

- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 52, 601-623.
- Daruich, J., Zirulnik, F., Giménez, M.S., 2001. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ. Res. Sec A.* 85, 226-231.
- Dawson, T.M., Dawson, V.L., 1994. Nitric oxide: actions and pathological roles. *Neuroscientist* 1, 9-20.
- Dawson V.L., Dawson, T.M., 1996. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem. Neuroanat.* 10, 179-190.
- Dawson, T.M., Mandlr, A.S., Lee, M.K., 2002. Animal models of PD: pieces of the same puzzle?. *Neuron* 35, 219-222.
- Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2003. Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Clin. Invest.* 111, 145-151.
- De Luigi A., Fragiaco, C., Lucca, U., Quadri, P., Tettamanti, M., Grazia De Simoni, M., 2001. Inflammatory markers in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1985-1995.
- De Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 202-226.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J., 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324, 1-18.
- Desport, J.C., Couratier, P., 2002. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nutr. Clin. Metabol.* 16, 253-259.
- Di Giulio, A.M., Ricca, A., Cascardo, A.R., Casaró, A., 2005. Documento sobre micotoxinas y residuos de pesticidas. Cadenas: trigo/maíz/soja/girasol. Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, basado en *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human system, Council of Agricultural Science and Technology, Task Force Report N° 139, 2002. Iowa, USA.*

- Di Monte, D.A., 2003. The environment and Parkinson's disease: in the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins?. *Lancet Neurol.* 2, 531-538.
- *Radic. Biol. Med.* 33, 1714-1723.
- Flohé, L., Günzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Method Enzymol.* 105, 114-121.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol Chem* 226, 497-509.
- Fong, C.S., Wu, R.M., Shieh, J.C., Chao, Y.T., Fu, Y.P., Kuao, C.L., Cheng, C.W., 2007. Pesticides exposure on southwestern Taiwanese with *MnSOD* and *NQO1* polymorphisms is associated with increased risk of Parkinson's disease. *Clin. Chim. Acta* 378, 136-141.
- Franceschutti, D., Baldwin, J., Lee, L., Mutus, B. 1996. Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site. *Protein Eng.* 9, 189-194.
- Frei, B., Higdon, J.V., 2003. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J. Nutr.* 133, 3275S-3284S.
- Galas M-C., Bizat, N., Cuvelier, L., Bantubungi, K., Brouillet, E., Schiffmann, S.N., Blum, D., 2004. Death of cortical and striatal neurons induced by mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 15, 152-159.
- Gao, H.M., Liu, B., Zhang, W., Hong, J.S., 2003. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends. Pharmacol. Sci.* 24, 395-401.
- García, S.J., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2005. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: targeting glial cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 455-461.
- Garside, S., Woulfe, J., Mazurek, M.F., 1997. The ontogeny of NADP-diaphorase neurons in serum-free striatal cultures parallels in vivo development. *Neuroscience* 76, 1221-1230.
- Gasser, T., 2001. Genetics of Parkinson's disease. *J. Neurol.* 248, 833-840.

- Giasson, B.I., Lee, V.M., 2001. Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. *Neuron* 31, 885-888.
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D., 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacol.* 40, 959-975.
- Gilon, P., Henquin, J-C., 2001. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic  $\beta$ -cells function. *Endocrine Soc.* 22, 565-604.
- Giray, B., Gürbay, A., Hincal, F., 2001. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicol. Lett.* 118, 139-146.
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Colombo, R., Milzani, A., Rossi, R., 2003. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1365-1372.
- González-Pérez, O., González-Castaneda, R.E., 2006. Therapeutic perspectives on the combination of  $\alpha$ -lipoic acid and vitamin E. *Nutr. Res.* 26, 1-5.
- Gorman, A.M., McGowan, A., O'Neill, C., Cotter, T., 1996. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *J. Neurol. Sci.* 139, 45-52.
- Grammatopoulos, T.N., Ahmadi, F., Jones, S.M., Fariss, M.W., Weyhenmeyer, J.A., Zawada, W.M., 2005. Angiotensin II protects cultured midbrain dopaminergic neurons against rotenone-induced cell death. *Brain. Res.* 1045, 64-71.
- Griffiths, H.R., Møller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, A., Cooke, M., Coolen, S., Haenen, G., Hoberg, A.M., Loft, S., Lunec, J., Olinski, R., Parry, J., Pompella, A., Poulsen, H., Verhagen, H., Astley, S.B., 2002. Biomarkers, *Mol. Aspects Med.* 23, 101-208.
- Gu, M., Owen, A.D., Toffa, S.E.K., Cooper, J.M., Dexter, D.T., Jenner, P., Marsden, C.D., Schapira, A.H.V., 1998. Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J. Neurol. Sci.* 158, 24-29.

- Gutteridge, J.M.C., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41, 1819-1828.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hall, A.V., Antoniou, H., Wang, Y., Cheung, A.H., Arbus, A.M., Olson, S.L., Lu, W.C., Kau Marsden, P.A., 1994. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 269, 33082-33090.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third Edition. Oxford Science Publications, 1999.
- Halliwell, B., Clement, M.V., Long, H.L., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 486, 10-13.
- Han, D., Tritschler, H.J., Packer, L., 1995.  $\alpha$ -Lipoic acid increases intracellular glutathione in a human T-lymphocyte Jurkat cell line. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 207, 258-264.
- Harthland, A.J., Smith, J.M., Dunne, F., 2000. Correcting serum fructosamine concentration for total protein or albumin concentration it is not appropriate during Asian pregnancy. *Clin. Chim. Acta* 292, 175-180.
- Hatch, G.M., Vance, D.E., Wilton, D.C., 1993. Rat liver mitochondrial phospholipase A<sub>2</sub> is an endotoxin-stimulated membrane-associated enzyme of Kupffer cells which is released during liver perfusion. *Biochem J.* 293, 143-150.
- Hatcher, J.M., Pennell, K.D., Miller, G.W., 2008. Parkinson's disease and pesticides: toxicological perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 322-329.
- Hazarika, A., Sarkar, S.N., Hajore, S., Kataria, M., Malik, J.L., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: Biochemical interaction study. *Toxicology* 185, 1-8.
- He, F., 1999. Biological monitoring of exposure to pesticides: current issues. *Toxicol. Lett.* 108, 277-283.

- 
- Heales, S.J.R., Bolaños, J.P., Stewart, V.C., Brookes, P.S., Land, J.M., Clark, J.B., 1999. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1410, 215-228.
  - Heikkila, R.E., Cabbat, F.S., Cohen, G., 1976. *In vivo* inhibition of superoxide dismutase in mice diethyldithiocarbamate. *J. Biol. Chem.* 251, 2182-2185.
  - Hernández, A.F., López, O., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J.L., Parrón, T., Alvarez, J.C., Lorente, J.A., Pla, A., 2005. Changes in erythrocyte enzymes in human long-term exposed to pesticides. Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol. Lett.* 159, 13-21.
  - Hietanen, E., Linnainmaa, K., Vainio, H., 1983. Effect of phenoxyherbicides and glyphosate on the hepatic and intestinal biotransformation activities in the rat. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 53, 103-112.
  - Hirsch, E., Graybiel, A.M., Aqid, Y.A., 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334, 345-348.
  - Holmquist, L., Stuchbury, G., Berbaum, K., Muscat, S., Young, S., Hager, K., Engel, J., Münch, G., 2007. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and relates dementias. *Pharmacol. Therapeut.* 113, 154-164.
  - Honig, L.S., Rosenberg, R.N., 2000. Apoptosis and neurologic disease. *Am. J. Med.* 108, 317-330.
  - Hori, Y., Fujisawa, M., Shimada, K., Sato, M., Kikuchi, M., Honda, M., Hirose, Y., 2002. Quantitative determination of glufosinate in biological samples by liquid chromatography with ultraviolet detection after p-nitrobenzoyl derivatization. *J. Chromatogr.* 767, 255-262.
  - Hori, Y., Fujisawa, M., Shimada, K., Hirose, Y., 2003. Determination of the herbicide glyphosate and its metabolite in biological specimens by Gas Chromatography-Mass spectrometry. A case of poisoning by Roundup herbicide. *J. Anal. Toxicol.* 27, 162-166.

- Huerga, M., San Juan, S., 2004. Informe: El control de plagas en la agricultura argentina. Estudio sectorial agrícola-rural. Banco mundial/Centro de inversiones FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Argentina.
- Ingold, K.U., Burton, G.W., Foster, D.O., Hughes, L., Lindsay, D.A., Webb, A., 1987. Biokinetics of and discrimination between dietary RRR- and SRR- $\alpha$ -tocopherols in the male rat. *Lipids* 22, 163-172.
- Iverson, S.L., Orrenius, S., 2004. The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys* 423, 37-46.
- Jackson, M.J., Papa, S., Bolaños, J., Bruckdorfer, R., Carlsen, H., Elliott, R.M., Flier, J., Griffiths, H.R., Heales, S., Holst, B., Lorusso, M., Lund, E., Moskaug, J., Moser, U., Di Paola, M., Polidori, M.C., Signorile, A., Stahl, W., Viña-Ribes, J., Astley, S.B., 2002. Antioxidantes, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Mol. Aspects Med.* 23, 209-285.
- Jacob R.A., 1995. The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.* 15, 755-766.
- Jenner, P., Olanow, C.W., 1996. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47 (suppl. 3), s161-s170.
- Jenner, P., 1998. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 13, 24-34.
- Jia, Z., Misra, H.P., 2007. Developmental exposure to pesticides zineb and/or endosulfan renders the nigrostriatal dopamine system more susceptible to these environmental chemicals later in life. *Neurotoxicology* 28, 727-735.
- John, S., Kale, M., Rathore, N., Bhatnagar, D., 2001. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes, *J. Nutr. Biochem.* 12, 500-504.
- Johnson, P.E., Milne, D.B., Lykken, G.I., 1992. Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 56, 917-925.



- Kagan, V.E., Serbinova, E.A., Forte, T., Scita, G., Packer, L., 1992. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 33, 385-397.
- Kagan, V.E., Tyurina, Y.Y., Bayir, H., Chu, C.T., Kapralov, A.A., Vlasova, I.I., Belikova, N.A., Tyurin, V.A., Amoscato, A., Epperly, M., Greenberger, J., DeKosky, S., Shvedova, A.A., Jiang, J., 2006. The “pro-apoptotic genes” get out of mitochondria: oxidative lipidomics and redox activity of cytochrome c/cardiolipin complexes. *Chem. Biol. Interact.* 163, 15-28.
- Kamath, V., Rajini, P.S., 2007. Altered glucose homeostasis and oxidative impairment in pancreas of rats subjected to dimethoate intoxication. *Toxicology* 231, 137-146.
- Kamel, F., Hoppin, J.A., 2004. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environ. Health Persp.* 112, 950-958.
- Kanthasamy, A.G., Kitazawa, M., Kanthasamy, A., Anantharam, V., 2005. Dieldrin-induced neurotoxicity: Relevance in Parkinson’s disease pathogenesis. *Neurotoxicology* 26, 701-719.
- Khrolenko, M.V., Wieczorek, P.P., 2005. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *J. Chromatogr. A* 1093, 111-117.
- Kim, M.S., Park, J.Y., Namkoong, C., Jang, P.G., Ryu, J.W., Song, H.S., Yun, J.Y., Namgoong, I.S., Ha, J., Park, I.S., Lee, I.K., Viollet, B., Youn, J.H., Lee, H.K., Lee, K.U., 2004. Anti-obesity effect of  $\alpha$ -lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP activated protein kinase. *Nat. Med.* 10, 727-733.
- Kirby, M.L., Barlow, R.L., Bloomquist, J.R., 2001. Neurotoxicity of the organochlorine insecticide heptachlor to murine striatal dopaminergic pathways. *Toxicol. Sci.* 61, 100-106.

- Kirkland, R.A., Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., Franklin, J.L., 2002. Loss of cardiolipin and mitochondria during programmed neuronal death: evidence of the role for lipid peroxidation and autophagy. *Neuroscience* 115, 587-602.
- Kitazawa, M., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G., 2001. Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1473-1485.
- Knudsen, L.E., Hansen, A.M., 2007. Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *Int. J. Hyg. Environ.-Health* 210, 461-470.
- Kondoh, M., Inoue, Y., Ataqi, S., Futakawa, N., Higashimoto, M., Sato, M., 2001. Specific induction of metallothionein synthesis by mitochondrial oxidative stress. *Life Sci.* 69, 2137-2146.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751-5754.
- Kou, J., Gillette, J.S., Bloomquist, J.R., 2006. Neurotoxicity in murine striatal dopaminergic pathways following co-application of permethrin, chlorpyrifos, and MPTP. *Pestic. Biochem. Physiol.* 85, 68-75.
- Krieger, R.I., 1995. Pesticides exposure assessment. *Toxicol. Lett.* 82/83, 65-72.
- Kritchevsky, D., Davidson, L.M., Kim, H.K., Malhotra, S., 1972. Quantitation of serum lipids by a simple TLC-Charring method. *Clin. Chim. Acta* 46, 63-68.
- Lang, A.E., Obeso, J.A., 2004. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *Lancet Neurol.* 3, 309-316.
- Lapolla, A., Traldi, P., Fedele, D., 2004. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin. Biochem.* 38, 103-115.
- Lauterburg, B.H., Adams, J.D., Mitchell, J.R., 1984. Hepatic glutathione homeostasis in the rats: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology* 4, 586-590.
- Le Couteur, D.G., McLean, A.J., Taylor, M.C., Woodham, B.L., Board, P.G., 1999. Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother.* 53, 122-130.

- Lim, J-S., Yang, J-H., Chun B-Y., Kam, S., Jacobs, D.R., Lee, D-H., 2004. Is serum  $\gamma$ -glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress?. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1018-1023.
- Linder, M.C., Hazegh-Azam, M., 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 797S-811S.
- Liu, C.S., Chen, H.W., Lii, C.K., Chen, S.C., Wei, Y.H., 1998. Alterations of small-molecular-weight antioxidants in the blood of smokers. *Chem. Biol. Interact.* 116, 143-154.
- López, O., Hernández, A.F., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J.L., Parrón, T., Villanueva, E., Pla, A., 2007. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicol. Lett.* 171, 146-153.
- Lotti, M., 1995. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin. Chem.* 41, 1814-1818.
- Lowry, H.O., Rosebrough, N.J., Farr, A., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maczurek, A., Hager, K., Kenklies, M., Sharman, M., Martins, R., Engel, J., Carlson, D.A., Münch, G., 2008. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 60, 1463-1470.
- Mahaboob Khan, S., Sobti, R.C., Lincee, K., 2005. Pesticide-induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clin. Chim. Acta* 358, 131-138.
- Malik, A.K., Rao, A.L.J., 1991. Spectrophotometric determination of ziram, ferbam and zineb with diphenylcarbazone. *Talanta* 38, 941-944.
- Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., García Ovando, H., Weyers, A., Ugnia, L., González Cid, M., Larripa, I., Gorla, N., 2009. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 834-837.

- Marangon, K., Devaraj, S., Tirosh, O., Packer, L., Jialal, I., 1999. Comparison of the effect of  $\alpha$ -lipoic acid and  $\alpha$ -tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1114-1121.
- Mardsen, Neurophysiology, En: Stern, GM editor, Parkinson's disease, London Chapman and Hall Medical, 1990, pag: 57-98.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pirogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474.
- Marra, C.A., Nella, J., Manti, D., Alaniz, M.J.T. de, 2007. Lipid metabolism in rats is modified by nitric oxide availability through a  $Ca^{++}$ -dependent mechanism. *Lipids* 42, 211-228.
- Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Ceron, J.J., 2004. Comparison of two automated spectrophotometric methods for ceruloplasmin measurement in pigs. *Res.Vet. Sci.* 83, 12-19.
- Mayne, S.T., 2003. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* 133 (Suppl.): 933S-940S.
- Mc Cord, J.M., Fridovich, Y., 1969. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- McAteer, J.A., Douglas, W.H.J., 1979. Monolayers culture technique. *Method Enzymol.* 58, 132-140.
- McConnell, R., Hruska, A.J., 1993. An epidemic of pesticide poisoning in Nicaragua: Implications for prevention in developing countries. *Am. J. Public Health* 83, 1559-1562.
- McMillin, J.B., Dowhan, W., 2002. Cardiolipin and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 97-107.

- McNaught, K. P., Jenner, P., 2001. Proteosomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 297, 191-194.
- Micheli, F., 1998. En: *Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados*. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Migliore, L., Coppedé, F., 2008. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat. Res.* 674, 73-84.
- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A., 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* 384, 240-242.
- Miller, R.J., Wilson, S.M., 2003. Neurological disease: UPS stops delivering!. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 18-23.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62-71.
- Misciagna, G., Logroscino, G., De Michele, G., Cisternino, A.M., Guerra, V., Freudenheim, J.L., 2004. Fructosamine, glycated hemoglobin, and dietary carbohydrates. *Clin. Chim. Acta* 340, 139-147.
- Mocchegiani, E., Bertoni-Freddari, C., Marcellini, F., Malavolta, M., 2005. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog. Neurobiol.* 75, 367-390.
- Mohan Kumar, K.M., Bobby, Z., Selvaraj, N., Kumar Das, A., Chandra Koner, B., Sen, S.K., Ramesh, R., Ranganathan, P., 2004. Possible link between glycated hemoglobin and lipid peroxidation in hyperthyroidism. *Clin. Chim. Acta* 342, 187-192.
- Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal* 11, 2002-2012.
- Moro, M.A., Almeida, A., Bolaños, J.P., Lizasoain, I., 2005. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 1291-1304.
- Morrison WR, Smith LM. 1964. Preparation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5: 600-608.

- Moser, V.C., Simmons, J.E., Gennings, C., 2006. Neurotoxicological interactions of a five-pesticide mixture in preweaning rats. *Toxicol. Sci.* 92, 235-245.
- Murray, J., Taylor, S.W., Zhang, B., Ghosh, S.S., Capaldi, R.A., 2003. Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J. Biol.Chem.* 278, 37223-37230.
- Nakamura, K., Handa, S., 1984. Coomassie brilliant blue staining of lipids on thin-layer plates. *Anal. Biochem.* 142, 406-410.
- National Research Council, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, (1985) Publication N° 85-23 (rev), National Institute of Health, Bethesda, MD.
- Navarro, A., Boveris, A., 2008. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 60, 1534-1544.
- Nielsen, B.S., Larsen, E.H., Ladefoged, O., Lam, H.R., 2006. Neurotoxic effect of maneb in the rats as studied by neurochemical and immunohistochemical parameters. *Environ. Toxicol. Pharm.* 21, 268-275.
- Orrenius, S., 2004. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol. Lett.* 149, 19-23.
- Ostrander, D.B., Sparagna, G.C., Amoscato, A.A., McMillin, J.B., Dowhan, W., 2001. Decreased cardiolipin synthesis corresponds to cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 38061-38067.
- Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivitivsky, B., Orrenius, S., 2002. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 5, 1259-1263.
- Packer, L., Witt, E.H., Tritschler, H.J., 1995. Alpha lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 227-250.
- Packer, L., Tritschler, H.J., 1996. Alpha-lipoic acid: the metabolic antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 625-626.

- Packer, L., Tritschler, H.J., Wessel, K., 1997. Neuroprotection by the metabolic antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 359-378.
- Panigrahi, M., Sadguna, Y., Shivakumar, B.R., Kolluri, S.V.R., Roy, S., Packer, L., Ravindranath, V., 1996.  $\alpha$ -Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 717, 184-188.
- Paolini, M., Sapone, A., González, F.J., 2004. Parkinson's disease, pesticides and individual vulnerability. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 124-129.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Ruggiero, F.M., 2000. The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett.* 466, 323-326.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Ruggiero, F.M., 2002. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* 286, 135-141.
- Paroni, R., Ceriotti, F., Gallanello, R., Battista Leoni, G., Panico, A., Scurati, E., Peleari, R., Chemello, L., Quaino, V., Scaldaferrri, L., Lapolla, A., Mosca, A., 2007. Performance characteristics and clinical utility of an enzymatic method for the measurement of glycated albumin in plasma. *Clin. Biochem.* 40, 1398-1405.
- Patel, S., Singh, V., Kumar, A., Gupta, Y.K., Singh, M.P., 2006. Status of antioxidant defense system and expression of toxicant responsive genes in striatum of maneb- and paraquat- induced Parkinson's disease phenotype in mouse: Mechanism of neurodegeneration. *Brain Res.* 1081, 9-18.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic press 1998, 4<sup>o</sup> edition.
- Peixoto, F., 2005. Comparative effects of Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61, 115-122.

- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156, 61-66.
- Pesticide Action Network. Residuos de plaguicidas en alimentos, Reseña n° 8. United Kingdom, 1998.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Pistolesse, M., Paradies, G., 2001. Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in apoptosis. *FEBS Lett.* 509, 435-438.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Paradies, G., 2003. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J.* 17, 2202-2208.
- Petrosillo, G., Matera, M., Moro, N., Ruggiero, F.M., Paradies, G., 2009. Mitochondrial complex I dysfunction in rat heart with aging: critical role of reactive oxygen species and cardiolipin. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 88-94.
- Peuchen, S., Bolaños, J.P., Heales, S.J.R., Almeida, A., Duchen, M.R., Clark, J.B., 1997. Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidante status within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 52, 261-281.
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L., Schägger, H., 2003. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 52873-52880.
- Pocernich, C.B., Cardin, A.L., Racine, C.L., Lauderback, C.M., Butterfield, D.A., 2001. Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease. *Neurochem. Int.* 39, 141-149.



- Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Lisdero, C., Riobó, N., Schöpfer, F., Boveris, A., 1996. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch. biochem. Biophys.* 328, 85-92.
- Pope, S., Land, J.M., Heales, S.J.R., 2008. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target?. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 794-799.
- Pörn-Ares, M.I., Samali, A., Orrenius, S., 1998. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death. Diff.* 5, 1028-1033.
- Prahalathan, C., Selvakumar, E., Varalakshmi, P., 2006. Modulatory role of lipoic acid on adriamycin-induced testicular injury. *Chem. Biol. Int.* 160, 108-114.
- Prakasam, A., Sethupathy, S., Lalitha, S., 2001. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin. Chim. Acta* 310, 107-112.
- Priyadarshi, A., Khuder, S.A., Schaub, E.A., Priyadarshi, S.S., 2001. Environmental risk factors and Parkinson's disease: A Metaanalysis. *Environ. Res. Section A.* 86, 122-127.
- Radad, K., Rausch, W.D., Gille, G., 2006. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochem. Int.* 49, 379-386.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls. *J. Biol. Chem.* 266, 4244-4250.
- Rahimi, R., Abdollahi, M., 2007. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 115-121.
- Rami, A., Agarwal, R., Botez, G., Winckler, J., 2000.  $\mu$ -Calpain activation, DNA fragmentation, and synergistic effects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage. *Brain Res.* 866, 299-312.
- Rana, S.V., 2008. Metals and apoptosis: recent developments. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 22, 262-284.

- Ranjbar, A., Solhi, H., Mashayekhi, F.J., Susanabdi, A., Renzaie, A., Abdollahi, M., 2005. Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorous insecticides; a case control study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 88-91.
- Raynaud, F., Marcilhac, A., 2006. Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease. *FEBS J.* 273, 3437-3443.
- Reers, M., Smith, T.W., Chen, L.B., 1991. J-Aggregate formation of carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 30, 4480-4486.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C.Jr., 1993. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* 123, 1939-1951.
- Rehman, H., Ali, M., Atif, F., Kaur, M., Bhatia, k., Raisuddin, S., 2006. Modulatory effect of deltamethrin and antioxidants in mice. *Clin. Chim. Acta* 369, 61-65.
- Remor, A.P., Totti, C.C., Moreira, D.A., Dutra, G.P., Heuser, V.D., Boeira, J.M., 2008. Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ. Int.* 35, 273-278.
- Reznick, A.Z., Packer, L., 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Method Enzymol.* 233, 357-363.
- Ricca, A. INTA, Inocuidad química de los alimentos desde el punto de vista de los residuos de pesticidas, investigación, desarrollo, aplicación, prevención, control y legislación. Doc. INTA/Oct. 2004.
- Ricci, J.E., Gottlieb, R.A., Green, D.R., 2003. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J. Cell Biol.* 160, 65-75.
- Rice, D., Barone, S., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence for humans and animal models. *Environ. Health. Perspect.* 108, 511-533.

- Ritz, B., Yu, F., 2000. Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984-1994. *Int. J. Epidemiol.* 29, 323-329.
- Rosenberg, H.R., Culik, R., 1959. Effect of  $\alpha$ -lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies. *Arch. Biochem. Biophys.* 80, 86-93.
- Rushlow, W., Flumerfelt, B., Naus, C., 1995. Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH diaphorase in the caudate-putamen on the rat. *J. Comp. Neurol.* 351, 499-508.
- SAGYPA, 2007. Estimaciones agrícolas. Anexo Estadístico. Dirección de Coordinación de Delegaciones, SAGPyA, Ministerio de Economía de Argentina.
- Samantaray, S., Knaryan, V.H., Guyton M.K., Matzelle, D.D., Ray S.K., Banik, N.L., 2007. The parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of lewis rats. *Neuroscience* 146, 741-755.
- Sambrook J., Fritsch, E., Maniatis, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Sathiyapriya, V., Bobby, Z., Kumar, S.V., Selvaraj, N., Parthibane, V., Gupta, S., 2006. Evidence for the role of lipid peroxides and glycation of hemoglobin and plasma proteins in non-diabetic asthma patients. *Clin. Chim. Acta* 366, 299-303.
- Sathiyapriya, V., Selvaraj, N., Nandeesh, H., Bobby, Z., Agrawal, A., Pavithran, P., 2007. Enhanced glycation of hemoglobin and plasma proteins is associated with increased lipid peroxide levels in non-diabetic hypertensive subjects. *Arch. Med. Res.* 38, 822-826.
- Sawaya, W.N., Al-Awadhi, F.A., Saeed, T., Al-Omair, A., Husai, A., Ahmad, N., Al-Omirah, H., Al-Zenki, S., Khalafawi, S., Al-Otaibi, J., Al-Amiri, H., 2000. Dietary intake of organophosphate pesticides in Kuwait. *Food Chem.* 69, 331-338.
- Sayim, F., 2007. Dimethoate-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 59, 237-243.

- Schlame, M., Rüstow, B., 1990. Lysocardiolipin formation and reacylation in isolated rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 272, 589-595.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., Bitsch, R., 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic. Res.* 36, 177-187.
- Seaton, T.A., Jenner, P., Marsden, C.D., 1996. The isomers of thiocotic acid alter <sup>14</sup>C-deoxyglucose incorporation in rat basal ganglia. *Biochem. Pharmacol.* 51, 983-986.
- Selvaraj, N., Bobby, Z., Sridhar, M.G., 2008. Increased glycation of hemoglobin in chronic renal failure patients and its potential role of oxidative stress. *Arch. Med. Res.* 39, 277-284.
- Sen, T., Sen, N., Tripathi, G., Chatterjee, U., Chakrabarti, S., 2006. Lipid peroxidation associated cardiolipin loss and membrane depolarization in rat brain mitochondria. *Neurochem. Int.* 49, 20-27.
- Seth, V., Banerjee, B.D., Chakravorty, A.K., 2001. Lipid peroxidation, free radical scavenging enzymes, and glutathione redox system in blood of rats exposed to propoxur. *Pestic. Biochem. Physiol.* 71, 133-139.
- Sevillano, S., de la Mano, A.M., Manso, M.A., Orfao, A., de Dios, I., 2003. N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. *Biochem. Biophys. Acta* 1639, 177-184.
- Sharma, Y., Bashir, S., Irshad, M., Datta Gupta, S., Dogra, T.D., 2005a. Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. *Toxicol.* 206, 49-57.
- Sharma, Y., Bashir, S., Irshad, M., Nag, T.C., Dogra, T.D., 2005b. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. *Toxicology* 215, 173-181.
- Shergill, J.K., Cammack, R., Cooper, C.E., Cooper, J.M., Mann, V.M., Schapira, A.H.V., 1996. Detection of nitrosyl complex in human substantia nigra in relation to Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res.* 228, 298-305.

- Shidoji, Y., Hayashi, K., Komura, S., Ohishi, N., Yagi, K., 1999. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 343-347.
- Shila, S., Kokilavani, V., Subathra, M., Panneerselvam, C., 2005. Brain regional responses in antioxidant system to  $\alpha$ -lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology* 210, 25-36.
- Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Jenner, P., Marsden, C.D., 1994. Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 36, 356-361.
- Sies, H., Stahl, W., Sundquist, A.R., 1992. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci.* 669, 7-20.
- Simmons, J.E., 1995. Chemical mixtures: challenge for toxicology and risk assessment. *Toxicology* 105, 111-119.
- Singh, S., Dikshit, M., 2007. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. *Brain Res. Rev.* 54, 233-250.
- Singh, V.K., Jyoti, Krishna Reddy, M.M., Kesavachandran, C., Rastogi, S.K., Siddiqui, M.K.J., 2007. Biomonitoring of organochlorines, glutathione, lipid peroxidation and cholinesterase activity among pesticide sprayers in mango orchards. *Clin. Chim. Acta* 377, 268-272.
- Sivapiriya, V., Jayanthisakthisekaran Venkatraman, S., 2006. Effects of dimethoate (O,O-dimethyl S-methyl carbamoyl methyl phosphorodithioate) and ethanol in antioxidant status of liver and kidney of experimental mice. *Pestic. Biochem. Phys.* 85, 115-121.
- Slaughter, M.R., Thakkar, H., O'Brien, P.J., 2003. Differential expression of the lenticular antioxidant system in laboratory animals: a determinant of species predilection to oxidative stress-induced ocular toxicity?. *Curr. Eye. Res.* 26, 15-23.
- Sobczak, A., Golka, D., Szoltysek-Boldys, I., 2004. The effects of tobacco smoke on plasma alpha- and gamma- tocopherol levels in passive and active cigarette smokers. *Toxicol. Lett.* 151 (3) 429-437.

- Sobocanec, S., Balog, T., Kusić, B., Sverko, V., Sarić, A., Marotti, T., 2008. Differential responses to lipid peroxidation in male and female mice with age: correlation of antioxidant enzymes matters. *Biogerontology* 9, 335-343.
- Sorimachi, H., Ishiura, S., Suzuki, K., 1997. Structure and physiological function of calpains. *J. Biochem.* 328, 721-732.
- Sosan, M.B., Akingbohunge, A.E., Ojo, I.A.O., Durosinmi, A.M., 2008. Insecticide residues in the blood serum and domestic water source of cacao farmers in Southwestern Nigeria. *Chemosphere* 72, 781-784.
- Speciale, S.G., 2002. MPTP Insights into parkinsonian neurodegeneration. *Neurotoxicol. Teratol.* 24, 607-620.
- Stalikas, C.D., Konidari, C.N., 2001. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *J. Chromatogr. A* 907, 1-19.
- Stewart, V.C., Heales, S.J.R., 2003. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radical. Biol. Med.* 34, 287-303.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.
- Tabatabaie, T., Floyd, R.A., 1994. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 314,112-119.
- Takahashi, Y., Oakes, S.M., Williams, M.C., Takahashi, S., Miura, T., Joyce-Brady, M., 1997. Nitrogen dioxide exposure activates  $\gamma$ -glutamyl transferase gene expression in rat lung. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143, 388-396.
- Tarbah, F.A., Mahler, H., Temme, O., Daldrup, T., 2001. An analytical method for the rapid screening of organophosphate pesticides in human biological samples and foodstuffs. *Forensic Sci. Int.* 121, 126-133.

- Testa, C.M., Sherer, T.B., Greenmyre, J.T., 2005. Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 134, 109-118.
- Tewari, S.N., Harpalani, S.P., 1976. Detection and determination of organophosphorus insecticides in tissues by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* 130, 229-236.
- Thiruchelvam, M., Richfield, E.K., Goodman, B.M., Baggs, R.B., Cory-Slechta, D.A., 2002. Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. *Neurotoxicology* 23, 621-633.
- Toumainen, A., Kangas, J.A., Meuling, W.J.A., Glass, R.C., 2002. Monitoring of pesticide applicators for potential dermal exposure to malathion and biomarkers in urine. *Toxicol. Lett.* 134, 125-132.
- Tsikas, D., 2006. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assay based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatogr. B* 851, 51-70.
- Van der Berg, J.J., Op den Kamp, J.S., Lubin, B.H., Kuypers, F.A., 1993. Conformational changes in oxidized phospholipids and their preferential hydrolysis by phospholipase A<sub>2</sub>: a monolayer study. *Biochemistry* 32, 4962-4967.
- Van Hemmen J.J., Brouwer, D.H., 1995. Assessment of dermal exposure to chemicals. *Sci. Total Environ*, 168, 131-141.
- Virág, L., Szabó, E., Gergely, P., Szabó, C., 2003. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett.* 140, 113-124.
- Von Ahsen, O., Waterhouse, N.J., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., Green, D.R., 2000. The "harmless" release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1192-1199.
- Wang, K.K., Posmantur, R., Nadimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R.A., Talanian, R.V., Keegan, M., Herzog, L., Allen, H., 1998. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 187-196.

- Wang, X-F, Li, S., Chou, A.P, Bronstein, J.M., 2006. Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 23, 198-205.
- Wardle, N.J., Bligh, S.W., Hudson, H.R., 2008. Organophosphorus compounds: intervention in mechanisms of signal transduction relevant to proliferative, immunological and circulatory disorders. *Curr. Med. Chem.* 15, 2230-2257.
- Willems, D., Dorchy, H., Dufresne, D., 1998. Serum antioxidant status and oxidized LDL in well-controlled young type I diabetic patient with and without subclinical complications. *Atherosclerosis* 137, S61-S64.
- Wiseman, H., Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 313, 17-29.
- Yagi, K., 1976. A simple fluorometric assay for lipoperoxides in blood plasma. *Biochem. Med.* 15, 212-216.
- Yamaguchi, M., Kambe, S., Eto, T., Yamakoshi, M., Kouzuma, T., Suzuki, N., 2005. Point of care testing system via enzymatic method for the rapid, efficient assay of glycated albumin. *Biosens. Bioelectron.* 21, 426-432.
- Yuan, R.Y., Wu, M.Y., Hu, S.P., 2000. Antioxidant status in patients with Parkinson's disease. *Nutr. Res.* 20, 647-652.
- Zatta, P., Drago, D., Zambenedetti, P., Bolognin, S., Nogara, E., Peruffo, A., Cozzi, B., 2008. Accumulation of copper and other metal ions, and metallothionein I/II expression in the bovine brain as a function of aging. *J. Chem. Neuroanat.* 36, 1-16.
- Zelazowsky, A.J., Gasyna, Z., Stillman, M.J., 1989. Silver binding to rabbit liver metallothionein. Circular dichroism and emission study of silver-thiolate cluster formation with apometallothionein and the alpha and beta fragments. *J. Biol. Chem.* 264, 17091-17099.
- Zeng, B.Y., Medhurst, A.D., Jackson, M., Rose, S., Jenner, P., 2005. Proteosomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age. *Mech. Ageing Dev.* 126, 760-766.



- Zhou, Y., Shie, F.S., Piccardo, P., Montine, T.J., Zhang, J., 2004. Proteosomal inhibition induced by manganese ethylene-bis-dithiocarbamate: relevance to Parkinson's disease. *Neurosci.* 128, 281-291.
- Ziegler, D., Gries, F.A., 1997. Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral and cardiac autonomic neuropathy. *Diabetes* 46, suppl 2, S62-66.
- Ziegler, D., Reljanovic, M., Mehnert, H., Gries, F.A., 1999. Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107, 421-423.