

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria



**TESIS DOCTORAL**

**Efectos neurotóxicos del clorpirifos sobre el sistema colinérgico e implicaciones legales del uso del perfil toxicogenómico como biomarcador de toxicidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Paula Viviana Moyano-Cires Ivanoff**

Directores

**Javier del Pino Sans  
María José Anadón Baselga  
Miguel Andrés Capó Martí**

**Madrid, 2017**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
Programa De Doctorado En Investigación En Ciencias  
Médico-Quirúrgicas  
Departamento De Toxicología y Legislación Sanitaria



**EFFECTOS NEUROTOXICOS DEL CLORPIRIFOS  
SOBRE EL SISTEMA COLINERGICO E  
IMPLICACIONES LEGALES DEL USO DEL  
PERFIL TOXICOGENOMICO COMO  
BIOMARCADOR DE TOXICIDAD**

**PAULA VIVIANA MOYANO-CIRES IVANOFF**

**2016**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Programa De Doctorado En Investigación En Ciencias**

**Médico-Quirúrgicas**

**Departamento De Toxicología y Legislación Sanitaria**



**EFFECTOS NEUROTOXICOS DEL CLORPIRIFOS SOBRE EL  
SISTEMA COLINERGICO E IMPLICACIONES LEGALES  
DEL USO DEL PERFIL TOXICOGENOMICO COMO  
BIOMARCADOR DE TOXICIDAD.**

**PAULA MOYANO-CIRES IVANOFF**

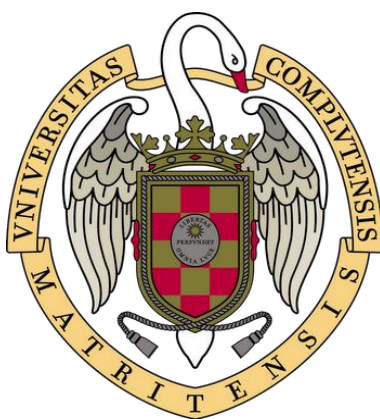
**Madrid, 2016**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Programa De Doctorado En Investigación En Ciencias Médico-Quirúrgicas**

**Departamento De Toxicología y Legislación Sanitaria**



**EFFECTOS NEUROTOXICOS DEL CLORPIRIFÓS SOBRE EL  
SISTEMA COLINERGICO E IMPLICACIONES LEGALES DEL USO  
DEL PERFIL TOXICOGENOMICO COMO BIOMARCADOR DE  
TOXICIDAD.**

**PAULA MOYANO-CIRES IVANOFF**

**Javier del Pino Sans, María José Anadón Baselga, Miguel Andrés Capó Martí**

**Madrid, 2016**

**Dña. MARIA JOSE ANADON BASELGA**, Profesora Titular del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Facultad de Medicina, **D. MIGUEL ANDRES CAPO MARTI** Profesor Titular del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria y **D. JAVIER DEL PINO SANS** Profesor Contratado Doctor del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense de Madrid

**CERTIFICAN:** Que Dña. PAULA VIVIANA MOYANO-CIRES IVANOFF ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado: “EFECTOS NEUROTOXICOS DEL CLORPIRIFOS SOBRE EL SISTEMA COLINERGICO E IMPLICACIONES LEGALES DEL USO DEL PERFIL TOXICOGENOMICO COMO BIOMARCADOR DE TOXICIDAD”, el cual consideramos que reúne las condiciones y la calidad científica deseadas para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste se expide el presente certificado en Madrid, a de de dos mil dieciséis.

La Directora

El Director

El Director

Fdo: M<sup>a</sup> José Anadón Baselga Fdo: Miguel Andres Capo Marti Fdo: Javier del Pino Sans

### **Deseo expresar mi agradecimiento:**

- A la Prof. Dra. María José Anadón Baselga, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este período de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral, así como por todos los medios y consejos puestos a mi disposición.
- Al Prof. Dr. Javier del Pino Sans, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este período de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.
- Al Prof. Dr. Miguel Andres Capo Marti, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este período de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.
- A mis padres por su apoyo y ayuda durante toda esta etapa académica y por siempre estar a mi lado cada vez que los necesito.
- A mis hijos Javier Rodrigo y Victoria Carolina, por se una inconmensurable fuente de amor, alegría, inspiración y ánimo para seguir avanzando y llegando cada vez un paso más adelante.
- A mi marido, por apoyar todas y cada una de mis batallas, sueños y ambiciones. Por estar siempre a mi lado y poner su granito de arena en la consecución de esta tesis.

## **LISTADO DE ACRONIMOS EMPLEADOS EN ESTA TESIS**

- AC- Adenilato ciclasa
- 5HT- Serotonina
- PCR- Reacción en cadena de la polimerasa
- SNC- Sistema nervioso central
- Pc- Peso corporal
- ADN- Ácido desoxirribonucleico
- ARN- Ácido ribonucleico
- CPF-Clorpirifós
- OF-Organofosfatos
- EA- Enfermedad de Alzheimer
- AChE-Acetilcolinesterasa
- NOAEL-Nivel Sin Efecto Adverso Observable
- LOAEL- Nivel mas bajo con efectos adversos observables
- PPP-Productos de Protección de Plantas
- UE-Unión Europea
- BuChE-Butirilcolinesterasa
- NTE-Esterasa de Neuropatía
- DG-Día Gestacional
- DPN-Día Posnatal
- TCP-3,5,6-tricloro-2-piridinol
- DL<sub>50</sub>-Dosis Letal 50
- PMSF- Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
- OPIDP- Polineuropatía retardada inducida por pesticidas OFs
- SNC-SNP- Sistema nervioso central-sistema nervioso periférico
- DPGME- Dipropilenglicol metil éter
- DMT-Dosis Máxima Tolerada
- CI<sub>50</sub>-Concentración Inhibitoria 50
- Ki-Constante de inhibición
- ERO-Especies reactivas de oxígeno
- DE<sub>50</sub>-Dosis Eficaz 50
- PON1-Paroxonaxa
- ChAT- Acetiltransferasa de colina
- CREB- Elemento de respuesta a AMPc
- DRG-Ganglios de la raíz dorsal
- EPA-Environmental Protection Agency
- FIFRA- Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act
- FFDCa-Federal Food, Drug, and Cosmetic Act
- FQPA-Food Quality Protection Act
- PRIA-Pesticide Registration Improvement Act
- COP-Contaminantes orgánicos persistentes
- LMR-Límite máximo de residuos
- ACh-Acetilcolina

- EFSA-Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
- MDA- Malondialdehído
- LDH- Lactato deshidrogenasa
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Peróxido de Hidrógeno
- CHT- Transportador de colina de alta afinidad
- NAC-N-acetil cisteína
- MAP-2- Proteína asociada a los microtúbulos
- QPCR- Reacción en Cadena de la Polimerasa semicuantitativa
- ACTB-Gen de la beta actina
- SD-Desviación Estándar
- ND- No Detectado
- NC- No Cuantificable
- NF68- Proteína neurofibrilar 68
- NF200- Proteína neurofibrilar 200
- P53- Proteína tumoral 53
- RM- Receptores muscarínicos
- ChAT- Colina acetiltransferasa
- HC-3- Hemicolinio-3.
- am- Aceite de maíz
- RN- Receptores nicotínicos
- AC- Adenilato ciclasa
- IP- Inositol fosfato
- ac- Aceite de cacahuete
- iv- Intravenoso
- GFAP- Proteína gliofibrilar ácida
- FCF- Factor de crecimiento de fibroblastos
- PBM- Proteína mielina básica
- $\beta$ AR- Receptor adrenérgico beta
- VAChT- Transportador de la acetilcolina vesicular
- MTT- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

# ÍNDICE

SUMARY.....	I
RESUMEN.....	II
1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	22
2. INTRODUCCION.....	26
3. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	30
3.1. Clorpirifós.....	31
3.2. Mecanismo de acción.....	33
3.3. Metabolismo.....	37
3.4. Neurotoxicidad.....	41
3.4.1. Neurotoxicidad general de los organofosforados.....	41
▪ Síndrome colinérgico agudo	
▪ Síndrome intermedio	
▪ Neuropatía periférica retardada	
3.4.2. Neurotoxicidad general del clorpirifós.....	46
▪ Toxicidad aguda colinérgica	
▪ La sensibilidad dependiente de la edad a la toxicidad colinérgica aguda	
▪ Neuropatía periférica con o sin síndrome intermedio	
▪ Efectos cognitivos por la exposición crónica al clorpirifós	
▪ La neurotoxicidad en el desarrollo por clorpirifós	
▪ Efectos neurotoxicos en el desarrollo por clorpirifós	
3.5. Normativa y Legislación.....	81
3.5.1 Regulación en los Estados Unidos de America.....	81
3.5.2. Regulación Multilateral.....	83
▪ Convenio de Estocolmo	
3.5.3. Regulación por Organismos Internacionales.....	86

<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Especificaciones sobre Pesticidas para la Salud Pública: Informe de Evaluación 221/2008-Clorpirifós de la (FAO)/ World Health Organization (WHO).</li> </ul>	
3.5.4. Regulación a Nivel Europeo.....	86
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reglamento 3600/92/CEE</li> <li>▪ Reglamento 396/2005/CE</li> <li>▪ Directiva 2005/72/CE</li> <li>▪ Directiva 2008/17/CE</li> <li>▪ Reglamento de ejecución (UE) N° 400/2014</li> <li>▪ Reglamento de ejecución (UE) 2015/595</li> <li>▪ Reglamento 2016/60/UE</li> </ul>	
3.5.5. Regulación a Nivel Nacional.....	89
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Real Decreto 290/2003</li> <li>• Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y el Reglamento 850/2004/CE</li> <li>• Real Decreto 951/2014</li> <li>• Real Decreto 971/2014</li> </ul>	
<b>4. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>92</b>
4.1. Productos químicos.....	92
4.2. Línea celular.....	92
4.2. Protocolo y diseño experimental.....	94
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Análisis de la viabilidad celular</li> <li>▪ Silenciamiento de genes</li> <li>▪ Análisis de las actividades enzimáticas</li> <li>▪ Análisis de la densidad de las espinas dendríticas</li> </ul>	

- Análisis de la expresión génica
- Análisis de la inducción de estrés oxidativo
- Análisis estadístico

<b>5. RESULTADOS</b> .....	108
5.1. Efecto del CPF sobre la viabilidad de las células SN56 a través del la prueba del MTT.....	108
5.2. Evaluación de la muerte celular mediante el método LDH.....	112
5.3. Efecto sobre la actividad de las caspasas 3/7.....	113
5.4. El análisis de PCR en tiempo real.....	114
5.5. El análisis de PCR Array en tiempo real.....	120
5.6. Determinación de la actividad de la AChE.....	123
5.7. Determinación de la actividad de la ChAT.....	123
5.8. Medición de los niveles de acetilcolina.....	124
5.9. Ensayo de la peroxidación lipídica.....	124
5.10. Medición de los niveles de peróxido de hidrógeno.....	126
5.11. Efecto de la CPF sobre la densidad de las espinas dendríticas .....	127
<b>6. DISCUSION</b> .....	129
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	144
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b> .....	147
<b>9. ANEXO I</b> .....	164

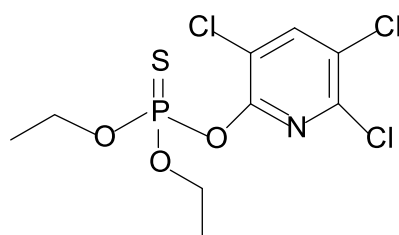
## **SUMMARY**

## SUMMARY

### CHLORPYRIFOS NEUROTOXIC EFFECTS ON CHOLINERGIC SYSTEM AND LEGAL IMPLICATIONS OF THE USE OF TOXICOGENOMIC PROFILE AS A BIOMARKER OF TOXICITY.

#### INTRODUCTION

Chlorpyrifos (CPF) is one of the organophosphates (OP) insecticides most widely used in numerous agricultural and residential settings (Figure 1). CPF is able to cause developmental toxicity, immunological abnormalities, and neurotoxicity. Moreover, OP occupational exposure has been related in human epidemiological studies with neurological and neuro-behavioral deficits including impairments of cognition. In this regard, CPF has been shown to produce learning deficits in rats after acute and repeated administration similar to those induced in Alzheimer's disease (AD). However, the complete mechanisms through which CPF induces these cognitive alterations are unknown.



**Figure 1.** Chlorpyrifos chemical structure (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS).

In this regard, the cholinergic system, mainly basal forebrain cholinergic neurons, is involved in the regulation of memory and learning processes, and the impairment of cholinergic transmission or a loss of the cholinergic neurons could induce these effects. In this regard, it

has been reported that CPF may affect cholinergic transmission, and alter the cholinesterase (AChE) variants, which have been shown to be related to the loss of basal forebrain cholinergic neurons. In addition, it has been reported that CPF produces oxidative stress, which has been also linked to the induction of cognitive deficits, changes in expression of AChE variants and neuronal death. Also, it has been shown that the expression of P75<sup>NTR</sup> and  $\alpha_7$ -nAChR receptor is altered in the basal forebrain of rats after long term exposure to CPF and this condition has been linked to the induction of oxidative stress, loss of cholinergic neurons and disruption of learning and memory processes in other brain regions. Moreover, it has also been shown that dendritic spines are involved in the regulation of learning and memory processes and their disruption could also contribute to the alteration of those processes. In this regard, it has been described that CPF alters the dendritic spines density in the prefrontal cortex and the hippocampus after acute and repeated exposure to subclinical doses, respectively, therefore their disturbance in the cholinergic neurons of the basal forebrain could also mediate these cognitive disorders.

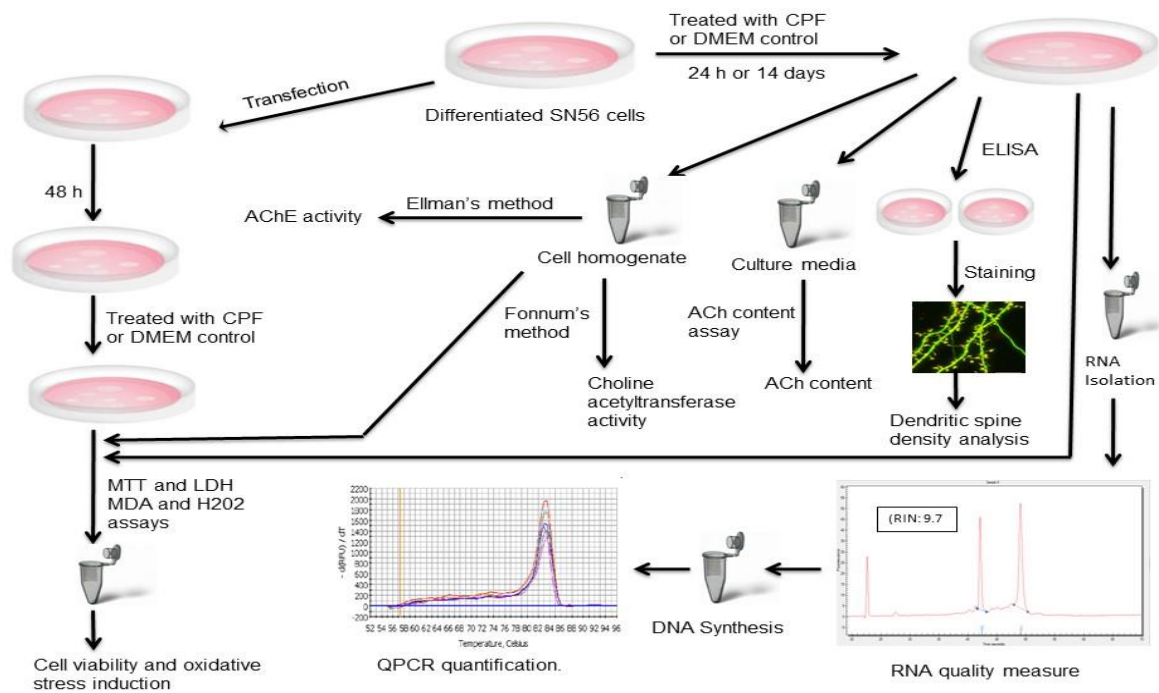
Based on these data, we hypothesized that the CPF, at subclinic concentrations, could induce dendritic spines alteration in the basal forebrain cholinergic neurons and, at clinic concentrations, cell death, through the alteration of cholinergic transmission, or through the induction of oxidative stress produced by disruption in the expression of P75<sup>NTR</sup> and  $\alpha_7$ -nAChR receptors, which may mediate its effect on these neurons by altering AChE variants, resulting in the cognitive disorders described.

## MATERIAL AND METHODS

To test our hypothesis, we studied in SN56 basal forebrain cholinergic neurons, CPF toxic effects after 24 h and 14 days of exposure on dendritic spines, induction of cell death and the gene expression pathways which mediate these effects in this region and the cholinergic mechanisms related to it. We also evaluated the effects of CPF after 24 h and 14 days of exposure on the expression of P75<sup>NTR</sup> and  $\alpha_7$ -nAChR and its implication in the induction of oxidative stress, loss of cholinergic neurons and altered variants of AChE.

We used SN56 cells, a cholinergic murine neuroblastoma cell line derived from septal neurons as a model of cholinergic neurons of the basal forebrain region to assess toxic effects of CPF in this specific type of neurons and the mechanisms through which they are induced. To determine the density of dendritic spine, the cellular content of acetylcholine (ACh), of malondialdehyde (MDA), of lactate dehydrogenase (LDH) and the content of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), the activities of AChE and acetylcholine transferase (ChAT), the expression of AChE variants, high-affinity choline transporters (CHT), ChAT, and vesicular acetylcholine transporter (VAChT), the major regulatory genes of cell death pathways (PCR Array Cell Death Pathway Finder Pad reference PAMM-212Z) and of dendritic spines plasticity (PSD95, NMDAR1, SPN and SYP) and  $\alpha_7$ -nAChR and P75<sup>NTR</sup> receptors and the effects of silencing  $\alpha_7$ -nAChR, ChAT and AChE or P75<sup>NTR</sup> overexpression on cell viability and of silencing  $\alpha_7$ -nAChR and P75<sup>NTR</sup> overexpression on the induction of oxidative stress, the SN56 cells were seeded in 6-well plates at a density of 10<sup>6</sup> cells/well. Cells were treated for 24 h or for 14 days with CPF at concentrations between 0.01  $\mu$ M to 70  $\mu$ M and between 0.01  $\mu$ M to 40  $\mu$ M, respectively with or without N-acetyl cysteine (NAC; 1 mM). At least 3 replicate wells/treatment were used. A group treated with vehicle was used in parallel for each experiment as a control group.

In the literature, 10–100  $\mu\text{M}$  chlorpyrifos has been routinely used to study chlorpyrifos toxicity, although there are not enough data regarding the relative distribution or concentration of CPF in human brain after acute and chronic exposure. In addition, studies have shown that the blood plasma concentration of CPF from human volunteers were similar to 0.1  $\mu\text{M}$ , although it has been recently reported, using a physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model, that blood plasma concentration present in humans could be around 0.015  $\mu\text{M}$ , reaching the brain concentrations around 0.01  $\mu\text{M}$  (Arnold et al., 2015). Moreover, whole-body molar concentrations associated with the doses of CPF (2.5–25.0 mg/kg/day) used in behavioral experiments have been reported to be calculated as ranging between approximately 7.0 and 8.0 to 70.0 and 80.0  $\mu\text{M}$ . The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) set for CPF is 0.1 mg/kg bw per day, which would be around 0.3  $\mu\text{M}$  concentration in the tissues. The used doses are relevant to study the cognitive disorders according to all described above. Furthermore, we chose CPF 30  $\mu\text{M}$  concentration, which was the lowest concentration observed to induce cell death after acute exposure, to study the CPF necrotic and apoptotic mechanisms. Figure 2 shows the protocol and experimental design followed in this investigation.



**Figure 2.** Summarizes the protocol and experimental design followed in this investigation

## RESULTS AND DISCUSSION

Our research shows that CPF impaired cholinergic transmission and it induced AChE inhibition and increased CHT expression only after long-term exposure, which suggests that acetylcholine levels alteration could be mediated by these actions. Moreover, CPF induces, after acute and long-term exposure, cell death on cholinergic neurons from basal forebrain and this effect is independent of AChE inhibition or acetylcholine alteration, but was mediated partially by AChE variants alteration.

Moreover, we show that CPF alters P75<sup>NTR</sup> and  $\alpha_7$ -nAChRs expression, which induced reactive oxygen species leading to generation of oxidative stress shown as induction of lipid peroxidation. The induction of oxidative stress was mediated partially by P75<sup>NTR</sup> and  $\alpha_7$ -nAChRs alteration. In addition, the generation of oxidative stress and P75<sup>NTR</sup> and  $\alpha_7$ -nAChRs

alteration by CPF mediated partially the decrease in cell viability and this effect was partially mediated through AChE variants alteration.

Furthermore, our results show that CPF induces after acute and long-term exposure cell death through apoptosis as determined by caspases 3/7 activation and at higher concentrations through necrosis shown by LDH release. This results were confirmed by PCR array analysis of the main cell death pathways.

Finally, we showed that CPF induces after acute and long-term exposure an alteration of dendritic spines at subclinic concentrations, below those that induced cell death. Evaluation of cell death pathways and genes related to dendritic spine plasticity revealed that some of them are altered at lower concentrations than which produce the effects observed and below the NOAEL.

## CONCLUSIONS

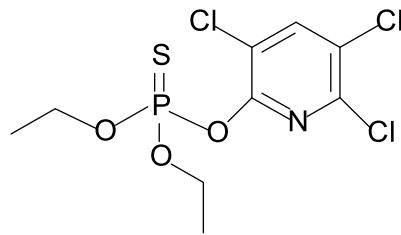
After acute and long-term exposure, CPF induces at low concentration a dendritic spine density reduction and at higher concentrations induces oxidative stress mediated partially through  $\alpha_7$ -nAChRs and P75<sup>NTR</sup> altered expression and cell death on cholinergic neurons from basal forebrain through apoptotic and necrotic mechanisms. Cell death was mediated in part through induction of oxidative stress, overexpression of P75<sup>NTR</sup> and  $\alpha_7$ -nAChRs downregulation. In addition, all these mechanisms mediated the observed cell death on cholinergic neurons from basal forebrain in part through AChE variants overexpression. These effects were initiated at lower concentration than from which they are manifest, as indicated by transcriptional alterations of key genes. Our results, particularly those for CPF treatment, suggest that toxicogenomic profiles provide a sensitive tool for identifying and characterizing

thresholds of toxicity for potentially toxic compounds based upon a transcriptome-level of insight into their mechanisms. These effects could explain cognitive alterations and neurodegenerative diseases induced by CPF. In this regard, all the mechanisms that we reported to induce cholinergic cell loss in basal forebrain have been described to be involved with the induction of cognitive disorders, which supports this hypothesis. Future studies should be developed to determine the other mechanisms implicated in these effects observed on cholinergic neurons. These results are of interest, since they provide new information on the mechanisms that mediate dendritic spine density alteration and cell death induced by CPF, and because they lead to a better understanding of some effects related to CPF toxicity and highlight the need for a new NOAEL and lowest observed adverse effect level (LOAEL) and a new risk assessment of this pesticide.

# **RESUMEN**

## RESUMEN

Clorpirifós (CPF) es uno de los insecticidas organofosforados (OP) más utilizados en aplicaciones agrícolas y residenciales (Figura 1). El CPF es capaz de causar alteraciones de desarrollo, inmunológicas, y efectos neurotóxicos. Por otra parte, la exposición ocupacional a los OP se ha relacionado, en estudios epidemiológicos en humanos, con déficits neurológicos y neuroconductuales, incluyendo alteraciones de la cognición. En este sentido, el CPF se ha demostrado que produce en ratas tras la administración aguda y repetida, déficits de aprendizaje similares a los inducidos en la enfermedad de Alzheimer (AD). Sin embargo, los mecanismos completos a través del cual el CPF induce estas alteraciones cognitivas son desconocidos.



**Figura 1.** Estructura química del clorpirifós (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS).

En este sentido, el sistema colinérgico, principalmente las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, está implicado en la regulación de los procesos de aprendizaje y de memoria, y el deterioro de la transmisión colinérgica o una pérdida de las neuronas colinérgicas de esta región podría inducir estos efectos. A este respecto, se ha descrito que el CPF puede afectar a la transmisión colinérgica, y alterar las variantes la colinesterasa (AChE), que se han demostrado estar relacionadas con la pérdida de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Además, se ha descrito que el CPF produce estrés oxidativo, que ha sido también relacionado con la inducción de déficits cognitivos, cambios en la expresión de las variantes de la AChE y de la muerte neuronal. Además, se ha demostrado que la expresión de los receptores P75<sup>NTR</sup> y  $\alpha_7$ -nAChR se altera en el prosencéfalo basal de ratas tras la exposición a largo plazo al CPF y

esta condición se ha relacionado con la inducción de estrés oxidativo, la pérdida de neuronas colinérgicas y la alteración de los procesos de aprendizaje y memoria en otras regiones del cerebro. Por otra parte, también se ha demostrado que las espinas dendríticas están implicadas en la regulación de los procesos de aprendizaje y memoria y su disrupción podría también contribuir a la alteración de estos procesos. A este respecto, se ha descrito que el CPF altera la densidad de las espinas dendríticas en la corteza prefrontal y el hipocampo tras la exposición aguda y repetida a dosis subclínicas, respectivamente, por lo que su alteración en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal también podría mediar estos trastornos cognitivos.

Basándose en estos datos, nuestra hipótesis es que el CPF a concentraciones subclínicas podría inducir una alteración de las espinas dendríticas en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y concentraciones clínicas inducir la muerte celular de estas neuronas, a través de la alteración de la transmisión colinérgica, o a través de la inducción de estrés oxidativo producido por la alteración en la expresión de los receptores  $P75^{NTR}$  y  $\alpha_7$ -nAChR, que puede mediar su efecto sobre estas neuronas alterando las variantes de la AChE, dando como resultado los desórdenes cognitivos descritos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

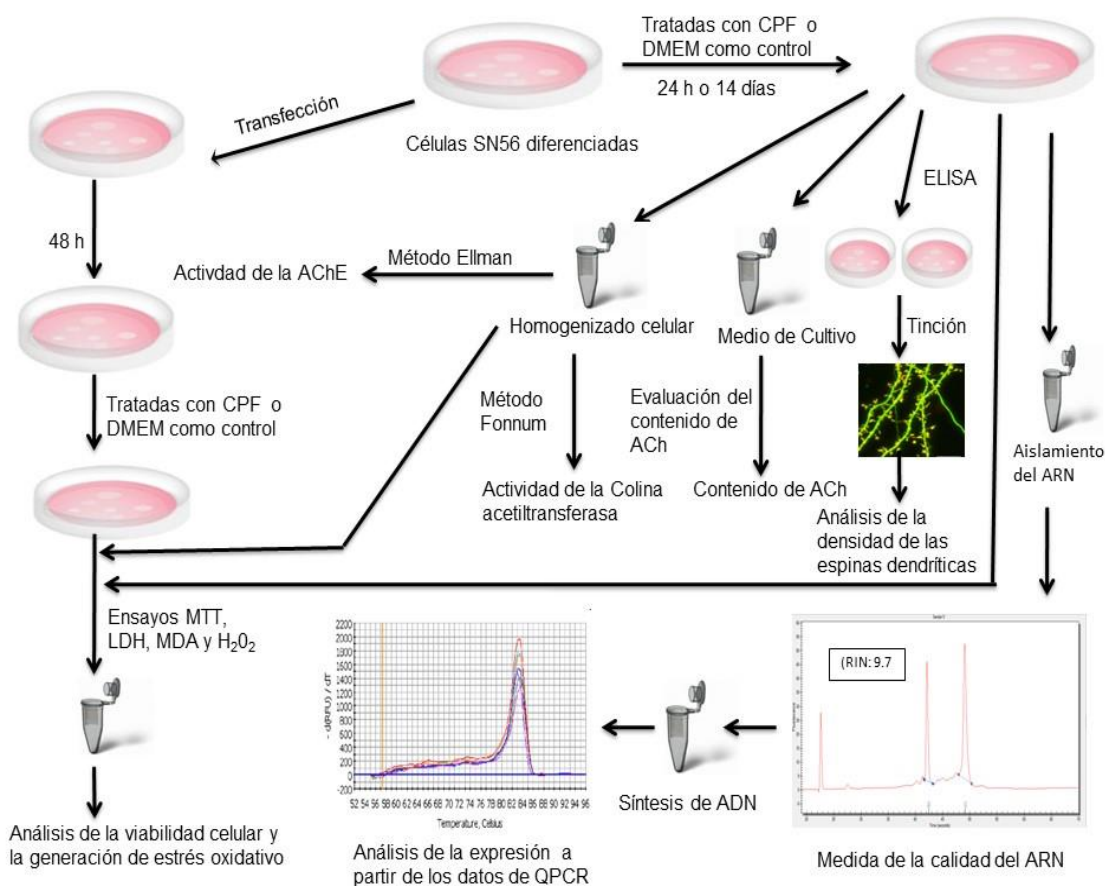
Para probar nuestra hipótesis, se estudió en neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal, los efectos tóxicos del CPF tras 24 h y de 14 días de exposición sobre la densidad de las espinas dendríticas, la inducción de muerte celular y las vías de expresión génica que median estos efectos en esta región y los mecanismos colinérgicos relacionados. También se evaluaron los efectos del CPF tras 24 h y de 14 días de exposición en la expresión de  $P75^{NTR}$  y  $\alpha_7$ -nAChR

y su implicación en la inducción de estrés oxidativo, la pérdida de neuronas colinérgicas y la alteración de las variantes de la AChE.

Utilizamos las células SN56, que es una línea celular colinérgica de neuroblastoma murino derivado de neuronas septales como modelo de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal para evaluar los efectos tóxicos del CPF en este tipo específico de neuronas y los mecanismos mediante los que se inducen estos efectos. Para determinar la densidad de las espinas dendrítica, el contenido celular de la acetilcolina (ACh), de malondialdehído (MDA), de lactato deshidrogenasa (LDH) y de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), la actividad de la AChE y de la acetilcolina transferasa (ChAT), la expresión de las variantes de la AChE, de los transportadores de colina de alta afinidad (CHT), y vesicular de acetilcolina (VACHT), de los principales genes reguladores de las vías de muerte celular (PCR Array Cell Death Pathway Finder Pad referencia PAMM-212Z) y de la plasticidad de las espinas dendríticas (PSD95, NMDAR1, SPN y SYP) y de los receptores  $\alpha_7$ -nAChR y p75<sup>NTR</sup> y los efectos del silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR, ChAT y AChE o de la sobreexpresión de p75<sup>NTR</sup> sobre la viabilidad celular y del silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR y la sobreexpresión de p75<sup>NTR</sup> sobre la inducción de estrés oxidativo, las células SN56 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de  $10^6$  células / pocillo. Las células fueron tratadas durante 24 h o durante 14 días con CPF a concentraciones entre 0,01  $\mu$ M a 70  $\mu$ M y entre 0,01  $\mu$ M a 40  $\mu$ M, respectivamente, con o sin N-acetil cisteína (NAC; 1 mM). Se usaron al menos 3 réplicas por pocillo/ tratamiento. Un grupo tratado con vehículo se utilizó en paralelo para cada experimento como un grupo de control.

En la literatura, las concentraciones de 10-100  $\mu$ M de clorpirifós se han utilizado habitualmente para estudiar la toxicidad de este compuesto especialmente las alteraciones cognitivas. Además, diferentes estudios han mostrado que la concentración de plasma sanguíneo de CPF alcanzadas en voluntarios humanos fueron similares a 0,1  $\mu$ M, aunque se ha

descrito recientemente que la concentración plasmáticas de CPF en humanos podría estar alrededor de 0,015  $\mu\text{M}$ , alcanzando concentraciones cerebrales de alrededor de 0,01  $\mu\text{M}$  (Arnold et al., 2015). Por otra parte, se ha descrito que las concentraciones molares asociados con las dosis de CPF *in vivo* utilizados en los experimentos de comportamiento de 2,5 a 25,0 mg/kg/día varía entre aproximadamente 7,0 y 8,0 a 70,0 y 80,0  $\mu\text{M}$  respectivamente. El nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) para el CPF es de 0,1 mg/kg de peso corporal por día, que estaría conforme a lo descrito alrededor de la concentración de 0.3  $\mu\text{M}$  en los tejidos. Con forme a todo lo descrito anteriormente, las dosis utilizadas son relevantes para el estudio de los trastornos cognitivos. Por otra parte, se optó por la concentración de CPF 30  $\mu\text{M}$  para estudiar los mecanismos de necrosis y apoptosis, porque fue la concentración más baja observada que indujo la muerte celular tras la exposición aguda al CPF. La figura 2 muestra el protocolo y el diseño experimental utilizado en esta investigación.



**Figura 2.** Representación esquemática del diseño experimental de la investigación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestra investigación muestra que el CPF altero la transmisión colinérgica e indujo la inhibición de la AChE y aumento la expresión de CHT aunque en este caso sólo después de la exposición a largo plazo, lo que sugiere que los niveles de acetilcolina alteración podría estar mediada por estas acciones. Por otra parte, el CPF indujo, tras la exposición aguda y a largo plazo, la muerte celular en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y este efecto fue independiente de la inhibición de la AChE o de la alteración de la concentración de la acetilcolina, pero fue parcialmente mediada por la alteración de las variantes de la AChE.

Por otra parte, mostramos que el CPF altero la expresión de P75<sup>NTR</sup> y  $\alpha_7$ -nAChR, indujo la formación de especies reactivas de oxígeno que condujeron a la generación de estrés oxidativo, como muestra la inducción de la peroxidación lipídica. La inducción de estrés oxidativo fue mediada en parte por la alteración de P75<sup>NTR</sup> y  $\alpha_7$ -nAChR. Además, la generación de estrés oxidativo y la alteración de P75<sup>NTR</sup> y  $\alpha_7$ -nAChR por CPF mediaron en parte la disminución de la viabilidad de células y este efecto fue mediado parcialmente a través de la alteración de las variantes de la AChE.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que el CPF indujo muerte celular tras la exposición aguda y a largo plazo, a través de la apoptosis lo cual fue determinado por la activación de las caspasas 3/7 y a mayores concentraciones a través de la necrosis mostrado por la liberación de LDH. Este resultado se confirmó mediante el análisis de la expresión génica de los principales genes que regulan las principales vías de la muerte celular.

Por último, hemos demostrado que el CPF induce, tras la exposición aguda y a largo plazo, una alteración de las espinas dendríticas a concentraciones que suclínicas e inferiores a las que se

induce la muerte celular. La evaluación de las vías de muerte celular y de los genes relacionados con la plasticidad de la espina dendrítica reveló que algunos de ellos están alterados a concentraciones más bajas que las que produce los efectos observados y por debajo de la NOAEL.

## CONCLUSIONES

Después de la exposición aguda y de largo plazo, el CPF induce a concentraciones subclínicas una reducción de la densidad de la espina dendrítica, y a concentraciones clínicas induce estrés oxidativo mediado parcialmente a través de la alteración de la expresión de  $\alpha_7$ -nAChR y P75<sup>NTR</sup> y muerte celular de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, a través de mecanismos de apoptosis y necrosis. La muerte celular es mediada en parte a través de la inducción de estrés oxidativo, la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> y la represión de  $\alpha_7$ -nAChR. Además, todos estos mecanismos median la muerte celular observada en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, en parte, a través de la alteración de las variantes de la AChE. Estos efectos se inician a concentración más baja que aquellas a partir de las cuales los efectos son evidentes, como se indica por las alteraciones de la transcripción de los genes clave. Nuestros resultados, sugieren que los perfiles toxicogenómicos proporcionan una herramienta sensible para la identificación y caracterización de los umbrales de toxicidad para los compuestos potencialmente tóxicos. Estos efectos podrían explicar las alteraciones cognitivas inducidas por el CPF. En este sentido, todos los mecanismos que hemos mostrado que producen pérdida de células colinérgica en el prosencéfalo basal se han descrito que están involucrados en la inducción de trastornos cognitivos, lo cual apoya esta hipótesis. Estudios futuros deben ser desarrollados para determinar los otros mecanismos implicados en estos efectos observados en las neuronas colinérgicas. Estos resultados son de interés, ya que proporcionan nueva

información sobre los mecanismos que median la alteración de la densidad de las espinas dendríticas y la muerte celular inducida por el CPF, y porque conducen a una mejor comprensión de algunos de los efectos relacionados con la toxicidad del CPF y ponen de relieve la necesidad de determinar un nuevo NOAEL y una nueva evaluación de los riesgos de este biocida.

**JUSTIFICACION Y OBJETIVOS  
DEL TRABAJO**

## **1. JUSTIFICACION, HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO**

Los biocidas suponen un riesgo creciente para la salud de los animales y las personas expuestas a los mismos, existiendo una especial preocupación sobre su posible participación en la inducción de enfermedades neurodegenerativas tanto en los animales como en el hombre. En este sentido, se ha descrito que los plaguicidas organofosforados, de los cuales el más usado es el clorpirifós (CPF), inducen trastornos cognitivos, tanto tras la administración aguda como repetida, similares a los inducidos en la enfermedad de Alzheimer (EA). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales se inducen estos efectos son desconocidos.

En este sentido, el sistema colinérgico, principalmente las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, está implicado en la regulación de los procesos de aprendizaje y memoria, y una alteración de la transmisión colinérgica o una pérdida de estas neuronas colinérgicas podría inducir estos efectos. A este respecto, se ha descrito que el CPF puede afectar a la transmisión colinérgica, y alterar las variantes de la colinesterasa (AChE) en otras regiones cerebrales, las cuales se ha demostrado que están relacionadas con la pérdida de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Además, se ha descrito que el CPF produce estrés oxidativo en otras regiones cerebrales, que se ha relacionado con la inducción de déficits cognitivos, cambios en la expresión de las variantes de la AChE y muerte neuronal. También, se ha demostrado que la expresión de los receptores  $P75^{NTR}$  y  $\alpha_7$ -nAChR está alterada en el prosencéfalo basal de ratas tras la exposición a CPF a largo plazo y esta alteración se ha relacionado con la inducción de estrés oxidativo, la pérdida de neuronas colinérgicas, y la interrupción de los procesos de aprendizaje y memoria. Por otra parte, también se ha demostrado que las espinas dendríticas participan en la regulación de los procesos de aprendizaje y memoria y su disrupción también podría contribuir a la alteración de dichos

procesos. En este sentido, se ha descrito que el CPF altera la densidad de las espinas dendríticas en la corteza prefrontal y el hipocampo tras la exposición aguda y a largo plazo a dosis subclínicas, respectivamente, por lo que su perturbación en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal también podría mediar estos trastornos cognitivos.

Según estos datos, hipotetizamos que el CPF podría inducir a concentraciones subclínicas una alteración de las espinas dendríticas en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, y a concentraciones clínicas, además de esta alteración, la muerte de las mismas, a través de la alteración de la transmisión colinérgica, o a través de la inducción de estrés oxidativo producido por la alteración de la expresión de los receptores  $P75^{NTR}$  y  $\alpha_7$ -nAChR, la cual podría mediar su acción sobre estas neuronas a través de la alteración de las variantes de la AChE, dando lugar a las alteraciones cognitivas descritas. Por otra parte, también hipotetizamos que las alteraciones en la densidad de las espinas dendríticas o de la viabilidad celular se podrían iniciar a concentraciones subclínicas antes de que sean evidentes siendo necesaria una revisión del NOAEL y LOAEL de este boicida.

Para probar esta hipótesis, nuestro objetivo fue evaluar en neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal, los efectos del CPF, desde concentraciones subclínicas, tras 24 h y 14 días de exposición sobre:

- 1- La densidad de las espinas dendríticas y la inducción de muerte neuronal, así como las vías de expresión génica que median estos efectos.
- 2- La transmisión colinérgica y los mecanismos implicados en su regulación, así como la posible participación sobre la viabilidad celular de estas neuronas.
- 3- La expresión de  $P75^{NTR}$  y  $\alpha_7$ -nAChR y su implicación en la inducción de estrés oxidativo, la pérdida de neuronas colinérgicas y la alteración de las variantes de la AChE.

4- Análisis de las implicaciones legales de los resultados obtenidos en relación con la evaluación del riesgo del compuesto.

El interés de este trabajo se centra en aportar nuevos datos sobre la neurotoxicidad inducida por el CPF, que permiten una nueva comprensión de los mecanismos que contribuyen a los efectos nocivos del CPF sobre la función y viabilidad neuronal, y la posible relevancia del CPF en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. La evaluación del perfil toxicogenómico de las vías de muerte celular y la plasticidad de la espina dendrítica, reveló que algunos de estos genes están alterados a concentraciones más bajas de aquellas a las que producen muerte celular o alteración de las espinas dendríticas y por debajo del Nivel sin efecto adverso observable (NOAEL), lo que pone de relieve la necesidad de la determinación de un nuevo NOAEL y nivel mínimo con efecto adverso observable (LOAEL), así como una nueva evaluación del riesgo de este biocida. El presente estudio sugiere que los perfiles toxicogenómicos proporcionan una herramienta más sensible para identificar y caracterizar los umbrales de toxicidad para los compuestos potencialmente tóxicos basados en los niveles de transcripción de genes clave.

# **INTRODUCCION**

## **2. INTRODUCCION**

El gran desarrollo económico y social que ha tenido lugar en el mundo a partir de mediados del siglo XIX ha implicado la necesidad de mejorar los sistemas de producción y suministro de alimentos. El desarrollo agrícola y pecuario demanda un incremento en la producción con el objetivo de obtener mayores ganancias y satisfacer, al mismo tiempo, los requerimientos nutricionales necesarios de la población.

El 90% de la población depende, para su abastecimiento, de alimentos de tan sólo 15 tipos de cultivos vegetales y 7 especies de animales. A pesar de todos los esfuerzos realizados, las plagas destruyen anualmente cerca del 35% de las cosechas en todo el mundo. Incluso una vez recogidas, los insectos, los microorganismos, los roedores y las aves infligen una pérdida adicional de entre un 10 y un 20%, con lo que las pérdidas oscilan entre un 40 y un 50%. Muchas zonas del mundo se enfrentan a una grave escasez de alimentos por lo que el control de las plagas es imprescindible para conseguir una optimización del rendimiento.

Los biocidas han sido diseñados para matar una gran variedad de organismos vivos indeseables para el hombre. Esta clase de productos se ha utilizado en todo el mundo para la protección de cultivos y en la salud pública para el control de enfermedades transmitidas por vectores u hospedadores intermediarios.

Según la organización mundial de la salud (OMS), un pesticida o plaguicida es “cualquier sustancia o mezcla de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, que está destinada a combatir, matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de algunos seres vivos considerados como plaga tales como insectos, ácaros, roedores y otras especies

indeseables de plantas y animales que son perjudiciales para el hombre o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, producción de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, incluyendo también aquellos que pueden administrarse a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos”.

El término plaguicida está ampliamente difundido y es muy difícil erradicarlo del uso habitual de la sociedad, pero actualmente se tiende a denominar estos productos bajo dos formas más correctas, biocidas y productos de protección de plantas (PPP) o fitosanitarios. Los biocidas son plaguicidas de uso no agrícola, es decir, son las sustancias o mezcla de sustancias destinados a matar por medios químicos o biológicos, organismos vivos. Los plaguicidas que se utilizan para eliminar plagas en agricultura y que no pertenecen al grupo de biocidas son los llamados productos de protección de plantas o fitosanitarios.

En relación con los plaguicidas, se ha afirmado que ningún otro grupo de productos conocidos por su toxicidad son utilizados tan ampliamente. El mercado global de pesticidas experimentará un crecimiento sostenido hasta el año 2016, para alcanzar los 59.000 millones de dólares en ventas.

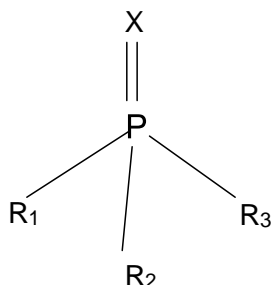
La Organización Mundial de la Salud ha estimado que cada año se producen en el mundo alrededor de un millón de intoxicaciones agudas por exposición a plaguicidas, con una letalidad entre el 0,4 y el 1,9%. Por otra parte, la exposición mantenida a dosis bajas de plaguicidas se ha relacionado con una variedad de trastornos a medio y largo plazo, incluyendo diferentes tipos de cáncer, alteraciones de la reproducción y alteraciones del sistema nervioso, entre otros.

Debido a su alta actividad biológica y en algunos casos a su persistencia en el hábitat, el uso de plaguicidas puede causar efectos adversos a la salud humana y al medio ambiente, de ahí que haya surgido la necesidad de desarrollar compuestos que presenten acción selectiva y por tanto una menor toxicidad, sobre todo para mamíferos y aves. Esto ha llevado al desarrollo de moléculas como el clorpirifós, que es un pesticida organosforado, cuyo estudio es el objetivo de la presente tesis.

## **REVISION BIBLIOGRAFICA**

### **3. REVISION BIBLIOGRAFICA**

Los organofosforados (OFs) son comúnmente utilizados como pesticidas en la agricultura, la industria y para uso doméstico en todo el mundo. Además, estos productos químicos se utilizan como parasiticidas en la medicina veterinaria. Estos productos químicos producen su toxicidad a través de la inhibición de la enzima de la acetilcolinesterasa (AChE). Algunos de los OFs con mayor potencial de inhibición de la AChE también se utilizan como agentes nerviosos o gases nerviosos en la guerra química. Esencialmente, todos los OFs son ésteres de ácido fosfórico con diferentes combinaciones de oxígeno, carbono, azufre y/o nitrógeno unido. La estructura general de los compuestos organofosforados se muestran en la Figura 1. Los OFs del tipo fosforotioatos (como bromofos, diazinón, fentión y el paratión) poseen poca o ninguna actividad anticolinesterásica y requieren de desulfuración para pasar a la forma oxon análoga antes de adquirir efectos anticolinesterásicos. Dado que muchos compuestos de esta familia son extremadamente tóxicos y carecen de selectividad para las distintas especies, su uso inadvertido/accidental sigue constituyendo una amenaza para el medio ambiente, la salud humana y animal, la vida silvestre y los sistemas acuáticos (Gupta & Milatovic, 2012).



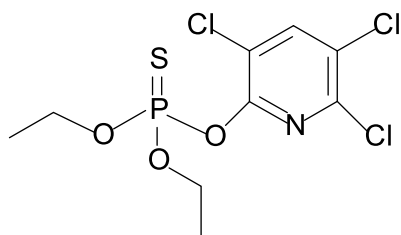
**Figura 1.** Estructura química general de los organofosforados

### 3.1. CLORPIRIFÓS

El clorpirifós (CPF) es un compuesto organofosforado que se encuentra entre los 3 plaguicidas más usados a nivel mundial, pese a haber sido introducido en el mercado en 1965. El CPF ha sido ampliamente utilizado en todo el mundo como insecticida en la agricultura para el control de plagas en los cultivos, en el hogar para el control de plagas de insectos (por ejemplo, cucarachas, pulgas y termitas) y como un componente en collares para mascotas contra garrapatas y pulgas, en la granja para el control de garrapatas en el ganado, en la salud pública para el control de mosquitos, y también para reducir el daño de los insectos al césped en los jardines y campos de golf. El uso doméstico de clorpirifós fue eliminado en Estados Unidos en 2001, y está siendo evaluada su eliminación para uso residencial en la Unión Europea (UE). En 2006, Dow AgroSciences, el principal fabricante de clorpirifós en los Estados Unidos y la Unión Europea, inició una fase de eliminación progresiva a nivel mundial de los usos no agrícolas del clorpirifós. El CPF continúa siendo utilizado para controlar daños de los insectos a los cultivos en todo el mundo. Aunque el clorpirifós está registrado para su uso en docenas de cultivos diferentes; más del 60% del uso de clorpirifós en Estados Unidos se encuentra en 3 cultivos, maíz (39%), frutos secos (15%) y la soja (9%). El uso de CPF en árboles frutales supone un 10% del uso total. Hoy en día, los usos no agrícolas representan menos del 3% del total, y se limitan al control de mosquitos para fines de salud pública y el control de insectos en campos de golf. Sin embargo, se puede continuar registrando y fabricando fuera de los Estados Unidos y la Unión Europea para uso doméstico (ATSDR, 1997).

El clorpirifós, O,O-dietil O-3,5,6 -tricloro-2-piridil fosforotioato (**Figura 2**), se presenta como cristales sólidos cuyo color oscila entre incoloro y blanco amarillento. El compuesto tiene un leve olor similar a mercaptanos, y es sólo ligeramente soluble en agua, pero es soluble en la mayoría de disolventes orgánicos. El CPF está presente como ingrediente activo

en una variedad de formulaciones y sistemas de administración. En la Tabla 1 se recogen las principales características físico-químicas y otros datos del CPF.



**Figura 2.** Estructura química del clorpirifos (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS).

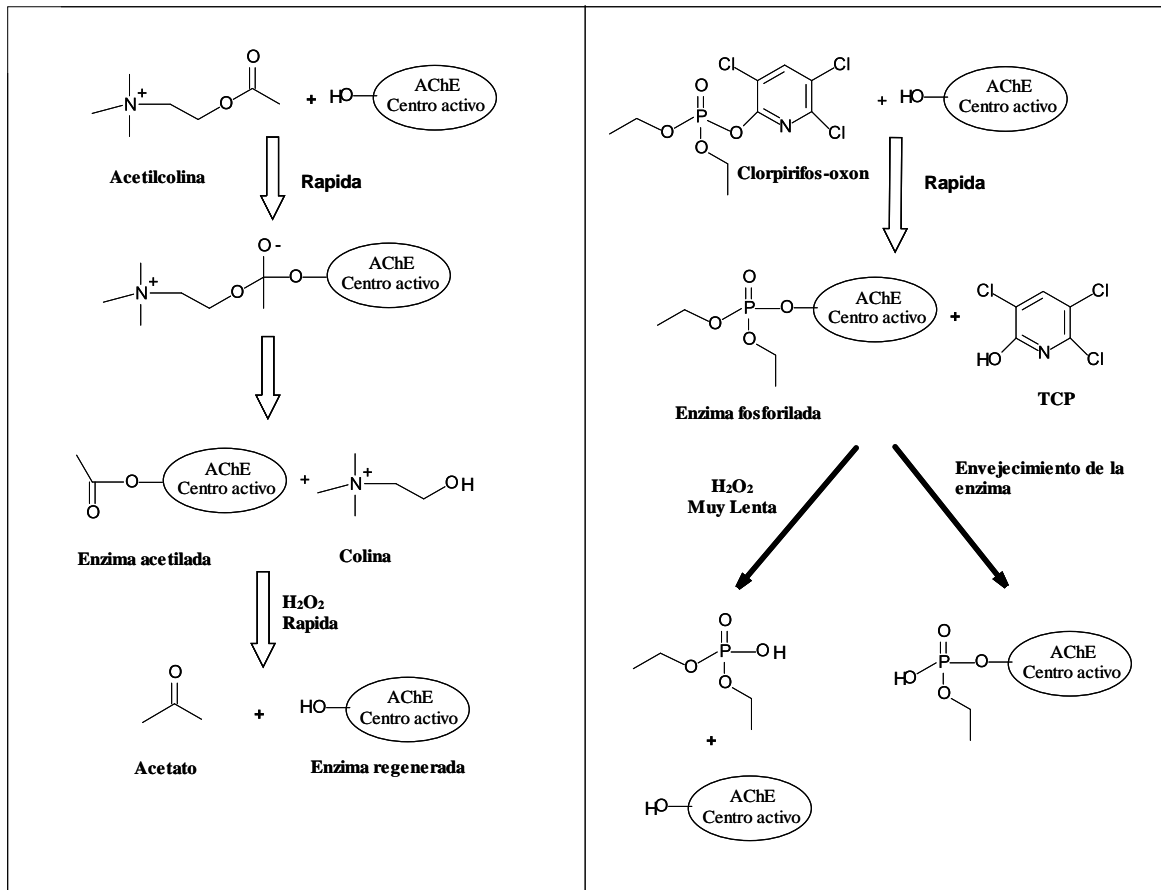
**Tabla 1.** Principales propiedades físico-químicas del clorpirifós(JMPR, 1999).

<b>Nombre genérico:</b>	Clorpirifós
<b>Nombre químico:</b>	O, O- dietil O- 3,5,6- tricloro- 2 - piridil fosforotioato
<b>Fórmula empírica:</b>	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS
<b>Peso molecular:</b>	350,57
<b>Punto de fusión:</b>	41-42 °C
<b>Forma física:</b>	Cristales sólidos
<b>Color:</b>	Cristales incoloros a blancos amarillento
<b>Coefficiente partición octanol : agua</b>	4,82
<b>Solubilidad en agua a 20 °C:</b>	0,7 mg/L
<b>Solubilidad en agua a 25 °C:</b>	2,0 mg/L
<b>Solubilidad en isooctano:</b>	79% p/p
<b>Solubilidad en metanol:</b>	43% p/p
<b>Densidad a 43.5 °C</b>	1.398 g/cm <sup>3</sup>

### 3.2. MECANISMO DE ACCION

El principal mecanismo de acción de los efectos tóxicos de clorpirifós se relaciona con la capacidad del metabolito oxon del clorpirifós para unirse e inhibir irreversiblemente la acetilcolinesterasa (AChE) en los tejidos diana. El grupo fosfato (P=O) del clorpirifós fosforila al hidroxilo de la serina de la AChE, impidiendo que la misma actúe sobre su sustrato fisiológico (Figura 3). La unión entre el fósforo y la enzima es mucho más fuerte y estable que la que se establece entre el carbono del acetato de la acetilcolina y la enzima, lo cual determina que la desfosforilación, o sea la recuperación de la enzima, se realice a una velocidad sumamente lenta, lo que prácticamente equivale a una inhibición de carácter irreversible. Una vez que la enzima ha envejecido, es decir, que ha perdido uno de los grupos alquilo, la inhibición es de carácter irreversible, por lo que la actividad se recupera únicamente por síntesis de nueva enzima (Costa, 2006).

El sistema nervioso es la principal diana del CPF porque la AChE cataboliza el neurotransmisor acetilcolina, terminando así su función sináptica. La inhibición enzimática origina el acúmulo de la acetilcolina en los sitios en los que ésta se libera fisiológicamente, tanto en el SNC como en las terminaciones nerviosas periféricas. Pudiendo producir, por lo tanto, la estimulación de los receptores muscarínicos en los órganos efectores vegetativos; la estimulación, seguida de depresión o parálisis, de todos los ganglios vegetativos y de la musculatura esquelética por activación nicotínica, y la estimulación con depresión ocasional posterior de receptores colinérgicos centrales. La inhibición de esta enzima es también la responsable del efecto farmacológico del clorpirifós en el control de artrópodos, sumado al hecho que éstos presentan una capacidad muy baja para eliminar a los OF (Fukuto, 1990).



**Figura 3.** Interacción de la acetilcolina y el organofosforado clorpirifós-oxon con el sitio activo de la acetilcolinesterasa.

El clorpirifós también inhibe la butirilcolinesterasa (BuChE), lo cuál a pesar de que no genera signos clínicos de relevancia, es sumamente importante ya que los valores de actividad de esta enzima son de utilidad para valorar la exposición a compuestos organofosforados y carbamatos (Costa, 2006). Hay evidencia sustancial que demuestra que la actividad enzimática de la BuChE plasmática es sustancialmente más sensible a la inhibición por clorpirifós (Oxon) que la AChE eritrocitaria, la cual es ampliamente reconocida como un reflejo de la actividad de la AChE en el cerebro, la médula espinal y los nervios periféricos somáticos y el sistema nervioso autónomo. Por lo tanto, la BuChE plasmática podría ser utilizada como biomarcador directo para evaluar la inhibición de las colinesterasas por el clorpirifós-oxon.

Una tercera esterasa, que también puede resultar inhibida por el CPF, es la esterasa de neuropatía (NTE). Muchos compuestos pueden inhibir esta enzima, pero sólo son los OFs quienes ocasionan el envejecimiento de la misma y originan un cuadro de neuropatía periférica retardada (OPIDP) que se presenta entre 2 a 3 semanas posteriores a la exposición a un OF. Tanto la fosforilación como el proceso de envejecimiento que originan los OFs sobre la NTE son semejantes a los que sufre la AChE. La inhibición de esta enzima constituye el segundo mecanismo en importancia para explicar la toxicidad de los organofosforados y en particular para el CPF (Costa, 2006).

Además de las dianas descritas, se han identificado en estudios *in vitro* numerosas dianas moleculares potenciales para el clorpirifós, incluyendo la citotoxicidad, efectos sobre la síntesis de macromoléculas (ADN, ARN, proteínas), las interacciones con los receptores de neurotransmisores, las interacciones con las vías de transducción de señales, los efectos sobre la diferenciación neuronal, las interacciones con diversas enzimas, otros efectos neuroquímicos (por ejemplo, alteración de la liberación de neurotransmisores o de la recaptación), y otros efectos (por ejemplo, estrés oxidativo, efectos sobre los microtúbulos etc). Para la gran mayoría de estos mecanismos, los efectos no se ven en concentraciones inferiores a las necesarias para provocar una inhibición significativa de AChE, y por lo tanto la protección contra la inhibición de la colinesterasa también podría proteger contra estos efectos. Sin embargo, se han identificado algunas dianas para el clorpirifós en las que puede causar efectos a concentraciones inferiores a las necesarias para inhibir la actividad de la AChE (Eaton et al., 2008).

En este sentido, la enzima serina hidrolasa KIAA1363, que parece ser importante en una red de señalización que implica al factor de activación de plaquetas, y es altamente expresada en células cancerígenas. La actividad de la KIAA1363 es inhibida por el clorpirifós-oxon a

concentraciones nanomolares inferiores a las concentraciones que causan la inhibición de la AChE. Un segundo ejemplo es la fosforilación del factor de elementos de respuesta a AMPc (CREB) en las neuronas corticales de rata, la cual se ha descrito que ocurre a concentraciones extremadamente bajas. Se ha descrito que el tratamiento *in vitro* de neuronas corticales de rata con clorpirifós-oxon induce un aumento de la fosforilación de CREB tres veces por encima de lo normal a concentraciones más de 1.000 veces inferiores a las necesarias para provocar la inhibición de la colinesterasa. CREB desempeña un papel importante en la regulación de la expresión de genes, especialmente genes cuyos productos median la plasticidad sináptica, que se correlaciona con los procesos de aprendizaje y memoria. También se ha descrito que el TCP, uno de los principales metabolitos del CPF, aumenta la fosforilación de CREB *in vitro*, aunque es mucho menos potente que el clorpirifós-oxon. El clorpirifós oxon es 1000 veces más potente que el clorpirifós, lo que sugiere un mecanismo de acción similar a la inhibición de la colinesterasa. La importancia funcional de dicho aumento en CREB fosforilado (pCREB) es desconocida, y los autores sugieren que puede representar una respuesta neuroprotectora sutil al estrés metabólico, aunque sólo se ha observado en las neuronas en cultivo. Hasta la fecha, no se han realizado estudios *in vivo* que hayan demostrado alteraciones en la fosforilación de CREB en el tejido nervioso, a dosis inferiores a las que causan la inhibición de la BuChE plasmática (Eaton et al., 2008).

Además, otros estudios *in vitro* han observado efectos del clorpirifós sobre el crecimiento neuronal en cultivos de tejidos a concentraciones que no causan inhibición significativa de la AChE. En un estudio en cultivo de neuronas simpáticas disociadas de los ganglios cervicales superiores de ratas de entre el día gestacional (DG) 20 al día posnatal (DPN) 1, tanto el clorpirifós (0,1-1 nM) como el clorpirifós-oxon (0,001 nM) disminuyeron la longitud axonal, pero no el número de los axones, mientras que el TCP no presentó efectos. Estos

resultados se observaron a concentraciones mil veces menores que las concentraciones necesarias para inhibir la actividad de AChE. Otro estudio con neuronas sensoriales embrionarias derivadas de los ganglios de la raíz dorsal, encontró que tanto el clorpirifós como el clorpirifós-oxon disminuyeron la longitud axonal sin afectar a otros parámetros de crecimiento celular o la actividad enzimática de la AChE. Los autores concluyeron que a bajas concentraciones de clorpirifós (1 nM) y de clorpirifós-oxon (0,01 nM) se inhibe el crecimiento axonal al interferir con la morfogénea en lugar de la actividad enzimática de la AChE. En conjunto, estos estudios son de interés ya que sugieren un nuevo mecanismo por el cual el clorpirifós y clorpirifós-oxon pueden interferir con el crecimiento axonal a concentraciones sustancialmente menores a aquellas necesarias para inhibir la actividad enzimática de la AChE. Aún no se ha examinado si tales efectos sobre el crecimiento axonal se producen *in vivo* a baja dosis de exposición, pero de producirse podría afectar a la sinaptogénesis en el cerebro en desarrollo (Eaton et al., 2008).

### **3.3. METABOLISMO**

El CPF es metabólicamente activado por desulfuración oxidativa al clorpirifós oxon, siendo el metabolito el que produce los efectos neurotóxicos (Sultatos & Murphy, 1983b; Chambers & Chambers, 1989). El CPF se metaboliza ampliamente en aves, animales mamíferos y en humanos (JMPR, 1999). Se han realizado diversos estudios sobre el metabolismo del CPF en varias especies, incluyendo humanos, cabras, gallinas, cerdos, ratas, y vacas. En todas las especies, el CPF oxon fue rápidamente metabolizado formándose diversos metabolitos, entre los cuales están el 3,5,6-tricloro-2-piridilfosfato (5-80%), y el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP; 15-20%) (Figura 4) (Sultatos & Murphy, 1983a, 1983b; Sultatos et al., 1984, 1985; Costa et al., 1990), aunque el oxon es altamente reactivo y también puede ser inactivado

mediante la unión a las carboxilesterasas en los tejidos o en el plasma (Chambers, 1992; Chambers & Carr, 1993). La bioactivación se produce principalmente en el hígado, y la inactivación se lleva a cabo en gran medida en el hígado y plasma. Sin embargo, los valores de dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) en rata no se correlacionan con las tasas de desulfuración en el hígado, pero si se correlacionan con las tasas mucho más bajas de la activación en el cerebro, lo que sugiere que la biotransformación local del CPF en los tejidos diana puede ser un determinante importante de la neurotoxicidad (Chambers, 1992). Las principales vías metabólicas del clorpirifos en animales se resumen en la Figura 4 (JMPR, 1999).

Las aves y los mamíferos absorben fácilmente el CPF por el tracto gastrointestinal y a través de la piel debido a su lipofilia. Lo excretan rápidamente, alrededor del 80% por la orina y del 4-15% por las heces. Al cabo de unos 30 días se observan niveles bajos de residuos en todos los tejidos y no hay indicios de bioacumulación. Los niveles máximos de residuos observados han sido en el riñón y el hígado y los menores en la grasa y músculos. El tejido adiposo es el que tarda más tiempo en eliminar los residuos (JMPR, 1999). En las personas intoxicadas con clorpirifós se detectó su presencia en plasma a una concentración más baja que la de los metabolitos, que se excretan principalmente en la orina. Los metabolitos dietil fósforados son excretados en la orina con una cinética de primer orden y con una vida media de eliminación promedio de  $6,1 \pm 2,2$  h en la fase más rápida y  $80 \pm 26$  h en la más lenta (Drevenkar et al., 1993). En un estudio realizado en varones voluntarios que recibieron clorpirifós a una dosis oral de 0,5 mg/kg de peso corporal y 1 mes después una dosis dérmica de 5 mg/kg de peso corporal, se observó que el tiempo para alcanzar la concentración máxima de TCP en sangre fue de 0,5 h tras la dosificación oral, y 22 h después del tratamiento dérmico. La vida media de eliminación, independientemente de la vía de administración, fue de 27 h. El

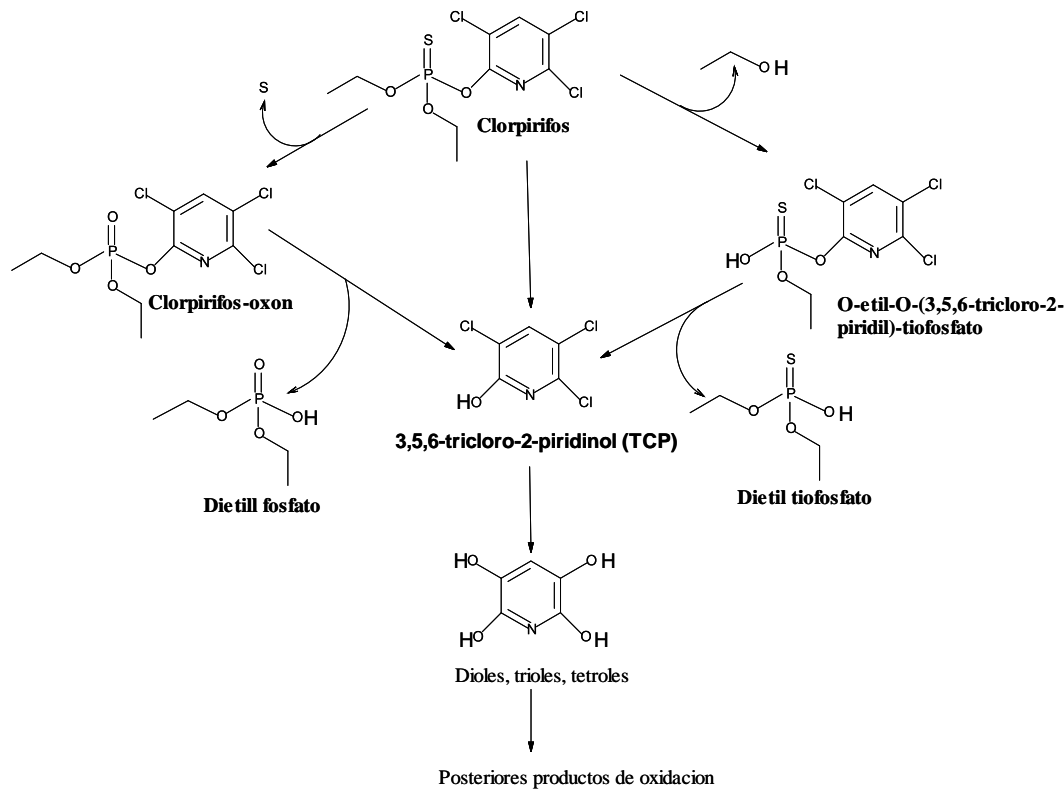
porcentaje de la dosis administrada que se recuperó en la orina fue del 70% tras la dosificación oral y del 1,3% después de la administración por vía cutánea (Nolan et al., 1982, 1984).

La toxicidad moderada de clorpirifós en muchas especies de mamíferos (McCollister et al., 1974) se ha atribuido a la desintoxicación hidrolítica del oxon por A-esterasas tales como paraoxonasa, que es más activa hacia el clorpirifós oxon que al paraoxón (Sultatos et al., 1984, 1985 ; Costa et al., 1990; Li et al., 1993). Como resultado de esta escisión hidrolítica del clorpirifós oxon a productos que son mucho más solubles en agua que el compuesto de partida, este insecticida se elimina relativamente rápidamente en peces, ratas y seres humanos y se considera que tiene un bajo potencial de acumulación tras exposición repetida a dosis relativamente bajas (Eto, 1979; Nolan et al., 1984; Sunaga et al., 1989; Barron et al., 1991). Una demostración directa del efecto desintoxicante de la paraoxonasa se ha proporcionado al mostrar que la inhibición de la acetilcolinesterasa cerebral en ratas tras el tratamiento con clorpirifós oxon se reduce notablemente mediante el tratamiento previo con la enzima purificada (Costa et al., 1990).

Por otra parte, los niveles séricos de actividad de la clorpirifós oxonasa son 40 veces mayor en el conejo que en la rata (Furlong et al., 1989), lo cual está de acuerdo con el valor de la  $DL_{50}$  de clorpirifós, sustancialmente mayor en el conejo (2000 mg/kg, por vía oral en aceite de maíz) en comparación con la rata (118-245 mg/kg, por vía oral en aceite de maíz) (McCollister et al., 1974). Los valores de  $DL_{50}$  relativamente bajos (15 mg/kg en glicerol o 50 mg/kg en cápsulas de gelatina por vía oral) (Capodicasa et al., 1991; Rowe et al., 1978) descritos para el clorpirifós en gallinas podrían reflejar niveles extremadamente bajos de A-esterasas séricas (Brealy et al., 1980; Costa et al., 1990). Los seres humanos parecen estar situados hacia el extremo superior del espectro de desintoxicación con un valor medio para la actividad clorpirifós oxonasa sérica aproximadamente 10 veces mayor que en la rata (Furlong et al.,

1989). Aunque no se ha demostrado que las clorpirifós oxonasa humanas presenten un claro polimorfismo genético, como se ha demostrado para la paraoxonasa, se ha encontrado una variación de 13 veces en la actividad de la clorpirifós oxonasa en el suero humano. Faltan datos que justifiquen la variación individual correspondiente en la susceptibilidad de los humanos a la toxicidad del clorpirifós (Furlong et al., 1988, 1989, 1993; Costa et al., 1990; Li et al., 1993).

Los inhibidores específicos de A-esterasas no han sido identificados, pero estas enzimas parecen tener una cisteína en el centro activo (Aldridge & Reiner, 1972; Aldridge, 1993) y pueden ser inhibidas *in vitro* por compuestos mercuriales o en menor medida por el fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) (Sultatos & Murphy, 1983a). La actividad de la clorpirifós oxonasa también se inhibe *in vitro* a concentraciones altas de algunos disolventes orgánicos (Furlong et al., 1989). En vista de la importancia de las A-esterasas en la desintoxicación de clorpirifós, es razonable esperar que la inhibición de estas enzimas *in vivo* pudiera potenciar la toxicidad de este insecticida.



**Figura 4.** Metabolismo del clopirifos en animales y en el hombre.

### 3.4. NEUROTOXICIDAD

#### 3.4.1. Neurotoxicidad general de los organofosforados

##### *Síndrome colinérgico agudo*

Los insecticidas OFs tienen alta toxicidad aguda, con valores de  $DL_{50}$  oral en rata a menudo por debajo de 50 mg/kg, aunque para algunos compuestos (por ejemplo, malatión) la toxicidad es mucho menor, debido a la desintoxicación eficaz. Las dianas primarias de los OFs son las colinesterasas (BuChE y AChE), cuyo papel fisiológico es hidrolizar la acetilcolina, un neurotransmisor importante en los sistemas nerviosos central y periférico. La acetilcolina

transmite información a través los receptores nicotínicos y muscarínicos, tanto en las divisiones simpática y parasimpática del sistema nervioso periférico, como de los nervios motores somáticos a las fibras del músculo esquelético. La inhibición de las colinesterasas por los OFs provoca la acumulación de acetilcolina en las sinapsis colinérgicas, lo que resulta en la sobreestimulación de los receptores colinérgicos. Como estos receptores están localizados en la mayoría de los órganos del cuerpo, se produce el "síndrome colinérgico", que incluye un aumento de la sudoración y salivación, secreción bronquial profunda, broncoconstricción, miosis, aumento de la motilidad gastrointestinal, diarrea, temblores musculares, y diversos efectos sobre el sistema nervioso central. Cuando se produce la muerte, se cree que esta es debida a la insuficiencia respiratoria causada por la inhibición de los centros respiratorios del troncoencéfalo, broncoconstricción y secreción bronquial muy elevada, y por parálisis flácida de los músculos respiratorios (Eaton et al., 2008).

A nivel molecular, los OFs fosforilan un grupo hidroxilo en la serina del centro activo inhibiendo de esta manera la enzima, impidiendo así su acción sobre el sustrato fisiológico. Posteriormente, la AChE fosforilada se hidroliza por el agua a un ritmo muy lento, pero la hidrólisis puede ser facilitada por ciertos productos químicos (oximas) que se utilizan en el tratamiento de la intoxicación por OFs. Sin embargo, las oximas son ineficaces en la reactivación de la AChE fosforilada una vez que el complejo enzima-inhibidor está "envejecido". El envejecimiento consiste en la pérdida (por hidrólisis no enzimática) de uno de los dos grupos alquilo. Cuando la AChE fosforilada ha envejecido, la enzima es inhibida irreversiblemente, y el único medio de restaurar su actividad es a través de la síntesis de nueva enzima, un proceso que puede tardar días. La atropina, un antagonista muscarínico, es el antídoto principal para la intoxicación con OFs; mediante el bloqueo de los receptores muscarínicos, que impide la acción de la acumulación de acetilcolina en estos receptores. Como

se ha dicho, las oximas, tal como pralidoxima, también se utilizan en la terapia de la intoxicación con los OF, y en algunos casos también se utiliza el diazepam para aliviar la ansiedad o antagonizar las convulsiones (Eaton et al., 2008).

### ***Síndrome Intermedio***

Además del síndrome colinérgico agudo, los OFs también pueden causar el síndrome intermedio, que se observa en el 20-50% de los casos de intoxicación aguda por OFs. El síndrome se desarrolla en un par de días después del envenenamiento, durante la recuperación de las manifestaciones colinérgicas, o en algunos casos, cuando los pacientes están completamente recuperados de la crisis colinérgica inicial. Las características predominantes del síndrome intermedio son una marcada debilidad de las vías respiratorias, el cuello, y los músculos proximales de las extremidades. El síndrome intermedio no es un efecto directo de la inhibición de la AChE, y sus mecanismos subyacentes precisos son desconocidos. Un mecanismo plausible de la debilidad muscular es que se produzca por la inducción de daños reparables en las uniones neuromusculares por la estimulación excesiva de la misma durante la fase de toxicidad colinérgica, de manera que el síndrome intermedio representa una miopatía reversible (Eaton et al., 2008).

### ***Neuropatía periférica retardada.***

Un tercer síndrome neurotóxico asociado con la exposición a ciertos OFs es la neuropatía periférica, conocida como polineuropatía retardada inducida por pesticidas OFs (OPIDP). La neuropatía periférica ocurre más comúnmente después de un episodio previo de toxicidad colinérgica aguda y del síndrome intermedio; sin embargo, sigue siendo posible que

la neuropatía pueda desarrollarse en ausencia de toxicidad colinérgica, ya que los mecanismos subyacentes de estos fenómenos no están relacionados con la inhibición de la AChE pero si con la degeneración de fibras nerviosas que produce los signos clínicos de neuropatía. Los OFs con alta potencia aguda pueden inducir una toxicidad colinérgica tan grave que induzcan la muerte sin que transcurra el tiempo suficiente para que se desarrolle la neuropatía periférica. Sin embargo, si la toxicidad colinérgica se trata eficazmente, permitiendo así que el animal o ser humano pueda sobrevivir a la misma, permite de ese modo que la neuropatía periférica aparezca semanas más tarde. De las especies de laboratorio que desarrollan la neuropatía axonal tras exposiciones individuales o múltiples a plaguicidas organofosforados, la gallina ha sido objeto de más estudios experimentales. Estos estudios han identificado una proteína neuronal, la NTE, como diana molecular importante de los plaguicidas OFs, que también está presente en otros tejidos no nerviosos, incluyendo los linfocitos. La inhibición de la NTE en los linfocitos inducida por clorpirifós se correlaciona con el nivel de inhibición de la NTE en los nervios periféricos (Osterloh et al., 1983). Los estudios con gallinas y otras especies demuestran que la neuropatía clínica se desarrolla en gallinas si se inhibe en el tejido nervioso mas del 50-90% (en función del compuesto) de la actividad enzimática de la NTE tras unas horas de exposición (Johnson, 1990; Lotti, 1991). Se requieren grados similares de inhibición neuronal de la NTE para inducir neuropatía después de exposiciones individuales o repetidas a pequeñas dosis de OFs, que prolongan la inhibición de la NTE a un grado suficiente para provocar daños en los nervios. Si bien la relación entre la inhibición neuronal de la NTE y la aparición posterior de la neuropatía es fuerte, no se ha podido demostrar de manera inequívoca una clara relación causa-efecto. Para cualquier pesticida OF dado, el grado de inhibición de la enzima NTE se correlaciona con la gravedad de la neuropatía resultante. La neuropatía por OFs puede ser bloqueada por el tratamiento previo con agentes (carbamatos, sulfonatos, y fosfinatos) que inhiben la NTE, pero tienen poca o ninguna capacidad para inducir la neuropatía, aunque los

mismos agentes pueden potenciar la actividad inductora de neuropatía de los OFs (fosfatos, fosfonatos, fosforoamidatos). Otros estudios experimentales con animales muestran que el carbamato y el fosfinato, promotores de la neuropatía axonal inducida por OFs, magnifican también otras axonopatías tóxicas y traumáticas, lo que sugiere que estos inhibidores de la NTE deterioran algún mecanismo implicado en la homeostasis axonal (Lotti, 2000).

La exposición sistémica a OFs neuropáticos resulta en una distribución simétrica de daño en los nervios, siendo las fibras nerviosas de diámetro más grande y las más largas, las primeras en someterse a la degeneración distal. El estudio neuropatológico de la neuropatía periférica en los seres humanos y animales de laboratorio revela la presencia de degeneración axonal retrógrada distal, de las fibras nerviosas alargadas en las vías de la columna vertebral, así como de los nervios de las extremidades, un patrón conocido como axonopatía distal del sistema nervioso central-sistema nerviosos periférico (SNC-SNP) (Cavanagh, 1963; Spencer & Schaumburg, 1976). Las vías motoras que parten de la corteza frontal, de la médula espinal y de la médula espinal a los músculos de las extremidades, se ven muy afectadas. Las neuronas sensoriales primarias que constituyen axones en las espinas dorsales de la columna vertebral y los nervios periféricos también están involucrados. El cuadro clínico resultante de neuropatía periférica está dominado por una distribución simétrica distal de debilidad motora, con alguna participación de la función sensorial y autonómica periférica. El aspecto clínico de la neuropatía en los adultos aparece característicamente un par de semanas después de una sola exposición elevada y avanza por un período de tiempo antes de estabilizarse y recuperarse en mayor o menor medida. La neuropatía periférica también puede aparecer en el contexto de la exposición crónica a plaguicidas organofosforados. Después de que la exposición cese, la recuperación de la fuerza y la función sensorial está asociada con la regeneración de los axones periféricos de los órganos diana. Los axones centrales, piramidales y dorsales de la médula no pueden

regenerarse, lo que resulta en la aparición paradójica durante la recuperación de la neuropatía severa de la espasticidad de las extremidades inferiores. La disfunción sensorial y autonómica residual puede persistir durante años después del cese de la exposición. Se ha descrito que los niños son resistentes y se recuperan rápidamente de la neuropatía periférica inducida por el fosfato de tricresilo OF (Senanayake, 1981).

### **3.4.2. Neurotoxicidad general del Clorpirifós**

#### ***Toxicidad aguda colinérgica***

Se realizó un estudio clínico controlado en hombres y mujeres sanos (18-55 años) sobre los efectos a corto plazo del tratamiento con una dosis oral única de clorpirifós (99,8% de pureza) para determinar el NOAEL basado en la inhibición de la AChE eritrocitaria (Kisicki et al., 1999). El estudio siguió un diseño doble ciego, aleatorizado, controlado, utilizando placebo y dosis crecientes de CPF y fue realizado en dos fases separadas por 14 días. La Fase 1 incluyó 6 hombres y 6 mujeres asignados al azar a cada uno de los tres grupos que recibieron clorpirifós en dosis de 0,5 y 1 mg/kg vehículo. La Fase 2 empleó 6 hombres y 6 mujeres voluntarios asignados aleatoriamente a cada uno los grupos que recibieron las dosis de clorpirifós de 0,00 mg/kg (placebo) o 2,0 mg/kg. Los datos clínicos estudiados incluyeron la determinación de signos y síntomas de toxicidad, signos vitales, electrocardiograma, datos clínicos de laboratorio, y la determinación de la actividad enzimática de la AChE eritrocitaria. Las muestras de sangre se recogieron 10 h antes del tratamiento, en el momento del tratamiento y a las 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, y 168 h después del tratamiento con clorpirifós. La orina total fue recogida en 4 períodos de tiempo (-48 h a 0 h) antes de la dosificación con clorpirifós y en 15 períodos de tiempo después (0-168 h) del tratamiento con clorpirifós. No hubo evidencia de signos o síntomas de toxicidad relacionados con el clorpirifós en ninguna de las fases del

estudio. Las comparaciones entre los grupos no revelaron diferencias estadísticamente significativas sobre la actividad de la AChE eritrocitaria (sobre la base de que es necesaria una disminución mínima del 17,3% para identificar una depresión estadística de la actividad; Gallo & Lawryk, 1991). Una de las mujeres que recibió 2.0 mg/kg de peso corporal de clorpirifós mostró una disminución del 28% a las 12 h después del tratamiento, y una cierta recuperación a las 36 horas y 48 horas después del tratamiento. Los autores del estudio concluyeron que una dosis única de 1 mg/kg de peso corporal de clorpirifós es el NOAEL para la inhibición de AChE eritrocitaria, siendo la dosis umbral 2,0 mg/kg por vía oral.

Además, se realizó un estudio farmacocinético del clorpirifós (99,8% de pureza) con 6 hombres caucásicos sanos de 27-50 años de edad (Nolan et al., 1984). El sujeto piloto recibió una dosis oral única de 0,5 mg/kg de clorpirifós, y 1 mes más tarde, una dosis única de 0,5 mg/kg de CPF en cloruro de metileno por vía dérmica, seguido, 2 semanas más tarde, por una segunda dosis dérmica de 0,5 mg/kg de CPF en dipropilenglicol metil éter (DPGME). Menos del 5% de cualquiera de las dosis dérmicas del CPF fue absorbido. Otros sujetos recibieron una dosis oral de 0,5 mg/kg y 4 semanas más tarde una dosis dérmica de 5,0 mg/kg de clorpirifós en DPGME. No se observaron signos o síntomas de toxicidad en ninguno de los sujetos. La actividad de la colinesterasa plasmática en el sujeto piloto fue inhibida en un 29% respecto a los niveles previos a la administración y los otros sujetos sufrieron una inhibición del 15% respecto a los niveles previos. No se describió ningún cambio en los niveles de colinesterasa eritrocitaria, aunque es evidente una posible inhibición moderada de la actividad enzimática a partir de los datos proporcionados.

También, se realizó un estudio clínico controlado en un establecimiento penitenciario de Nueva York sobre los efectos a corto plazo del tratamiento oral con dosis repetidas de clorpirifós (99,5% de pureza) en 16 varones adultos sanos voluntarios (Coulston et al., 1972). Los individuos recibieron dosis diarias orales (un número no especificado) de 0,10 mg/kg (9

días), 0,03 mg/kg (20 días), 0,014 mg/kg (28 días), o 0,00 mg/kg (48 días de placebo) de clorpirifós administrados en el desayuno. Se obtuvieron, de cada voluntario, muestras de sangre heparinizada dos veces por semana para la determinación de la actividad de la colinesterasa en plasma y eritrocitos. Se obtuvieron muestras de sangre adicionales semanalmente para determinaciones hematológicas y de bioquímica séricas de rutina, cuyos resultados fueron normales. No se observó una reducción significativa de la actividad enzimática de la colinesterasa (micro moles de acetato/min/ml) en los hombres tratados con 0.014 mg/kg-día durante 28 días. Sin embargo, en los días 13, 16, 23 y 27, todos los sujetos estudiados tenían actividades enzimáticas que eran un 10-20% más bajas que sus valores individuales basales medios. Se observó que los hombres que recibieron dosis diarias de 0,03 mg/kg-día durante 21 días presentaban una inhibición de la BuChE plasmática del 13% con respecto a los controles y del 30% con respecto a los niveles basales, y 2 de los 4 sujetos mostraron una reducción del 30-50% en 20 días. Las personas que recibieron 0,10 mg/kg/día de clorpirifós presentaron una inhibición de la BuChE plasmática del 66% de los valores basales a los 9 días. Tomados en conjunto, estos datos sugieren una relación dosis-tiempo-respuesta, con algunas variaciones entre individuos, en los que ocurren grandes reducciones en la actividad plasmática de la BuChE en períodos relativamente cortos (<10 días) a dosis de 0,1 mg/kg-día, y con reducciones más pequeñas durante períodos más largos (> 10 días) con dosis ~ 10% más pequeñas. Por lo tanto, el umbral de efecto para la inhibición de BuChE plasmática en los hombres adultos con una breve exposición prolongada diaria oral a clorpirifós es probable que se encuentre en/o por debajo de 0,01 mg/kg-día. Lo cual es tres veces menor que el nivel (0,03 mg/kg-día) propuesto por los autores del estudio. Los datos sobre la recuperación de la actividad de la colinesterasa plasmática en los sujetos del estudio mostraron una relación inversa entre la tasa de recuperación y la dosis de clorpirifós. Para la actividad de la AChE eritrocitaria (micromoles de acetato/min/ml), no se observaron cambios de importancia toxicológica durante las fases de

tratamiento o de recuperación. Del mismo modo, no se describieron manifestaciones clínicas excepto para el sujeto 3 (0,10 mg/kg-día de clorpirifós), que se quejó en el día 10 del "goteo nasal, visión borrosa y sensación de desmayo" y que, después del tratamiento para el resfriado, era asintomático al final del día.

La Tabla 2 resume los estudios disponibles en humanos y un estudio a largo plazo en el mono rhesus (Coulston, 1971). Las conclusiones son: (a) La actividad enzimática de plasma BuChE es más sensible que la actividad enzimática de AChE de eritrocitos y (b) la dosis umbral para la exposición oral repetida es de 1-2 órdenes de magnitud (de 20 a 50 veces) menor que la dosis umbral para una sola exposición oral.

**Tabla 2.** Estudios controlados en primates: Dosis única y dosis repetida (Eaton et al., 2008)

Especie	pureza	tratamiento	tipo	Dosis Umbral		Clorpirifós en sangre
				AChE	BuChE	
Humano adulto	99,80%	0.5, 1 y 2 mg/kg po	dosis única	2 mg/kg	-	-
Humano adulto-varón	99,80%	0.5 mg/kg po	dosis única	ND	0.5 mg/kg	<30 ng/ml
Humano adulto-varón	99,80%	5,0 mg/kg dermica	dosis única	ND	NC	<30 ng/ml
Humano adulto-varón	99,50%	0.014, 0.03 y 0.1 mg/kg po	dosis diaria	0.1 mg/kg	0.01 mg/kg	-
Mono Rhesus adulto	99,50%	0.08, 0.4 y 2 mg/kg po	dosis diaria 6 meses	>0.08 mg/kg	Deprimida a todas las dosis	-

ND: No Detectado. NC: No cuantificable. -: No estudiado.

### ***Sensibilidad edad-dependiente de la toxicidad colinérgica aguda.***

Varios investigadores han demostrado que los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos a la toxicidad aguda inducida por clorpirifós (Pope et al., 1991b; Whitney et al., 1995; Moser et al., 1996; Zheng et al., 2000). Por ejemplo, se describió que la  $DL_{50}$  del clorpirifós en ratas recién nacidas [PND 7] es 10 veces menor que en los animales adultos (Zheng et al., 2000). La dosis máxima tolerada (DMT) de clorpirifós se estimó en 15 mg/kg en ratas de 10 días de edad, en comparación con 100 mg/kg en ratas adultas (Moser & Padilla, 1998). Del mismo modo, Pope y Chakraborti (1992) describieron valores de DMT para el clorpirifós de 45 mg/kg en ratas de 7 días de edad, y de 279 mg/kg en ratas adultas (ratio = 6,2). Vidair (2004) mostró que en casi todas las comparaciones entre las ratas jóvenes y adultas, los animales jóvenes son más sensibles que los adultos. Por el contrario, las diferencias relacionadas con la edad son mucho menos pronunciadas (o incluso inexistentes) en el caso de exposiciones repetidas a clorpirifós (Pope & Chakraborti, 1992).

La sensibilidad a la inhibición de la AChE cerebral por clorpirifós-oxon es similar en ratas neonatas (DPN 4) que en adultas, con valores de concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) de 5,2 y 4,6 nM, respectivamente (Mortensen et al., 1996, 1998). Del mismo modo, Atterberry et al. (1997) describieron que el clorpirifós-oxon inhibe la AChE cerebral con una  $CI_{50}$  de 3,7 y 3,8 nM en ratas el DPN 1 y DPN 80, respectivamente. Esto indica que las diferencias intrínsecas en la AChE cerebral muestran las diferencias relacionadas con la edad observada en la susceptibilidad a la toxicidad aguda por clorpirifós. Un estudio reciente (Kousba et al., 2007) describió que la constante de inhibición ( $K_i$ ) para la inhibición por clorpirifós-oxon de la AChE en homogenizados cerebrales era cinco veces mayor el DPN 5 que el PND 17 en ratas, lo que implica una diferencia relacionada con la edad en la sensibilidad a la AChE. Sin embargo, este

resultado puede ser debido a una contribución diferencial de factores extrínsecos (Padilla et al., 2000; Kousba et al., 2007). Por ejemplo, en el cerebro se describió que la  $CI_{50}$  de la AChE cerebral de ratones salvajes es de 4 nM; sin embargo, de 0,7 nM en el tejido cerebral de los ratones que carecen de KIAA1363, una hidrolasa de serina que se une al clorpirifós-oxon con afinidad relativamente alta (Nomura et al., 2006).

También se considera que las capacidades de desintoxicación diferencial, debido en gran parte a diferencias en la expresión de la paraoxonasa en animales jóvenes en comparación con los adultos, es el principal determinante de la susceptibilidad dependiente de la edad a la toxicidad colinérgica aguda de clorpirifós (Eaton et al., 2008).

### ***Neuropatía periférica con o sin Síndrome intermedio***

Los plaguicidas OFs son mucho mejores inhibidores de la AChE que de la NTE. Lotti (2000) ha propuesto un método para comparar las propiedades inhibitoras enzimáticas de una serie de compuestos OFs por la relación  $DL_{50}$ /dosis de neuropatía en la gallina, cuando ésta última representa la dosis requerida para inducir la debilidad de las extremidades posteriores. Cuando la relación  $DL_{50}$ /dosis de neuropatía es  $> 1$ , el OF induce la neuropatía a dosis que no causan toxicidad colinérgica fatal en el 50% de los animales tratados con dosis únicas. A la inversa, una proporción  $< 1$  describe compuestos que inducen la neuropatía pero sólo si el animal se trata con medicamentos (atropina, oximas) para reducir la toxicidad colinérgica de otro modo fatal. El clorpirifós, como otros pesticidas comerciales, tiene una relación  $DL_{50}$ /dosis de neuropatía  $< 0,1$ . Por lo tanto, la toxicidad colinérgica es el factor limitante para el desarrollo de la neuropatía por clorpirifós en las gallinas. Los pesticidas OFs (incluyendo el clorpirifós),

por tanto, sólo causan neuropatía periférica con dosis que inevitablemente provocan toxicidad colinérgica fatal (Lotti & Moretto, 2005).

Las "reglas" establecidas en las gallinas parecen también poder ser aplicadas en los seres humanos, a pesar de un caso descrito en un hombre con alta exposición oral a clorpirifós que sugiere que la inducción de la neuropatía clínica podría estar asociada con un menor grado de inhibición de la actividad de la enzima NTE humana en relación con la gallina (Lotti et al., 1986). Como se predijo a partir de estudios en gallinas, las exposiciones agudas a clorpirifós en seres humanos adultos que producen toxicidad colinérgica que requieren tratamiento con atropina y oxima han participado en la aparición de neuropatía motora.

Varios estudios han tratado de establecer una relación entre la exposición a clorpirifós, los cambios en la actividad de enzimas específicas en la sangre, especialmente de la AChE eritrocitaria y la BuChE plasmática, y la aparición del metabolito TCP de clorpirifós en la orina como un indicador de la exposición. Lotti (2000) estableció que los metabolitos urinarios tienen poco valor aparte de probar la exposición a OFs, y que la inhibición de la BuChE plasmática no tiene ningún significado neurotóxico y no debe ser utilizada para establecer el NOAEL. Los estudios controlados en seres humanos adultos tratados con dosis orales pequeñas o dérmicas únicas o repetidas de clorpirifós muestran que la actividad de la BuChE plasmática declina en ausencia de cambios en la actividad de la AChE eritrocitaria (Coulston et al., 1972; Nolan et al., 1984); no se han encontrado estudios comparables que examinen los cambios en la actividad de la enzima NTE. En un estudio controlado en los operadores de control de plagas de Australia, realizado por Dyer y colaboradores (Dyer et al., 2001) se encontró que los controladores australianos tuvieron valores similares para la actividad de la AChE eritrocitaria pero valores

diferentes para las actividades enzimáticas de la NTE linfocitaria (~ 50% inferior) y AChE plasmática (23% inferior).

Los informes de casos de exposición aguda a clorpirifós no proporcionan ninguna información adicional sobre la susceptibilidad diferencial de las BuChE, AChE y NTE. Un estudio prospectivo de 1 año en adultos que participan en la fabricación de clorpirifós demostró una depresión media modesta de la actividad enzimática BuChE plasmática y una ausencia de neuropatía periférica u otro deterioro clínico. La exposición crónica de los trabajadores a una dosis de clorpirifós suficiente para inducir depresión leve de la actividad de la BuChE fracasó a la hora de inducir evidencia manifiesta o subclínica de la neuropatía sensorial o motora (Albers et al., 2004). El daño axonal, parece poco probable que ocurra en los adultos expuestos a clorpirifós a dosis insuficiente para inhibir la actividad enzimática de la AChE eritrocitaria o de la BuChE plasmática, la enzima más sensible. Nolan y colaboradores (1984) han propuesto que la BuChE plasmática es un indicador sensible de la exposición a clorpirifós. En resumen, la exposición sistémica a clorpirifós puede inducir una neuropatía motora o sensoriomotora autolimitada y en gran parte reversible en humanos adultos expuestos de forma aguda a niveles que inducen toxicidad colinérgica. Mientras que la neuropatía periférica, por lo general, no se produce sin depresión previa de la actividad de la AChE eritrocitaria, aunque no es posible descartar un daño nervioso menor, subclínico, en la ausencia de toxicidad colinérgica.

Por otra parte, además de la conocida neuropatía periférica inducida por OFs, se ha descrito parálisis bilateral retardada de cuerdas vocales reversible, de inicio posterior a la exposición oral única a clorpirifós y el tratamiento de la toxicidad colinérgica aguda (Aiuto et al., 1993; de Silva et al., 1994). Uno de los casos, un niño de 3 años con niveles de BuChE plasmática normales a los 3 días de exposición al clorpirifós y del tratamiento de la toxicidad

colinérgica, mostró arreflexia y la parálisis de las cuerdas vocales durante los días de hospitalización 11-18. El segundo caso, un hombre de 21 años de edad, desarrolló parálisis laríngea recurrente 28 días después de la exposición al clorpirifós y la manifestación de toxicidad colinérgica grave que desencadenó un síndrome intermedio (parálisis de los músculos proximales de las extremidades, los flexores del cuello, los nervios craneales motores, y los músculos respiratorios). Se cree que estos efectos pueden surgir de una actividad colinérgica excesiva en las uniones sinápticas durante la fase de la toxicidad colinérgica. Los efectos clínicos de esta miopatía generalmente aparecen 1-4 días después de la toxicidad colinérgica severa inducida por OFs, y pueden retrasarse hasta 15 días, y por lo general se recuperan en el plazo de 2 semanas (Lotti, 2000). El síndrome intermedio es mecánicamente distinto tanto de la toxicidad colinérgica aguda como de la neuropatía periférica retardada inducida por OFs. De hecho, en el caso del hombre intoxicado con clorpirifós que desarrolló síndrome intermedio, se describió que la función de los nervios craneales eran normales antes del desarrollo de la parálisis laríngea recurrente. Cabe destacar que, tanto en el hombre y en el niño con esta condición, los estudios electrofisiológicos y clínicos revelaron la parálisis de las cuerdas vocales sin evidencia de neuropatía simétrica distal.

### ***Efectos cognitivos por exposición crónica al clorpirifós***

La exposición ocupacional a organofosforados en general y al clorpirifós en particular se ha correlacionado en estudios epidemiológicos en humanos con déficits neurológicos y neuroconductuales incluyendo alteraciones de las funciones cognitivas (Hernández et al., 2015; Rohlman et al., 2011). En este sentido, se ha demostrado que el CPF produce déficits de aprendizaje en ratas similares a los inducidos en la enfermedad de Alzheimer (EA) tras la administración aguda y repetida (López-Granero et al., 2013b; Middlemore-Risher et al., 2010;

Moser et al., 2005). Sin embargo, los mecanismos completos a través de los cuales el CPF induce estas alteraciones cognitivas son desconocidos.

Las neuronas colinérgicas y sus proyecciones están ampliamente distribuidos en todo el sistema nervioso central (CNS), con un papel esencial en la regulación de muchas funciones vitales, tales como el aprendizaje, la memoria, la organización cortical del movimiento y el control de flujo sanguíneo cerebral (Mesulam et al., 2002). La toxicidad del CPF se inicia típicamente por la inhibición de la acetilcolinesterasa (Rush et al., 2010), con la consiguiente alteración de la neurotransmisión colinérgica, que podría conducir a las alteraciones cognitivas descritas. Sin embargo, los estudios de exposición ocupacional en humanos no logran encontrar una correlación significativa entre la actividad de la colinesterasa en la sangre y los déficit neuro-conductuales observados (Hernández et al., 2015; Rohlman et al., 2011). Por otra parte, se ha sugerido que los OFs podrían conducir a deficiencias en el transporte axonal y la dinámica mitocondrial (Middlemore-Risher et al., 2010; Terry et al., 2007; Terry et al., 2003) similares a los que se ha propuesto que están involucrados en la patogénesis de la EA (Baltazar et al., 2014). Por otra parte, López-Granero et al. (2013b) describieron que la exposición alimentaria crónica en ratas produce trastornos cognitivos y emocionales relacionados con cambios en las variantes de la AChE.

Por otro lado, la región del prosencéfalo basal es una de las regiones colinérgicas centrales más importantes (Voytko, 1996), donde las neuronas colinérgicas proyectan sus axones a lo largo de la formación del hipocampo y el neocórtex regulando los procesos de aprendizaje y memoria (Everitt & Robbins 1997; Ward & Hagg 2000). La degeneración de las neuronas colinérgicas septo-hipocampales, como sucede en la EA y otras enfermedades neurodegenerativas, provoca déficits de memoria atribuibles a la pérdida de la modulación

colinérgica de los circuitos sinápticos del hipocampo (Scheiderer et al., 2006). De hecho, la gravedad de déficit de memoria está fuertemente correlacionada con el grado de pérdida de células colinérgicas (Bierer et al., 1995). Por lo tanto, la alteración de la transmisión colinérgica o pérdida neuronal colinérgica en esta región podría estar relacionada con el deterioro de las funciones cognitivas inducidas por el CPF entre otras acciones (Andersson et al., 1997). En este sentido, se ha descrito que el CPF induce muerte celular neuronal tanto *in vitro* como *in vivo* por apoptosis y necrosis (Caughlan et al., 2004; Geter et al., 2008; Ki et al., 2013; Lee et al., 2012; Terry et al., 2003; Kammon et al., 2010; Nasr et al., 2016). Además, se ha descrito que el CPF incrementa la expresión génica de las variantes AChE-R y AChE-S tras 48 h de exposición en células PC12 (Jameson et al., 2007). Se ha atribuido un papel neuroprotector a la variante AChE-R en el declive neuronal dependiente de envejecimiento, así como en patologías neurodegenerativas tales como la EA (Berson et al., 2008). Además, la sobreexpresión de la variante AChE-S se ha relacionado con la intensificación del deterioro neurológico (Birikh et al., 2003), la apoptosis y necrosis en función del nivel de sobreexpresión (Greenberg et al., 2010; Toiber et al., 2009; Del Pino et al., 2014), y la muerte celular de neuronas colinérgicas de la región cerebral basal anterior (Del Pino et al. 2014; Del Pino et al. 2015a). En este sentido, la pérdida selectiva de la forma tetramérica de la AChE como se observa después de la exposición a CPF (López-Granero et al., 2013b) se ha relacionado con trastornos neurodegenerativos, tales como la EA (Saez-Valero et al., 1999). De acuerdo con todo lo anterior, los trastornos cognitivos podrían estar mediados por la inducción de la pérdida neuronal colinérgica en el prosencéfalo basal través de la alteración de la expresión de las variantes de la AChE.

Sin embargo, otros mecanismos parecen estar implicados en estos efectos. En este sentido, los déficits cognitivos descritos tras la exposición a CPF han sido también relacionados con la inducción de estrés oxidativo y el tratamiento antioxidante mejora estos déficits (Ambali

et al., 2010; López-Granero et al., 2013a). Además, se ha descrito que el estrés oxidativo puede inducir la muerte celular en las neuronas colinérgicas septales (Traver et al., 2005), así como cambios en la expresión de las variantes de la AChE (Bond et al., 2006). Se ha descrito que el CPF puede inducir estrés oxidativo debido a un aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), el agotamiento de las defensas antioxidantes, y la disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes mediadas por alteración del regulador maestro de las rutas de estrés oxidativo NRF<sub>2</sub>/HO-1 (Chiapella et al., 2013). Además, se ha descrito que tras 14 días de exposición a dosis bajas de CPF se produce la alteración de la expresión de los receptores del factor de crecimiento nervioso P75 (P75<sup>NTR</sup>) y los receptores de acetilcolina  $\alpha$ -7 nicotínicos ( $\alpha$ -7-nAChR), en el prosencéfalo basal de ratas (Terry et al., 2007). Ambos receptores, que se expresan principalmente en las neuronas colinérgicas del basal (Azam et al., 2003; Piro & Cuello, 1990), están involucrados en el mantenimiento de la viabilidad celular, así como de los procesos de aprendizaje y memoria y la defensa contra el estrés oxidativo (Hernández et al., 2010; Liu & Zhao, 2004; Mi et al., 2009; Oh et al., 2000; Qi et al., 2007). Por lo tanto, su alteración podría producir los efectos observados.

Por otra parte, se ha descrito que la reducción en el número de espinas dendríticas, como se ha observado en los trastornos neurodegenerativos como la EA, afecta principalmente a las redes neuronales de importancia crítica para el mantenimiento de la memoria y la cognición, tales como el sistema colinérgico del prosencéfalo basal, las regiones medias temporales, el hipocampo, y muchas áreas de asociación neocorticales (Baloyannis, 2015), induciendo trastornos cognitivos (Hains et al., 2015; Mandolesi et al., 2008). En este sentido, se ha descrito que el CPF induce una alteración en la densidad de las espinas dendríticas en la corteza prefrontal y el hipocampo tras la exposición aguda y a largo plazo a dosis subclínicas respectivamente (Oostingh et al., 2009; Speed et al., 2012). Por lo tanto, una alteración de la

densidad de las espinas dendríticas de las neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal podría mediar este efecto.

### ***Neurotoxicidad en el desarrollo por clorpirifós***

La neurotoxicidad en el desarrollo relaciona alteraciones en el comportamiento, neuroquímicas, neurohistológicas, y/o alteraciones morfológicas del SNC sucedidas en los descendientes de la madres expuestas durante la gestación y la lactancia (Lazarini et al., 2001). Se sabe que la exposición durante el desarrollo a plaguicidas puede interferir con el normal desarrollo de los sistemas de neurotransmisores y ocasionar un daño directo sobre los mismos (Richardson et al., 2006). En este sentido se ha visto en numerosos estudios de toxicidad en el desarrollo *in vivo* en ratas, y varios en ratones, que la administración de clorpirifós a hembras preñadas causa alteraciones del desarrollo neurológico en la descendencia. Los efectos comúnmente observados han sido: disminución de receptores muscarínicos y nicotínicos, disminución de la actividad de la colina acetiltransferasa, y cambios en la función serotoninérgica, incluyendo el aumento o disminución de los receptores 5-HT. Los cambios funcionales de comportamiento incluyen hiperactividad en las mujeres y un aumento de errores de memoria (Eaton et al., 2008).

El mecanismo por el que se producen estos efectos no se conoce pero se sabe que los neurotransmisores en el sistema nervioso inmaduro pueden actuar como factores tróficos que median procesos durante el desarrollo tales como diferenciación y proliferación celular. Además, estudios más recientes demuestran que los neurotransmisores también pueden mediar la dirección de migración neuronal y el crecimiento axonal durante la formación de circuitos neuronales (Ruediger & Bolz, 2007). Neurotransmisores tales como catecolaminas o la

acetilcolina aparecen en el embrión de animales vertebrados e invertebrados incluso antes de que las neuronas se hayan diferenciado (Pendleton et al., 1998). Muchos neurotransmisores cambian su papel funcional en el SNC durante el desarrollo. La misma molécula puede ser crucial para la diferenciación, crecimiento neuronal y el establecimiento de las redes neuronales en el SNC inmaduro, mientras que en el SNC maduro cambia su función hacia un papel modulador de la comunicación sináptica entre neuronas (Herlenius & Lagercrantz, 2001). En este sentido se asume que los neurotransmisores monoaminérgicos juegan un papel durante el desarrollo, definido como “morfogenético” (Buznikov et al., 1996; Levitt et al., 1997; Nicotra & Shatten, 1990; Nicotra & Senatori, 1989). Por lo tanto, una alteración en los niveles de alguno de los neurotransmisores puede modificar el desarrollo de los diferentes sistemas de neurotransmisores (Lauder, 1985; Lakshmana & Raju, 1994).

Entre los estudios realizados se encuentran los de Chambers y colaboradores (1999, 2001, 2003, 2004, 2005 y 2007) que llevaron a cabo una serie de estudios sobre los efectos de la exposición al clorpirifós durante el desarrollo en ratas. Los principales resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 3. En estos estudios fueron observados cambios en los receptores muscarínicos, sobre el transportador de colina, y la actividad locomotora. En todos los estudios, las dosis de clorpirifós utilizadas provocaron una inhibición significativa de la AChE del cerebro en las crías.

**Tabla 3.** Estudios *in vivo* de neurotoxicidad en el desarrollo tras tratamiento con clorpirifós en r (Eaton et al., 2008).

Tratamiento	Efecto	AChE en cerebro
3, 5, 7 mg/kg-día po en am con "waffer" de vainilla (DG 6-20)	Disminución de ChAT el DPN 12 (dosis más alta)	26-45% disminución el DPN1
3, 7 mg/kg po en am con "waffer" de vainilla (DG 6-20)	Disminución de RM (18-27%) los DPN 1-6 (dosis mayor). Disminución de ChAT (11%) el DPN 12 (dosis mayor).	Disminución del 15-30% el DPN1
100, 150, 200 mg/kg sc en am a madres gestantes el DPN1	ND (el objetivo del estudio fue determinar la exposición de las crías por vía leche materna)	Disminución 12-26% el DPN 6. Disminución 72-83% en madres el DPN 1.
A. 3 mg/kg DPN 1-21. B. 3 mg/kg DPN 1-6 y 6 mg/kg DPN 7-21. C. 3 mg/kg DPN 1-5, 6 mg/kg DPN 7-13 y 12 mg/kg DPN 15-21 po en am cada día	Disminución de los RM	Disminución 20-60% el DPN 22.
A. 3 mg/kg DPN 1-21. B. 3 mg/kg DPN 1-6 y 6 mg/kg DPN 7-21. C. 3 mg/kg DPN 1-5, 6 mg/kg DPN 7-13 y 12 mg/kg DPN 15-21 po en am cada día	Hipoactividad el DPN 25 y DPN 30 a dosis media y alta (B, C)	Disminución 26-50% el DPN 20
A. 1,5 mg/kg DPN 1-21. B. 1,5 mg/kg DPN 1-5, 3 mg/kg DPN 6-13 y 6 mg/kg DPN 14-21 po en am cada día	Disminución RM (10-17% el DPN 12-22 (ambas dosis). Disminución ChAt el DPN 30 (dosis alta). Disminución del transportador vesicular de ACh el DPN 30	Disminución 40-60% el DPN 22
A. 1 mg/kg DPN 1-8. B. 1 mg/kg DPN 1-5 y 2 mg/kg DPN 6-8. C. 1,5 mg/kg DPN 1-5 y 3 mg/kg DPN 6-8 po en am	Disminución RM	Disminución 20-60% el DPN 8

Ach, acetilcolina; RM, receptores muscarínicos; ChAT, colinacetiltransferasa; am, aceite de maíz; ND, no determinado

Pope y colaboradores (1993, 1995, 1999, 2000, 2001, 2002 y 2003), estudiaron la inhibición de la AChE en ratas jóvenes y adultas, así como otras características neuroquímicas del sistema colinérgico y los efectos sobre el comportamiento por exposición a CPF durante el desarrollo (Tabla 4). Se observaron cambios sobre los receptores muscarínicos, la síntesis de acetilcolina, y la adenilato ciclasa. De particular interés fue uno de los estudio en el que se compararon los efectos de las administraciones agudas y repetidas de clorpirifós en crías (DPN 7) y ratas adultas (Zheng et al., 2000). Tras la exposición aguda, las dosis eficaces 50 (DE<sub>50</sub>) para la inhibición de la AChE cerebral y plasmática fueron 1.5-2.9 mg/kg en los recién nacidos y 3.9-4.4 mg/kg en los adultos, con una relación de valores de NOAEL entre los recién nacidos y adultos de ~ 10. Este hallazgo confirma la mayor susceptibilidad de las ratas jóvenes a la toxicidad aguda del clorpirifós.

Con exposiciones repetidas (dosis diarias durante 14 días desde el DPN 7 o en adultos), sin embargo, las DE<sub>50</sub> fueron 1,2-2,2 mg/kg-día en neonatos y 0,5-3,3 mg/kg-día en los adultos, y las relaciones entre los valores NOAEL, basado en la inhibición de la AChE, en los recién nacidos y los adultos fueron 0,2 en eritrocitos y 2 en cerebro. Esto indica que la diferencia en la sensibilidad parece ser menor en magnitud con exposiciones a dosis bajas repetidas. Esto se ha atribuido a la rápida recuperación de la actividad de la AChE tras la exposición en los recién nacidos (Pope et al., 1991a; Moser & Padilla, 1998; Liu et al., 1999; Ashry et al., 2002), lo cual a su vez puede ser debido a una mayor tasa de síntesis basal de proteínas en el animal en desarrollo (Michalek et al., 1982).

**Tabla 4.** Estudios *in vivo* sobre la neurotoxicidad en el desarrollo del clorpirifós (Eaton et al., 2008)

Tratamiento	Efecto	AChE en Cerebro
40 mg/kg, sc. ac. po cada 4 días desde DPN 7	RM disminuidos (7–12%) 4–14 días después del último tratamiento	55–60% disminución 4 días después del último tratamiento
200 mg/kg s.c. en DG12	RM disminuidos el DG20 (16%) y el DPN3 (11%)	>40% disminución los DG16-20; 30% disminución el DPN 3
5, 10 mg/kg-día (DPN 1–7 or DPN1–14), sc. en ac.	RM disminuidos (M2) (10–21%)	Disminución del 40–70% los DPN 8, 15
0.15–15 mg/kg-día (DPN 7–21). Po en ac	RM y RN disminuidos a las dosis de 7.5 y 15 mg/kg-día el DPN 21	Disminución 20–90% el DPN 21
7.5, 15 mg/kg en DPN7 o 23.5, 47 mg/kg el DPN17. PO en ac 23.5, 47 mg/kg el PND17	Cambios en la liberación de Ach	40-80% disminución los DPN7, 17
13.5, 45 mg/kg-día en DPN 7-14 sc en ac	RM disminuidos los DPN 15-19. Cambios en AC basales y estimuladas. Sin cambios en acumulación de IP	~50%disminución el DPN 14
13.5, 45 mg/kg-día el DPN 7-14 sc en ac	Sin efectos en la síntesis de ACh	40-80% disminución los DPN 15-18

ACh, acetilcolina; AChE, acetilcolinesterasa; RM, receptores muscarínicos; RN, receptores nicotínicos; AC, adenilato ciclasa; IP, inositol fosfato; ac, aceite de cacahuete.

Abou-Donia y colaboradores (2001, 2002, 2003, 2004 y 2006), llevaron a cabo una serie de estudios para determinar los efectos sobre el desarrollo asociados con la exposición prenatal al clorpirifós en ratas. Los principales resultados se resumen en la Tabla 5 (Eaton et al., 2008). En general, las dosis de clorpirifós utilizadas causaban una inhibición significativa de la actividad de la AChE. En uno de los estudios (Abou-Donia et al., 2006), no se encontraron cambios conductuales ni histológicos el DPN 90 en ratas expuestas durante la gestación a clorpirifós [1 mg/kg-día los DG 4-20]. Además, en el DPN 90, se observó un aumento de la actividad de la AChE en el tronco cerebral. Sin embargo, no se proporcionó información sobre la actividad de la AChE en momentos anteriores.

**Tabla 5.** Estudios in vivo sobre la neurotoxicidad en el desarrollo del clorpirifós (Eaton et al., 2008)

Tratamiento	Efecto	AChE en Cerebro
30 mg/kg, dérmica, entre DG14 y 18 (administración única)	ND	Disminución (67%) en el cerebro de los fetos 24h después del tratamiento
5.0 mg/kg entre DG11 y 13, iv (inyección única)	No se detectó clorpirifós o TCP en los fetos, pero se detectó un nivel bajo de radioactividad	ND
50 mg/kg en DG18 (po en am)	Recuperación de AChE más rápida en fetos que en ratas madres	~90% disminución en fetos en DG 19
0.1 mg/kg-día, DG4-20, dérmica en etanol	Sin cambios histopatológicos	Incremento en tronco cerebral y cerebelo en DPN 30
0.1 mg/kg-día, DG4-20, dérmica en etanol	Sin efecto en RM y RN. Sin cambios histopatológicos. Sin efecto en GPAP.	Incremento (20%) en tronco cerebral en DPN 60. Sin cambios en otras áreas del cerebro.
0.1 mg/kg, DG4-20, dérmica en etanol	Disminución de la fuerza de agarre y el rendimiento en plano inclinado (DPN 90). Disminución de células Purkinje. Incremento de GFAP.	Incremento (~20%) en tronco cerebral en DPN90 (hembras solo)

RM, receptores muscarínicos; RN, receptores nicotínicos; am, aceite de maíz; iv, intravenoso; ND, no detectado; GFAP, proteína gliofibrilar ácida

Las Tablas 6, 7 y 8 resumen los principales resultados obtenidos por Slotkin y colaboradores (1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005 y 2006) en un gran número de estudios que utilizaron diferentes protocolos de exposición pre y postnatal. En todos estos estudios el clorpirifós fue administrado por inyección subcutánea (sc) a crías de rata. Los cuatro protocolos principales de exposición fueron: (1) exposición los DPN 1-4 a 1 mg/kg-día de clorpirifós; (2) exposición los DPN 11-14 a 5 mg/kg-día de clorpirifós; (3) exposición prenatal los DG 9-12 a 1 o 5 mg/kg-día de clorpirifós; y (4) exposición prenatal los DG 17-20 a 1 o 5 mg/kg-día de clorpirifós. Además, algunos estudios utilizaron protocolos ligeramente diferentes, que involucran principalmente dosis suplementarias. Se evaluaron marcadores

bioquímicos, moleculares y conductuales a diferentes intervalos tras el cese de la exposición para determinar los efectos a corto y largo plazo de la exposición al clorpirifós.

La Tabla 6 presenta un resumen de los resultados obtenidos tras la exposición postnatal a 1 mg/kg-día de clorpirifós en los días DPN 1-4. Esta exposición a clorpirifós se ha descrito que provoca una serie de efectos bioquímicos, moleculares, y de comportamiento que incluyen cambios en el contenido de ARN, en la síntesis de ADN, en los parámetros neuroquímicos relacionados con los sistemas colinérgico, serotoninérgico y noradrenérgico, en la expresión de proteínas marcadoras gliales y de factores de crecimiento, en los sistemas de transducción de señales (adenilato ciclasa), y en varios marcadores de comportamiento. Song et al. (1997a) midieron la actividad de la AChE en el tronco cerebral el DPN 5 (24 h después de la última administración de clorpirifós) y el DPN 10 (6 días después de la última administración de clorpirifós); la actividad de la AChE se redujo en un 25% y 10%, respectivamente. Dada la rápida recuperación de la actividad de la AChE en ratas neonatas tras su inhibición por organofosforados (Pope et al., 1991a; Moser & Padilla, 1998; Liu et al., 1999; Ashry et al., 2002), se puede prever que la inhibición de la AChE sea aún mayor poco tiempo después de la exposición al clorpirifós. De hecho, en otro estudio (Dam et al., 2000), se midió la actividad de la AChE a las 2 y 4 h después de la primera administración subcutánea de 1 mg/kg de clorpirifós el DPN 1. A las 2 h, la actividad de la AChE se redujo en ~ 75% en el tronco cerebral, ~ 60% en el cerebro anterior, y ~ 75% en el cerebelo. La inhibición de la AChE fue mayor en crías machos que en hembras, y fue inferior a las 4 h que a las 2 h, lo que indica una rápida recuperación. Por lo tanto, el protocolo de dosificación de 1 mg/kg día de clorpirifós los DPN 1-4 que se ha descrito que no causa ningún signo de toxicidad manifiesta o cambios en el peso corporal (Slotkin et al., 2006), provoca una inhibición significativa de actividad de la AChE en el cerebro de crías de rata, que parece recuperarse algo entre las dosis diarias y/o sobre la dosificación repetida, de la inhibición máxima que se produce horas después de la exposición.

**Tabla 6.** Efectos observados en estudios *in vivo* (ratas) con clorpirifós (1 mg/kg-día en DPN 1-4) (Eaton et al., 2008)

Efecto
Cambios en ADN, niveles de proteína. Alta mortalidad a la dosis más alta (5 mg/kg)
Disminución de adenilato ciclasa. Disminución en la AChE
Disminución de ARN en prosencéfalo, tronco cerebral
Disminución de la síntesis de ADN el DPN 5. Sin efecto en proteína, ni síntesis de RNA
Disminución de ChAT en tronco cerebral.
Disminución de la actividad motora (solo machos). Cambios en el reflejo de enderezamiento, geotaxis negativa (solo hembras). Disminución en la AChE
Efectos en la transcripción de factores Sp1 y AP-1
Cambios en ChAT
Disminución en el transportador de 5-HT
Disminución en la tasa de recambio de noradrenalina. Desensibilización a la nicotina
Cambios en GFAP
Sin efecto en MPB, NF68, NF200
Incremento de c-fos, sin cambios en p53
Incremento de los receptores de 5-HT
Incremento de los receptores de 5-HT
Disminución de los receptores nicotínicos en cerebelo el DPN 10 (solo $\alpha 4\beta 2$ )
Cambios en AC
Cambios de comportamientos relacionados con el sistema serotoninérgico
Incremento en la tasa de recambio 5-HT
Incremento de los receptores de 5-HT y del transportador de 5-HT el DPN 60
Microarray mostró cambios en > 150 genes. No se realizó un PCR posterior de confirmación
Disminución de la expresión de FGF en prosencéfalo el DPN 5
Sin efecto en la expresión de las variantes de la AChE

AC, adenilato ciclasa; FCF, factor de crecimiento de fibroblastos; 5-HT, serotonina; ChAT, colina acetiltransferasa; GFAP, proteína gliofibrilar ácida, NF68, proteína fibrilar 68; F200, proteína fibrilar 200; PBM, proteína mielina básica.

La Tabla 7 presenta un resumen de los efectos observados después de la exposición al clorpirifós los DPN 11-14 a la dosis de 5 mg/kg-día, administrado por vía subcutánea. Se han descrito numerosos cambios bioquímicos, moleculares y de comportamiento. Song et al. (1997b) indicaron que la actividad de AChE en el tronco cerebral se redujo en un 65% a las 24 h de la última dosis de clorpirifós el DPN 14, y todavía permanecía inhibida un 25% el DPN 20, 6 días después de la terminación del tratamiento. Dam et al. (2000) demostraron que el clorpirifós causó un 10% (tronco cerebral), 20% (cerebro anterior) y 25% (cerebelo) de

inhibición de la AChE cerebral a las 2 h y 4 h del tratamiento (el DPN 11). Estos resultados difieren de los obtenidos en el estudio anterior, en el que la inhibición de la AChE fue mayor en momentos anteriores de tiempo tras la administración de clorpirifós. Esto sugiere que las administraciones repetidas de clorpirifós tienen un efecto "inhibitorio acumulativo" en la actividad de la AChE. Sin embargo, como en la exposición anterior, la administración de 5 mg/kg día de clorpirifós desde el DPN 11 hasta el DPN 14 causó una inhibición significativa de la AChE cerebral.

**Tabla 7.** Efectos observados en diferentes estudios con clorpirifós *in vivo* (ratas) (5 mg/kg-día en DPN 11–14) (Eaton et al., 2008).

---

Disminución de niveles de ADN y proteínas. Pérdida de peso corporal a dosis mayor (25 mg/kg)
Disminución de la actividad de la AC en el prosencéfalo. Disminución de la AChE
Disminución de niveles de RNA en tronco cerebral y prosencéfalo
Disminución de ChAT. Sin efectos en el tronco cerebral
Efectos en la transcripción nuclear de los factores Sp1 y AP-1
Cambios en la actividad de ChAT
Disminución del transportador de serotonina
Cambios en GFAP
Disminución de la tasa de recambio de noradrenalina. Desensibilización a la nicotina.
Disminución de los receptores de 5-HT
Disminución de PBM, NF68
Disminución de c-fos, sin cambios en p53
Disminución del número de células gliales en hipocampo
Cambios en los receptores de 5-HT
Disminución de receptores nicotínicos en cerebelo, tronco cerebral y prosencéfalo los DPN 15, 20
Disminuye la actividad de la ChAT, la unión a receptores muscarínicos M2 los DPN 15, 60.
Cambios en AC
Disminución del número de neuronas y células gliales
Disminuciones de la señal de AC
Cambios en el sistema serotoninérgico
Incremento de la tasa de recambio de 5-HT

---

AC, adenilato ciclasa; 5-HT, serotonina; ChAT, colina acetiltransferasa; GFAP, proteína gliofibrilar ácida; NF68, neurofilamento 68; PBM, proteína mielínica básica.

La Tabla 8 resume los efectos observados después de la exposición prenatal al clorpirifós. En la mayoría de los estudios, se utilizaron dos niveles de dosis de clorpirifós (1 o 5 mg/kg-día) durante la primera (DG 9-12) o segunda parte (DG 17-20) de la gestación. En

algunos estudios también se utilizaron dosis adicionales más altas. La exposición prenatal temprana al clorpirifós (1 o 5 mg/kg-día, DG 9-12) causó una serie de efectos tales como cambios en la neuroquímica colinérgica, serotoninérgica y noradrenérgica, y cambios de comportamiento (Aldridge et al., 2003a; Meyer et al., 2003; Aldridge et al., 2004; Icenogle et al., 2004; Qiao et al., 2004; Slotkin & Seidler, 2007). Sin embargo, no se proporcionó información sobre la actividad de la AChE en el cerebro o en la sangre de las hembras o fetos por dicha exposición. Los investigadores, sin embargo, afirmaron que "los efectos observados requieren dosis más próximas al umbral para la pérdida de peso fetal; lo cual implica una menor vulnerabilidad en el cerebro fetal en comparación con el neonatal "(Qiao et al., 2002a).

La exposición prenatal al clorpirifós (1 o 5 mg/kg-día) los DG 17-20 también produjo una serie de alteraciones bioquímicas y conductuales (Tabla 8). El clorpirifós causó en el cerebro de los fetos el DG 21 (24 h después de la última administración de clorpirifós) una inhibición dosis-dependiente de la AChE cerebral (no efecto, inhibición del 15-20%, del 40-50%, del 60-70%, del 80% y > 80% a las dosis de 1 mg/kg-día, 2 mg/kg-día, 5 mg/kg-día, 10 mg/kg-día, 20 mg/kg-día, y 40 mg/kg-día respectivamente (Qiao et al., 2002b y 2002a). Por lo tanto, la dosis de 1 mg/kg-día parece ser el NOAEL para la inhibición sostenida de la AChE de cerebro fetal, no obstante teniendo en cuenta la rápida recuperación de la AChE durante el desarrollo del cerebro, es probable que se produzca la inhibición transitoria en momentos anteriores (por ejemplo, durante la exposición o a las 2-4 h tras la última exposición) (Dam et al., 2000).

**Tabla 8.** Sumario de estudios sobre los efectos en los DPN 17-20 de la exposición prenatal en ratas a clorpirifós (Eaton et al., 2008)

Tratamiento	Efecto
1 o 5mg/kg-día (DG17-20)	Hiperactividad en hembras. Errores en la memoria de trabajo.
1, 2, 5 mg/kg-día (DG 9-12)	Disminución del ratio proteína/ADN.
1, 2, 5, 10, 20, 40 mg/kg-día (DG 17-20)	Disminución receptores muscarínicos M2 (desde 5 mg/kd-día). Disminución de la actividad de la AChE
1-40 mg/kg-día (GD17-20)	Cambios en GFAP (solo a las dosis de 20-40 mg/kg-día)
1, 2, 5 mg/kg- día (GD9-12)	Cambios en receptores de 5-HT (DG 17, 21, todas las dosis).
1-40 mg/kg- día (GD17-20)	Incremento en receptores de 5-HT. Incremento de la respuesta de AC a 5-HT (todas las dosis)
1, 2, 5, 10, 20, 40 mg/kg-día (DG 17-20)	Incremento de PBM y NF68 (desde 5 mg/kg)
1, 2, 5 mg/kg- día (DG 9-12)	Sin cambios en AC. Receptor $\beta$ AR incrementado a 2, 5 mg/kg-día.
1, 2, 5, 10, 20, 40 mg/kg-día (DG 17-20)	Cambios en AC (desde 2 mg/kg). Receptor $\beta$ AR disminuido a 1, 2 mg/kg, no a dosis altas.
1, 5 mg/kg- día (DG 9-12)	Incremento de la actividad de ChAT.
1, 5 mg/kg- día (DG 9-12)	Incremento de los receptores de 5-HT (ambas dosis).
1, 5 mg/kg- día (DG 17-20)	Incremento de los receptores de 5-HT (desde 1 mg/kg-día).
1, 5 mg/kg-día (DG 9-12)	Hiperactividad. Disminución del aprendizaje y la memoria en laberinto de 16 brazos.
1, 5 mg/kg- día (DG 9-12)	Cambios en AC (dosis mas alta).
1, 5 mg/kg- día (DG 17-20)	Cambios en AC (ambas dosis).
1, 5 mg/kg-día (DG 9-12) 1, 5 mg/kg-día (DG 17-20)	Incremento de la tasa de recambio de 5-HT y dopamina (ambas dosis).

5-HT, serotonina; AC, adenilato ciclasa;  $\beta$ AR, receptor adrenergico beta; ChAT, colina acetil transferasa; GFAP, proteína gliofibrilar ácida, PBM, proteína mielina basica; NF68, proteína neurofibrilar 68.

Se han observado algunos efectos tras la exposición a dosis bajas de clorpirifós (1 mg/kg-día el DG 17-20). Estos incluyen un aumento en los receptores de serotonina y un aumento de la respuesta de la adenilato ciclasa a la serotonina en el cerebro anterior el DG 21 (Aldridge et al., 2003b; Meyer et al., 2004); un aumento de la tasa de recambio de la serotonina y la dopamina (Meyer et al., 2004; Aldridge et al., 2005a, 2005b); y cambios en el comportamiento tales como una disminución en la latencia en la alternancia espontánea entre tareas, y errores de memoria de trabajo en el laberinto de brazos radiales (Levin et al., 2002).

En un estudio realizado por Maurissen et al. (2000), conforme con las directrices para estudios de neurotoxicidad en el desarrollo de la EPA, el clorpirifós se administró en aceite de maíz por sonda a ratas embarazadas desde el DG 6 al día 10 de la lactancia, a dosis de 0,3, 1,0 o 5,0 mg/kg-día. La exposición de las crías se produjo en el útero y a través de la leche materna. La toxicidad fue evidente en las madres y crías a la dosis alta. No se encontraron efectos a ninguna de las dosis en una serie de pruebas de comportamiento (actividad motora, de sobresalto auditivo, retraso en la alternancia espacial). El examen neuropatológico también fue normal. También se midieron los niveles sanguíneos de clorpirifós y de TCP y la actividad de la AChE cerebral (Mattsson et al., 2000). En las crías, la actividad de la AChE fue significativamente menor en el cerebro (~ 60%) y la sangre (> 80%) el DG 20 a la dosis alta (5 mg/kg-día). La inhibición persistía en el cerebro el DPN 1 y en la sangre el DPN 11. No se observó efecto inhibitorio de la AChE en las crías, ya sea en el cerebro o la sangre, a las dosis inferiores de clorpirifós. La actividad de la AChE en las madres se redujo a las dosis de 1 y 5 mg/kg día en el cerebro y la sangre, y sólo en la sangre a la dosis más baja. El nivel más alto de clorpirifós en la sangre de los fetos (46,1 ng/g) fue encontrado el DG 20 en el grupo tratados con 5 mg/kg-día. El DPN 1, el nivel de clorpirifós había disminuido a 12,4 ng/g en la sangre, y fue indetectable en momentos posteriores. Las concentraciones de TCP en la sangre de los fetos

o las crías el DG 20 y el DPN1 oscilaron desde 97 hasta 1.782 ng/g, y desde 50 a 638 ng/g, respectivamente, dependiendo de la dosis de clorpirifós. Este estudio por lo tanto no identificó ningún efecto neurotóxico por exposición al clorpirifós durante el desarrollo utilizando protocolos de la EPA, incluso a niveles de dosis que causaron una inhibición significativa de la AChE. En un estudio de seguimiento por el mismo grupo (Marty et al., 2007), se cuantificaron los niveles de clorpirifós y TCP en la sangre de las crías tras la administración de una dosis única de clorpirifós (1 mg/kg el DPN 5). Dependiendo del modo de administración (por sonda en aceite de maíz o en la leche; subcutánea en DMSO), los niveles de clorpirifós en sangre variaron entre 9 y 49 ng/g (0,02-0,14  $\mu$ M), y los niveles de TCP variaron desde 171 hasta 320 ng/g (0,8 a 1,5  $\mu$  M).

Moser y Padilla (1998) describieron una disminución en los receptores muscarínicos en las diferentes áreas del cerebro tras la exposición aguda al clorpirifós (15 mg/kg en aceite de maíz por sonda) el DPN 17. Esta dosis causó inhibición significativa (50-90%) de la AChE cerebral y sanguínea y signos de alteraciones del comportamiento inducidos por toxicidad colinérgica.

Moser (2000) comparó los efectos sobre el comportamiento en ratas tratadas con clorpirifós el DPN 17 (4, 10, 20 mg/kg de CPF en aceite de maíz por sonda), el DPN 27 (10, 25, 50 mg/kg de CPF en aceite de maíz por sonda), y en ratas adultas (10, 50, 100 mg/kg de CPF en aceite de maíz por sonda). Las dosis fueron seleccionadas desde la dosis más baja sin efecto hasta la DMT para cada grupo de edad. Las dosis altas en cada grupo causaron una inhibición del 85-90% de la AChE cerebral (Moser et al., 1998). Un grado similar de inhibición de la AChE se asoció con una magnitud similar de la disfunción para algunas funciones o

acciones (por ejemplo, andar, temblor), pero no para otras. Por ejemplo, la salivación, la respuesta de la pupila, y la respuesta rápida no fueron alteradas en las ratas jóvenes.

Betancourt y colaboradores (Betancourt & Carr, 2004; Betancourt et al, 2006) trataron las crías de ratas los DPN 1-6 con 1,5 o 3,0 mg/kg-día de clorpirifós (por sonda en aceite de maíz). Se observó una disminución de los niveles de ARNm para el factor de crecimiento de fibroblastos, reelina y los receptores muscarínicos M1, así como un aumento en los niveles del ARNm de GFAP en el cerebro anterior el DPN 7. Estas dosis de clorpirifós no causaron signos manifiestos de toxicidad, pero inhibieron significativamente la actividad de la AChE cerebral (28 y 43%).

En un estudio realizado por Gultekin et al. (2007), se administró a ratas jóvenes (DPN 30) por vía subcutánea clorpirifós a la dosis de 40 mg/kg. Esta dosis, causó >50% de disminución de la actividad de la AChE plasmática el DPN 32, así como un pequeño aumento en las subunidades del receptor de glutamato NMDA NR2B y NR2A en el hipocampo el DPN 44.

En contraste con los estudios descritos, en los que los efectos neurotóxicos durante el desarrollo se asocian con una disminución significativa en la actividad de la AChE, se ha identificado en algunos estudios que la exposición al clorpirifós durante el desarrollo induce alteraciones del mismo a niveles de dosis que no causan inhibición aparente o persistente de la AChE. En este sentido, Jett et al. (2001), trataron ratas subcutáneamente con clorpirifós (0,3 y 7,0 mg/kg) los DPN 7, 11, y 15 o los DPN 22 y 26. Se realizaron pruebas de comportamiento (test de Morris) entre el DPN 24 y el DPN 28 (es decir, 9 días tras la última inyección en el primer grupo, y durante el tratamiento con clorpirifós en el segundo grupo). Los investigadores emplearon este protocolo de exposición para investigar los efectos de la exposición antes y

después del destete (que se produce el DPN 21). Cuando la exposición se produjo previa al destete, se encontraron efectos estadísticamente significativos tras la exposición a la dosis alta (7,0 mg/kg), pero no a la dosis baja (0,3 mg/kg) de clorpirifós. Cuando la exposición se produjo después del destete, efectos significativos en los mismos parámetros fueron encontrados en ambos niveles de dosis de clorpirifós. Sin embargo, a pesar de una diferencia de 23 veces en los niveles de dosis, no se observó una relación dosis respuesta, ya que ambas dosis causaron idénticos cambios en los parámetros medidos. No se encontraron cambios en los receptores muscarínicos en las diferentes regiones cerebrales el DPN 16 en las ratas expuestas antes del destete. Tampoco ninguno de los tratamientos causó inhibición de la actividad de la AChE en las diferentes áreas del cerebro a las 3 h ó la 24 h tras la administración de clorpirifós.

Ricceri et al. (2003) examinaron los efectos de la exposición postnatal al clorpirifós los DPN 1-4 o los DPN 11-14 en ratones. El clorpirifós se administró subcutáneamente a las dosis de 1 o 3 mg/kg-día. No observaron efecto sobre la ganancia de peso corporal y no causó ningún signo evidente de toxicidad. El tratamiento temprano (DPN 1-4 en cualquiera de las dosis) no tuvo efecto sobre un número de acciones de comportamiento (actividad locomotora el DPN 25, en la búsqueda de la novedad en los DPN 35-38, de evitación pasiva el DPN 60). Sin embargo, el tratamiento con clorpirifós (DPN 11-14) provocó un aumento de la actividad locomotora el DPN 25, y un aumento de la respuesta agonística en ratones machos en ambos niveles de dosis. La actividad de la AChE se midió en todo el cerebro a diferentes intervalos tras la exposición al clorpirifós. El DPN 4, ambas dosis (1 y 3 mg/kg-día) causaron la inhibición de la actividad de la AChE (20-23%) 1 h después del último tratamiento, con una recuperación completa a las 4 horas. En un estudio posterior, Ricceri et al. (2006) trataron con clorpirifós (3 o 6 mg/kg-día los DG 15-18) hembras preñadas de ratón, y se estudió los efectos en la descendencia el DPN 70 sobre la actividad locomotora espontánea en campo abierto, en la prueba de laberinto para

la ansiedad, y en el comportamiento socio-agonístico (comportamiento agresivo). Los grupos de ratones controles, así como los ratones expuestos prenatalmente al clorpirifós, también fueron expuestos al clorpirifós postnatalmente los DPN 11-14 (1 o 3 mg/kg-día por vía subcutánea). La exposición prenatal a 6 mg/kg-día de clorpirifós causaron hiperactividad; este efecto también estuvo presente en ratones a los que, además de la exposición prenatal, también se les dio 1 mg/kg-día de clorpirifós los DPN 11-14. En los animales tratados solamente después del nacimiento, a la dosis de 3 mg/kg-día se observó hiperactividad. Los ratones machos expuestos prenatal o postnatalmente a la dosis alta de clorpirifós (6 y 3 mg/kg respectivamente) muestran un mayor comportamiento agresivo. En los ratones hembra, la exposición postnatal solamente (ambas dosis) aumentó la conducta maternal en los animales vírgenes. En el laberinto, el porcentaje de tiempo empleado en los brazos aumento en ratones hembras expuestas después del nacimiento a 3 mg/kg-día de clorpirifós, lo que sugiere una disminución de la ansiedad. La actividad de la AChE se midió en el cerebro y en suero en todos los grupos de tratamiento. Tras la exposición prenatal, la actividad de la AChE en el cerebro de las crías el día de nacimiento no fue afectada por el tratamiento, pero la actividad de la AChE sérica se inhibió significativamente. El DPN 15, las actividades de la AChE cerebral y del suero se mantuvieron sin cambios por la exposición prenatal al clorpirifós. Sin embargo, el DPN 15, los ratones expuestos prenatalmente al disolvente y desde el DPN 11 hasta 14 al clorpirifós (1 o 3 mg/kg-día) no mostraron cambios en la actividad de la AChE cerebral, pero si mostraron una disminución significativa (25 y 45%, respectivamente) de la AChE sérica. En los animales que fueron expuestos tanto prenatalmente como postnatalmente al clorpirifós, la actividad de la AChE no se vio afectada en el cerebro, pero se redujo de un 40 a 50% en el suero.

Utilizando el mismo protocolo de exposición descrito por Ricceri et al. (2003), Venerosi et al. (2006) investigaron los efectos de la exposición al clorpirifós durante el desarrollo a través de una prueba de reconocimiento social en ratones hembra el DPN 120. Encontraron efectos

significativos en los ratones que fueron expuestos a 6 mg/kg-día en el útero (DG 15-18), seguido de una exposición a 3mg/kg-día los DPN 11-14. Como se indicó anteriormente, se observó que el CPF inhibe la actividad de la AChE plasmática en un 40-50%, sin afectar la actividad de la AChE cerebral (Ricceri et al., 2003).

En resumen, existen, aparte de los estudios que indican efectos del clorpirifós sobre el comportamiento o marcadores neuroquímicos durante el desarrollo tras la exposición a dosis de clorpirifós que causaron la inhibición de la actividad de la AChE cerebral y/o plasmática, un numero de estudios donde se han observados efectos sobre el desarrollo a niveles de dosis que no causan ninguna inhibición AChE. Estos estudios implican que mecanismos distintos de la inhibición AChE puede ser responsable de los efectos observados por la exposición al clorpirifós. Se requieren posteriores estudios que confirmen estos efectos producido así como los posibles mecanismos diferentes a la inhibición de la AChE.

Por otra parte, existen tres estudios de cohortes, uno realizado por la Universidad de Columbia (Perrera et al., 2003, 2004, 2005, 2006), otro por la Universidad de California (UC)-Berkeley (Eskenazi et al., 1999, 2004, 2007), y el ultimo por el Centro Médico Monte Sinaí (Berkowitz et al., 2003, 2004), que han examinado a mujeres embarazadas que estuvieron expuestas a clorpirifós, para detectar la posible asociación entre la exposición intrauterina al clorpirifós y la aparición de resultados adversos del desarrollo neurológico en sus hijos. Aunque se describieron efectos significativos en dos de estos estudios, no se observaron asociaciones consistentes cuando se compararon los resultados de los tres estudios.

Las estimaciones de la exposición al clorpirifós en estos estudios de cohortes demuestran que los niveles de exposición eran muy inferiores a los descritos que causan algún tipo de

inhibición medible de la AChE. En el estudio en la ciudad de Nueva York realizado por la Universidad de Columbia, se observaron varias asociaciones estadísticamente significativas entre la exposición a clorpirifós y los resultados adversos del desarrollo neurológico, produciéndose la exposición al clorpirifós por uso residencial. Sin embargo, las estimaciones de la exposición en este estudio, incluso en el "peor de los casos," no era probable que excediera la exposición en la dieta promedio en más de 10 veces.

El estudio realizado por la Universidad de UC-Berkeley consistía en evaluar familias que vivían en una zona agrícola con exposiciones intensas a clorpirifós y otros pesticidas. No se correlaciono la exposición al clorpirifós (evaluado mediante concentraciones urinarias de TCP) con alteraciones anormales del desarrollo neurológico.

Por último, el realizado por el Hospital Monte Sinaí es un estudio de cohorte prospectivo multiétnico de las madres y los niños nacidos en el Hospital Mount Sinaí de la ciudad de Nueva York. En el estudio se obtuvieron muestras de sangre materna y de orina durante el tercer trimestre y se obtuvieron muestras de sangre del cordón umbilical en el nacimiento y ambas se analizaron para determinar la actividad y los polimorfismos de la paroxonasa 1 (PON1). Se presumen que las poblaciones en evaluación en el estudio del Hospital Monte Sinaí, al igual que en la del estudio de la Universidad de Columbia, tienen exposiciones de uso residencial al clorpirifós. Las muestras de orina fueron analizadas para determinar los metabolitos de plaguicidas, incluyendo los dialquilfosfatos y el TCP. El nivel de TCP urinario medio, 7,6 µg/L, fue aproximadamente 5 veces mayor que la media de los EE.UU. (NHANES III), pero dentro de los límites de confianza del 95%. No se encontró asociación significativa entre el nivel de TCP y el peso al nacer, longitud al nacer, o circunferencia de la cabeza. Sin embargo, hubo una pequeña pero significativa reducción en la circunferencia de la cabeza al comparar los bebés de

las mujeres con baja actividad de la PON1 y el tercil urinario más alto de TCP con bebés de mujeres con una alta actividad de la PON1 y el tercil urinario más bajo de TCP. No se encontró asociación significativa entre TCP y la actividad de la PON1 con el peso al nacer o la longitud al nacer. Además, no se encontró ninguna asociación para el genotipo de la PON1 infantil con el peso al nacer o para los genotipos de la PON1 materna o infantil con la circunferencia de la cabeza o de la longitud al nacer.

En el estudio de la Universidad de Columbia, se encontró una pequeña pero estadísticamente significativa asociación entre la disminución en el peso al nacer y la longitud al nacer con una mayor exposición al clorpirifós, evaluada por las concentraciones sanguíneas de clorpirifós en la sangre materna y/o de cordón umbilical, a partir de una sola muestra de sangre tomada en el momento del nacimiento. Los estudios de seguimiento de esta cohorte describieron una asociación entre los niveles de clorpirifós en la sangre y el deterioro de la función cognitiva, la función motora, y el comportamiento. Sin embargo, la magnitud de los efectos observados fue modesta y no estuvieron fuera del normal. Los autores intentaron controlar los factores de confusión, incluyendo otros factores de riesgo conocidos del desarrollo neurológico en esta cohorte, como el tabaquismo materno perinatal y el alcohol; sin embargo, es difícil descartar la contribución de estos y tal vez otros factores de confusión.

### ***Macanismos deneurotoxicidad en el desarrollo por Clorpirifós.***

Varios estudios han examinado los mecanismos de los efectos tóxicos *in vitro* del clorpirifós, y/o clorpirifós-oxon, y en algunos casos también del TCP. Una amplia variedad de mecanismos fueron observados con los tres compuestos que incluyen citotoxicidad, alteración de la síntesis de macromoléculas (ADN, ARN, proteínas), de las interacciones con receptores

de neurotransmisores, de las interacciones con las rutas de transducción de señal, sobre la diferenciación neuronal, de las interacciones con diversas enzimas, alteraciones neuroquímicas (por ejemplo, liberación de neurotransmisores o de recaptación), y otras alteraciones (por ejemplo, el estrés oxidativo, efectos sobre los microtúbulos, etc) (Eaton et al., 2008).

La citotoxicidad, medida por diferentes vías, se observó generalmente en concentraciones micromolares en el caso de clorpirifós. Para este efecto, el clorpirifós-oxon parece ser sólo ligeramente más potente que el clorpirifós, mientras que el TCP muestra menor citotoxicidad. Se observó que los tres compuestos inhiben la síntesis de macromoléculas, en particular la síntesis de ADN, a concentraciones micromolares. Una vez más, el clorpirifós y el clorpirifós-oxon parecen ser esencialmente equipolentes, mientras el TCP aparece con menor potencia. La disminución de la síntesis de ADN también se ha descrito tras la exposición al clorpirifós durante el desarrollo *in vivo* (Dam et al., 1998).

Unos pocos estudios investigaron la interacción del clorpirifós y sus metabolitos con los receptores muscarínicos colinérgicos. El clorpirifós mostró en los estudios de unión, una baja capacidad para desplazar tanto agonistas o antagonistas de los receptores muscarínicos. En contraste, el clorpirifós-oxon desplaza la unión agonista a receptores muscarínicos M<sub>2</sub> con alta potencia (CI<sub>50</sub> = 7.22 nM), mientras que es ineficaz hacia la unión de antagonistas muscarínicos. Sin embargo, estas concentraciones son sólo ligeramente mayores que las requeridas para inhibir la actividad enzimática de la AChE. Las alteraciones de los receptores muscarínicos M<sub>2</sub> (disminución de la densidad) se han observado en varios estudios tras la exposición durante el desarrollo a clorpirifós (Liu et al., 1999; Tang et al., 1999; Qiao et al., 2002b.; Rhodes et al., 2004; Richardson & Chambers, 2004, 2005). Sin embargo, como estos cambios se asociaron con la inhibición de la AChE, el papel desempeñado por la interacción directa de clorpirifós-

oxon con los receptores (frente a los efectos de la acetilcolina acumulada) no se puede discernir fácilmente. El clorpirifós-oxon también se describió que interactúa con los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> (CI<sub>50</sub> = 14 nM), aunque el clorpirifós fue activo sólo en concentraciones micromolares. No hay datos sobre el TCP. La administración de clorpirifós *in vivo*, en ratones adultos, causa inhibición de los receptores cannabinoides, pero sólo a una dosis que causa signos de intoxicación colinérgica (Quistad et al., 2002).

Se han encontrado diferentes vías de transducción de señales afectadas por el clorpirifós-oxon. Es de destacar que la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, posiblemente mediada por la activación de los receptores muscarínicos M<sub>2</sub>, donde los valores de la CI<sub>50</sub> para el clorpirifós-oxon variaron de 15 a 155 nM. Los efectos del clorpirifós sobre el sistema adenilato ciclasa tras la exposición durante el desarrollo prenatal o postnatal se han descrito en varios estudios (Song et al., 1997a; Aldridge et al., 2003a; Meyer et al., 2004, 2005). Las alteraciones de los factores de transcripción nuclear AP-1 y Sp1 también se han descrito tanto *in vitro* como *in vivo* tras la administración de clorpirifós (Crumpton et al., 2000a; Garcia et al., 2001).

Los efectos del clorpirifós y el clorpirifós-oxon en la diferenciación neuronal se investigaron en varios sistemas celulares. Ambos compuestos inhibieron la diferenciación neuronal en concentraciones micromolares. Sin embargo, estudios realizados por Howard et al. (2005) y por Yang et al. (2008) mostraron efectos del clorpirifós y el clorpirifós-oxon en los ganglios cervicales superiores y ganglios de la raíz dorsal a concentraciones nanomolares o menores.

Se encontró que diversas enzimas, algunas relacionadas con aspectos de la transducción de señales, eran inhibidas por el clorpirifós-oxon, algunas desde concentraciones nanomolares medias a altas. Una en particular, la KIAA1363 hidrolasa de serina, fue inhibida por el

clorpirifós-oxon con una  $CI_{50}$  of 8nM, dentro del rango de la inhibición de la AChE. Sin embargo, tras la administración *in vivo* del clorpirifós-oxon a los ratones, una inhibición del 39% de la KIAA1363 cerebral se asoció con una inhibición del 98% de la AChE, y la letalidad (Nomura et al., 2006). Por otro lado, la KIAA1363 puede servir como un mecanismo de desintoxicación importante para el clorpirifós-oxon en el cerebro. De hecho, como se mencionó anteriormente, la  $CI_{50}$  del clorpirifós-oxon para la inhibición de la AChE en el ratón fue seis veces mayor en el cerebro de los ratones de tipo salvaje que de ratones knockout para KIAA1363, lo que indica un papel protector de esta enzima (Nomura et al., 2006).

En otros parámetros neuroquímicos que se examinaron, en relación con el sistema colinérgico u otros sistemas de neurotransmisores, los efectos del clorpirifós o del clorpirifós-oxon fueron observados en concentraciones micromolares. Algunos de los cambios (por ejemplo, ChAT) también se han observado después de la exposición durante el desarrollo a clorpirifós (Presa et al., 1999; Slotkin et al., 2001; Richardson & Chambers, 2003, 2005). Por último, también se han descrito otros efectos *in vitro* para estos tres compuestos a concentraciones micromolares, con la única excepción de la fosforilación de CREB en las neuronas corticales de rata, que se describió a concentraciones extremadamente bajas (Schuh et al., 2002). Este estudio también informó del efecto de TCP a concentraciones picomolares. Como se dijo anteriormente, dos estudios describieron efectos del clorpirifós, el clorpirifós-oxon y el TCP en concentraciones muy bajas. En un estudio realizado por Schuh et al. (2002), se utilizaron neuronas corticales de rata y de hipocampo para probar el efecto de clorpirifós, del clorpirifós-oxon, y del TCP sobre la fosforilación de CREB, un factor de transcripción que se ha sugerido que desempeña un papel en la plasticidad sináptica y en la supervivencia celular y la diferenciación (Schuh et al., 2002). En las neuronas corticales, 1 h después de la exposición al clorpirifós se encontró que produjo un aumento de tres veces de pCREB, con una  $CI_{50}$  de

~0.06 nM. Tanto clorpirifós-oxon como TCP producen el mismo efecto, con valores de  $CI_{50}$  de ~0.00003 nM y de ~0.03 nM, respectivamente. También se observaron efectos similares en las neuronas del hipocampo, pero a concentraciones más altas (clorpirifós, desde 1 hasta 10 nM; clorpirifós-oxon, desde 0,01 a 0,1 nM). No se observaron efectos en los astrocitos corticales. Ninguno de los tres compuestos afectó la viabilidad celular, mientras que las concentraciones más bajas que provocaron una inhibición de la AChE fueron 1  $\mu$ M (clorpirifós) y 1 nM (clorpirifós-oxon). El TCP (hasta 10  $\mu$ M) no inhibió la AChE. La importancia funcional de dicho aumento en pCREB es desconocida, y los autores sugieren que puede representar una respuesta neuroprotectora al estrés metabólico sutil.

Howard et al. (2005) examinaron el efecto de clorpirifós, clorpirifós-oxon y del TCP en la diferenciación de las neuronas simpáticas disociadas de los ganglios cervicales superiores de ratas en los DG 20 a DPN 1. La diferenciación de las neuronas se indujo por la proteína de hueso morfogenética-7. Los tres compuestos se disolvieron en DMSO y se utilizaron en concentraciones de 0,1 nM-10 $\mu$ M (clorpirifós y TCP) o 0,0001 a 10 nM (clorpirifós-oxon). Se utilizaron dos protocolos experimentales: (1) 24 h de incubación, 1 h después de la siembra, para investigar los efectos sobre el crecimiento axonal; y (2) 72 h de incubación a 5 días *in vitro*, para investigar los efectos sobre las dendritas. Ambos, clorpirifós (0,1-1 nM) y clorpirifós-oxon (0,001 nM) disminuyeron la longitud axonal, pero no el número de axones, mientras que el TCP no presentó efectos. A concentraciones más altas (clorpirifós y TCP, 1 $\mu$ M; clorpirifós-oxon, 1 nM) estos compuestos aumentaron la longitud dendrítica por neurona, sin afectar el número de dendritas. La actividad AChE fue inhibida por clorpirifós 1  $\mu$ M y clorpirifós-oxon 1 nM, pero no por TCP.

En un estudio posterior, Yang et al. (2008) examinaron los efectos del clorpirifós y el clorpirifós-oxon en el crecimiento axonal de las neuronas sensoriales derivadas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de embriones. Encontraron que ambos compuestos disminuyeron la longitud axonal sin afectar el número de axones por célula, la síntesis de proteínas, la viabilidad celular, o la actividad enzimática de la AChE. En las neuronas DRG de ratones knockout para la AChE, el crecimiento axonal fue alterado, pero ni clorpirifós ni el clorpirifós-oxon tuvieron ningún efecto sobre la longitud axonal. Los autores concluyeron que bajas concentraciones de clorpirifós (1 nM) y de clorpirifós-oxon (0,01 nM) inhiben el crecimiento axonal en las neuronas DRG. Estos dos últimos estudios son de interés ya que sugieren un nuevo mecanismo por el cual clorpirifós y clorpirifós-oxon pueden interferir con el crecimiento axonal en concentraciones inferiores a las necesarias para inhibir la AChE actividad enzimática.

### **3.5.NORMATIVA Y LEGISLACION**

#### **3.5.1 Regulación en los Estados Unidos de América.**

La Environmental Protection Agency (EPA) es la encargada de regular el uso de pesticidas en base a una amplia autoridad otorgada, fundamentalmente, por dos importantes leyes, la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA- Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act) y la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FFDCA-Federal Food, Drug, and Cosmetic Act). Estas leyes han sido modificadas por la Ley de Protección de la Calidad de Alimentos (FQPA-Food Quality Protection Act) y la Ley de Mejora del Registro de Plaguicidas (PRIA-Pesticide Registration Improvement Act).

- Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA) - Requiere que todos los plaguicidas vendidos o distribuidos en los Estados Unidos (incluidos los plaguicidas importados) sean registrados por la EPA.

- ✓ El registro se basa en la evaluación de los datos científicos y la evaluación de los riesgos y beneficios del uso de un producto.
- ✓ Las instrucciones de la etiqueta controlan la utilización de los productos.
- ✓ Se puede autorizar el uso limitado de plaguicidas no registrados o plaguicidas registrados para otros usos para tratar emergencias y necesidades locales especiales.
- ✓ Se puede suspender o cancelar el registro de un producto.
- ✓ Se requiere formación para los trabajadores de zonas tratadas con plaguicidas y certificación y capacitación para aplicadores de plaguicidas de uso restringido.
- Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FFDCA) - obliga a establecer niveles de tolerancias para todos los plaguicidas utilizados en alimentos o de manera que dé lugar a un residuo en o sobre la alimentación humana o animal. La tolerancia es el nivel máximo permisible de residuos de plaguicidas permitidos en o en la alimentación humana y animal de uso alimentario.
  - ✓ Incluye disposiciones estrictas para proteger a los lactantes y los niños, así como a otras subpoblaciones sensibles.
  - ✓ Proporciona exenciones del requisito de una tolerancia.
- En virtud de la Ley de Protección de la Calidad de Alimentos, de 1996, que modificó tanto la FIFRA como la FFDCA, es necesario determinar que un pesticida plantea una "certeza razonable de no causar daño" antes de poder ser registrado para su uso en alimentos o piensos. Se debe revisar cada registro de plaguicidas al menos una vez cada 15 años.
  - ✓ Hay varios factores que deben abordarse antes de poder establecer una tolerancia, incluyendo:
    - el agregado, la exposición no ocupacional del pesticida (exposición a través de la dieta y el agua potable y el uso de pesticidas en y alrededor del hogar);

- los efectos acumulativos de la exposición a los pesticidas que tienen un mecanismo común de toxicidad, es decir, dos o más productos químicos de pesticidas u otras sustancias que causan un efecto tóxico común por la misma, o esencialmente la misma, secuencia de eventos bioquímicos (es decir, interpretado como modo de acción);
  - si hay un aumento de la susceptibilidad a los bebés y niños, u otras subpoblaciones sensibles, de la exposición a los pesticidas; y
  - si el plaguicida produce un efecto en los seres humanos similares a un efecto producido por un estrógeno natural o produce otros efectos de disrupción endocrina.
- La Ley de Mejora de Registro de Plaguicidas de 2003 (PRIA) también modificó la FIFRA y FFDCA. PRIA se volvió a autorizar por la Ley de Renovación de 2007 Mejora de Registro de Plaguicidas y la Ley de Extensión de Mejora de Registro de Plaguicidas de 2012.
    - ✓ Las empresas deben pagar tarifas de servicio de acuerdo a la categoría de la acción de registro.
    - ✓ EPA debe cumplir con los plazos de revisión de decisiones, que dan lugar a un proceso de evaluación más predecible para las empresas.
    - ✓ Se proporcionan períodos de revisión de decisiones más corto para las solicitudes de registro de riesgo reducido.

### **3.5.2. Regulación Multilateral.**

#### ***Convenio de Estocolmo.***

El Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes es un tratado mundial para proteger la salud humana y el medio ambiente de los productos químicos que permanecen intactos en el ambiente por largos períodos de tiempo, que al ser ampliamente

distribuida geográficamente, se acumulan en el tejido adiposo de los seres humanos y animales, y tienen efectos nocivos en la salud humana o el medio ambiente.

La exposición a contaminantes orgánicos persistentes (COP) puede conducir a serios problemas de salud, incluyendo algunos tipos de cáncer, defectos de nacimiento, disfunciones en los sistemas inmunológico y reproductivo, mayor susceptibilidad a enfermedades y daños a los sistemas nervioso central y periférico. Dado su transporte a larga distancia, ningún gobierno puede por sí solo proteger a sus ciudadanos o su medio ambiente frente a los COP.

En respuesta a este problema mundial, el Convenio de Estocolmo exige que las partes adopten medidas para eliminar o reducir la liberación de contaminantes orgánicos persistentes al medio ambiente. El objetivo del Convenio de Estocolmo es proteger la salud humana y el medio ambiente frente a los contaminantes orgánicos persistentes. Las disposiciones de la Convención requieren que cada parte:

- Prohíba y/o elimine la producción y uso, así como la importación y exportación, de las sustancias que se enumeran en el anexo A del Convenio

Anexo A permite el registro de exenciones específicas para la producción o el uso de COP incluidos, de conformidad con dicho anexo y en el artículo 4, teniendo en cuenta que se aplican reglas especiales a los PCB. La importación y exportación de productos químicos enumerados en el anexo A se llevará a cabo bajo condiciones restrictivas específicas, tal como se establece en el párrafo 2 del artículo 3.

- Restrinja la producción y uso, así como la importación y exportación, de las sustancias que se enumeran en el anexo B del Convenio (artículo 3)

El anexo B permite el registro de propósitos aceptables para la producción y uso de los COP incluidos de conformidad con dicho anexo, y para el registro de exenciones específicas para

la producción y uso de los COP incluidos, de conformidad con dicho anexo y en el artículo 4. La importación y exportación de productos químicos enumerados en el anexo B pueden tener condiciones restrictivas específicas, tal como se establece en el párrafo 2 del artículo 3.

- Reduzca o elimine las liberaciones derivadas de la producción no intencional de COP que se enumeran en el anexo C del Convenio (artículo 5)

La Convención promueve el uso de las mejores técnicas disponibles y las mejores prácticas ambientales para la prevención de la liberación de COP en el medio ambiente.

- Asegure que los depósitos y residuos que contengan, o estén contaminados con COPs son gestionados con seguridad y de manera ambientalmente racional (artículo 6)

El Convenio exige que identificar y gestionar para reducir o eliminar las liberaciones de COP procedentes de estas fuentes tales existencias y desechos. El Convenio también exige que los desechos que contienen contaminantes orgánicos persistentes sean transportados a través de fronteras internacionales, teniendo en cuenta las reglas, normas y directrices.

- Seleccione nuevos COPs (artículo 8)

El Convenio establece procedimientos detallados para la inclusión de nuevos contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en los anexos A, B y/o C. Una comisión compuesta por expertos en evaluación o gestión de productos químicos - el Comité de Examen de Contaminantes Orgánicos Persistentes, se estableció para examinar las propuestas para la inclusión de productos químicos, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 8 y los requisitos de información establecidos en los anexos D, E y F de la Convención.

- Otras disposiciones de la Convención se relacionan con el desarrollo de los planes de aplicación (artículo 7), el intercambio de información (artículo 9), la información pública, la

sensibilización y la educación (artículo 10), la investigación, desarrollo y vigilancia (artículo 11), la asistencia técnica (artículo 12 ), los recursos y mecanismos financieros (artículo 13), la presentación de informes (artículo 15), evaluación de la eficacia (artículo 16) y en caso de incumplimiento (artículo 17).

### **3.5.3. Regulación por Organismos Internacionales.**

#### ***Especificaciones sobre Pesticidas para la Salud Pública: Informe de Evaluación 221/2008-Clorpirifós de la (FAO)/ World Health Organization (WHO).***

El Informe de Evaluación 221/2008 de las Especificaciones para la Salud Pública de Pesticidas de la WHO establece una evaluación del riesgo del clorpirifós en función de distintos estudios, tanto publicados como realizados expresamente para esta evaluación, estableciendo un NOAEL de 0.1 mg/kg, basado en la inhibición observable de la actividad eritrocitaria de la acetilcolinesterasa en humanos, y una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 0,01, basada en este NOAEL con un factor de seguridad de 10. De acuerdo con estos datos, la WHO clasificó el clorpirifós como “Moderadamente peligroso, Clase II”

### **3.5.4. Regulación a Nivel Europeo**

#### ***Reglamento 3600/92/CEE***

Establece las disposiciones de aplicación de la primera fase del programa de trabajo contemplado en la Directiva 91/414/CEE del Consejo, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios y establece una lista de sustancias activas que deben evaluarse con vistas a su posible inclusión en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE.

### *Directiva 2005/72/CE*

Establece incluir las sustancias activas clorpirifós, clorpirifós-metil, mancoceb, maneb y metiram en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE para garantizar que los productos fitosanitarios que las contengan puedan autorizarse en todos los Estados miembros de conformidad con lo dispuesto en dicha Directiva.

### *Reglamento 396/2005/CE*

Establece las cantidades máximas autorizadas de residuos de plaguicidas que pueden encontrarse en los productos de origen animal o vegetal destinados al consumo humano o animal. Dichos límites máximos de residuos (LMR), que están fijados por la Comisión Europea, incluyen:

1. LMR específicos para ciertos alimentos destinados a las personas o los animales.
2. Un límite general aplicable cuando no se haya fijado ningún LMR (un límite por defecto de 0,01 mg/kg).

La legislación abarca todos los productos destinados a la alimentación humana o animal que figuran en el anexo I. Estos productos no están sujetos a los límites establecidos si se destinan a la siembra o la plantación; pruebas autorizadas sobre las sustancias activas; la fabricación de productos que no sean alimentos; la exportación.

Algunas sustancias enumeradas por la Comisión (anexo VII) pueden ser autorizadas aunque superen los LMR fijados, siempre que se cumplan las condiciones siguientes: que los productos en cuestión no estén destinados al consumo inmediato; que se establezcan controles

para evitar que dichos productos se pongan a disposición del consumidor; que se informe de dichas medidas a los demás países de la UE y a la Comisión.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es responsable de la evaluación de la seguridad de las nuevas solicitudes presentadas para los LMR. Esto se basa en su toxicidad, los límites máximos esperados en los alimentos y las dietas de los consumidores. A partir del dictamen de la EFSA, la Comisión elabora un reglamento que establece un nuevo LMR o que modifica o suprime un LMR existente. Para el clorpirifós se ha establecido un LMR de 0.01-1.5 mg/kg para productos de consumo humano.

La UE tiene un programa que, cada año, comprueba una lista acordada de productos para asegurar el cumplimiento de los LMR de los plaguicidas.

#### *Directiva 2008/17/CE*

Modifica Anexo II de la Directiva 90/642, de 27 de noviembre, Anexo II de la Directiva 86/363, de 24 de julio, Anexo II de la Directiva 86/362, de 24 de julio.

#### *Reglamento de ejecución (UE) N° 400/2014*

Establece un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2015, 2016 y 2017 que tiene como objetivo garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal y evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos.

### *Reglamento de ejecución (UE) 2015/595*

Establece a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2016, 2017 y 2018 con el objetivo de garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal y evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos.

### *Reglamento 2016/60/UE*

Modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, respecto de los límites máximos de residuos de clorpirifós en una serie de productos alimenticios.

### **3.5.5. Regulación a Nivel Nacional.**

#### *Real Decreto 290/2003*

Se establecen los métodos de muestreo para el control de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal.

#### *Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y el Reglamento 850/2004/CE*

Tiene como objetivo recopilar información y elaborar un diagnóstico de la situación española respecto a los COP y, en consecuencia, formular las medidas necesarias para ajustarse a las obligaciones que imponen tanto el Convenio de Estocolmo como el Reglamento (CE) n.º 850/2004.

*Real Decreto 951/2014*

Regula la comercialización de determinados medios de defensa fitosanitaria

*Real Decreto 971/2014*

Regula el procedimiento de evaluación de productos fitosanitarios.

## **MATERIAL Y METODOS**

## **4. MATERIAL Y METODOS**

### **4.1. Productos químicos**

Los compuestos clorpirifós (99,99%), acetilcolina, tetraisopropilo pirofosforamida (iso-OMPA), acetiltiocolina, ácido ditio-nitrobenzoico, poli-L-lisina, dimetil sulfóxido (DMSO), dibutiril-AMPC, ácido retinoico, N-acetilcisteína (NAC), tetracloruro de 3,3'-diaminobencidina, anticuerpo monoclonal anti proteína-2 asociada a microtúbulos (MAP-2), paraformaldehído y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) se obtuvieron de Sigma (Madrid, España). [14C] acetil-CoA se obtuvo de Perkin Elmer (Madrid, España). Todos los demás productos químicos fueron de grado reactivo de la pureza más alta disponible de laboratorio.

### **4.2. Línea celular**

Se utilizaron células SN56, una línea celular colinérgica de neuroblastoma murino derivada de neuronas septales (Hammond et al., 1990), como modelo de neuronas colinérgicas de la región cerebral basal anterior para evaluar los efectos tóxicos del CPF en este tipo específico de neuronas y los mecanismos a través de los que son inducidos. Las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio Dulbecco de Eagle modificado (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), penicilina/estreptomina, L-glutamina 2 mM (Sigma, Madrid, España), y piruvato de sodio 1 mM. El medio se cambió cada 48 h (Hudgens et al. 2009). La diferenciación de las células SN56 se realizó mediante el cultivo durante 3 días con dibutiril-AMPC 1 mM y ácido retinoico 1µM (Bielarczyk et al., 2003, Szutowicz et al., 2006), que produce la maduración morfológica y un aumento de 3-4 veces la

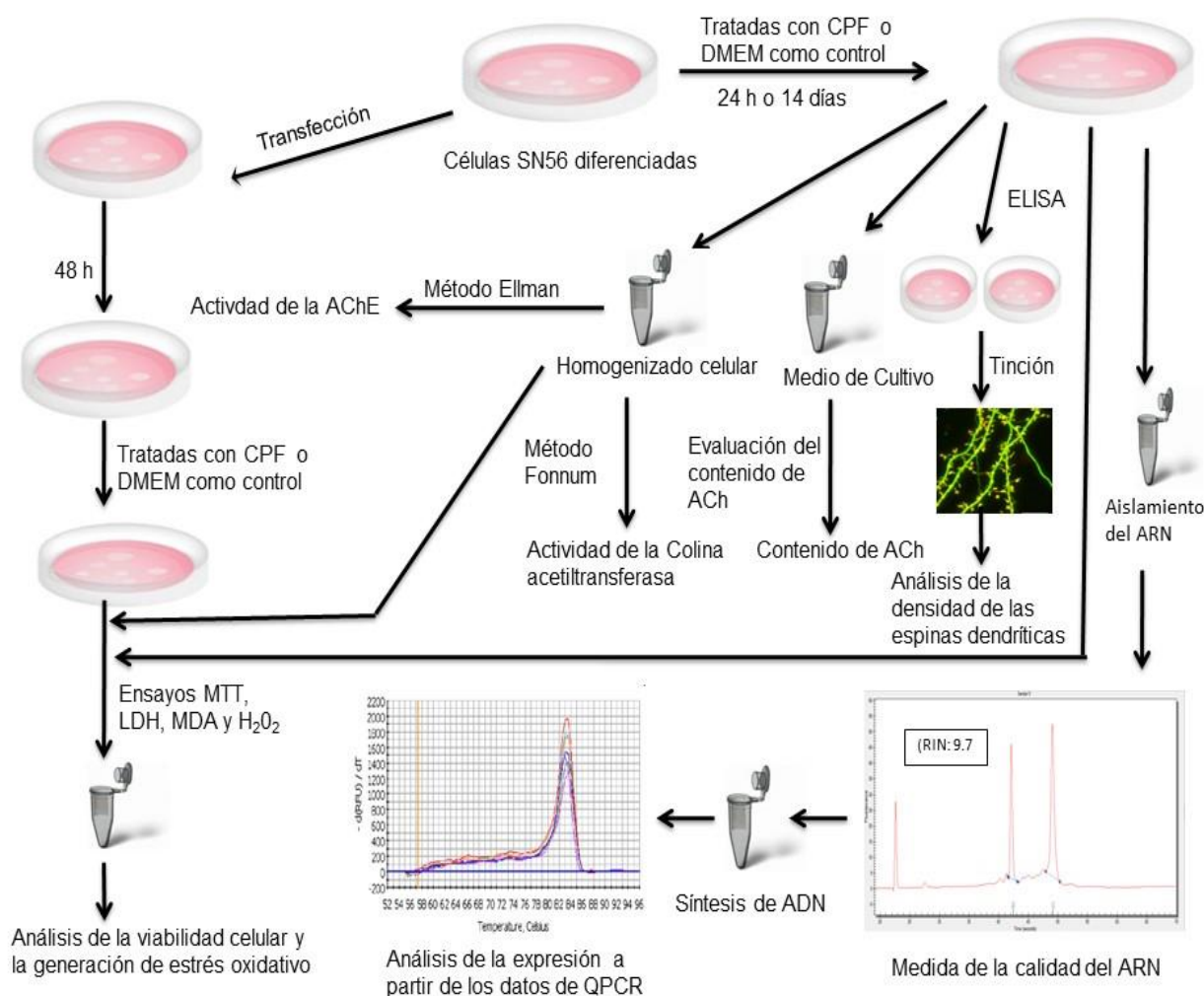
actividad de ChAT y el nivel de acetilcolina en estas células. Se ha descrito que las células así diferenciadas son más sensibles a compuestos neurotóxicos que afectan a las vías colinérgicas (Bielarczyk et al., 2003, Szutowicz et al., 2006).

Con el fin de determinar la densidad de las espinas dendríticas, el contenido celular de acetilcolina (ACh), del malondialdehído (MDA), del contenido de lactato deshidrogenasa (LDH) y el contenido de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), las actividades de la AChE y la acetilcolina transferasa (ChAT), la expresión génica de las variantes de la AChE, del transportador de colina de alta afinidad (CHT), del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), de la ChAT, de los principales genes reguladores de las rutas de muerte celular (PCR Array Cell Death Pathway Finder de ratón de referencia PAMM-212Z) y de los principales genes reguladores la plasticidad de las espinas dendríticas (PSD95, NMDAR1, SPN and SYP) y de los receptores  $\alpha_7$ -nAChR y P75<sup>NTR</sup>, así como los efectos del silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR, ChAT y AChE y la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> sobre la viabilidad celular y de  $\alpha_7$ -nAChR y P75<sup>NTR</sup> sobre la inducción de estrés oxidativo y alteración de las variantes de la colinesterasa, las células SN56 fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de  $10^6$  células/pocillo. Las células fueron tratadas durante 24 h o durante 14 días con CPF a concentraciones entre 0,01  $\mu$ M a 70  $\mu$ M y 0,01  $\mu$ M a 40  $\mu$ M, respectivamente con o sin N-acetil cisteína (NAC; 1 mM) y con o sin Ach (0,01 $\mu$ M-100  $\mu$ M). Se usaron al menos 3 replicas pocillos/tratamiento. Un grupo tratado con el vehículo del CPF se empleó en paralelo para cada experimento como grupo control.

#### **4.2. Protocolo y diseño experimental**

En la literatura, las concentraciones de clorpirifós de 10-100 mM se han usado

rutinariamente para estudiar la toxicidad del clorpirifós (Crumpton et al., 2000; Dam et al., 1999; Jett & Navoa, 2000; Roy et al., 1998), aunque no hay suficientes datos respecto a la distribución relativa o las concentraciones de CPF que alcanzan el cerebro en el hombre tras la exposición aguda y crónica. Además, algunos estudios han mostrado que la concentración plasmática de CPF en voluntarios humanos eran similares a 0.1  $\mu\text{M}$  (Nolan et al., 1984. Sin embargo, se ha descrito recientemente que mediante el uso de un modelo fisiológico basado en la farmacocinética y farmacodinamia (PBPK/PD), que las concentraciones plasmática que podrían estar presentes en humanos serían aproximadamente 0.015  $\mu\text{M}$ , y las concentraciones alcanzadas a nivel cerebral serían aproximadamente 0.01  $\mu\text{M}$  (Arnold et al., 2015). Por otra parte, se ha descrito que las concentraciones molares de CPF a nivel corporal asociadas con las dosis (2,5 a 25,0 mg/kg/día) utilizadas en los experimentos de comportamiento varían entre aproximadamente 7,0 y 8,0 a 70,0 y 80,0  $\mu\text{M}$  (Terry et al., 2003). El NOAEL fijado para el CPF es de 0,1 mg/Kg de peso corporal por día (JMPR, 1999), lo que sería equivalente a una concentración alrededor de 0,3  $\mu\text{M}$  en los tejidos de acuerdo con Terry et al. (2003). De acuerdo a lo expuesto, las dosis utilizadas en nuestra investigación parecen ser las más relevantes para el estudio de los trastornos cognitivos. Por otra parte, se usó la concentración de CPF 30  $\mu\text{M}$  para estudiar el perfil toxicogenómico y las principales rutas genómicas necróticas y apoptóticas, por que fue la concentración más baja observada que inducía la muerte celular tras la exposición aguda. La Figura 5 representa el diseño experimental seguido en la investigación.



**Figura 5.** Representación esquemática del diseño experimental de la investigación.

### *Análisis de la viabilidad celular*

La determinación de los efectos del CPF sobre la viabilidad celular fue realizada a través del método del MTT y de la determinación de la liberación del LDH resultado de la muerte neuronal por necrosis. El método del MTT se basa en la ruptura de la sal de MTT tetrazolio de color amarillo a cristales de formazán de color púrpura por la acción de la deshidrogenasa mitocondrial. Las células se incubaron con 100 µl de solución de MTT (concentración final 0,5 mg/ml) durante 4 h después del tratamiento con CPF. Después de 4 h a 37°C, el medio se eliminó y la sal de formazán se disolvió en 250 µl de DMSO. La formación de producto de

formazán solubilizado se midió espectrofotométricamente a 570 nm (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, ThermoFisher Scientific, Madrid, España). Se tomó como 100% de viabilidad las células control tratadas con DMSO como.

La determinación de la liberación de LDH al medio de cultivo se realizó usando el kit Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, el medio de cultivo se retiró y se pipeteó en placas de 96 pocillos. Se añadió la mezcla de reactivos maestra, y después de 3 min se determinó la intensidad colorimétrica a 450 nm cada 5 minutos utilizando un espectrofotómetro de microplacas.

Finalmente, la inducción de la apoptosis fue determinada a través de la medida de la activación de las caspasas 3/7 por medio del uso de kit Caspase-Glo 3/7 Luminescence Assay Kit (Promega, Madrid, Spain), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, al final del tratamiento, las células SN56 cultivadas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se rasparon y recogieron las células en un tubo de microcentrífuga en oscuridad. A las células se les adicionaron volúmenes iguales de reactivo y de tampón lisis y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 h y la luminiscencia resultante se leyó en cada muestra. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### ***Silenciamiento de genes***

El silenciamiento de los genes  $\alpha_7$ -nAChR, ChAT y AChE en las células SN56 se realizó transfectando las mismas con ARNsi en placas de 6 pocillos ( $1 \times 10^6$  células/pocillo) usando el reactivo de transfección HiPerfect de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen,

Barcelona, España). Dos conjuntos de ARNsi dúplex (Qiagen, Barcelona, España) homólogas a las secuencias de los genes  $\alpha_7$ -nAChR, ChAT y AChE de ratón fueron diseñadas utilizando el Algoritmo de diseño HiPerformance (Norvatis AG) y fueron adquiridos de Qiagen (números de catálogo GS11423, GS1805 y GS11441, respectivamente). Como control de transfección, se utilizó el control negativo ARNsi All Star (Qiagen, Barcelona, España). 48 h después de la transfección, la eficacia del silenciamiento de AChE, ChAT, y  $\alpha_7$ -nAChR se determinó por RT-PCR utilizando cebadores específicos de ratón para la secuencia de ARNm de AChE, ChAT y  $\alpha_7$ -nAChR (Qiagen, Barcelona, España). Los efectos del silenciamiento de AChE, ChAT, y  $\alpha_7$ -nAChR en la lesión de las células se estudió mediante el ensayo de MTT, el ensayo del LDH y el ensayo de activación de las caspasas 3/7. Además, el efecto del silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR en la generación de estrés oxidativo se determinó por el ensayo de la peroxidación lípidica y la medición de los niveles de peróxido de hidrógeno. Por último, los efectos del silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR sobre la expresión génica de AChE-S y AChE-R se determinaron por análisis de PCR en tiempo real. Después de 24 h de incubación con los ARNsi, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante otras 24 h o 14 días en medio de cultivo con o sin CPF.

### ***Sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>***

Para demostrar que la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> es responsable de la generación de estrés oxidativo, la alteración de la expresión de las variantes de la AChE y de la muerte celular inducida observada tras el tratamiento con CPF en las células SN56, se estudiaron células SN56 transfectadas con el plásmido de expresión conteniendo el gen P75<sup>NTR</sup>, para sobreexpresar este gen. La clonación, caracterización y transfección de plásmidos de expresión con el gen P75<sup>NTR</sup> se realizaron como se ha descrito previamente (Jung et al., 2003) con ligeras modificaciones. El P75<sup>NTR</sup> se amplificó mediante RT-PCR y se clonó en el marco con epítipo V5 en plásmido

pcDNA3.1 TOPO V5 His (Invitrogen, Madrid, España) usando el kit de clonación TOPO (Invitrogen, Madrid, España). El éxito de la clonación del plásmido P75<sup>NTR</sup> fue verificada por secuenciación. Las células fueron transfectadas con los plásmidos (P75<sup>NTR</sup> o plásmido vacío) utilizando el reactivo Superfect (Qiagen) de transfección de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, 2 µg de plásmido y 10 µl reactivo de transfección Superfect fueron utilizados por cada  $4 \times 10^5$  células. Se añadió el marcador de selección G418 (500 mg/ml) el segundo día después de la transfección. Esta concentración de antibiótico G418 es óptima para la selección de células SN56 transfectadas de forma estable con P75<sup>NTR</sup>. A continuación, el medio de mantenimiento contuvo 25 mg/ml de G418. Las células se subcultivaron semanalmente y el medio se cambió dos veces por semana. Las células transfectadas se cultivaron aproximadamente durante 3 semanas hasta que todas las células no transfectadas murieron y aparecieron colonias de células G418. La transfección fue confirmada por QPCR.

### *Análisis de las actividades enzimáticas*

Se determinó la actividad de la AChE tras 24 h y 14 días de exposición a CPF, usando el método estándar Ellman de tiocolina (Ellman et al., 1961), con modificaciones menores (Hartl et al., 2011; Zimmermann et al., 2008), y los valores de actividad se normalizaron frente a la concentración total de proteína determinada a través del uso kit BCA (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain). Brevemente, al final de los tratamientos, las células SN56 se lavaron con tampón fosfato, se recogieron por raspado, y se lisaron usando un tampón RIPA (Thermo Scientific, Madrid, España) con un cóctel de inhibidores de proteasas (ThermoFisher Scientific, Madrid, España). Después de la centrifugación a 10.000 x g durante 10 min a 4°C, el sobrenadante del lisado celular (10 µl) se pipeteó en una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía tampón Ellman, así como iso-DMPA, (concentración final 100 mM). El ensayo

cinético se inició por adición de acetiltiocolina y ácido ditionitrobenzoico (1 mM y 500 mM concentraciones finales, respectivamente). La absorbancia se leyó usando un lector de placas (412 nm). Todas las muestras se realizaron por triplicado. La actividad de la AChE se calculó como nmol/min/mg de proteína y se representa como porcentaje respecto al control. La actividad de butirilcolinesterasa fue inhibida por iso-DMPA.

La enzima ChAT cataliza la transferencia de un grupo acetilo de la coenzima A, acetil-CoA, con la colina dando lugar a la ACh. La actividad de la ChAT se midió en el homogenizado celular por medio del método radio-enzimático de Fonnum (Fonnum, 1975), con una modificación que implica la incorporación de [ $C^{14}$ ] acetil-CoA en la ACh (Mennicken & Quirion 1997; Zheng et al., 2002). Los cultivos control y tratados (de placas de 6 pocillos por muestra) se lavaron con PBS, se rasparon en 100  $\mu$ l de tampón de homogenización frío (tampón fosfato de sodio 40 mM, pH 7,4, que contiene 200 mM de NaCl y 0,5% Triton X-100) y luego se homogenizaron mediante sonicación (Zheng et al., 2002). La radioactividad correspondiente al producto de reacción ([ $C^{14}$ ] ACh) se midió por medio de un medidor de cuentas. Todos los valores de actividad de ChAT, obtenidos por triplicado para cada muestra, se expresaron como pmol de ACh sintetizada/h/mg de proteína.

### ***Análisis de la Concentración de ACh***

Para determinar la concentración de ACh en el medio de cultivo se usó un kit comercial colorimétrico/fluorométrico (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (Reale et al., 2012) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recogió el medio de cultivo después de 24 h y de 14 días de tratamiento y se centrifugó a 800 x g. Posteriormente, el sobrenadante se liofilizó, y se reconstituyó en 50  $\mu$ l del tampón de ensayo, y se almacenó a -80°C hasta su

posterior análisis. 50 µl de la muestra se mezclaron con 50 µl de solución de reacción que incluye tampón de ensayo para la colina, la sonda de colina y AChE de acuerdo con las instrucciones. Cada muestra se ensayó por triplicado, y todo el experimento se llevó a cabo por triplicado. El nivel de ACh (pmol/pocillo) se calculó mediante la grafica de la fluorescencia de cada muestra frente a las concentraciones estándar de colina. La medición de la fluorescencia se determinó a  $\lambda$  Ex/Em 535/587 nm.

### ***Análisis de la densidad de las espinas dendríticas***

Para determinar los efectos de la exposición aguda y a largo plazo al CPF sobre la densidad de las espinas dendríticas en las neuritas de las neuronas colinérgicas SN56, se realizó la técnica de enzimo-inmuno ensayo (ELISA) de acuerdo al protocolo de Wright y McCarthy (2009) para la determinación de la proteína MAP-2. La proteína MAP-2 no está localizada en las espinas dendríticas pero permite la cuantificación precisa de la densidad de las mismas. Las células SN56 diferenciadas se suspendieron en medio DMEM. Las células en suspensión se sembraron a una densidad de  $10^6$  células/ml en cubreobjetos de vidrio (22 mm de diámetro) recubiertos de poli-L-lisina (0,10 mg/ml) colocadas en placas Petri de plástico (35 mm de diámetro) recubiertas con poli-L-lisina. Los cubreobjetos con células SN56 adheridas se fijaron con paraformaldehído helado 4% (p/v) durante 15 min y luego se colocaron en tampón fosfata suplementado con potasio 0,5 M (KPBS) hasta su uso. Los cubreobjetos se lavaron tres veces en KPBS, y las células se permeabilizaron con 50% de etanol durante 1 h y se bloquearon con 10% de suero de cabra en Triton-X-100 complementado con 0,1% de KPBS (KPBST). Después de tres lavados de 15 min con KPBS, las células de los cubreobjetos se incubaron a continuación durante la noche con el anticuerpo monoclonal anti-proteína-2 asociada a microtúbulos (MAP-2) a una dilución 1:1000 en KPBST al 0,1% a 4° C. Tras tres lavados con KPBST al 0,1% se

realizó una inmersión durante 2 h en anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con biotina (Vector Laboratories, Barcelona, España) con la dilución 1:500 en KPBST al 0,1%, después las células se lavaron en KPBST al 0,1%, y se visualizaron utilizando el complejo Vectastainavidina-biotina (Vector Laboratories, Barcelona, España) en la dilución 1:1000 en KPBST al 0,1% durante 1 h antes de la tinción con 0,05% (p/v) de tetracloruro de 3,3'-diaminobenzidina, 0,005% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y 2,5% (v/p) de sulfato de níquel (II) en acetato de sodio 0.175 M.

### *Análisis de la expresión génica*

Para la realización de la determinación de los cambios en la expresión génica tras la exposición aguda y a largo plazo al CPF se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa semicuantitativa (QPCR). El ARN total fue extraído mediante el método del Trizol (Invitrogen, Madrid, España). La concentración final de ARN se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) y la calidad de las muestras del ARN total se evaluó utilizando el LabChip Experion (Bio-Rad, Madrid, España). La síntesis del ADN complementario del ARN se realizó con 1.000 ng de ARN usando el kit de síntesis PCR Array First Strand-Synthesis Kit (C02; SuperArray Bioscience, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante, incluyendo un paso de eliminación de ADN genómico y controles de ARN externos. Después se realizó la QPCR utilizando conjuntos de cebadores prevalidados de los genes en estudio incluyendo una etapa de eliminación de ADN genómico y controles de ARN externos. Después de la transcripción inversa, se realizó una QPCR utilizando conjuntos de cebadores prevalidados (SuperArray Bioscience) que codifican para el ARNm de ChAT (PPM57674A), VAcHT (PPM04178), CHT (PPM31807A), AChE (PPM35356A), P75<sup>NTR</sup> (PPM04327F),  $\alpha_7$ -nAChR (PPM03977A), la proteína de densidad

postsináptica 95 (PSD95; PPH01848A), espinofilina (SPN; PPM34114A), sinaptofisina (SYP; PPM03241A), N-metil-D-aspartato subunidad NR1 (NMDAR1; PPH01823F) y ACTB (PPM02945B). Los cebadores para ambas isoformas de la AChE, R y S, (Tabla 9) se tomaron de Shaltiel et al. (2013). Las reacciones se realizaron en un CFX96 mediante Real-Time PCR SYBR Green Master Mix PA-012 (SuperArray Bioscience). Los parámetros del termociclador fueron 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos. Se utilizó el gen de la beta actina (ACTB) como un control interno para la normalización. Los cambios relativos en la expresión génica se calcularon utilizando el método de Ct (ciclo umbral). Los datos de expresión se presentan como múltiplos de cambio reales (Livak & Schmittgen, 2001).

**Table 9.** Cebadores usados para la determinación de la expresión génica de las variantes de la AChE.

Abreviatura	Gen	Referencia	Cebadores Sentido (S) y Antisentido (R)
AChE-S	Acetilcolinesterasa	Shaltiel et al., (2013)	S-ctgaacctgaagcccttagag A-ccgcctcgccagagtat
AChE-R	Acetilcolinesterasa	Shaltiel et al., (2013)	S-gagcaggggaatgcacaag A-ggggaggtaaagaagagag

También, después de la transcripción inversa, se realizó una QPCR utilizando la placa Cell Death Pathway Finder PCR Array de ratón (PAMM-212Z) utilizado para analizar la expresión de 84 genes clave implicados en la muerte celular, en un formato de 96 pocillos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (SABiosciencesInc). Las reacciones se realizaron en un CFX96 mediante Real-Time PCR SYBR Green Master Mix PA-012 (SuperArray Bioscience). Los parámetros del termociclador fueron 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los cambios relativos en la expresión génica se calcularon a través de la matriz SuperArray PCR Software de análisis de

datos utilizando el método de ciclo umbral (Ct) con la normalización de los datos en factor de varios genes de normalización. Los datos de expresión se presentan como múltiplos de cambio reales.

Elegimos el estudio de los genes ChAT, VAChT, y AChE para determinar el efecto del CPF sobre la transmisión colinérgica, debido a que el neurotransmisor ACh es sintetizado por la enzima ChAT (Oda, 1999) y la enzima CHT media la recaptación de la colina a nivel presináptico como paso limitante de la velocidad de síntesis de la ACh (Bazalakova y Blakely 2006). VAChT es responsable del transporte de la acetilcolina desde el citoplasma a las vesículas sinápticas, siendo este un paso limitante en la liberación de ACh (Oda, 1999). Por último, la AChE descompone la acetilcolina, terminando, por lo tanto, el proceso de neurotransmisión (Ballard et al., 2005). Además elegimos los genes PSD95, NMDAR1, SPN y SYP para determinar el efecto del CPF sobre la densidad de las espinas dendríticas, debido a que estos son los principales reguladores de la plasticidad de las espinas dendríticas (Feng et al., 2000; Hu et al., 2008; Zhang et al., 2016). Por último, elegimos la realización del PCR array Cell Death Pathway Finder debido a que engloba los principales genes que regulan las rutas de muerte por necrosis, apoptosis y autofagia como vía para determinar los mecanismos por los cuales se pueden inducir alguno de estos tipos de muerte en esta región cerebral por la acción del CPF.

### ***Análisis de la inducción de estrés oxidativo***

Para determinar la inducción de estrés oxidativo tras la exposición aguda o prolongada a CPF medimos la concentración de MDA (indicador de la peroxidación de lípidos) y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (indicador de la inducción de radicales libres). La concentración intracelular de MDA se cuantificó después de 24 h y 14 días de exposición a CPF con o sin NAC (1 mM) usando el kit

MDA Assay Kit (Abcam, Cambridge, Reino Unido), siguiendo el protocolo del fabricante. Tras el tratamiento se recogieron  $1 \times 10^6$  células y se homogenizaron en tampón de lisis de MDA (300  $\mu$ l) en hielo, con 3  $\mu$ l de BHT (100X) y se centrifugaron durante 10 min a 13.000 x g para eliminar el material insoluble. La muestra (200  $\mu$ l) o estándar (200  $\mu$ l de MDA) se mezcló con 600  $\mu$ l de solución de TBA, se incubaron a 95°C durante 50 min y se enfriaron a temperatura ambiente en un baño de hielo durante 10 min. Se añadió cada muestra y estándar (200  $\mu$ l) (duplicado) a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 532 nm usando un lector de microplacas. La concentración de malondialdehído fue determinada como nmol/mg de proteína y se representa como porcentaje respecto al control.

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es una de las especies de oxígeno reactivas (ERO) producidas bajo condiciones de estrés oxidativo. El contenido de  $H_2O_2$  se midió usando el kit Hydrogen Peroxide Assay Kit (Abcam, Cambridge, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, después de 24 h y 14 días de tratamiento con la CPF con o sin NAC (1 mM), las células sin transfectar y las células SN56 transfectadas se recogieron en tampón de ensayo  $H_2O_2$  y luego se centrifugó durante 15 min a 1.000 x g. Un total de 50  $\mu$ l del sobrenadante se mezcló con 50  $\mu$ l de la mezcla de reacción (tampón de ensayo: 46  $\mu$ l; sonda OxiRed: 2  $\mu$ l; HRP: 2  $\mu$ l) y después se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. La densidad óptica se leyó a 570 nm con un lector de microplacas, y la concentración de  $H_2O_2$  se calculó de acuerdo a una curva de concentración estándar. El contenido de peróxido de hidrógeno en las muestras se expresa en nanomoles por mililitro y se representa como porcentaje respecto al control.

### *Análisis estadístico*

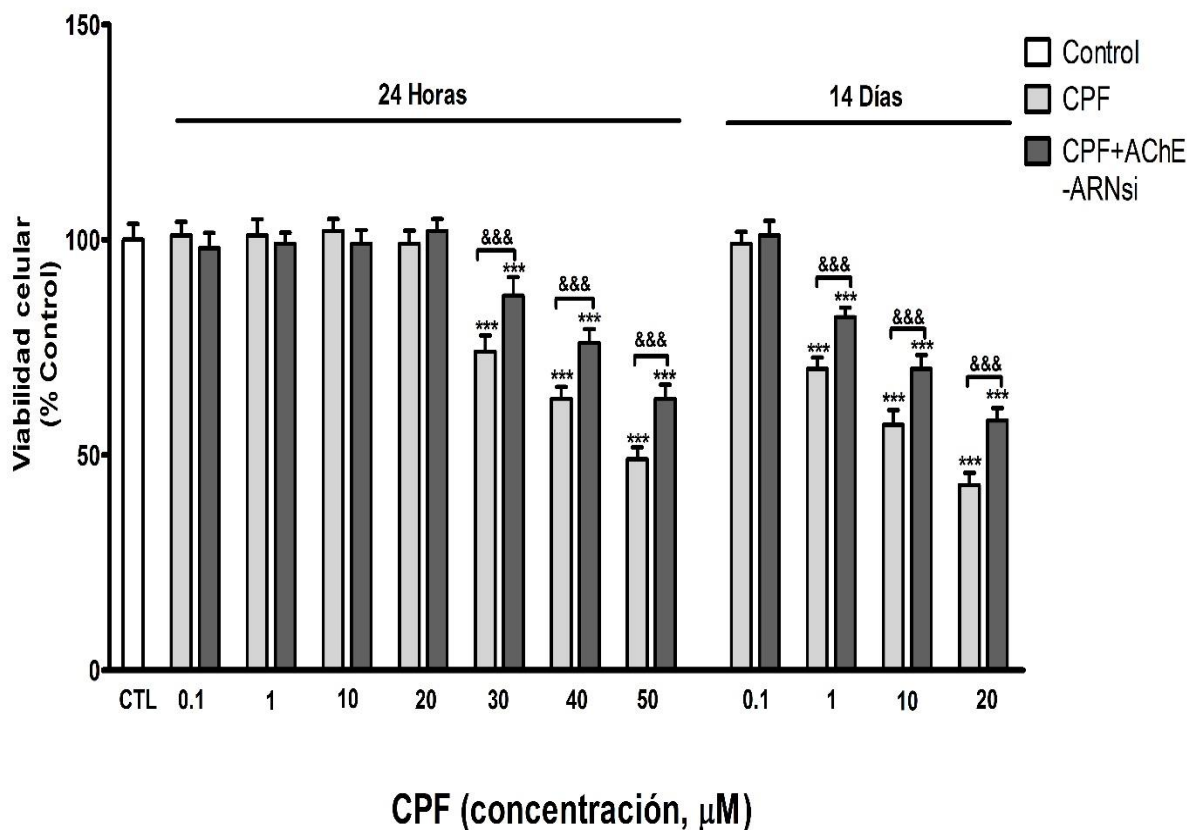
Los datos se representan como media  $\pm$  desviación estándar (DS). Las comparaciones entre los grupos experimentales y control se realizaron mediante análisis ANOVA de dos vías para determinar la interacción entre el tratamiento y la transfección tanto por silenciamiento como por sobreexpresión de un gen, y de una vía para la determinación de diferencias significativas entre diferentes dosis de un tratamiento, seguido por la prueba post-hoc de Tukey. La diferencia estadística fue aceptada cuando  $p \leq 0,05$ . El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo por ordenador utilizando el software GraphPad.

## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

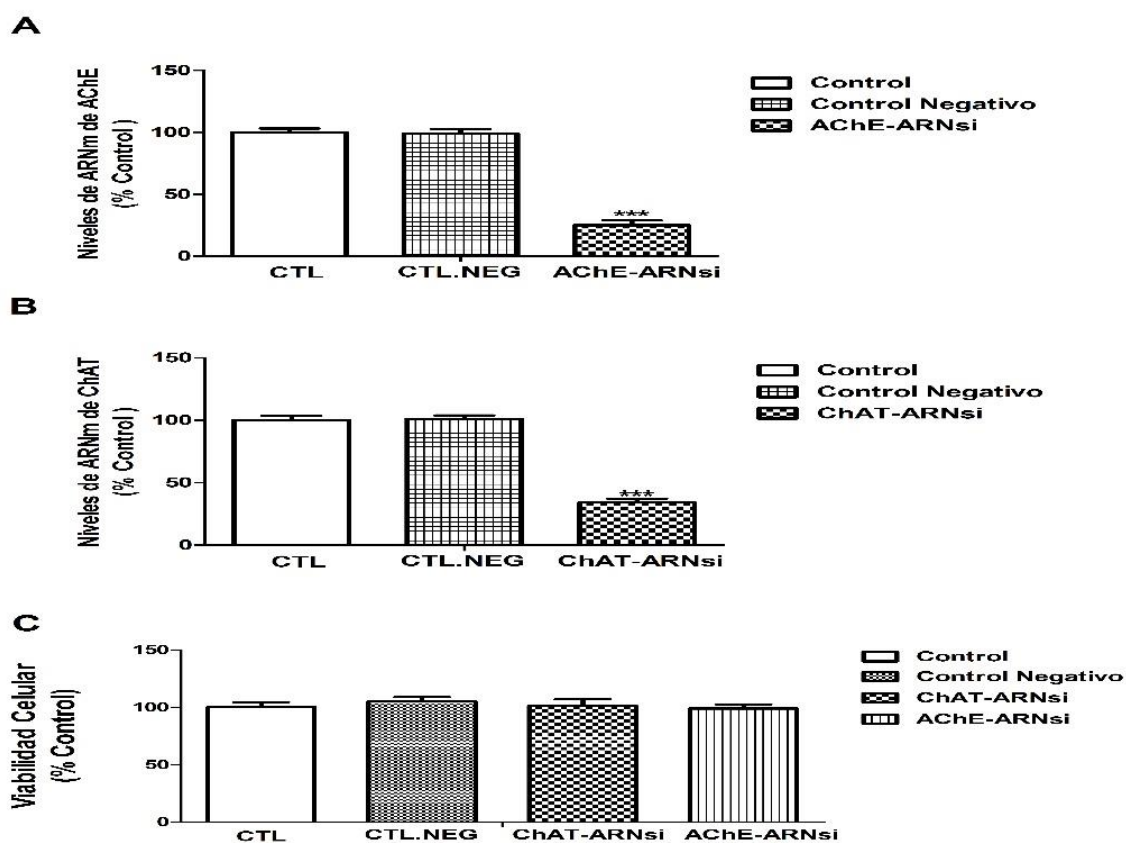
### 5.1. Efecto del CPF sobre la viabilidad de las células SN56 a través de la prueba del MTT.

Utilizamos la prueba del MTT para evaluar la supervivencia celular después de 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. La prueba del MTT mostró a partir de las concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente, una clara reducción concentración-dependiente en la viabilidad celular en comparación con células tratadas con vehículo (control) (Figura 6).



**Figura 6.** Efecto sobre la viabilidad celular tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control. &&& $p < 0.001$  comparado con el tratamiento de CPF.

No observamos efectos en la reducción de la viabilidad celular después de 24 h y 14 días de tratamiento de células SN56 silenciadas para ChAT. Por otra parte, después de la exposición a largo plazo a CPF, el tratamiento de los cultivos con ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M), no indujo un efecto significativo con respecto a los controles. Sin embargo, después del tratamiento con CPF de células SN56 silenciadas para AChE observamos una reversión parcial de la reducción de la viabilidad celular (Figura 6). La transfección de células con ARN de silenciamiento control no produjo ningún efecto sobre la viabilidad celular (Figura 7C). No hubo diferencia significativa entre los datos de las células tratadas con vehículo y las células sin ningún tratamiento.

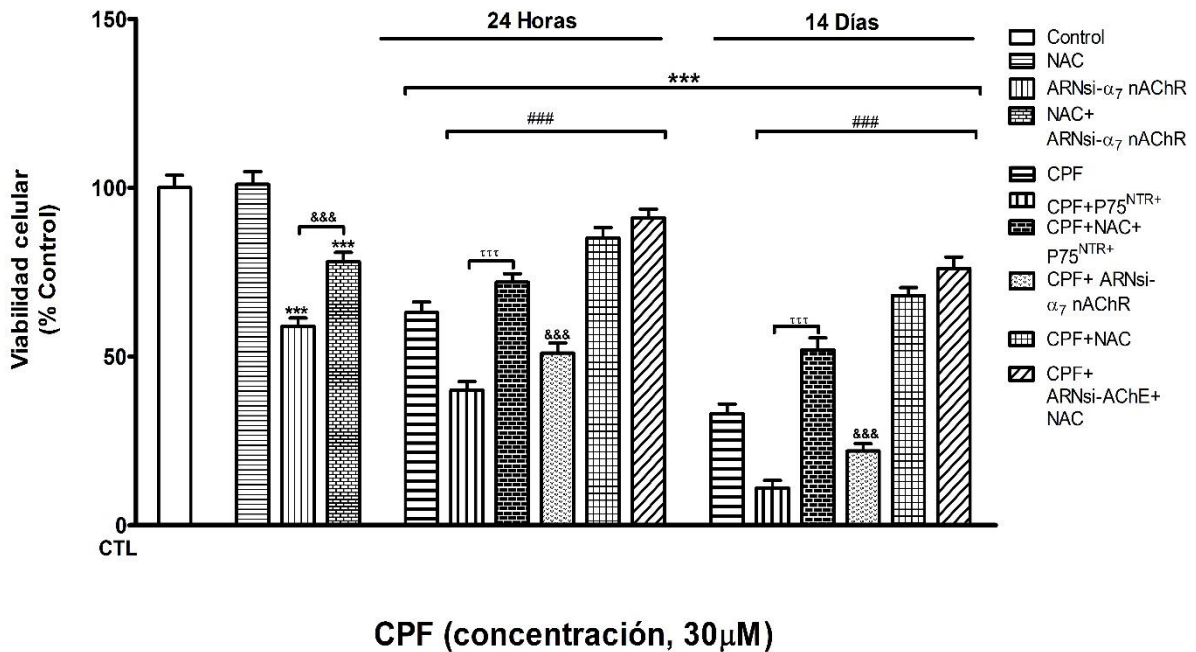


**Figura 7.** Efecto sobre la viabilidad celular y sobre la expresión génica de la ChAT y la AChE tras su silenciamiento. Silenciamiento de (A) AChE y (B) ChAT detectado por QPCR tras 48 de la transfección. (B) Efectos del silenciamiento de ChAT y AChE sobre la viabilidad celular determinados por medio del test de MTT. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control.

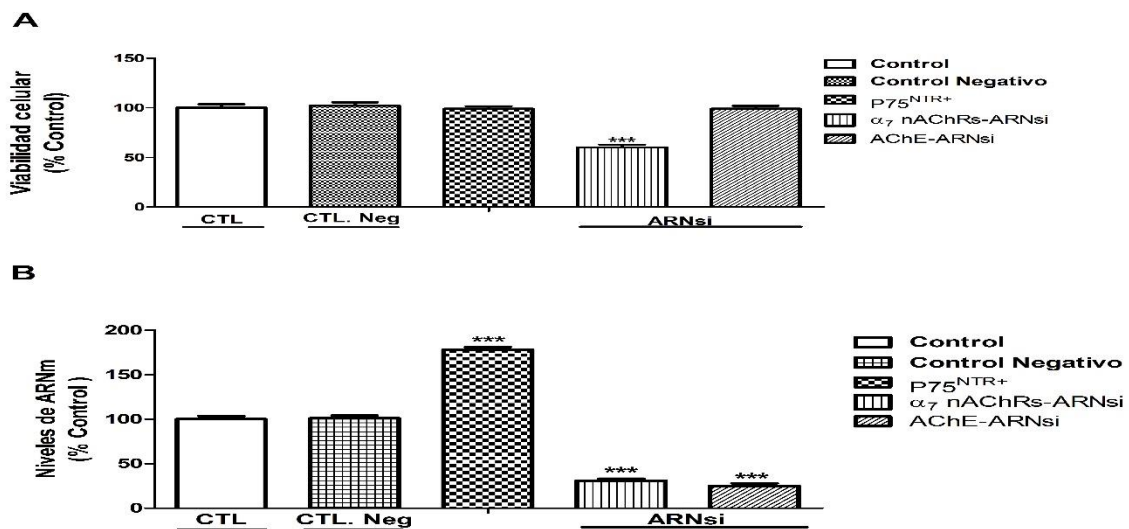
Por otra parte utilizamos la prueba de MTT para evaluar la implicación del estrés oxidativo y de los genes AChE, P75<sup>NTR</sup> y  $\alpha_7$ -nAChR en la supervivencia celular tras el

tratamiento durante 24 h y de 14 días a la concentración de 30  $\mu$ M de CPF con o sin NAC (1 mM). La prueba del MTT tras 24 h y tras 14 días de incubación del cultivo celular con CPF mostró una reducción de la viabilidad celular en comparación con células tratadas con vehículo (control). No observamos ningún efecto sobre la viabilidad celular después del tratamiento a corto y largo plazo con NAC (1 mM). El tratamiento con NAC de células SN56 silenciadas individualmente para  $\alpha_7$ -nAChR, revirtió parcialmente la muerte celular inducida por el silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR (Figura 8).

Además, tras 24 h y 14 días de tratamiento con CPF de células SN56 silenciadas para  $\alpha_7$ -nAChR o con sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>, observamos una reducción significativa en la viabilidad celular, que fue en el caso de  $\alpha_7$ -nAChR, mayor que la observada tras su silenciamiento o tras el tratamiento con CPF individualmente. Por otra parte, después del co-tratamiento con NAC y CPF a corto y largo plazo de células SN56 con sobreexpresión para P75<sup>NTR</sup> o de las células SN56 sin transfectar observamos una reversión parcial de la reducción de la viabilidad celular en comparación con el tratamiento con CPF individualmente y esta reversión fue menor en el caso de las células con sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>. Además, después del co-tratamiento con NAC y CPF a corto y largo plazo de las células SN56 silenciadas para AChE observamos una reversión de la reducción de la viabilidad celular en comparación con el tratamiento de CPF individual, pero no por completo (Figura 8). La transfección de células con ARN de silenciamiento o con plásmido vacío control no produjo ningún efecto sobre la viabilidad celular (Figura 9A).



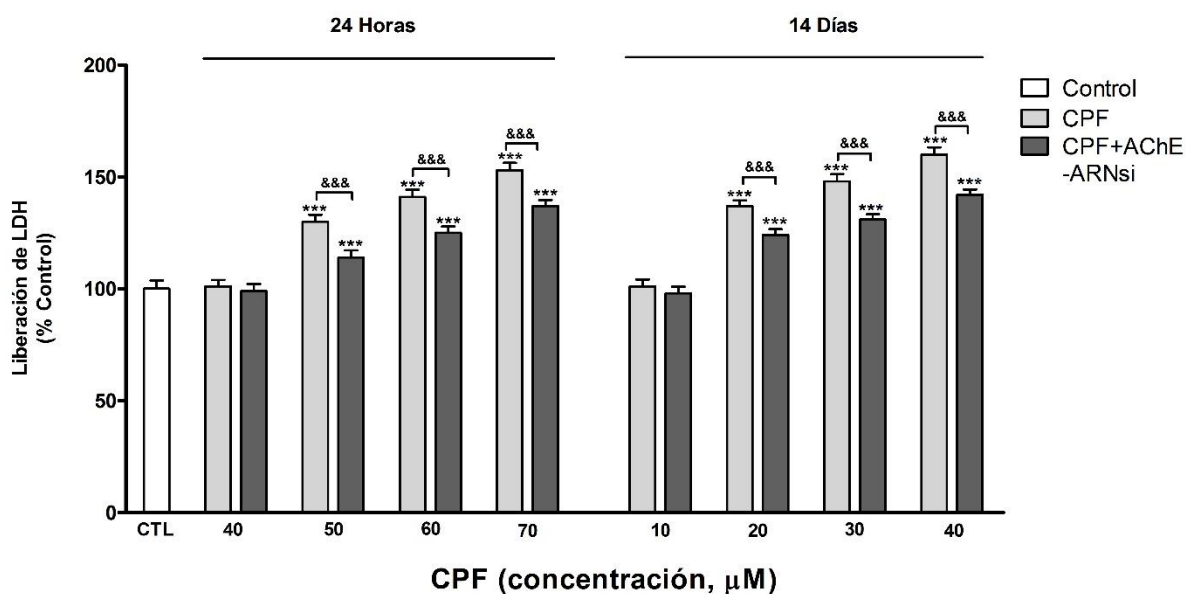
**Figura 8.** Determinación por el ensayo del MTT del efecto del estrés oxidativo,  $\alpha_7$ -nAChRs, AChE y P75<sup>NTR</sup> sobre la viabilidad celular de células SN56 tratadas con CPF (30  $\mu$ M) durante 24 h o 14 días. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p$ <0.001 comparado con el control. ### $p$ <0.001 comparado con el tratamiento de CPF. &&& $p$ <0.001 comparado con el silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChRs.  $\tau\tau\tau$  $p$ <0.001 comparado con la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>.



**Figura 9.** (A) Efectos del silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChRs y AChE o de la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> sobre la viabilidad celular determinados por medio del test de MTT. (B) Silenciamiento de AChE y ChAT o sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> detectado por QPCR tras 48 h de la transfección. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p$ <0.001 comparado con el control.

## 5.2. Evaluación de la muerte celular mediante el método LDH.

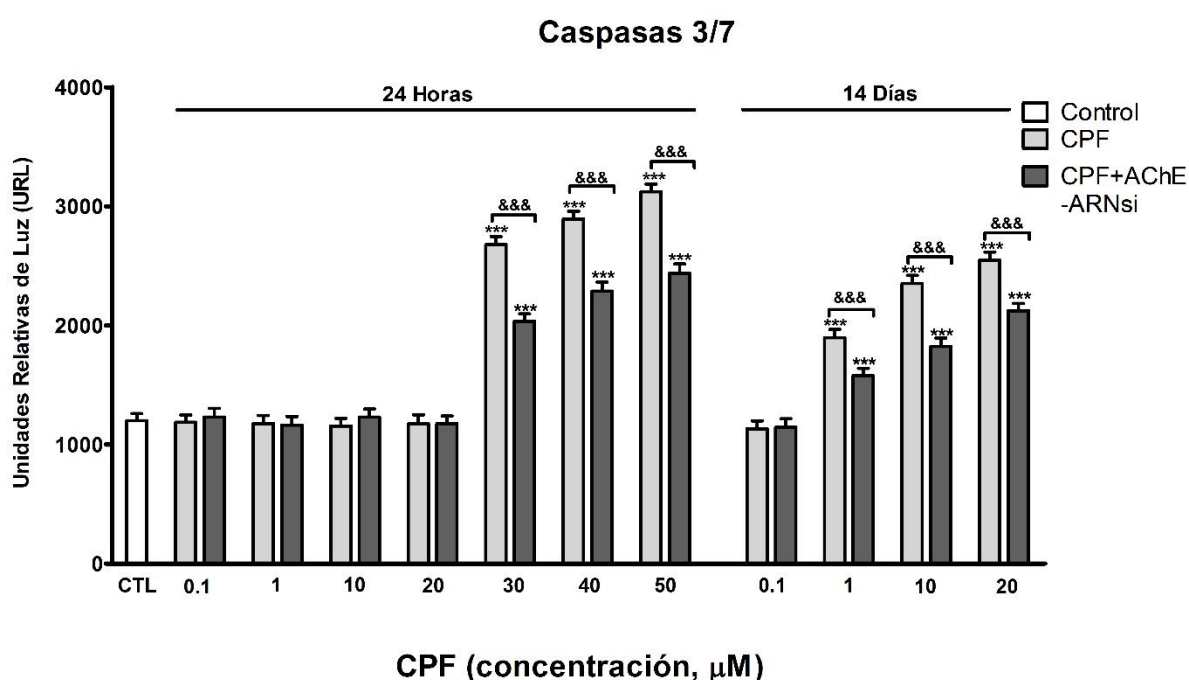
Utilizamos el ensayo de LDH para evaluar la supervivencia celular después de 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. El LDH se libera a partir de células como resultado de la pérdida de integridad de la membrana plasmática y es indicativo de la inducción del mecanismo de muerte celular por necrosis. Observamos un aumento de la liberación de LDH al medio en una forma concentración-dependiente tras 24 h y 14 días de exposición a CPF a partir de las concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$ , respectivamente, en comparación con las células tratadas con vehículo (control) (Figura 10). Por otra parte, después del tratamiento con CPF de células SN56 silenciadas para AChE también observamos una reversión parcial en la liberación de LDH (Figura 10). No hubo diferencia significativa entre los datos de las células tratadas con vehículo y las células sin tratamiento.



**Figura 10.** Efecto sobre la viabilidad celular tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF medido a través del ensayo del LDH. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control. &&& $p < 0.001$  comparado con el tratamiento de CPF.

### 5.3. Efecto sobre la actividad de las caspasas 3/7.

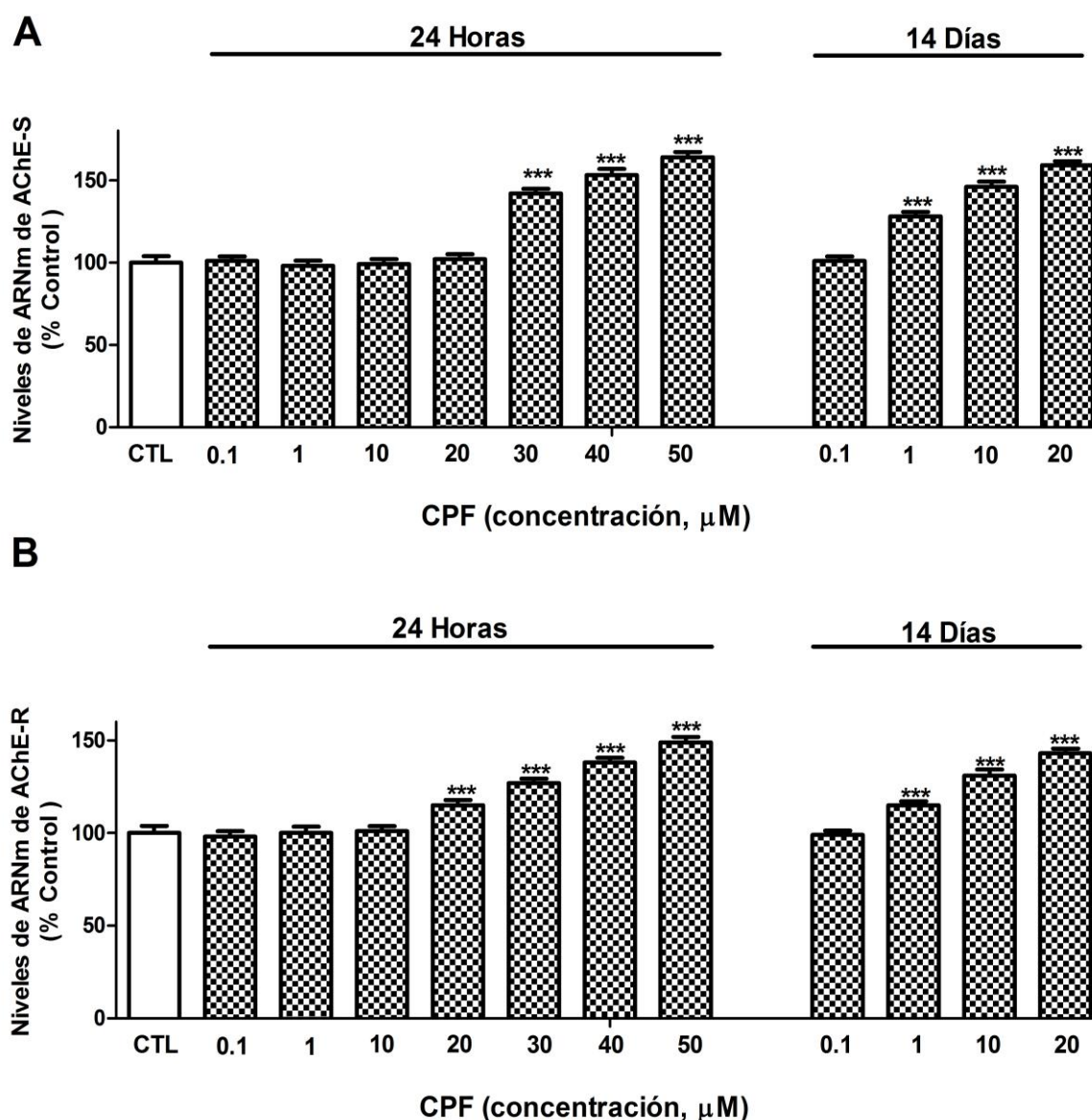
El CPF activó las caspasas en las células SN56 después del tratamiento durante 24 h y 14 días de una manera concentración-dependiente a partir de las concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente, en comparación con el grupo control. Después del tratamiento a 24 h y 14 días con CPF de las células silenciadas para AChE se activaron las caspasas 3/7 de una manera dependiente de la concentración a partir de las concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente, en comparación con el grupo de control y pero este aumento fue menor que el observado después del tratamiento con CPF individualmente (Figura 11) indicando una reversión parcial de este efecto. Sin embargo, el silenciamiento de ChAT no fue capaz de atenuar la disminución de la activación de las caspasas después del tratamiento con CPF individualmente durante 24 h y 14 días.



**Figura 11.** Efecto sobre la viabilidad celular tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF medido a través del ensayo del LDH. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control. &&& $p < 0.001$  comparado con el tratamiento de CPF.

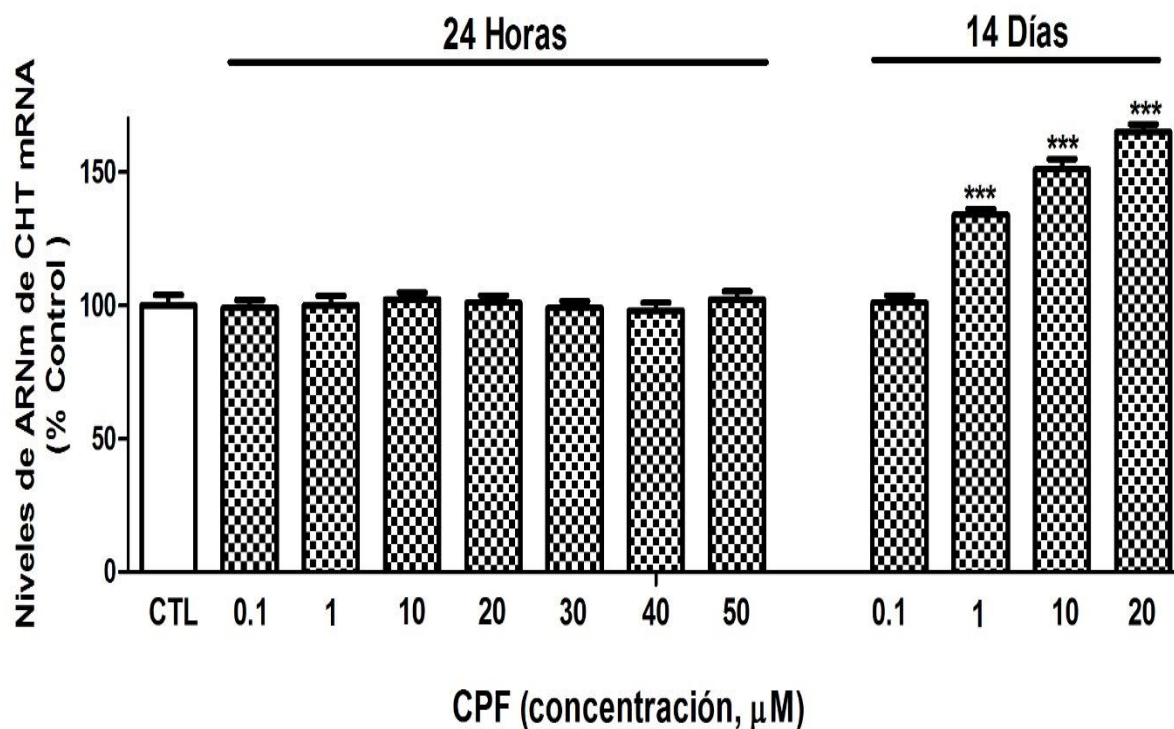
#### 5.4. El análisis de PCR en tiempo real

Después de la incubación durante 24 h y 14 días con diferentes concentraciones de CPF en células SN56, se midió la expresión de las variantes R y S de la AChE, encontrándose que éstas se indujeron de manera significativa en una manera concentración-dependiente (Figuras 12A y 12B, respectivamente).



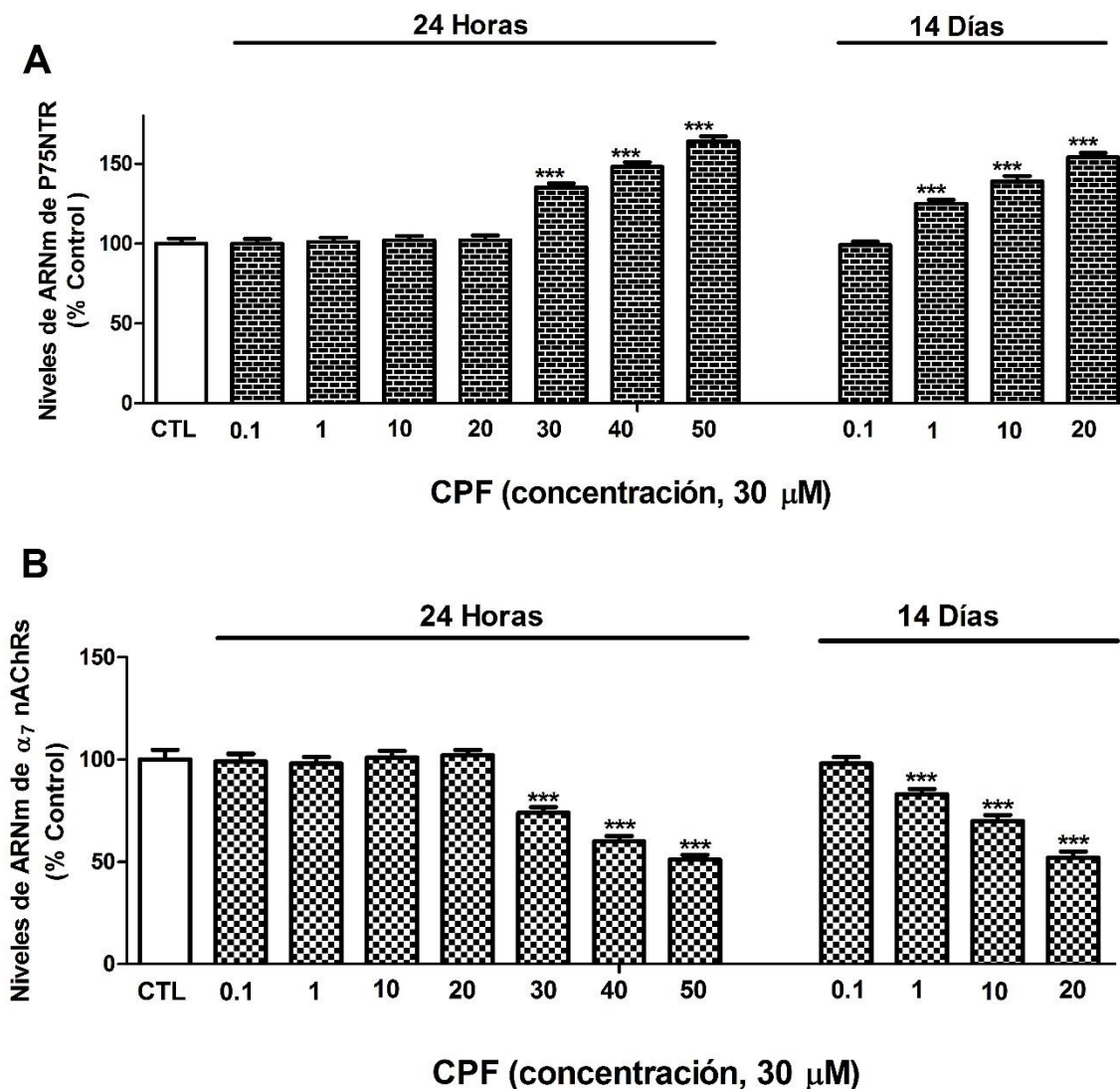
**Figura 12.** Efecto sobre la expresión génica de (A) AChE-S y (B) AChE-R tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control.

Por otra parte, la expresión de CHT se redujo después de la exposición a largo plazo a CPF a partir de la concentración de 1  $\mu\text{M}$  (Figura 13). Sin embargo, la expresión de ChAT y VAcHT no se vieron afectadas a ninguna concentración y tiempo de exposición.



**Figura 13.** Efecto sobre la expresión génica de CHT tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control.

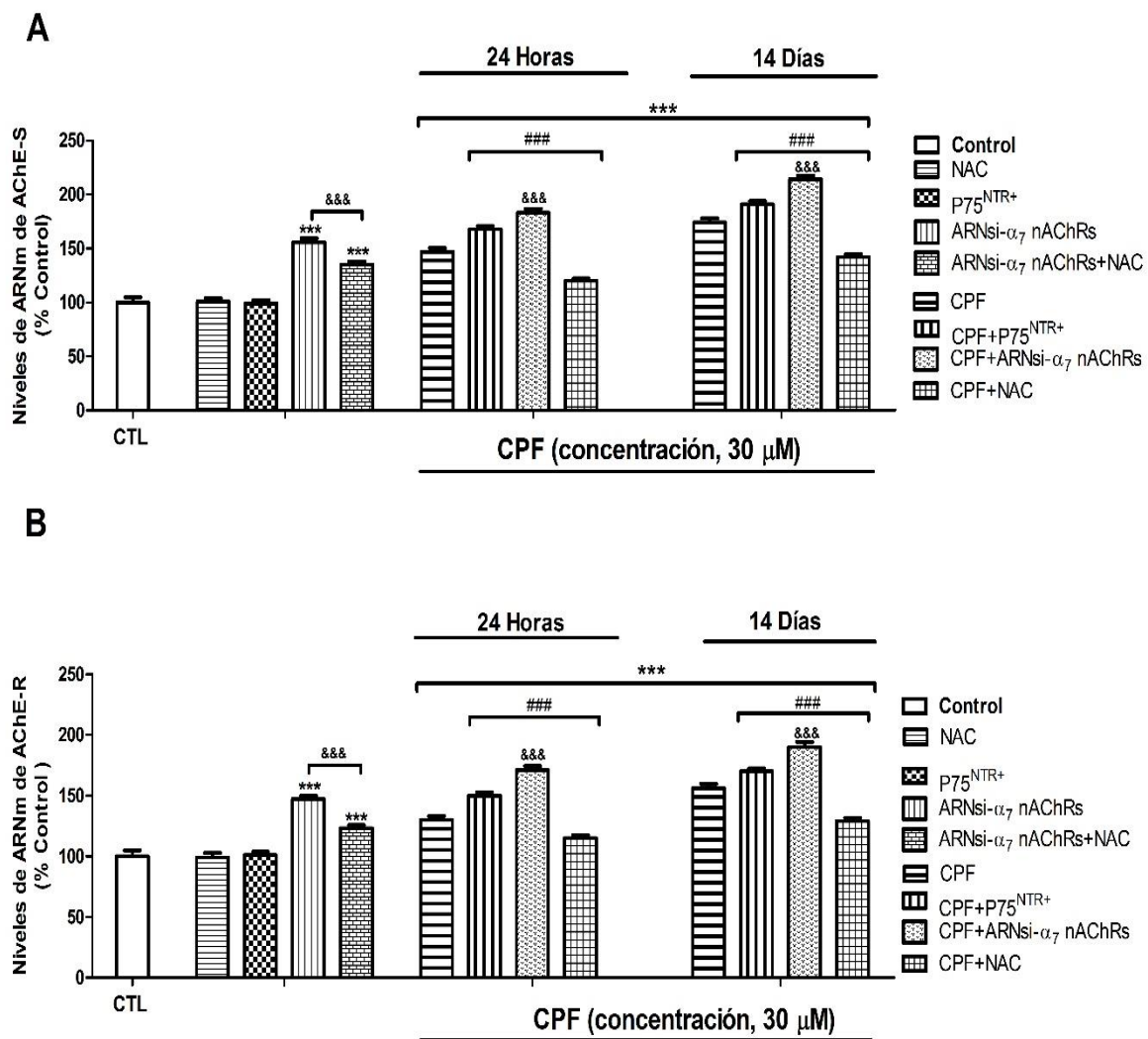
Además, observamos que se indujo y se disminuyó de manera significativa la expresión génica de P75<sup>NTR</sup> y  $\alpha_7$ -nAChR, respectivamente, de una manera concentración-dependiente (Figura 14A y 14B).



**Figura 14.** Efecto sobre la expresión genica de (A) P75<sup>NTR</sup> y (B) α<sub>7</sub>-nAChR tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. Los datos representan la media ± DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\*p<0.001 comparado con el control.

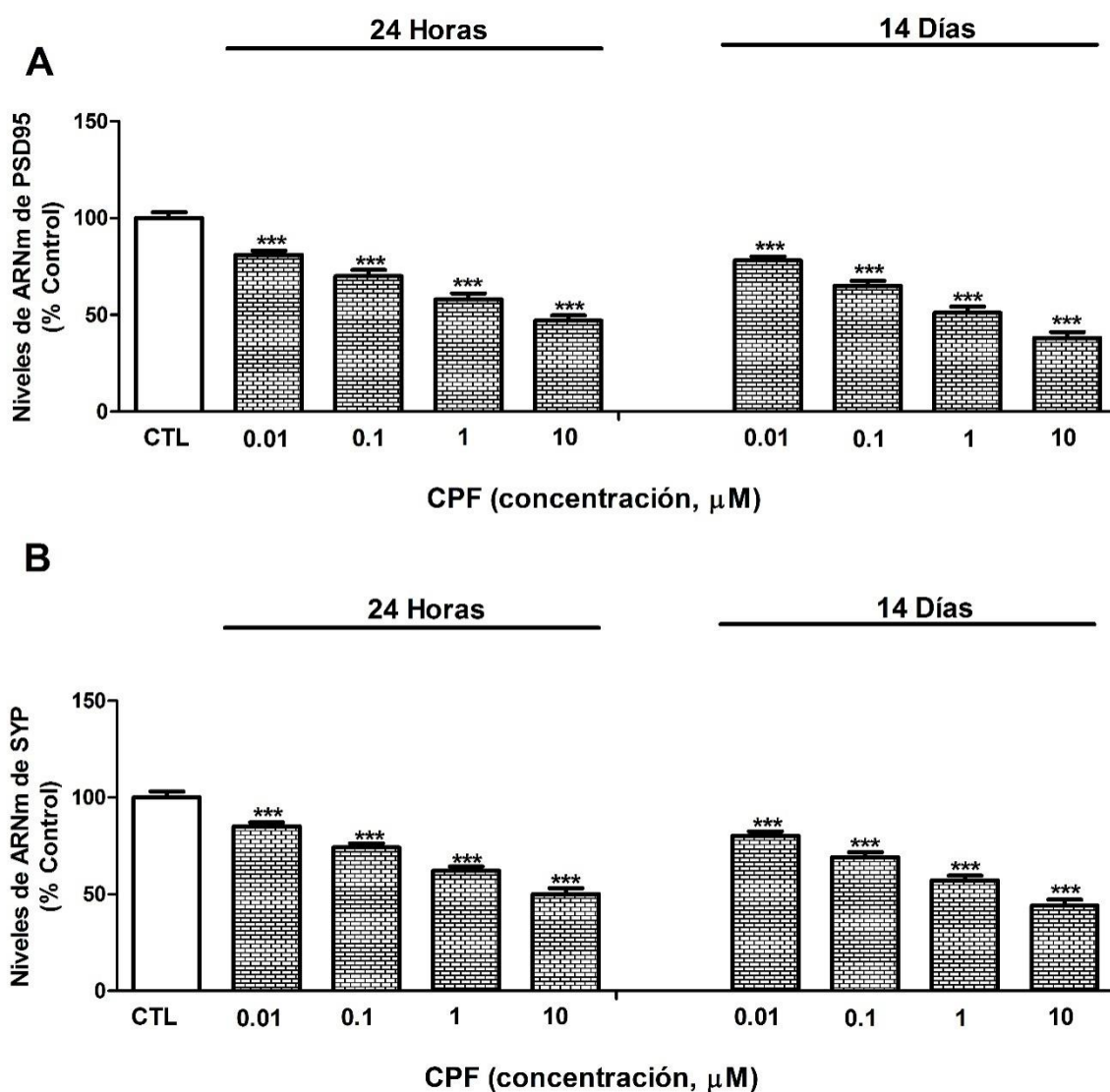
Además, el silenciamiento de α<sub>7</sub>-nAChR indujo un aumento de la expresión génica de AChE-S y AChE-R, aunque la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> no indujo ningún efecto (Figura 15A y 15B). El tratamiento con NAC de las células SN56 no transfectadas no indujo una alteración en la expresión de AChE-S o AChE-R, pero el co-tratamiento con NAC y CPF de las células silenciadas para α<sub>7</sub>-nAChR atenuó de forma parcial la sobreexpresión de AChE-S o AChE-R. Después de 24 h y 14 días de tratamiento con CPF de células SN56 silenciadas para α<sub>7</sub>-nAChR

o con sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>, se observó un mayor incremento en la expresión de AChE-S o AChE-R que el producido después del tratamiento individual con CPF o después del silenciamiento  $\alpha_7$ -nAChR, en el caso de  $\alpha_7$ -nAChR. Por otra parte, el co-tratamiento con NAC y CPF produjo una atenuación en el incremento de la expresión génica de AChE-S y AChE-R observado después del tratamiento individual con CPF, pero no fue completa (Fig. 15A y 15B).

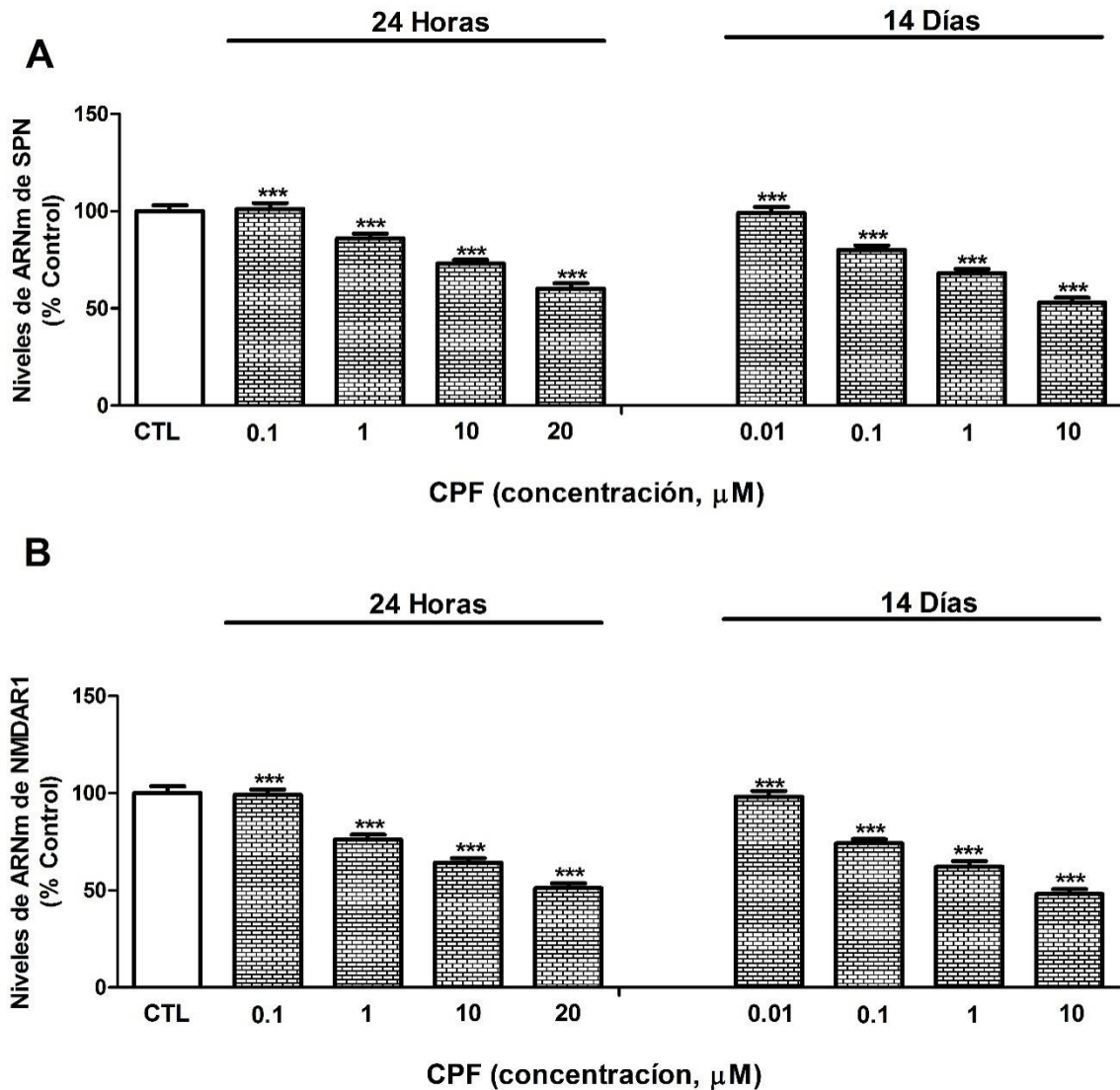


**Figura 15.** Efecto del estrés oxidativo,  $\alpha_7$ -nAChRs y P75<sup>NTR</sup> sobre la expresión génica de (A) AChE-S y (B) AChE-R tras 24 h y 14 días de exposición a CPF (30  $\mu$ M). Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p$ <0.001 comparado con el control. ### $p$ <0.001 comparado con el tratamiento de CPF. &&& $p$ <0.001 comparado con el silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChRs.

Por último, se observó después de la exposición aguda (de 0,01  $\mu\text{M}$ ) y a largo plazo (de 0,01  $\mu\text{M}$ ) a CPF, una reducción en la expresión de los genes PSD95 y SYP dependiente de la concentración (Fig. 16A y 16B), pero sólo hemos encontrado una reducción de la expresión de SPN y NMDANR1 dependiente de la concentración después de la exposición aguda a partir de la concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  de CPF y después de la exposición a largo plazo a partir de la concentración de 0,01  $\mu\text{M}$  de CPF (Fig. 17C y 17D).



**Figura 16.** Efecto sobre la expresión génica de (A) PSD95 y (B) SYP tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control.



**Figura 17.** Efecto sobre la expresión génica de (A) SPN y (B) NMDAR1 tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control.

La transfección de células con ARN de silenciamiento control no mostró ningún efecto sobre la expresión génica de ChAT (Figura 7A), AChE (Figura 7B) y  $\alpha_7$ -nAChR (Figura 10B), pero el silenciamiento de ChAT y AChE y  $\alpha_7$ -nAChR causó grandes reducciones en la expresión del gen ChAT (Figura 7A), AChE (Figura 7B) y  $\alpha_7$ -nAChR (Figura 9B). La transfección con el plásmido de expresión con P75<sup>NTR</sup> incrementó la expresión de P75<sup>NTR</sup> (Figura 9B).

## 5.5. El análisis de PCR Array en tiempo real

Después de la incubación durante 24 h y 14 días con concentraciones de 0,01  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$  de CPF en células SN56, se analizó el perfil de expresión génica de las vías de muerte por necrosis y apoptosis mediante un PCR array. El perfil de expresión génica en células tratadas con CPF fue significativamente diferente de los cultivos control. Los resultados muestran que después de 24 h y 14 días de exposición a una concentración de 0,01  $\mu\text{M}$  de CPF sólo se indujo la expresión de los genes proapoptóticos TNF, TNFRSF1A, TNFRSF10A, TNFRSF11B, los genes antiapoptóticos TRAF2, BICR2 y BIRC3 y los genes relacionados con el proceso de necrosis MAG, S100A7A y KCN1P1 (Tabla 10).

Por otra parte, después de 24 h de exposición a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  de CPF, 27 genes fueron sobreexpresados y en 5 genes se redujo su expresión por encima o por debajo de 1,5 veces, respectivamente, en comparación con el control (Tabla 11). Además, después de la exposición durante 14 días a una concentración de 0,01  $\mu\text{M}$  de CPF se observó el mismo efecto que a las 24 h de exposición a esta dosis, pero tras 14 días a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  de CPF, 43 genes fueron sobreexpresados y 7 genes redujeron su expresión por encima o por debajo de 1,5 veces, respectivamente, en comparación con el control (Tabla 11).

**Tabla 10.** Perfil de expresión génica de las principales vías de muerte tras el tratamiento a concentraciones de 0,01  $\mu$ M y 30  $\mu$ M de CPF durante 24 h en células SN56. En azul y rojo se representa los genes cuya expresión es reprimida o sobreexpresada respectivamente 2 veces por encima del 100%.

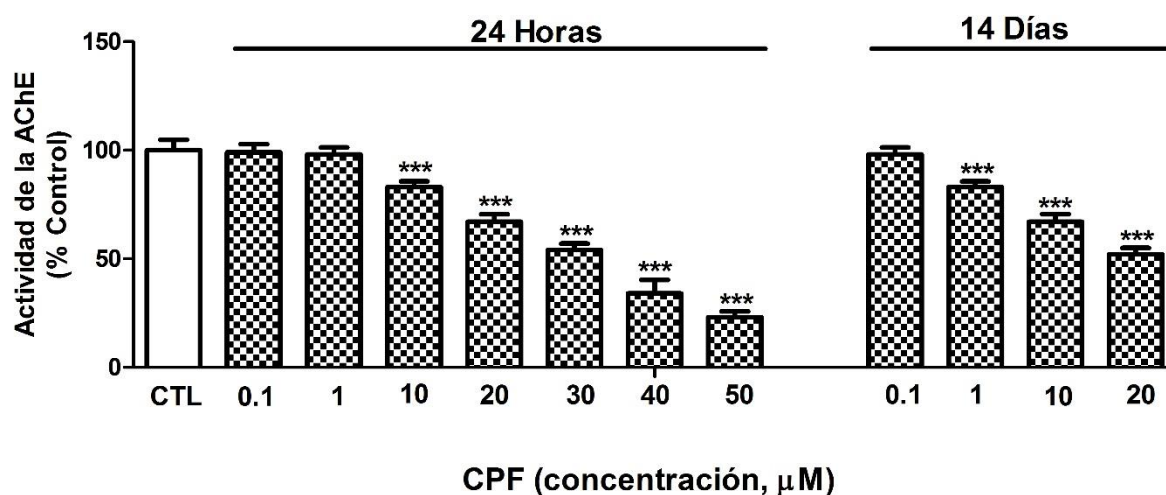
Nombre	N de referencia del banco de genes	N de veces de doblado del 100%		Nombre	N de referencia del banco de genes	N de veces de doblado del 100%	
		0.01 $\mu$ M	30 $\mu$ M			0.01 $\mu$ M	30 $\mu$ M
ABL1	NM_005157	1,11 <sup>b</sup>	1,23 <sup>a</sup>	FOXI1	NM_012188	1,12 <sup>a</sup>	0,07
AKT1	NM_005163	1,02	1,05	GAA	NM_000152	1,09	1,19 <sup>a</sup>
APAF1	NM_001160	1,15 <sup>b</sup>	2,52 <sup>a</sup>	GADD45A	NM_001924	1,11 <sup>a</sup>	2,24 <sup>a</sup>
APP	NM_000484	1,16 <sup>a</sup>	1,41 <sup>a</sup>	GALNT5	NM_014568	1,03	1,05
ATG12	NM_004707	1,17 <sup>a</sup>	1,13 <sup>a</sup>	GRB2	NM_002086	1,06	1,09
ATG16L1	NM_017974	1,21 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>	HSPBAP1	NM_024610	1,05	1,13 <sup>a</sup>
ATG3	NM_022488	1,04	1,11 <sup>a</sup>	HTT	NM_002111	1,06	1,23 <sup>a</sup>
ATG5	NM_004849	1,01	1,21 <sup>a</sup>	IFNG	NM_000619	1,07	1,08
ATG7	NM_006395	1,04	1,04	IGF1	NM_000618	1,01	1,14 <sup>a</sup>
ATP6V1G2	NM_130463	1,02	1,02	IGF1R	NM_000875	1,02	1,09
BAX	NM_004324	1,05	2,54 <sup>a</sup>	INS	NM_000207	1,07	1,11 <sup>b</sup>
BCL2	NM_000633	1,10 <sup>b</sup>	1,15 <sup>a</sup>	IRGM	NM_001145805	1,13 <sup>b</sup>	1,28 <sup>a</sup>
BCL2A1	NM_004049	1,02	1,04	JPH3	NM_020655	1,09	1,06
BCL2L1	NM_138578	1,13 <sup>a</sup>	2,23 <sup>a</sup>	KCNIP1	NM_014592	2,51 <sup>a</sup>	3,21 <sup>a</sup>
BCL2L11	NM_006538	1,01	2,32 <sup>a</sup>	MAG	NM_002361	2,12 <sup>a</sup>	2,69 <sup>a</sup>
BECN1	NM_003766	1,03	1,06	MAP1LC3A	NM_181509	1,08	2,35 <sup>a</sup>
BIRC2	NM_001166	1,72 <sup>a</sup>	-1,43 <sup>a</sup>	MAPK8	NM_002750	1,07	1,17 <sup>b</sup>
BIRC3	NM_001165	1,69 <sup>a</sup>	-1,59 <sup>a</sup>	MCL1	NM_021960	1,14 <sup>a</sup>	1,27 <sup>a</sup>
BMF	NM_033503	1,06	1,06	NFKB1	NM_003998	1,02	1,06
C1orf159	NM_017891	1,13 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>	NOL3	NM_003946	1,05	1,04
CASP1	NM_033292	1,05	2,21 <sup>a</sup>	OR10J3	NM_001004467	1,01	1,07
CASP2	NM_032982	1,01	1,09	PARP1	NM_001618	1,11 <sup>a</sup>	1,03
CASP3	NM_004346	1,05	1,57 <sup>a</sup>	PARP2	NM_005484	1,06	1,01
CASP6	NM_032992	1,06	1,25 <sup>a</sup>	PIK3C3	NM_002647	1,07	1,05
CASP7	NM_001227	1,02	2,31 <sup>a</sup>	PVR	NM_006505	1,06	1,10 <sup>a</sup>
CASP9	NM_001229	1,01	1,69 <sup>a</sup>	RAB25	NM_020387	1,03	1,02
CCDC103	NM_213607	1,07	1,05	RPS6KB1	NM_003161	1,27 <sup>a</sup>	1,31 <sup>a</sup>
CD40	NM_001250	1,08	3,31 <sup>a</sup>	S100A7A	NM_176823	2,17 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup>
CD40LG	NM_000074	1,06	3,56 <sup>a</sup>	SNCA	NM_000345	1,06	1,25 <sup>a</sup>
CFLAR	NM_003879	1,21 <sup>a</sup>	1,11 <sup>a</sup>	SPATA2	NM_006038	1,12 <sup>a</sup>	2,41 <sup>a</sup>
COMMD4	NM_017828	1,02	1,02	SQSTM1	NM_003900	1,17 <sup>a</sup>	1,12 <sup>a</sup>
CTSB	NM_001908	1,13 <sup>a</sup>	1,05	SYCP2	NM_014258	1,03	1,66 <sup>a</sup>
CTSS	NM_004079	1,08	1,04	TMEM57	NM_018202	1,11 <sup>a</sup>	1,15 <sup>a</sup>
CYLD	NM_015247	1,12 <sup>a</sup>	1,08	TNF	NM_000594	1,53 <sup>a</sup>	1,69 <sup>a</sup>
DEFB1	NM_005218	1,01	1,01	TNFRSF10A	NM_003844	1,61 <sup>a</sup>	1,78 <sup>a</sup>
DENND4A	NM_005848	1,03	1,33 <sup>a</sup>	TNFRSF11B	NM_002546	2,01 <sup>b</sup>	2,37 <sup>b</sup>
DFFA	NM_004401	1,05	1,09	TNFRSF1A	NM_001065	1,75 <sup>a</sup>	1,91 <sup>a</sup>
DPYSL4	NM_006426	1,01	1,05	TP53	NM_000546	1,10	1,67 <sup>a</sup>
EIF5B	NM_015904	1,03	1,33 <sup>b</sup>	TRAF2	NM_021138	2,22 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup>
ESR1	NM_000125	1,04	1,07	TXNL4B	NM_017853	1,01	1,69 <sup>a</sup>
FAS	NM_000043	1,02	2,31 <sup>a</sup>	ULK1	NM_003565	1,02	1,04
FASLG	NM_000639	1,06	2,13 <sup>a</sup>	XIAP	NM_001167	1,05	1,01

**Tabla 11.** Perfil de expresión génica de las principales vías de muerte tras el tratamiento a concentraciones de 0,01  $\mu$ M y 30  $\mu$ M de CPF durante 14 días en células SN56. En azul y rojo se representa los genes cuya expresión es reprimida o sobreexpresada respectivamente 2 veces por encima del 100%.

Nombre	N de referencia del banco de genes	N de veces de doblado del 100%		Nombre	N de referencia del banco de genes	N de veces de doblado del 100%	
		0.01 $\mu$ M	30 $\mu$ M			0.01 $\mu$ M	30 $\mu$ M
		ABL1	NM_005157			1,15 <sup>b</sup>	1,32 <sup>a</sup>
AKT1	NM_005163	1,07	1,08	GAA	NM_000152	1,04	1,32 <sup>a</sup>
APAF1	NM_001160	1,18 <sup>a</sup>	2,56 <sup>a</sup>	GADD45A	NM_001924	1,14 <sup>a</sup>	2,22 <sup>a</sup>
APP	NM_000484	1,19 <sup>a</sup>	1,31 <sup>a</sup>	GALNT5	NM_014568	1,06	-1,64
ATG12	NM_004707	1,18 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>	GRB2	NM_002086	1,04	2,51 <sup>a</sup>
ATG16L1	NM_017974	1,19 <sup>a</sup>	1,33 <sup>a</sup>	HSPBAP1	NM_024610	1,07	1,69 <sup>a</sup>
ATG3	NM_022488	1,07	1,19 <sup>a</sup>	HTT	NM_002111	1,03	1,13 <sup>a</sup>
ATG5	NM_004849	1,04	1,62 <sup>a</sup>	IFNG	NM_000619	1,05	1,02
ATG7	NM_006395	1,03	1,84 <sup>a</sup>	IGF1	NM_000618	1,06	1,16 <sup>a</sup>
ATP6V1G2	NM_130463	1,01	1,59 <sup>a</sup>	IGF1R	NM_000875	1,03	1,05
BAX	NM_004324	1,09	2,69 <sup>a</sup>	INS	NM_000207	1,06	1,11 <sup>a</sup>
BCL2	NM_000633	1,13 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>	IRGM	NM_001145805	1,10 <sup>b</sup>	1,29 <sup>a</sup>
BCL2A1	NM_004049	1,05	1,08	JPH3	NM_020655	1,05	2,38 <sup>a</sup>
BCL2L1	NM_138578	1,08	2,27 <sup>a</sup>	KCNIP1	NM_014592	2,62 <sup>a</sup>	-3,67 <sup>a</sup>
BCL2L11	NM_006538	1,07	2,34 <sup>a</sup>	MAG	NM_002361	2,25 <sup>a</sup>	-3,42 <sup>a</sup>
BECN1	NM_003766	1,07	1,09	MAP1LC3A	NM_181509	1,04	2,42 <sup>a</sup>
BIRC2	NM_001166	1,86 <sup>a</sup>	-1,62 <sup>a</sup>	MAPK8	NM_002750	1,02	1,21 <sup>b</sup>
BIRC3	NM_001165	1,82 <sup>a</sup>	-1,53 <sup>a</sup>	MCL1	NM_021960	1,10 <sup>b</sup>	1,29 <sup>a</sup>
BMF	NM_033503	1,09	2,95 <sup>a</sup>	NFKB1	NM_003998	1,03	1,07
C1orf159	NM_017891	1,12 <sup>a</sup>	3,76 <sup>a</sup>	NOL3	NM_003946	1,06	1,02
CASP1	NM_033292	1,02	2,19 <sup>a</sup>	OR10J3	NM_001004467	1,05	-3,67 <sup>a</sup>
CASP2	NM_032982	1,03	1,15 <sup>a</sup>	PARP1	NM_001618	1,13 <sup>a</sup>	1,74 <sup>a</sup>
CASP3	NM_004346	1,07	1,72 <sup>a</sup>	PARP2	NM_005484	1,02	1,81 <sup>a</sup>
CASP6	NM_032992	1,04	1,23 <sup>a</sup>	PIK3C3	NM_002647	1,05	2,28 <sup>a</sup>
CASP7	NM_001227	1,03	2,22 <sup>a</sup>	PVR	NM_006505	1,08	1,49 <sup>a</sup>
CASP9	NM_001229	1,06	1,68 <sup>a</sup>	RAB25	NM_020387	1,04	1,04
CCDC103	NM_213607	1,13 <sup>a</sup>	2,31 <sup>a</sup>	RPS6KB1	NM_003161	1,15 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>
CD40	NM_001250	1,08	4,48 <sup>a</sup>	S100A7A	NM_176823	2,28 <sup>a</sup>	-2,73 <sup>a</sup>
CD40LG	NM_000074	1,06	3,16 <sup>a</sup>	SNCA	NM_000345	1,03	1,29 <sup>a</sup>
CFLAR	NM_003879	1,21 <sup>a</sup>	1,27 <sup>a</sup>	SPATA2	NM_006038	1,10 <sup>b</sup>	2,36 <sup>a</sup>
COMMD4	NM_017828	1,02	2,12 <sup>a</sup>	SQSTM1	NM_003900	1,12 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>
CTSB	NM_001908	1,13 <sup>a</sup>	2,52 <sup>a</sup>	SYCP2	NM_014258	1,05	1,67 <sup>a</sup>
CTSS	NM_004079	1,05	2,26	TMEM57	NM_018202	1,13 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>
CYLD	NM_015247	1,10 <sup>b</sup>	2,22 <sup>a</sup>	TNF	NM_000594	1,59 <sup>a</sup>	1,66 <sup>a</sup>
DEFB1	NM_005218	1,04	1,93 <sup>a</sup>	TNFRSF10A	NM_003844	1,72 <sup>a</sup>	1,79 <sup>a</sup>
DENND4A	NM_005848	1,01	1,35 <sup>b</sup>	TNFRSF11B	NM_002546	2,14 <sup>b</sup>	2,26 <sup>b</sup>
DFFA	NM_004401	1,03	1,03	TNFRSF1A	NM_001065	1,83 <sup>a</sup>	1,91 <sup>a</sup>
DPYSL4	NM_006426	1,06	2,81	TP53	NM_000546	1,18	1,85 <sup>a</sup>
EIF5B	NM_015904	1,01	1,33 <sup>b</sup>	TRAF2	NM_021138	2,31 <sup>a</sup>	3,14 <sup>a</sup>
ESR1	NM_000125	1,02	1,01	TXNL4B	NM_017853	1,11	1,69 <sup>a</sup>
FAS	NM_000043	1,05	2,36 <sup>a</sup>	ULK1	NM_003565	1,09	1,02
FASLG	NM_000639	1,03	2,46 <sup>a</sup>	XIAP	NM_001167	1,06	1,04

## 5.6. Determinación de la actividad de la AChE

Se evaluó la actividad de la AChE en el lisado de células SN56 tras la exposición a concentraciones crecientes de CPF durante 24 h y 14 días. Se observó una disminución significativa en la actividad de AChE a partir de las concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  tras 24 h y 14 días de exposición, respectivamente (Figura 18). El efecto del CPF sobre la actividad AChE podría estar enmascarado por la pérdida de células, pero dado que los resultados se normalizaron con la concentración de proteínas, la reducción de la actividad AChE parece ser debida a un efecto directo del CPF sobre esta enzima.



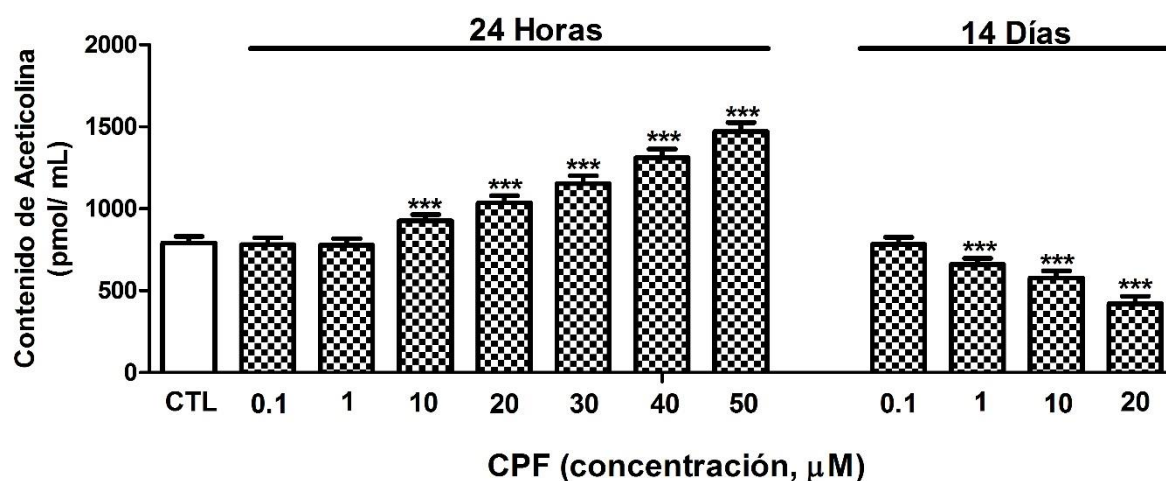
**Figura 18.** Efecto sobre la actividad de la AChE tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control.

## 5.7. Determinación de la actividad de la ChAT

La actividad de la colina acetiltransferasa en las células SN56 se midió después de 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. La actividad de la colina acetiltransferasa no se vio afectada en ninguna concentración y tiempo de exposición.

## 5.8. Medición de los niveles de acetilcolina

Los niveles de ACh se evaluaron en el sobrenadante del cultivo de células después de 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. Los niveles de ACh se incrementaron significativamente después de 24 h de exposición CPF a partir de la concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Por otra parte, después de la exposición a largo plazo a CPF los niveles de ACh se redujeron a partir de la concentración 1  $\mu\text{M}$  (Figura 19).

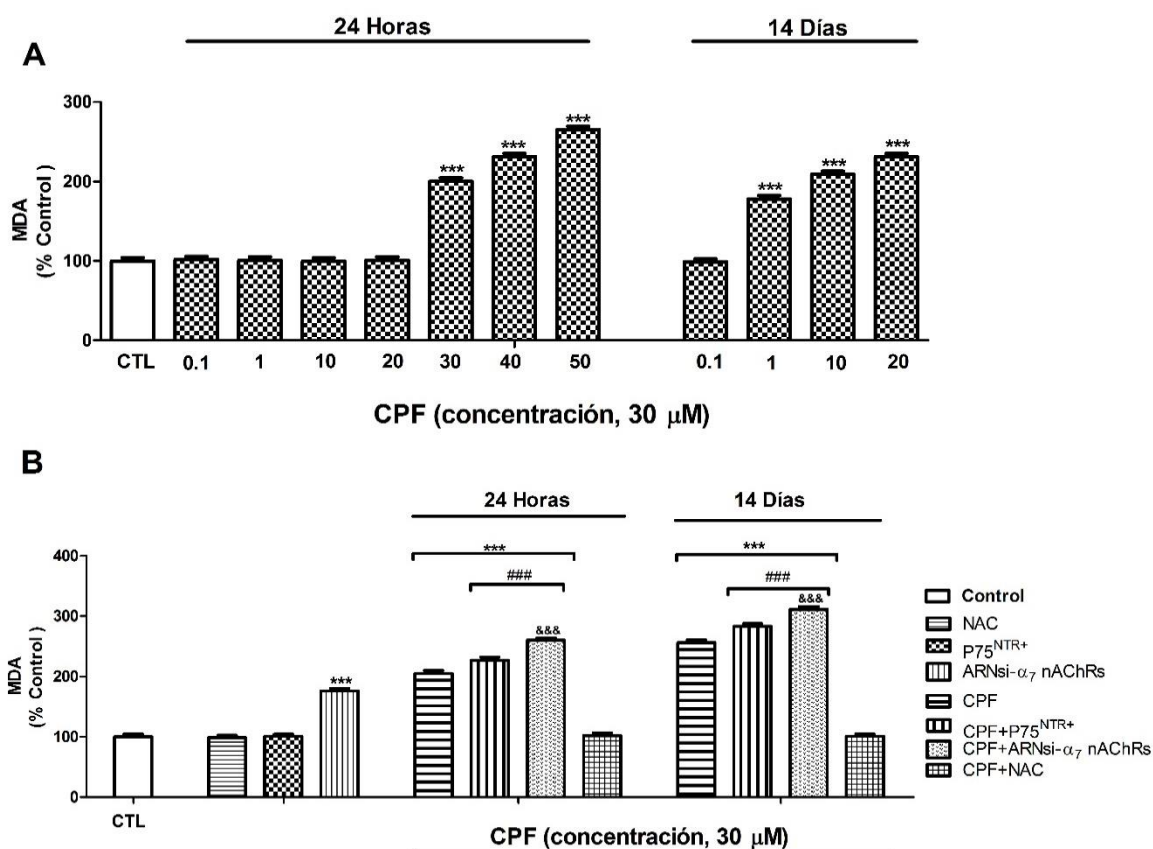


**Figura 19.** Efecto sobre el contenido de ACh tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control.

## 5.9. Ensayo de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se midió en las células SN56 después de la exposición durante 24 h y a largo plazo a concentraciones crecientes de CPF. El tratamiento con CPF indujo un aumento en los niveles de MDA en una manera dependiente de la concentración desde las concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente, en comparación con el grupo control, lo que indica el aumento de la peroxidación lipídica (Figura 20A). Por otra parte, el tratamiento

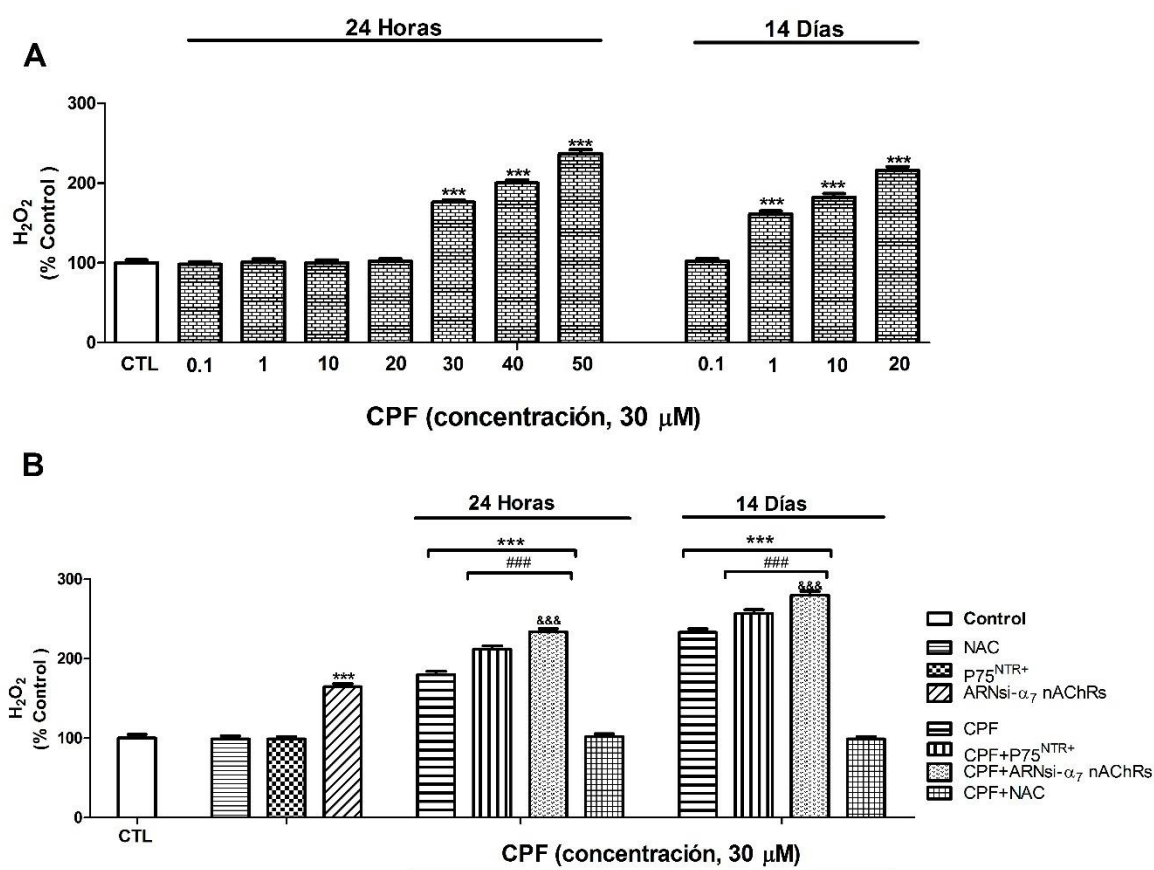
con NAC o la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> no indujo un aumento en los niveles de MDA. El silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR indujo un aumento de los niveles de MDA. Además, después del tratamiento durante 24 h y 14 días con CPF (30  $\mu$ M) de las células silenciadas para  $\alpha_7$ -nAChR o con sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>, se observó un mayor incremento de los niveles de MDA que el producido después del silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR o la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>, respectivamente, o después del tratamiento solo con CPF. Por último, el co-tratamiento con CPF y NAC a corto y largo plazo de células sin transfectar produjo una atenuación completa del aumento de los niveles de MDA observados después del tratamiento individual con CPF (Figura 20B).



**Figura 20.** Efecto sobre el contenido de MDA tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF (A). Efecto de  $\alpha_7$ -nAChRs y P75<sup>NTR</sup> sobre el contenido de MDA tras 24 h y 14 días de exposición a CPF (30  $\mu$ M). Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p$ <0.001 comparado con el control. ### $p$ <0.001 comparado con el tratamiento de CPF. &&& $p$ <0.001 comparado con el silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChRs.

## 5.10. Medición de los niveles de peróxido de hidrógeno

El  $H_2O_2$  es un subproducto metabólico de oxígeno reactivo que sirve como un regulador clave de una serie de estados relacionados con el estrés oxidativo. Después de 24 h y 14 días de tratamiento con CPF, el contenido de peróxido de hidrógeno aumentó de una manera dependiente de la concentración desde las concentraciones de  $30 \mu M$  y  $1 \mu M$ , respectivamente, en comparación con el grupo control (Figura 21A).

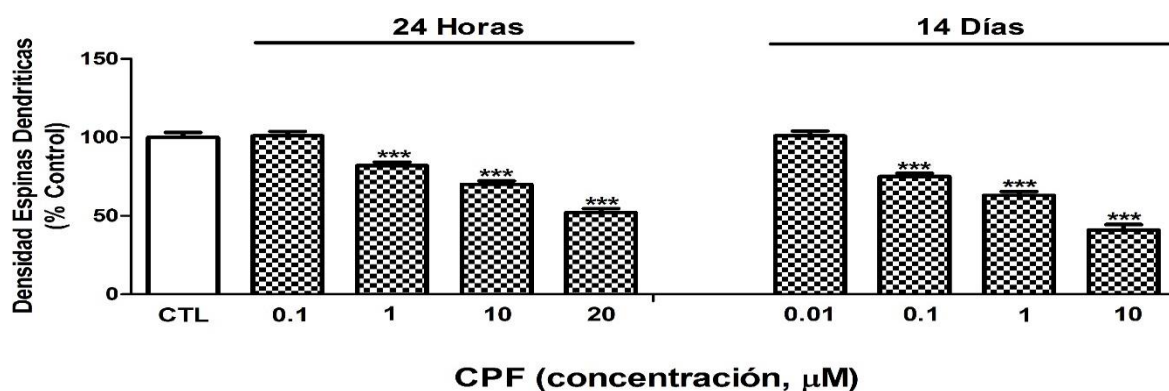


**Figura 21.** Efecto sobre el contenido de  $H_2O_2$  tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF (A). Efecto de  $\alpha_7$ -nAChRs y P75<sup>NTR</sup> sobre el contenido de  $H_2O_2$  tras 24 h y 14 días de exposición a CPF ( $30 \mu M$ ). Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control. ### $p < 0.001$  comparado con el tratamiento de CPF. &&& $p < 0.001$  comparado con el silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChRs.

El tratamiento con NAC o la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> no indujo ningún efecto sobre el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otra parte, el silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR indujo un aumento del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, después del tratamiento con CPF (30  $\mu$ M) durante 24 h y 14 días de las células silenciadas para  $\alpha_7$ -nAChR o con sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>, se observó un mayor incremento del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que el producido tras el silenciamiento individual de  $\alpha_7$ -nAChR o la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>, respectivamente, o después del tratamiento individual con CPF. Finalmente, el co-tratamiento con CPF y NAC a corto y largo plazo de las células sin transfectar produjo una atenuación completa del aumento del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observado después del tratamiento individual con CPF (Figura 21B).

### 5.11. Efecto de la CPF sobre la densidad de las espinas dendríticas

El tratamiento con CPF induce tras la exposición durante 24 h (desde 1  $\mu$ M) y 14 días (desde 0,1  $\mu$ M), de forma concentración-dependiente, una reducción en el número espinas dendríticas por longitud de neurita, en comparación con los controles en neuronas SN56 (Figura 22). No hubo efecto del tratamiento sobre el tamaño medio de soma o el número de neuritas por neurona.



**Figura 22.** Efecto sobre la densidad de las espinas dendríticas tras 24 h y 14 días de exposición a concentraciones crecientes de CPF. Los datos representan la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes en triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el control.

## **DISCUSION DE LOS RESULTADOS**

## **6. DISCUSION**

Los resultados de nuestra investigación demuestran que el CPF induce tras exposición aguda (desde 30  $\mu\text{M}$ ) y a largo plazo (desde 1  $\mu\text{M}$ ), muerte celular, concentración-dependiente, en las neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal. Estos resultados son similares a los descritos en trabajos anteriores tras la exposición aguda (Rush et al., 2010), aunque las concentraciones a partir de las cuales se indujo la muerte celular tras 14 días de exposición a CPF fueron menores que las que se ha descrito previamente que inducían la muerte celular en la región CA1 de cortes de hipocampo tras 8 días de tratamiento del cultivo con CPF (desde 100  $\mu\text{M}$ ), lo que podría ser debido al hecho de que esta concentración era la más baja evaluada (Terry et al., 2003). Se observó la activación de las caspasas 3/7 en el mismo intervalo de concentraciones, lo que confirma los resultados obtenidos de viabilidad celular y sugiere que la apoptosis es uno de los mecanismos de muerte que intervienen en la reducción neuronal observada. Estos resultados son similares a los descritos en trabajos previos que mostraban que el CPF induce la muerte celular a través de la apoptosis (Coughlan et al., 2004; Ki et al., 2013; Saez-Valero et al., 1999). Además, la exposición aguda (desde 50  $\mu\text{M}$ ) y a largo plazo (desde 20  $\mu\text{M}$ ) a CPF induce, de manera concentración dependiente, necrosis en las neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal, como se observa a través de la liberación de LDH. Estos resultados son apoyados por trabajos previos que mostraron que el CPF induce necrosis neuronal tras exposiciones agudas y a largo plazo (Kammon et al., 2010; Nasr et al., 2016).

Por otra parte, evaluamos la expresión de los principales genes que regulan las rutas de muerte celular para entender mejor los mecanismos de inducción de la muerte. Nuestros resultados mostraron que tras la exposición aguda y a largo plazo a CPF (0,01  $\mu\text{M}$ ) sólo se observó una inducción en la expresión de los genes pro-apoptóticos TNF, TNFRSF1A,

TNFRSF10A, TNFRSF11B, de los genes anti-apoptóticos TRAF2, BIRC2, BIRC3 y de los genes relacionados con el proceso de necrosis MAG, S100A7A y KCN1P1. La apoptosis se activa a través de la vía extrínseca cuando los estímulos extracelulares y las citoquinas CD40L, FASLG, TNFSF10 y los receptores TNF- $\alpha$  activados por citoquinas, incluyendo los receptores FAS y los receptores de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (RFNTs) como TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF10B y CD40, son activados (Davies et al., 2004; Thorburn, 2004), aunque los inhibidores de la apoptosis BIRC3 y BIRC2, a través de TRAF2, pueden impedir su activación (Mahul-Mellier, 2012). De acuerdo con esto, el CPF podría activar la muerte celular a través de la vía extrínseca, aunque fue bloqueada por la activación de los inhibidores de la apoptosis. Por otra parte, los genes MAG y S100A7A se han relacionado con la inducción de necrosis (Hitomi et al., 2008) y se ha descrito que la expresión de KChIP1 desempeña un papel protector contra la muerte celular (necrosis y apoptosis) y la reducción de su expresión conduce a la inducción de muerte celular por necrosis (Del Pino et al., 2015b). Por lo tanto, la sobreexpresión de KChIP1 tras la exposición a CPF podría ser un mecanismo de protección contra la lesión celular producida por el CPF.

Además, la exposición aguda (30  $\mu$ M) a CPF produjo un incremento mayor o inferior a 1,5 veces la expresión de 29 genes relacionados con la apoptosis y necrosis. Nuestra investigación mostró que el CPF aumentó la expresión de CD40, CD40LG, FAS, FASLG, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF1A, TNFRSF11B, lo que probablemente condujo a inducción de la apoptosis a través de la vía extrínseca. El CPF también aumentó la expresión de TRAF2 y disminuyó la expresión de los genes antiapoptóticos BIRC3 y BIRC2, lo cual permite la activación de caspasas, que a su vez incrementaron su expresión. Además, el CPF indujo la expresión de GADD45A y TP53. Se ha demostrado que la vía de P53-GADD45A desempeña un papel principal en el control de la detención del ciclo celular en G2-M tras el daño producido

por ciertos agentes sobre el ADN (Wang et al., 1999; Jin et al., 2002), por lo que su inducción podría conducir a la detención del ciclo celular. El CPF también aumentó la expresión de los genes proapoptóticos BAX y BCL2L11 y del gen antiapoptótico BCL2L1 (Vogler, 2012), disminuyó la relación de BCL2/BAX que regula la inducción de apoptosis (Oltvai et al., 1993), y aumentó la expresión de las caspasas CASP1, CASP3, CASP7, CASP9 que ejecutan la apoptosis, lo cual condujo a la inducción de la apoptosis observada. Además, el CPF aumentó la expresión de los genes relacionados con la necrosis KCN1P1, MAG y S100A7A como ocurrió a concentraciones más bajas, lo que indica que la necrosis está bloqueada, como confirman los resultados de liberación de LDH.

Finalmente tras la exposición a largo plazo a CPF (30  $\mu$ M), además del efecto observado sobre los mismos genes comentados tras la exposición aguda, se produjo un aumento de la expresión de los genes ATP6VG2, BMF, CLORF159, CCDC103, COMMD4, CTSB, STSS, CYLD, DEFB1, DPYSL4, FOXIL1, GRB2, HSPBAP1, JPH3, PARP1, PARP2, PIK3C3, PVR, TXNL4B, así como una disminución de la expresión de los genes GALNTL5, OR10J3, KCN1P1, MAG y S100A7A todos ellos relacionados con el control de la inducción de la necrosis de acuerdo con la investigación de Hitomi et al. (2008), dando lugar a la inducción de necrosis como confirman los resultados de liberación de LDH a esta concentración de CPF a largo plazo. Nuestra investigación indica que el CPF induce la muerte celular de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal mediante la participación de las vías de apoptosis y necrosis.

Por otra parte, hemos observado que tras 24 h de exposición a CPF (desde 10  $\mu$ M) se produce un aumento de los niveles de ACh, así como una reducción tras la exposición a largo plazo (desde 1  $\mu$ M). Además, el CPF indujo una reducción de la actividad de la AChE tras la exposición aguda (desde 10  $\mu$ M) y a largo plazo (desde 1  $\mu$ M). También, la exposición a largo

plazo a CPF (desde 1  $\mu\text{M}$ ) indujo una reducción de la expresión génica de CHT, que está de acuerdo con la disminución de la expresión de CHT observada en el prosencéfalo basal de ratas expuestas a CPF durante 14 días (Terry et al., 2007). Por lo tanto, el aumento en los niveles de ACh podría estar relacionado con la inhibición de la AChE, y su disminución podría ser debido a la reducción de la viabilidad celular, pero como se produjo la disminución de la expresión de CHT, ésta es la causa más probable de la reducción de los niveles de ACh. Anteriormente se ha descrito que la ACh juega un papel en la supervivencia celular, a través de la activación del receptor colinérgico (Resende & Adhikari 2009), y una reducción en sus niveles podría aumentar la muerte celular, siendo éste un mecanismo probable que también podría mediar en la muerte celular observada en las neuronas colinérgicas tras la exposición repetida. Sin embargo, la co-incubación de ACh con CPF no fue capaz de reducir la muerte celular inducida por CPF, sugiriendo que otros mecanismos deben estar implicados. A este respecto, se ha descrito que el CPF es capaz de bloquear los receptores muscarínicos (Howard et al., 2007), lo que podría explicar el efecto observado en la viabilidad celular.

Además, el CPF no afectó la expresión de CHAT y VAcHT, aunque la expresión de AChE-S y R se incrementó tras la exposición aguda y a largo plazo al CPF (desde 30  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente), lo cual está de acuerdo con lo descrito en trabajos previos (Jameson et al., 2007). Algunos estudios han asociado el aumento en la transcripción de la variante AChE-R con un papel neuroprotector y de reparación, mientras que la sobreexpresión de la variante AChE-S, ya sea por sí sola o en combinación con un incremento de la variante AChE-R, se ha relacionado con la inducción de la apoptosis y necrosis (Greenberg et al., 2010; Zimmermann, 2013; Del Pino et al., 2014). En este sentido, Del Pino et al. (2014), mostraron que la sobreexpresión de las variantes AChE-R y AChE-S induce apoptosis y mayores niveles de expresión, necrosis en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, lo cual apoya nuestros

resultados. Por lo tanto, el aumento de la variante AChE-S podría ser la causa de la muerte celular apoptótica y necrótica observada, y el aumento de la variante AChE-R podría ser un mecanismo neuroprotector frente a los posibles efectos perjudiciales inducidos por la sobreexpresión de la variante AChE-S. Por otra parte, el silenciamiento de la expresión de la AChE, pero no el silenciamiento de la expresión de la ChAT, revirtió parcialmente la muerte celular inducida tanto por necrosis como por apoptosis, como se observó a través de la activación de las caspasas y la liberación de LDH. En este sentido, se ha demostrado que el silenciamiento de la AChE reduce la activación de las caspasas y la liberación de LDH (Pegan et al., 2010; Del Pino et al., 2014). Por lo tanto, estos datos apoyan que la sobreexpresión de la variante AChE-S podría estar implicada en la muerte celular observada en las neuronas colinérgicas septales tras la exposición a corto y a largo plazo, aunque otros mecanismos deben estar implicados.

Por otra parte, nuestros resultados han mostrado que el CPF induce, tras la exposición aguda (desde 30  $\mu$ M) y a largo plazo (desde 1  $\mu$ M), la generación de ERO y peroxidación lipídica, aumenta la expresión genica de P75<sup>NTR</sup> y disminuye la expresión de  $\alpha_7$ -nAChR de una manera concentración dependiente en la neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal. En este sentido, se ha descrito que el CPF, tras la exposición aguda y repetida, eleva ERO y aumenta los niveles de peroxidación lipídica, lo cual apoya nuestros hallazgos (Ambali & Ayo 2012; Ambali et al., 2010). Además, se ha descrito que la expresión de las proteínas P75<sup>NTR</sup> y  $\alpha_7$ -nAChR se redujo en el prosencéfalo basal de ratas tras 14 días de exposición a dosis bajas de CPF (Terry et al., 2007), aunque nosotros observamos el efecto opuesto sobre la expresión génica de P75<sup>NTR</sup>. Una posible explicación de esta contradicción es que en la investigación de Terry et al. (2007), la concentración de las proteínas P75<sup>NTR</sup> no se normalizó con la concentración de proteínas totales, y por lo tanto, el valor real de la concentración de proteína

P75<sup>NTR</sup> podría estar enmascarado debido a la reducción de las neuronas.

Además, el silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR indujo estrés oxidativo. El tratamiento de las células silenciadas para  $\alpha_7$ -nAChR o con sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> con CPF aumentó el estrés oxidativo inducido tras el tratamiento con CPF de las células no transfectadas o después del silenciamiento  $\alpha_7$ -nAChR o la sobreexpresión P75<sup>NTR</sup>, respectivamente, lo que sugiere que la disminución de la expresión de  $\alpha_7$ -nAChR y la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> por la exposición a CPF media parcialmente la generación de ERO. En apoyo de esta idea, se ha descrito que el receptor  $\alpha_7$ -nAChR elimina los radicales libres (Liu & Zhao, 2004) a través de la activación de la ruta NRF2/HO-1 (Egea et al., 2015), y la disminución en la expresión de  $\alpha_7$ -nAChR incrementa la peroxidación lipídica como resultado del aumento de la producción de ERO (Qi et al., 2007), tal y como nosotros hemos observado. El P75<sup>NTR</sup> se ha descrito que induce resistencia al estrés oxidativo, principalmente mediante el aumento de la síntesis de glutatión (Mi et al., 2009) y el aumento de la actividad de enzimas eliminadoras de ERO (Goss et al., 1997), mecanismos que son alterados por el CPF. Además, la reducción de la expresión de P75<sup>NTR</sup> se ha descrito que conduce a una disminución en la resistencia al estrés oxidativo (Mi et al., 2009). De este modo, la sobreexpresión observada de P75<sup>NTR</sup> debería proteger contra el estrés oxidativo, efecto que no es observado. Sin embargo, también se ha descrito que el CPF induce la formación de proteínas A $\beta$  (Salazar et al., 2011) que interactúan con P75<sup>NTR</sup>, conduciendo a la inducción de estrés oxidativo (Perini et al., 2002), por lo tanto, la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> podría aumentar su interacción con las proteínas A $\beta$  y, por tanto, la generación de ERO. Estos resultados muestran que ambos receptores están involucrados en la generación de ERO, pero otros mecanismos pueden estar implicados. En este sentido, la alteración de GSK-3 $\beta$ , que puede ser producida por el tratamiento con CPF (Chen et al., 2012), podría inducir la generación de ERO (Guidotti et al., 2015), contribuyendo a este efecto.

Se ha descrito previamente que en condiciones de estrés oxidativo se incrementa la transcripción de las variantes de la AChE (Bond et al., 2006; Hartl et al., 2011). Por otra parte, el silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR aumento la expresión de las variantes de la AChE y el tratamiento antioxidante de las células silenciadas para  $\alpha_7$ -nAChR atenuó parcialmente la sobreexpresión de las variantes de la AChE, lo que sugiere que  $\alpha_7$ -nAChR modula de forma parcial la expresión de las variantes de la AChE a través del estrés oxidativo. El tratamiento con CPF de las células silenciadas  $\alpha_7$ -nAChR o con sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> produjo un mayor incremento en la inducción de la sobreexpresión de las variantes de la AChE. El co-tratamiento con CPF y NAC atenuó parcialmente la sobreexpresión de las variantes de la AChE. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> media de una manera indirecta la sobreexpresión de las variantes de la AChE, posiblemente a través de la inducción de estrés oxidativo y que otros mecanismos, además del estrés oxidativo, deben estar implicados. En este sentido, se ha descrito que el CPF bloquea los receptores muscarínicos (Howard et al., 2007) y se ha descrito que el bloqueo de los receptores muscarínicos M1 aumenta la expresión de estas variantes (Salmon et al., 2005), lo cual también podría contribuir a este efecto.

Las concentraciones que produjeron la alteración de la expresión génica de P75<sup>NTR</sup> y  $\alpha_7$ -nAChR y la generación de ERO son similares a las que previamente se ha descrito que inducen la muerte celular en estas neuronas (Del Pino et al., 2015c), lo que sugiere que estos mecanismos podrían estar implicados en este efecto. En este sentido, el silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR indujo muerte celular, pero la pérdida de células colinérgicas producida tras el tratamiento con CPF (30  $\mu$ M) de células silenciadas para  $\alpha_7$ -nAChR fue mayor que la producida tras el silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR o el tratamiento de CPF por separado, lo que sugiere que el receptor  $\alpha_7$ -nAChRs media parcialmente la muerte celular inducida por el CPF. El

mantenimiento del fenotipo colinérgico septo-hipocampal es realizado por acciones del receptor  $\alpha_7$ -nAChR y se ha descrito que una pérdida de  $\alpha_7$ -nAChR exacerba las primeras etapas del deterioro cognitivo y la patología septo-hipocampal en un modelo de EA en ratón (Hernández et al., 2010), lo cual apoya nuestros hallazgos. El tratamiento antioxidante de las células silenciadas para  $\alpha_7$ -nAChR revierte parcialmente la muerte celular inducida por el silenciamiento de  $\alpha_7$ -nAChR, lo que sugiere que otros mecanismos, además de la generación de ERO, están implicados en la inducción de muerte celular por la alteración de la expresión de  $\alpha_7$ -nAChR. Por otra parte, la incapacidad para reducir la muerte celular inducida por el CPF con la co-incubación de ACh a diferentes concentraciones con CPF podría ser debida al hecho de que el CPF disminuye la expresión de  $\alpha_7$ -nAChR y por lo tanto, las acciones de protección de la ACh fueron bloqueadas, aunque también podría ser debido al bloqueo de los receptores muscarínicos por el CPF (Howard et al., 2007), ya que la activación de algunos tipos de receptores muscarínicos es necesaria para la supervivencia celular (Budd et al., 2003; Budd et al., 2004; de Sarno et al., 2003; Lindenboim et al., 1995). Además, se ha descrito que el estrés oxidativo puede reducir la unión de los agonistas a  $\alpha_7$ -nAChR (Guan et al., 2003), lo cual también podría contribuir a este efecto.

Además, la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> no mostros ningún efecto sobre la viabilidad celular, pero el tratamiento con clorpirifós de estas células si que indujo una mayor disminución de la viabilidad celular con respecto al tratamiento con CPF individualmente indicando que esta sobreexpresión incrementa la vulnerabilidad de las neuronas ante agentes tóxicos. En este sentido, se ha descrito que la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>, como la que hemos observado, aumenta la vulnerabilidad neuronal y, en particular, de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, ante estímulos dañinos comunes, y que la administración de anticuerpos de anti-P75<sup>NTR</sup> reduce la pérdida de células colinérgicas e invierte el deterioro de la memoria espacial (Oh et al., 2000),

lo cual está de acuerdo con nuestros resultados. El co-tratamiento con antioxidante y CPF de las células con sobreexpresión para P75<sup>NTR</sup> atenuó parcialmente la disminución en la viabilidad de las células producida tras el silenciamiento de P75<sup>NTR</sup>, lo cual sugiere que otros mecanismos, además de la generación de ERO, están implicados en la inducción de muerte celular por la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>. En este sentido, como hemos indicado, el CPF puede inducir la producción de proteínas A $\beta$  que, al interaccionar, pueden inducir la muerte neuronal a través de la inducción de estrés oxidativo y por otros mecanismos. Además, la muerte celular inducida tras el tratamiento agudo y a largo plazo con CPF (30  $\mu$ M), fue parcialmente revertida a través de tratamiento antioxidante. El tratamiento antioxidante de células silenciadas para la AChE tratadas con CPF (30  $\mu$ M) no revirtió por completo la pérdida de células colinérgica, lo que sugiere que otros mecanismos también están implicados.

De acuerdo con todo lo expuesto anteriormente, otros mecanismos, además de los comentados previamente deben estar implicados en la muerte de estas neuronas por exposición al CPF. Se ha descrito que el CPF bloquea los receptores muscarínicos (Howard et al., 2007), impidiendo la transmisión colinérgica, lo que podría mediar el efecto observado en las neuronas colinérgicas, así como los déficits cognitivos. A este respecto, los estudios previos *in vitro* han demostrado que los agonistas muscarínicos (principalmente M1 y M3, aunque también M4) promueven la supervivencia celular (Budd et al., 2003; Budd et al., 2004; De Sarno et al., 2003; Lindenboim et al., 1995). Además, se ha descrito que el CPF incrementa la producción de proteínas A $\beta$  (Salazar et al., 2011), Tau y la hiperfosforilación de GSK-3 $\beta$  (Chen et al., 2012; Torres-Altó et al., 2011), las cuales se han relacionado con la inducción de muerte celular en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y en la EA (Kar et al., 2004), siendo también capaz de mediar este efecto. Se necesitan más estudios para determinar el resto de mecanismos a través de los cuales se producen estos efectos.

Estos resultados sugieren que el CPF induce la muerte celular mediada parcialmente por medio de la generación de estrés oxidativo, la sobreexpresión de la AChE y P75<sup>NTR</sup> y la reducción de la expresión de  $\alpha_7$ -nAChR. Además, nuestros resultados indican que  $\alpha_7$ -nAChR y P75<sup>NTR</sup> indujeron pérdida de células colinérgica en parte a través de la inducción de estrés oxidativo y que todos estos mecanismos median sus efectos parcialmente a través de la alteración de las variantes de la AChE. López-Granero et al. (2013b) describieron que la exposición alimentaria crónica a CPF en ratas produjo trastornos cognitivos y emocionales relacionados con los cambios en las isoformas de la AChE. Por otra parte, se ha descrito que la sobreexpresión de la variante AChE-S induce muerte de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal (Del Pino et al., 2014; Del Pino et al., 2015a). En este sentido, la pérdida de neuronas colinérgicas de prosencéfalo basal se ha relacionado con déficits cognitivos (Auld et al., 2002; Kar et al., 2004; Kesner et al., 1989; Madziar et al., 2005; Schliebs, 2005). De hecho, la gravedad del déficit de memoria está fuertemente correlacionada con el grado de pérdida de neuronas colinérgicas (Bierer et al., 1995). Por lo tanto, los efectos observados en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal pueden ser, en parte, responsables de los déficits de aprendizaje y los síntomas similares a los descritos en enfermedades neurodegenerativas observados tras la exposición aguda y a largo plazo al CPF.

Por otra parte, se observó que el CPF induce tras la exposición aguda (desde 1  $\mu$ M) y a largo plazo (desde 0,1  $\mu$ M) una reducción, concentración dependiente, en la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal. En este sentido, se ha descrito que el CPF induce una alteración en la densidad de las espinas dendríticas en la corteza prefrontal y el hipocampo tras la exposición aguda y repetida a dosis subclínicas, respectivamente (Oostingh et al., 2009; Speed et al., 2012), lo cual apoya nuestros resultados. La pérdida de espinas dendríticas observada en trastornos neurodegenerativos como la EA,

afecta principalmente a redes neuronales de importancia crítica para la regulación de los procesos de memoria y cognición, tales como el sistema colinérgico del prosencéfalo basal, las regiones medias temporales, el hipocampo y muchas áreas de asociación neocortical (Baloyannis, 2015) induciendo desórdenes cognitivos (Hains et al., 2015; Mandolesi et al., 2008). Además, se ha descrito la inducción de trastornos cognitivos a partir de dosis subclínicas de CPF y a dosis más bajas de las que producen pérdida de células colinérgicas del prosencéfalo basal (Terry et al., 2003), como sucede con la alteración de las espinas dendríticas, lo que sugiere que ambos procesos están implicados en la inducción de trastornos cognitivos, a dosis bajas sólo a través de la alteración de las espinas dendríticas y a dosis mayores a través de ambos mecanismos.

Además, se observó que tras la exposición aguda (desde 0,01  $\mu$ M) y a largo plazo (desde 0,01  $\mu$ M) a CPF, se produjo una disminución en la expresión génica de PSD95 y SYP. Se ha sugerido que SYP juega un papel en la formación y estabilización de las sinapsis (Tarsa & Goda, 2002), la regulación de la densidad y la morfología de las espinas dendríticas (Glantz et al., 2007; Li et al., 2011). Además, se ha descrito que PSD95 juega un papel en la determinación del tamaño y la fuerza de las sinapsis (Ehrlich & Malinow, 2004; Garner et al., 2000), la formación de las sinapsis (Garner et al., 2000) y la maduración de las espinas dendríticas (El-Husseini et al., 2000; Nikonenko et al., 2008). Por lo tanto, la alteración de ambos genes podría estar implicada en los efectos observados en las espinas dendríticas, siendo necesarios estudios posteriores para confirmarlo. Nuestros resultados muestran que la expresión de los genes PSD95 y SYP se alteró por debajo de la concentración a partir de la cual la disrupción de la densidad de las espinas dendríticas es evidente, lo que indica que los efectos nocivos de la exposición a CPF en las espinas dendríticas podrían iniciarse y detectarse antes de que sean manifiestos y estos genes podrían ser utilizados como biomarcadores de este efecto.

Además, PSD95 y SYP están involucrados en la regulación de la morfología de las espinas dendríticas y su alteración por la exposición a CPF también podría producir una alteración de la morfología de las mismas, lo cual podría contribuir a los trastornos cognitivos observados. Por otra parte, sólo se observó una reducción de la expresión génica de SPN y NMDANR1 concentración-dependiente tras la exposición aguda a CPF a partir de la concentración 1  $\mu$ M y después de la exposición a largo plazo a partir de la concentración 0,1  $\mu$ M, de igual modo que se produjo la reducción de la densidad de las espinas dendríticas, lo que sugiere que la alteración de ambos genes se correlaciona directamente con este efecto. En este sentido se ha descrito que el SPN, una proteína del citoesqueleto clave en la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas, modula la morfología de las espinas dendríticas y su número (Feng et al., 2000) y un aumento en la densidad de las espinas dendríticas se ha correlacionado con un aumento de la expresión de este gen (Hu et al., 2008). Además, el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), también está implicado en la plasticidad sináptica, así como en la regulación de los procesos de aprendizaje y memoria (Kannangara et al., 2014) y los antagonistas de este receptor reducen la densidad de las espinas dendríticas y el crecimiento de las neuritas (Zhang et al., 2016). Se necesitan más estudios para determinar la implicación de estos genes en los mecanismos de alteración de la morfología y la densidad de las espinas dendríticas.

Finalmente, el CPF indujo cambios en las rutas de muerte celular y de plasticidad de las espinas dendríticas a dosis inferiores a las requeridas para inducir de forma manifiesta estos efectos. Estos resultados apoyan la idea de que los cambios de expresión génica pueden usarse como una medida más sensible de los efectos tóxicos en las primeras etapas y a dosis más bajas, que la medida de otros indicadores toxicológicos típicos (Parfett et al., 2013), y que las alteraciones del perfil toxicogenómico proporcionan una herramienta útil para una determinación más precisa de los mecanismos toxicológicos en comparación con los

parámetros toxicológicos tradicionales y para reducir la incertidumbre en el establecimiento del LOAEL, del NOAEL, o las dosis de referencia (BMD) (Goldberg et al., 2004; Lobenhofer et al., 2004; Schlecht et al., 2006; Zheng et al., 2011). Por lo tanto, el análisis de los perfiles toxicogenómicos podría mejorar la evaluación del riesgo para la salud humana en general, con respecto a los resultados de las pruebas de toxicidad estándar. Previamente, este enfoque ha sido empleado en diferentes estudios como el publicado por Lobenhofer et al. (2004), que analizó *in vitro* las respuestas transcripcionales a concentraciones muy bajas de estrógeno, lo que confirmó que las concentraciones de estrógenos inferiores a aquellas que son fisiológicamente relevante no indujeron una respuesta transcripcionalmente medible. Ese umbral de concentración se conoce como el nivel sin efecto adverso transcripcional observable (NOATEL). En nuestro estudio, se demostró que los niveles más bajos adversos observados sobre la expresión transcripcional (LOATEL) de CPF en los 12 genes que respondieron fue al menos de 100 veces menor que el del NOAEL que se basa en la inhibición observable de la actividad eritrocitaria de la acetilcolinesterasa en humanos (JMPR, 1999). El examen de los datos del grupo de 12 genes que respondieron a las dosis más bajas de CPF nos lleva a proponer un LOATEL para el CPF de 0,003-0,004 mg/kg/día. El presente estudio no pudo, por lo tanto, establecer un nivel sin efecto adverso transcripcional observado (NOATEL) para el CPF. Estos cambios subclínicos de la transcripción pueden ser empleados como predictores de los efectos adversos de la exposición a compuestos tóxicos y por lo tanto ser utilizados para mejorar la evaluación de riesgos y la evaluación de la seguridad. Se requieren más estudios para confirmar este LOATEL propuesto.

En función de todo lo expuesto, se puede concluir que después de la exposición aguda y a largo plazo, el CPF induce a concentraciones subclínicas una reducción de la densidad de las espinas dendríticas y a concentraciones más altas, además, induce estrés oxidativo mediado

parcialmente a través de la alteración en la expresión de  $\alpha_7$ -nAChR y P75<sup>NTR</sup> y la muerte celular en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal a través de mecanismos de apoptosis y necrosis, dependiendo de la concentración de la exposición. La muerte inducida es independiente de la inhibición de la AChE y de la alteración de la transmisión colinérgica, pero está mediada en parte por la inducción de estrés oxidativo y la alteración de la expresión de  $\alpha_7$ -nAChR y P75<sup>NTR</sup>, los cuales a su vez median su efecto en parte por la sobreexpresión de las variantes de la AChE. La inducción de estos efectos se inicia a partir de concentraciones menores a aquellas a partir de las cuales son manifiestos, como se observa por las alteraciones de la transcripción de genes clave. Nuestros resultados sugieren que los perfiles toxicogenómicos proporcionan una herramienta sensible para la identificación y caracterización de los umbrales de toxicidad para los compuestos potencialmente tóxicos. Estos efectos podrían explicar las alteraciones cognitivas, así como la sintomatología similar a enfermedades neurodegenerativas inducida por el CPF. En este sentido, se ha descrito que los mecanismos que producen la pérdida de células colinérgicas del prosencéfalo basal están involucrados en la inducción de trastornos cognitivos, lo que apoya nuestra hipótesis. Son necesarios estudios posteriores para determinar el resto de mecanismos implicados en estos efectos observados en las neuronas colinérgicas. Estos resultados son de interés, ya que proporcionan nueva información sobre los mecanismos que median la alteración de la densidad de las espinas dendríticas y la muerte celular inducida por el CPF, y porque conducen a una mejor comprensión de algunos de los efectos relacionados con la toxicidad del CPF y ponen de relieve la necesidad de determinar un nuevo NOAEL y LOAEL, así como una nueva evaluación de los riesgos de este plaguicida.

# **CONCLUSIONES**

## **7. CONCLUSIONES**

(1) Los resultados de nuestra investigación demuestran que el CPF induce tras la exposición aguda (desde 1  $\mu\text{M}$ ) y a largo plazo (desde 0,1  $\mu\text{M}$ ) una reducción, concentración-dependiente, en la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal.

(2) El CPF induce muerte celular, concentración-dependiente, por apoptosis y necrosis tras exposición aguda (desde 30  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  respectivamente) y a largo plazo (desde 1  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  respectivamente) en las neuronas colinérgicas SN56 del prosencéfalo basal.

(3) El CPF induce cambios en las rutas de muerte celular y de plasticidad de las espinas dendríticas a dosis inferiores a las requeridas para inducir de forma manifiesta estos efectos.

(4) EL CPF produce un aumento de los niveles de ACh tras 24 h de exposición (desde 10  $\mu\text{M}$ ) mediado por la reducción de la actividad de la AChE, así como una reducción de los mismos tras 14 días de exposición (desde 1  $\mu\text{M}$ ) mediada por la disminución de la expresión de CHT.

(5) El CPF induce, tras la exposición aguda (desde 30  $\mu\text{M}$ ) y a largo plazo (desde 1  $\mu\text{M}$ ), la generación de ERO y peroxidación lipídica, mediada parcialmente por la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> y la reducción de la expresión de  $\alpha_7$ -nAChR de una manera concentración-dependiente.

(6) El CPF induce la muerte celular mediada parcialmente por medio de la generación de estrés oxidativo, la sobreexpresión de AChE y P75<sup>NTR</sup> y la reducción de la expresión de  $\alpha_7$ -nAChR. La alteración de la transmisión colinérgica no tuvo efecto sobre la inducción de muerte

neuronal. Además, nuestros resultados indican que todos estos mecanismos median sus efectos parcialmente a través de la alteración de las variantes de la AChE.

(7) Estos resultados apoyan la idea de que los cambios de expresión génica pueden usarse como una medida más sensible de los efectos tóxicos en las primeras etapas y a dosis más bajas, que la medida de otros indicadores toxicológicos típicos, siendo preferible su uso para la identificación y caracterización de los umbrales de toxicidad y los mecanismos de acción, y por lo tanto pudiendo ser utilizados para mejorar la evaluación de riesgos y la evaluación de la seguridad de los compuestos tóxicos.

(8) El examen de los datos del grupo de 12 genes que respondieron a las dosis más bajas de CPF nos lleva a proponer un LOATEL para el CPF de 0,003-0,004 mg/kg/día. El presente estudio no pudo establecer un NOATEL para el CPF.

(9) Se requieren estudios posteriores para determinar el resto de mecanismos implicados en estos efectos observados en las neuronas colinérgicas, para confirmar la implicación de estos efectos sobre las alteraciones cognitivas *in vivo*, el LOATEL propuesto y confirmar si es necesario un nuevo NOAEL y LOAEL, así como una nueva evaluación de los riesgos de este biocida.

## **BIBLIOGRAFIA**

## **8. BIBLIOGRAFIA**

- Abou-Donia, M.B., Khan, W.A., Dechkovskaia, A.M., Goldstein, L.B., Bullman, S.L. y Abdel-Rahman, A. (2006). In utero exposure to nicotine and chlorpyrifos alone, and in combination produces persistent sensorimotor deficits and Purkinje neuron loss in the cerebellum of adult offspring rats. *Arch Toxicol.* 80:620–631.
- Aiuto, L.A., Pavlakis, S.G. y Boxer, R.A. (1993). Life-threatening organophosphate-induced delayed polyneuropathy in a child after accidental chlorpyrifos ingestion. *J Pediatr.* 122:658–660.
- Albers, J.W., Garabrant, D.H., Schweitzer, S., Garrison, R.P., Richardson, R.J. y Berent, S. (2004b). Absence of sensory neuropathy among workers with occupational exposure to chlorpyrifos. *Muscle Nerve.* 29:677–686.
- Aldridge, W.N. (1993). The esterases: Perspectives and problems. *Chem Biol Interact.* 87:5-13.
- Aldridge, W.N. y Reiner, E. (1972). Enzyme inhibitors as substrates: Interactions of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids. Academic Press/ Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Aldridge, J.E., Seidler, F.J., Meyer, A., Thillai, I. y Slotkin, T.A. (2003a). Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: Effects during different critical periods. *Environ Health Perspect.* 111:1736–1743.
- Aldridge, J.E., Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (2003b). Changes in serotonin receptors in brain regions of rats after neonatal exposure to chlorpyrifos. *Toxicol Sci.* 72:124–125.
- Aldridge, J.E., Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (2004). Developmental exposure to chlorpyrifos elicits sex-selective alterations of serotonergic synaptic function in adulthood. *Toxicologist.* 78:273.
- Aldridge, J.E., Levin, E.D., Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (2005a). Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environ Health Perspect.* 113: 527–531.
- Aldridge, J.E., Meyer, A., Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (2005b). Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. *Environ Health Perspect.* 113: 1027–1031.
- Ambali, S.F., Idris, S.B., Onukak, C., Shittu, M. y Ayo, J.O. (2010). Ameliorative effects of vitamin C on short-term sensorimotor and cognitive changes induced by acute chlorpyrifos exposure in Wistar rats. *Toxicol Ind Health.* 26: 547-558.
- Ambali, S.F. y Ayo, J.O. (2012). Vitamin C Attenuates Chronic Chlorpyrifos-induced Alteration of Neurobehavioral Parameters in Wistar Rats. *Toxicol Int.* 19: 144-52.
- Andersson, H., Petersson-Grawe, K., Lindqvist, E., Luthman, J., Oskarsson, A. y Olson, L. (1997). Low-level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring. *Neurotox Teratol.* 19: 105-115.
- Arnold, S.M., Morriss, A., Velovitch, J., Juberg, D., Burns, C.J., Bartels, M., Aggarwal, M., Poet, T., Hays, S., y Price, P. (2015). Derivation of human Biomonitoring Guidance Values for chlorpyrifos using a physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model of cholinesterase inhibition. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71(2):235-243.

- Ashry, K.M., Abu-Qare, A.W., Saleem, F.R., Hussein, Y.A., Hamza, S.M., Kishk, A.M. y Abou-Donia, M.B. (2002). Inhibition and recovery of maternal and fetal cholinesterase enzymes following a single oral dose of chlorpyrifos in rats. *Arch Toxicol.* 76: 30–39.
- ATSDR. (1997). Toxicological profile for chlorpyrifos. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Atlanta, GA, USA.
- Atterberry, T.T., Burnett, W.T. y Chambers, J.E. (1997). Age-related differences in parathion and chlorpyrifos toxicity in male rats: Target and nontarget esterase sensitivity and cytochrome P450-mediated metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 147: 411-418.
- Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S. y Quirion, R. (2002). Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol.* 68: 209-245.
- Azam, L., Winzer-Serhan, U. y Leslie, F. M. (2003). Co-expression of alpha7 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience.* 119: 965-977.
- Ballard, C.G., Greig, N.H., Guillozet-Bongaarts, A.L., Enz, A. y Darvesh, S. (2005). Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res.* 2: 307-318.
- Baloyannis SJ (2015). Brain capillaries in Alzheimer's disease. *Hell J Nucl Med.* 1: 152.
- Baltazar, M.T., Dinis-Oliveira, R.J., de Lourdes Bastos, M., Tsatsakis, A.M., Duarte, J.A. y Carvalho, F. (2014). Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—a mechanistic approach. *Toxicol Lett.* 230: 85-103.
- Barron, M.G., Plakas, S.M. y Wilga, P.C. (1991). Chlorpyrifos pharmacokinetics and metabolism following intravascular and dietary administration in channel catfish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 108:474-482.
- Bazalakova, M.H. y Blakely, R.D. (2006). The high-affinity choline transporter: a critical protein for sustaining cholinergic signaling as revealed in studies of genetically altered mice. *Handb Exp Pharmacol.* 175: 525-544.
- Berkowitz, G.S., Wetmur, J.G., Birman-Deych, E., Obel, J., Lapinski, R.H., Godbold, J.H., Holzman, I.R. y Wolff, M.S. (2004). In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ Health Perspect.* 112: 388-391.
- Berkowitz, G., Wetmur, J., Birman-Deych, E., Holzman, I. y Wolff, M. (2003). Maternal exposure to indoor pesticides, paraoxonase activity, and fetal growth. *Am J Epidemiol.* 157: S67.
- Berson, A., Knobloch, M., Hanan, M., Diamant, S., Sharoni, M., Schuppli, D., Geyer, B.C., Ravid, R., Mor, T.S., Nitsch, R.M. y Soreq, H. (2008). Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. *Brain.* 131: 109-119.
- Betancourt, A.M. y Carr, R. (2004). The effect of repeated oral ingestion of chlorpyrifos on cholinesterase and carboxylesterase activity in adult rats. *Toxicologist.* 78:276.
- Betancourt, A.M., Burgess, S.C. y Carr, R.L. (2006). Effect of developmental exposure to chlorpyrifos on the expression of neurotrophin growth factors and cell-specific markers in neonatal rat brain. *Toxicol Sci.* 92:500–506.
- Bielarczyk, H., Jankowska, A., Madziar, B., Matecki, A., Michno, A. y Szutowicz, A. (2003). Differential toxicity of nitric oxide, aluminum, and amyloid- $\beta$ -peptide in SN56 cholinergic cells from mouse septum. *Neurochem Int.* 42: 323-331.
- Bierer, L.M., Haroutunian, V., Gabriel, S., Knott, P.J., Carlin, L.S., Purohit, D.P., Perl, D.P., Schmeidler, J., Kanof, P. and Davis, K.L. (1995). Neurochemical correlates of dementia

- severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem.* 64: 749-760.
- Birikh, K.R., Sklan, E.H., Shoham, S. and Soreq, H. (2003). Interaction of "readthrough" acetylcholinesterase with RACK1 and PKC $\beta$  II correlates with intensified fear-induced conflict behavior. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 283-288.
- Brealy, C.I., Walker, C.H. y Baldwin, B.C. (1980). A-esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphos-methyl to birds and mammals. *Pestic Sci.* 1 :546-554.
- Bond, C.E., Patel, P., Crouch, L., Tetlow, N., Day, T., Abu-Hayyeh, S., Williamson, C. and Greenfield, S.A. (2006). Astroglia up-regulate transcription and secretion of 'readthrough' acetylcholinesterase following oxidative stress. *Eur J Neurosci.* 24: 381-386.
- Budd, D.C., McDonald, J., Emsley, N., Cain, K., and Tobin, A.B. (2003). The C-terminal tail of the M3-muscarinic receptor possesses anti-apoptotic properties. *J Biol Chem.* 278: 19565-19573.
- Budd, D.C., Spragg, E.J., Ridd, K., and Tobin, A.B. (2004). Signalling of the M3-muscarinic receptor to the anti-apoptotic pathway. *Biochemical J.* 381: 43-49.
- Buznikov, G.A., Shmukler, Y.B. y Lauder, J.M. (1996). From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development?. *Cell Mol Neurobiol.* 16: 533-559.
- Capodicasa, E., Scapellato, M.L., Moretto, A., Caroldi, S. y Lotti, M. (1991). Chlorpyrifos-induced delayed polyneuropathy. *Arch Toxicol.* 65: 150-155.
- Caughlan, A., Newhouse, K., Namgung, U. y Xia, Z. (2004). Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases. *Toxicol Sci.* 78: 125-134.
- Cavanagh, J.B. (1963). Organo-phosphorus neurotoxicity: A model "dying back" process comparable to certain human neurological disorders. *Guys Hosp Rep.* 112:303-319.
- Chambers, J.E. y Chambers, H.W. (1989). Oxidative desulfuration of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, and leptophos by rat brain and liver. *J Biochem Toxicol.* 4:201-203.
- Chambers, J. E. (1992). The role of target site activation of phosphorothionates in acute toxicity. En: *Organophosphates: Chemistry, fate, and effects* (Chambers J.E. y Levi, P.E. Eds.). Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 229-239.
- Chambers, J.E. y Carr, R.L. (1993). Inhibition patterns of brain acetylcholinesterase and hepatic and plasma aliesterases following exposures to three phosphorothionate insecticides and their oxons in rats. *Fundam Appl Toxicol.* 2: 111-119.
- Chen, W.Q., Ma, H., Bian, J.M., Zhang, Y.Z. y Li, J. (2012). Hyper-phosphorylation of GSK-3 $\beta$ : possible roles in chlorpyrifos-induced behavioral alterations in animal model of depression. *Neurosci Lett.* 528: 148-152.
- Chiapella, G., Flores-Martin, J., Ridano, M. E., Reyna, L., Magnarelli de Potas, G., Panzetta-Dutari, G. M. y Genti-Raimondi, S. (2013). The organophosphate chlorpyrifos disturbs redox balance and triggers antioxidant defense mechanisms in JEG-3 cells. *Placenta.* 34: 792-798.
- Costa, L.G., McDonald, B.E., Murphy, S.D., Omenn, G.S., Richter, R.J., Motulsky, A.G., and Furlong, C.E. (1990). Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 103: 66-76.
- Costa, L.G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim. Acta.* 366: 1-13.

- Coulston, F., Golberg, L. y Griffinn, T. (1972). Safety evaluation of Dowco 179 in human volunteers. Unpublished report submitted to WHO by the Institute of Experimental Pathology and Toxicology, Albany Medical College Albany, NY, USA.
- Coulston, F., Goldberg, L., Abraham, R., Benitz, K.F., Griffin, T.B. y Norvell, M. (1971). Final report on safety evaluation and metabolic studies on Dowco 179. Submitted to WHO by Albany Medical College, Albany, NY, USA.
- Crumpton, T.L., Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (2000a). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: Effects on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation. *Brain Res.* 857: 87-98.
- Dam, K., Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (1998). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Delayed targeting of DNA synthesis after repeated administration. *Brain Res Dev Brain Res.* 108: 39-45.
- Dam, K., Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (2000). Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Brain Res Dev Brain Res.* 121:179-187.
- Davies, C.C., Mason, J., Wakelam, M.J. young, L.S. y Eliopoulos, A.G. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells. *J Biol Chem.* 279: 1010-1019.
- De Sarno, P., Shestopal, S. A., King, T. D., Zmijewska, A., Song, L. y Jope, R. S. (2003). Muscarinic receptor activation protects cells from apoptotic effects of DNA damage, oxidative stress, and mitochondrial inhibition. *J Biol Chem.* 278: 11086-11093.
- De Silva, H.J., Sanmuganathan, P.S. y Senanayake, N. (1994). Isolated bilateral recurrent laryngeal nerve paralysis: A delayed complication of organophosphorous poisoning. *Hum Exp Toxicol.* 13:171-173.
- Del Pino, J., Zeballos, G., Anadon, M.J., Capo, M.A., Diaz, M.J., Garcia, J. y Frejo, M.T. (2014). Higher sensitivity to cadmium induced cell death of basal forebrain cholinergic neurons: a cholinesterase dependent mechanism. *Toxicology.* 325: 151-159.
- Del Pino, J., Zeballos, G., Anadon, M.J., Moyano, P., Diaz, M.J., Garcia, J.M. y Frejo, M.T. (2015a). Cadmium-induced cell death of basal forebrain cholinergic neurons mediated by muscarinic M1 receptor blockade, increase in GSK-3beta enzyme, beta-amyloid and tau protein levels. *Arch Toxicol.* [Epub ahead of print]
- Del Pino, J., Frejo, M.T., Anadon, M.J., Capo, M.A., Moyano, P., Garcia, J.M. y Diaz, M.J. (2015b). Neuroprotective or neurotoxic effects of 4-aminopyridine mediated by KChIP1 regulation through adjustment of Kv 4.3 potassium channels expression and GABA-mediated transmission in primary hippocampal cells. *Toxicology.* 333: 107-17.
- Del Pino, J., Moyano, P., Anadon, M.J., García, J.M., Díaz, M.J., García, J. y Frejo, M.T. (2015c). Acute and long-term exposure to chlorpyrifos induces cell death of basal forebrain cholinergic neurons through AChE variants alteration. *Toxicology.* 336: 1-9.
- Drevenkar, V., Vasilic, Z., Stengl, B., Fröbe, Z. y Rumenjak, V. (1993). Chlorpyrifos metabolites in serum and urine of poisoned persons. *Chem Biol Interact.* 87: 315-22.
- Dyer, S.M., Cattani, M., Pisaniello, D.L., Williams, F.M. y Edwards, J.W. (2001). Peripheral cholinesterase inhibition by occupational chlorpyrifos exposure in Australian termiticide applicators. *Toxicology.* 169: 177-185.

- Eaton, D.L., Daroff, R.B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L.G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W.C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R. y Spencer, P.S. (2008). Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit Rev Toxicol.* 38: 1-125.
- Egea, J., Buendia, I., Parada, E., Navarro, E., Leon, R. y Lopez, M. G. (2015). Anti-inflammatory role of microglial  $\alpha 7$  nAChRs and its role in neuroprotection. *Biochem Pharmacol.* 97: 463-72.
- Ehrlich, I. y Malinow, R. (2004). Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci.* 24: 916-927.
- El-Husseini, A.E., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A. y Brecht, D.S. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science.* 290: 1364-1368.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr. y Feather-Stone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7: 88-95.
- Eskenazi, B., Bradman, A. y Castorina, R. (1999). Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ Health Perspect.* 107: 409-419.
- Eskenazi, B., Harley, K., Bradman, A., Weltzien, E., Jewell, N.P., Barr, D.B., Furlong, C.E. y Holland, N.T. (2004). Association of in utero organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population. *Environ Health Perspect.* 112: 1116-1124.
- Eskenazi, B., Marks, A.R., Bradman, A., Harley, K., Barr, D.B., Johnson, C., Morga, N. y Jewell, N.P. (2007). Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ Health Perspect.* 115: 792-798.
- Eto, M. (1979). *Organophosphorus pesticides: Organic and biological chemistry.* CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Everitt, B.J. y Robbins, T.W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol.* 48: 649-684.
- Feng, J. yan, Z., Ferreira, A., Tomizawa, K., Liauw, J.A., Zhuo, M., Allen, P.B., Ouimet, C.C. y Greengard, P. (2000) Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 9287-9292.
- Fonnum, F. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J Neurochem.* 24: 407-409.
- Fukuto, T.R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect.* 87: 245-254.
- Furlong, C. E., Richter, R. J., Seidel, S. L. y Motulsky, A. G. (1988). Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. *Am J Hum Genet.* 43: 230-238.
- Furlong, C. E., Richter, R. J., Seidel, S. L., Costa, L. G. y Motulsky, A. G. (1989). Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal Biochem.* 180: 242-247.
- Furlong, C. E., Humbert, R., Hassett, c., Omiecinski, C. J. y Wolfe, M. F. (1993). Molecular basis of the genetic variability of human paraoxonase. *Toxicologist.* 13:86.

- Gallo, M.A. y Lawryk, N.J. (1991). Organic phosphorous pesticides. In: Handbook of Pesticide Toxicology, Vol 2. Classes of Pesticides (Hayes, W.J. y Laws, E.R. Jr., Eds.). Academic Press, New York, NY, USA, pp. 917–1123.
- Garcia, S.J., Seidler, F.J., Crumpton, T.L. y Slotkin, T.A. (2001). Does chlorpyrifos target glial cell development?. *Neurotoxicology*. 22: 526.
- Garner, C.C., Nash, J. y Haganir, R.L. (2000). PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol*. 10: 274-280.
- Geter, D.R., Kan, H.L., Lowe, E.R., Rick, D.L., Charles, G.D., Gollapudi, B.B. y Mattsson, J.L. (2008). Investigations of oxidative stress, antioxidant response, and protein binding in chlorpyrifos exposed rat neuronal PC12 cells. *Toxicol Mech Methods*. 18: 17-23.
- Glantz, L.A., Gilmore, J.H., Hamer, R.M., Lieberman, J.A. y Jarskog, L.F. (2007). Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood. *Neuroscience*. 149: 582-591.
- Goldberg, Z., Schwietert, C.W., Lehnert, B., Stern, R. y Nami, I. (2004). Effects of low-dose ionizing radiation on gene expression in human skin biopsies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 58: 567-574.
- Goss, J. R., Taffe, K. M., Kochanek, P. M. y DeKosky, S. T. (1997). The antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase increase following traumatic brain injury in the rat. *Exp Neurol*. 146(1): 291-294.
- Greenberg, D.S., Toiber, D., Berson, A. y Soreq, H. (2010). Acetylcholinesterase variants in Alzheimer's disease: from neuroprotection to programmed cell death. *Neurodegener Dis*. 7: 60-63.
- Guan, Z. Z. yu, W. F., Shan, K. R., Nordman, T., Olsson, J. y Nordberg, A. (2003). Loss of nicotinic receptors induced by beta-amyloid peptides in PC12 cells: possible mechanism involving lipid peroxidation. *J Neurosci Res*. 71(3): 397-406.
- Guidotti, S., Minguzzi, M., Platano, D., Cattini, L., Trisolino, G., Mariani, E. y Borzi, R. M. (2015). Lithium Chloride Dependent Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation Links Oxidative DNA Damage, Hypertrophy and Senescence in Human Articular Chondrocytes and Reproduces Chondrocyte Phenotype of Obese Osteoarthritis Patients. *PLoS One*. 10(11): e0143865.
- Gultekin, F., Karakoyun, I., Sutcu, R., Savik, E., Cesur, G., Orhan, H. y Delibas, N. (2007). Chlorpyrifos increases the levels of hippocampal NMDA receptor subunits NR2A and NR2B in juvenile and adult rats. *Int J Neurosci*. 117: 47–62.
- Gupta, R.C. and Milatovic, D. (2012). Organophosphates and carbamates In: *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles 2nd Edition*. (Gupta, R.C. Ed.). Academic Press/Elsevier, Amsterdam, The nederlands, pp. 573-585.
- Hains, A.B. Yabe, Y. y Arnsten, A.F.T. (2015). Chronic Stimulation of Alpha-2A-Adrenoceptors With Guanfacine Protects Rodent Prefrontal Cortex Dendritic Spines and Cognition From the Effects of Chronic Stress. *Neurobiol Stress*. 215; 2: 1-9.
- Hammond, D.N., Lee, H.J., Tonsgard, J.H. y Wainer, B.H. (1990). Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res*. 512 (2): 190-200.
- Hartl, R., Gleinich, A. y Zimmermann, M. (2011). Dramatic increase in readthrough acetylcholinesterase in a cellular model of oxidative stress. *J Neurochem*. 116: 1088-1096.

- Herlenius, E. y Lagercrantz, H. (2001). Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Hum Dev.* 65(1): 21-37.
- Hernández, C.M., Beck, W.D., Naughton, S.X., Poddar, I., Adam, B.L., yanasak, N., Middleton, C. y Terry, A.V., Jr. (2015). Repeated exposure to chlorpyrifos leads to prolonged impairments of axonal transport in the living rodent brain. *Neurotoxicolog.* 47: 17-26.
- Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R.J. y Yuan, J. (2008). Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell.* 135 (7): 1311-1323.
- Howard, A.S., Bucelli, R., Jett, D.A., Bruun, D., Yang, D. y Lein, P.J. (2005). Chlorpyrifos exerts opposing effects on axonal and dendritic growth in primary neuronal cultures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 207:112–124.
- Hu, J., Vidovic, M., Chen, M.M., Lu, Q.Y. y Song, Z.M. (2008). Activation of  $\alpha$ 2A adrenoceptors alters dendritic spine development and the expression of spinophilin in cultured cortical neurones. *Brain Res.* 1199: 37-45.
- Hudgens, E.D., Ji, L., Carpenter, C.D., y Petersen, S.L. (2009). The gad2 promoter is a transcriptional target of estrogen receptor (ER) alpha and ER beta: a unifying hypothesis to explain diverse effects of estradiol. *J Neurosci.* 29(27): 8790-8797.
- Icenogle, L.M., Christopher, N.C., Blackwelder, W.P., Caldwell, D.P., Qiao, D., Seidler, F.J., Slotkin, T.A. y Levin, E.D. (2004). Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicol Teratol.* 26: 95-101.
- Jameson, R.R., Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (2007). Nonenzymatic functions of acetylcholinesterase splice variants in the developmental neurotoxicity of organophosphates: chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and diazinon. *Environ Health Perspect* 115: 65-70.
- Jett, D.A., Navoa, R.V., Beckles, R.A. y McLemore, G.L. (2001). Cognitive function and cholinergic neurochemistry in weanling rats exposed to chlorpyrifos. *Toxicol Appl Pharmacol.* 174: 89–98.
- Jin, S., Tong, T., Fan, W., Fan, F., Antinore, M.J., Zhu, X., Mazzacurati, L., Li, X., Petrik, K.L., Rajasekaran, B., Wu, M. y Zhan Q. (2002). GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. *Oncogene.* 21 (57): 8696-8704.
- JMPR (1999). Pesticide Residues in Food–1999, Evaluations Part II: Toxicological WHO/PCS/00.4, FAO/WHO Pesticide Residues in Food, No 154, Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues; World Health Organization: Geneva, Switzerland.
- Johnson, M.K. (1990). Organophosphates and delayed neuropathy—Is NTE alive and well?. *Toxicol Appl Pharmacol.* 102: 385–399.
- Kammon, A.M., Brar, R.S., Sodhi, S., Banga, H.S. y Sandhu, H.S. (2010). Neuropathological Studies of Chickens Following Exposure to Chlorpyrifos. *Toxicol Int.* 17: 78-81.
- Kannagara, T.S., Bostrom, C.A., Ratzlaff, A., Thompson, L., Cater, R.M., Gil-Mohapel, J. y Christie, B.R. (2014). Deletion of the NMDA receptor GluN2A subunit significantly decreases dendritic growth in maturing dentate granule neurons. *PLoS One.* 9: e103155.

- Kar, S., Slowikowski, S. P., Westaway, D. y Mount, H. T. (2004). Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci.* 29(6): 427-441.
- Kesner, R.P., Adelstein, T.B. y Crutcher, K.A. (1989). Equivalent spatial location memory deficits in rats with medial septum or hippocampal formation lesions and patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain Cogn.* 9: 289-300.
- Ki, Y.W., Park, J.H., Lee, J.E., Shin, I.C. y Koh, H.C. (2013). JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. *Toxicol Lett.* 218: 235-245.
- Kisicki, J.C., Seip, C.W. y Combs, M.L. (1999). A rising dose toxicology study to determine the no-observable-effect-level (NOEL) for erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) inhibition and cholinergic signs and symptoms of chlorpyrifos at three dose levels. Unpublished report No. LLC Study ID: DR#K-044793-284 submitted to WHO by MDS Harris, Lincoln, NE, USA.
- Kousba, A.A., Poet, T.S. y Timchalk, C. (2007). Age-related brain cholinesterase inhibition kinetics following in vitro incubation with chlorpyrifos-oxon and diazinon-oxon. *Toxicol Sci.* 95: 147-155.
- Lakshmana, M. y Raju, T.R. (1994). Endosulfan induces small but significant changes in the levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the developing rat brain and deficits in the operant learning performance. *Toxicology.* 91(2): 139-150.
- Lauder, J.M. (1985). Roles for neurotransmitters in development: possible interaction with drugs during the fetal and neonatal periods. *Prog Clin Biol Res.* 163C: 375-380.
- Lazarini, C.A., Flório, J.C., Lemonica, I.P. y Bernardi, M.M. (2001). Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. *Neurotoxicol Teratol.* 23(6): 665-673.
- Lee, J.E., Park, J.H., Shin, I.C. y Koh, H.C. (2012). Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. *Toxicol Appl Pharmacol.* 263: 148-162.
- Levin, E.D., Addy, N., Baruah, A., Elias, A., Christopher, N.C., Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (2002). Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicol Teratol.* 24: 733-741.
- Levitt, P., Harvey, J.A., Friedman, E., Simansky, K. y Murphy, E.H. (1997). New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci* 20(6): 269-274.
- Li, W.F., Costa, L.G. y Furlong, C.E. (1993). Serum paraoxonase status: A major factor in determining resistance to organophosphates. *J Toxicol Environ Health.* 40: 337-346.
- Lindenboim, L., Pinkas-Kramarski, R., Sokolovsky, M. y Stein, R. (1995). Activation of muscarinic receptors inhibits apoptosis in PC12M1 cells. *J Neurochem.* 64(6): 2491-2499.
- Liu, J., Olivier, K. y Pope, C.N. (1999). Comparative neurochemical effects of repeated methyl parathion or chlorpyrifos exposures in neonatal and adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 158: 186-196.
- Liu, Q. y Zhao, B. (2004). Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *Br J Pharmacol.* 141(4): 746-754.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4): 402-408.

- Lobenhofer, E.K., Cui, X., Bennett, L., Cable, P.L., Merrick, B.A., Churchill, G.A. y Afshari, C.A. (2004). Exploration of low-dose estrogen effects: identification of No Observed Transcriptional Effect Level (NOTEL). *Toxicol Pathol.* 32: 482-492.
- Lopez-Granero, C., Cardona, D., Gimenez, E., Lozano, R., Barril, J., Sanchez-Santed, F. y Canadas, F. (2013a). Chronic dietary exposure to chlorpyrifos causes behavioral impairments, low activity of brain membrane-bound acetylcholinesterase, and increased brain acetylcholinesterase-R mRNA. *Toxicology.* 308: 41-49.
- Lopez-Granero, C., Cardona, D., Gimenez, E., Lozano, R., Barril, J., Sanchez-Santed, F. y Canadas, F. (2013b). Chronic dietary exposure to chlorpyrifos causes behavioral impairments, low activity of brain membrane-bound acetylcholinesterase, and increased brain acetylcholinesterase-R mRNA. *Toxicology.* 308: 41-49.
- Lotti, M., Moretto, A., Zoppellari, R., Dainese, R., Rizzuto, N. y arusco, G. (1986). Inhibition of lymphocytic neuropathy target esterase predicts the development of organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Arch Toxicol.* 59: 176-179.
- Lotti, M. (1991). The pathogenesis of organophosphate delayed polyneuropathy. *Crit Rev Toxicol.* 21: 465-487.
- Lotti, M. (2000). Organophosphate compounds. En: *Experimental and Clinical Neurotoxicology* (Spencer, P.S. y Schaumburg, H.S. Eds.). Oxford University Press, New York, NY, USA, p. 897.
- Lotti, M. y Moretto, A. (2005). Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Toxicol Rev.* 24: 37-49.
- Madziar, B., Lopez-Coviella, I., Zemelko, V. y Berse, B. (2005). Regulation of cholinergic gene expression by nerve growth factor depends on the phosphatidylinositol-3'-kinase pathway. *J Neurochem.* 92: 767-779.
- Mahul-Mellier, A.L., Pazarentzos, E., Datler, C., Iwasawa, R., Abu-Ali, G., Lin, B. y Grimm, S. (2012). De-ubiquitinating protease USP2a targets RIP1 and TRAF2 to mediate cell death by TNF. *Cell Death Differ.* 19(5): 891-899.
- Mandolesi, L., De Bartolo, P., Foti, F., Gelfo, F., Federico, F., Leggio, M.G. y Petrosini, L. (2008). Environmental enrichment provides a cognitive reserve to be spent in the case of brain lesion. *J Alzheimers Dis.* 15: 11-28.
- Marty, M.S., Domoradzki, J.Y., Hansen, S.C., Timchalk, C., Bartels, M.J. y Mattsson, J.L. (2007). The effect of route, vehicle, and divided doses on the pharmacokinetics of chlorpyrifos and its metabolite trichloropyridinol in neonatal Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 100: 360-373.
- Mattsson, J.L., Maurissen, J.P., Nolan, R.J. y Brzak, K.A. (2000). Lack of differential sensitivity to cholinesterase inhibition in fetuses and neonates compared to dams treated perinatally with chlorpyrifos. *Toxicol Sci.* 53: 438-446.
- Maurissen, J.P., Hoberman, A.M., Garman, R.H. y Hanley, T.R., Jr. (2000). Lack of selective developmental neurotoxicity in rat pups from dams treated by gavage with chlorpyrifos. *Toxicol Sci.* 57: 250-263.
- McCollister, S.B., Kociba, R.J., Humiston, C.G., McCollister, D.D. y Gehring, P.J. (1974). Studies of the acute and long-term oral toxicity of chlorpyrifos (O,O-diethyl-O(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate). *Food Cosmet Toxicol.* 12: 45-61.
- Mennicken, F. y Quirion, R. (1997). Interleukin-2 increases choline acetyltransferase activity in septal-cell cultures. *Synapse.* 26: 175-183.

- Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E.G. y Lockridge, O. (2002). Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*. 110: 627-639.
- Meyer, A., Seidler, F.J., Cousins, M.M. y Slotkin, T.A. (2003). Developmental neurotoxicity elicited by gestational exposure to chlorpyrifos: When is adenylyl cyclase a target?. *Environ. Health Perspect*. 111: 1871–1876.
- Meyer, A., Seidler, F.J., Aldridge, J.E., Tate, C.A., Cousins, M.M. y Slotkin, T.A. (2004). Critical periods for chlorpyrifos-induced developmental neurotoxicity: Alterations in adenylyl cyclase signaling in adult rat brain regions after gestational or neonatal exposure. *Environ Health Perspect*. 112: 295–301
- Mi, Z., Rogers, D. A., Mirnics, Z. K. y Schor, N. F. (2009). p75NTR-dependent modulation of cellular handling of reactive oxygen species. *J Neurochem*. 110(1): 295-306.
- Michalek, H., Meneguz, A. y Bisso, G.M. (1982). Mechanisms of recovery of brain acetylcholinesterase in rats during chronic intoxication by isofluorophate. *Arch. Toxicol Suppl*. 5: 116–119.
- Middlemore-Risher, M.L., Buccafusco, J.J. y Terry, A.V., Jr. (2010). Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats. *Neurotoxicol Teratol*. 32: 415-424.
- Moser, V.C., Chanda, S.M., Mortensen, S.R., and Padilla, S. (1998). Age- and gender-related differences in sensitivity to chlorpyrifos in the rat reflect developmental profiles of esterase activities. *Toxicol Sci*. 46: 211–222.
- Moser., V.C. (2000). Dose-response and time-course of neurobehavioral changes following oral chlorpyrifos in rats of different ages. *Neurotoxicol Teratol*. 22: 713–723.
- Moser, N., Wevers, A., Lorke, D.E., Reinhardt, S., Maelicke, A. y Schroder, H. (1996). Alpha4-1 subunit mRNA of the nicotinic acetylcholine receptor in the rat olfactory bulb: Cellular expression in adult, pre- and postnatal stages. *Cell Tissue Res*. 285: 17-25.
- Moser, V.C. y Padilla, S. (1998). Age- and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 149: 107-119.
- Moser, V.C., Phillips, P.M., McDaniel, K.L., Marshall, R.S., Hunter, D.L. y Padilla, S. (2005). Neurobehavioral effects of chronic dietary and repeated high-level spike exposure to chlorpyrifos in rats. *Toxicol Sci*. 86: 375-386.
- Mortensen, S.R., Chanda, S.M. y Padilla, S. (1996). Age-related sensitivity to the anticholinesterase pesticide chlorpyrifos studies on the developmental changes in acetylcholinesterase AChE and esterase arylesterase activities. *J Neurochemistry*. 66: S17.
- Mortensen, S.R., Hooper, M.J. y Padilla, S. (1998). Rat brain acetylcholinesterase activity: Developmental profile and maturational sensitivity to carbamate and organophosphorus inhibitors. *Toxicology*. 125: 13-19.
- Nasr, H.M., El-Demerdash, F.M. y El-Nagar, W.A. (2016). Neuro and renal toxicity induced by chlorpyrifos and abamectin in rats: Toxicity of insecticide mixture. *Environ Sci Pollut Res Int*. 23: 1852-1859.
- Nikonenko, I., Boda, B., Steen, S., Knott, G., Welker, E. y Muller, D. (2008). PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling. *J Cell Biol*. 183: 1115-1127.

- Nicotra, A. y Senatori, O. (1989). Some characteristics of mitochondrial monoamine oxidase activity in eggs of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 92: 401-404.
- Nicotra, A. y Schatten, G. (1990). Propranolol, a beta-adrenergic receptor blocker, affects microfilament organization, but not microtubules, during the first division in sea urchin eggs. *Cell Motil Cytoskeleton.* 16(3): 182-189.
- Nolan, R.J., Rick, D.L., Freshour, N.L. y Saunders, J.H. (1982). Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers following single oral and dermal doses. Unpublished report No. HEB-DR-0043-4946-4 from Dow Chemical Co., Midland, Michigan, USA. Submitted to WHO by Dow AgroSciences, Indianapolis, Indiana, USA.
- Nolan, R.J., Rick, D.L., Freshour, N.L. y Saunders, J.H. (1984). Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 73: 8-15.
- Nomura, D.K., Durkin, K.A., Chiang, K.P., Quistad, G.B., Cravatt, B.F. y Casida, J.E. (2006). Serine hydrolase KIAA1363: Toxicological and structural features with emphasis on organophosphate interactions. *Chem Res Toxicol.* 19: 1142-1150.
- Oda, Y. (1999). Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int.* 49: 921-937.
- Oh, J.D., Chartisathian, K., Chase, T.N. y Butcher, L.L. (2000). Overexpression of neurotrophin receptor p75 contributes to the excitotoxin-induced cholinergic neuronal death in rat basal forebrain. *Brain Res.* 853: 174-185.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. y Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 74: 609-619.
- Osterloh, J., Lotti, M. y Pond, S.M. (1983). Toxicologic studies in a fatal overdose of 2,4-D, MCP, and chlorpyrifos. *J Anal Toxicol.* 7: 125-129.
- Oostingh, G.J., Wichmann, G., Schmittner, M., Lehmann, I. y Duschl, A. (2009). The cytotoxic effects of the organophosphates chlorpyrifos and diazinon differ from their immunomodulating effects. *J Immunotoxicol.* 6: 136-145.
- Padilla, S., Buzzard, J. y Moser, V.C. (2000). Comparison of the role of esterases in the differential age-related sensitivity to chlorpyrifos and methamidophos. *Neurotoxicology.* 21: 49-56.
- Parfett, C., Williams, A., Zheng, J.L. y Zhou, G. (2013). Gene batteries and synexpression groups applied in a multivariate statistical approach to dose-response analysis of toxicogenomic data. *Regul Toxicol Pharmacol.* 67: 63-74.
- Pegan, K., Matkovic, U., Mars, T., Mis, K., Pirkmajer, S., Breclj, J. y Grubic, Z. (2010). Acetylcholinesterase is involved in apoptosis in the precursors of human muscle regeneration. *Chem Biol Interact.* 187: 96-100.
- Pendleton, R.G., Rasheed, A., Roychowdhury, R. y Hillman, R. (1998). A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends Pharmacol Sci.* 19: 248-251.
- Perini, G., Della-Bianca, V., Politi, V., Della Valle, G., Dal-Pra, I., Rossi, F. y Armato, U. (2002). Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by beta-amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines. *J Exp Med.* 195: 907-918.
- Perera, F.P., Rauh, V., Tsai, W.Y., Kinney, P., Camann, D., Barr, D., Bernert, T., Garfinkel, R., Tu, Y.H., Diaz, D., Dietrich, J. y Whyatt, R.M. (2003). Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environ Health Perspect.* 111: 201-205.

- Perera, F., Rauh, V.A., Tang, D., Barr, D.B., Camann, D., Kinney, P.L., Andrew, H. y Whyatt, R.M. (2004). Relationship between prenatal environmental exposures, birth outcomes and cognitive development in an urban minority cohort. *Neurotoxicology*. 25: 667–668.
- Perera, F.P., Rauh, V., Whyatt, R.M., Tang, D., Tsai, W.Y., Bernert, J.T., Tu, Y.H., Andrews, H., Barr, D.B., Camann, D.E., Diaz, D., Dietrich, J., Reyes, A. y Kinney, P.L. (2005). A summary of recent findings on birth outcomes and developmental effects of prenatal ETS, PAH, and pesticide exposures. *Neurotoxicology*. 26: 573–587.
- Perera, F.P., Rauh, V., Whyatt, R.M., Tsai, W.Y., Tang, D., Diaz, D., Hoepner, L., Barr, D., Tu, Y.H., Camann, D. y Kinney, P. (2006). Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Environ Health Perspect*. 114: 1287–1292.
- Piolo, E.P. y Cuello, A.C. (1990). Distribution of nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the adult rat central nervous system. Effect of colchicine and correlation with the cholinergic system-II. Brainstem, cerebellum and spinal cord. *Neuroscience*. 34: 89–110.
- Pope, C.N., Chakraborti, T.K., Chapman, M.L., Farrar, J.D. y Arthun, D. (1991a). Comparison of In vivo Cholinesterase Inhibition in Neonatal and Adult Rats by Three Organophosphorothioate Insecticides. NTIS/PB92-110550, 110513. Govt Reports Announcements & Index Issue 02, 1992.
- Pope, C.N., Chakraborti, T.K., Chapman, M.L., Farrar, J.D. y Arthun, D. (1991b). Comparison of in vivo cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides. *Toxicology*. 68: 51–61.
- Pope, C.N. y Chakraborti, T.K. (1992). Dose-related inhibition of brain and plasma cholinesterase in neonatal and adult rats following sublethal organophosphate exposures. *Toxicology*. 73: 35–43.
- Qi, X.L., Nordberg, A., Xiu, J. y Guan, Z.Z. (2007). The consequences of reducing expression of the alpha7 nicotinic receptor by RNA interference and of stimulating its activity with an alpha7 agonist in SH-SY5Y cells indicate that this receptor plays a neuroprotective role in connection with the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 51: 377–383.
- Qiao, D., Seidler, F.J., Levin, E.D., Padilla, S. y Slotkin, T.A. (2002a). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Defining the vulnerable period. *FASEB J*. 16: A949.
- Qiao, D., Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (2002b). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Defining the vulnerable period. *Toxicologist*. 66:130-131.
- Qiao, D., Seidler, F.J., Abreu-Villaca, Y., Tate, C.A., Cousins, M.M. y Slotkin, T.A. (2004). Chlorpyrifos exposure during neurulation: Cholinergic synaptic dysfunction and cellular alterations in brain regions at adolescence and adulthood. *Brain Res. Dev. Brain Res*. 148:43–52
- Quistad, G.B., Nomura, D.K., Sparks, S.E., Segall, Y. y Casida, J.E. (2002). Cannabinoid CB1 receptor as a target for chlorpyrifos oxon and other organophosphorus pesticides. *Toxicol Lett*. 135: 89–93.
- Reale, M., de Angelis, F., di Nicola, M., Capello, E., di Ioia, M., Luca, G., Lugaresi, A. y Tata, A.M. (2012). Relation between Pro-inflammatory Cytokines and Acetylcholine Levels in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci* 13: 12656-12664.

- Resende, R.R. y Adhikari, A. (2009). Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *Cell Commun Signal*. 7: 20.
- Ricceri, L., Markina, N., Valanzano, A., Fortuna, S., Cometa, M.F., Meneguz, A. y Calamandrei, G. (2003). Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 191: 189-201.
- Ricceri, L., Venerosi, A., Capone, F., Cometa, M.F., Lorenzini, P., Fortuna, S. y Calamandrei, G. (2006). Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: Fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicol Sci*. 93: 105-113.
- Richardson, J.R. y Chambers, J.E. (2003). Effects of repeated developmental exposure to chlorpyrifos on presynaptic neurochemical components of the cholinergic system. *Neurotoxicol*. 24: 305.
- Richardson, J.R. y Chambers, J.E. (2004). Neurochemical effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in developing rats. *Toxicol Sci*. 77:83-90.
- Richardson, J.R. y Chambers, J.E. (2005). Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on cholinergic neurochemistry in developing rats. *Toxicol Sci*. 84: 352-359.
- Richardson, J.R., Caudle, W.M., Wang, M., Dean, E.D., Pennell, K.D. y Miller, G.W. (2006). Developmental exposure to the pesticide dieldrin alters the dopamine system and increases neurotoxicity in an animal model of Parkinson's disease. *J FASEB*. 20: 1695-1697.
- Rhodes, M.C., Seidler, F.J., Qiao, D., Tate, C.A., Cousins, M.M. Y Slotkin, T.A. (2004). Does pharmacotherapy for preterm labor sensitize the developing brain to environmental neurotoxicants? Cellular and synaptic effects of sequential exposure to terbutaline and chlorpyrifos in neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 195:203-217.
- Rohlman, D.S., Anger, W.K. y Lein, P.J. (2011). Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology*. 32: 268-276.
- Rowe, L.D., Warner, S.D. y Johnston, R.V. (1978). Acute Delayed Neurotoxicologic Evaluation of Chlorpyrifos in White Leghorn Hens. Report TA-609. Lake Jackson, Tex, USA. Submitted to WHO by Dow AgroSciences, Indianapolis, Indiana, USA.
- Roy TS, Andrews JE, Seidler FJ, and Slotkin TA. Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos. *Teratology*. 1998; 58(2), 62-68.
- Ruediger, T. y Bolz, J. (2007). Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. *Adv Exp Med Biol*. 621: 104-15.
- Rush, T., Liu, X.Q., Hjelmhaug, J. y Lobner, D. (2010). Mechanisms of chlorpyrifos and diazinon induced neurotoxicity in cortical culture. *Neuroscience*. 166: 899-906.
- Saez-Valero, J., Sberna, G., McLean, C.A. y Small, D.H. (1999). Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 72: 1600-1608.
- Salazar, J. G., Ribes, D., Cabre, M., Domingo, J.L., Sanchez-Santed, F. y Colomina, M.T. (2011). Amyloid beta peptide levels increase in brain of AbetaPP Swedish mice after exposure to chlorpyrifos. *Curr Alzheimer Res*. 8: 732-740.
- Salmon, A., Erb, C., Meshorer, E., Ginzberg, D., Adani, Y., Rabinovitz, I., Amitai, G. y Soreq, H. (2005). Muscarinic modulations of neuronal anticholinesterase responses. *Chem Biol Interact*. 157-158: 105-113.

- Schlecht, C., Klammer, H., Wuttke, W. y Jarry, H. (2006) A dose-response study on the estrogenic activity of benzophenone-2 on various endpoints in the serum, pituitary and uterus of female rats. *Arch Toxicol.* 80: 656-661.
- Schliebs, R. (2005). Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease--interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem Res.* 30: 895-908.
- Schuh, R.A., Lein, P.J., Beckles, R.A. y Jett, D.A. (2002). Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: Altered phosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicol Appl Pharmacol.* 182:176-185.
- Scheiderer, C.L., McCutchen, E., Thacker, E.E., Kolasa, K., Ward, M.K., Parsons, D., Harrell, L.E., Dobrunz, L.E. y McMahon, L.L. (2006). Sympathetic sprouting drives hippocampal cholinergic reinnervation that prevents loss of a muscarinic receptor-dependent long-term depression at CA3-CA1 synapses. *J Neurosci.* 26: 3745-3756.
- Senanayake, N. (1981). Tri-cresyl phosphate neuropathy in Sri Lanka: A clinical and neurophysiological study with a three year follow up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 44: 775-780.
- Shaltiel, G., Hanan, M., Wolf, Y., Barbash, S., Kovalev, E., Shoham, S., y Soreq, H. (2013). Hippocampal microRNA-132 mediates stress-inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target. *Brain Struct Funct.* 218: 59-72.
- Slotkin, T.A., Levin, E.D. y Seidler, F.J. (2006). Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: Effects on brain development are separable from systemic toxicity. *Environ Health Perspect.* 114: 746-751.
- Slotkin, T.A., Cousins, M.M., Tate, C.A. y Seidler, F.J. (2001). Persistent cholinergic presynaptic deficits after neonatal chlorpyrifos exposure. *Brain Res.* 902:229-243.
- Slotkin, T.A., Seidler, F.J. y Fumagalli, F. (2007). Exposure to organophosphates reduces the expression of neurotrophic factors in neonatal rat brain regions: Similarities and differences in the effects of chlorpyrifos and diazinon on the fibroblast growth factor superfamily. *Environ Health Perspect.* 115: 909-916
- Song, X., Seidler, F.J., Saleh, J.L., Zhang, J., Padilla, S. y Slotkin, T.A. (1997a). Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: Targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol Appl Pharmacol.* 145: 158-174.
- Song, X., Seidler, F.J., and Slotkin, T.A. (1997b). Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: Targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicologist* 36:100.
- Speed, H.E., Blaiss, C.A., Kim, A., Haws, M.E., Melvin, N.R., Jennings, M., Eisch, A.J. y Powell, C.M. (2012). Delayed reduction of hippocampal synaptic transmission and spines following exposure to repeated subclinical doses of organophosphorus pesticide in adult mice. *Toxicol Sci.* 125: 196-208.
- Spencer, P.S. y Schaumburg, H.H. (1976). Central-peripheral distal axonopathy-the pathology of dying-back polyneuropathies. En: *Progress in Neuropathology* (Zimmerman, H.M. Ed.). Grune and Stratton, New York, NY, USA, p. 253.
- Sultatos, L.G. y Murphy, S.D. (1983a) Hepatic microsomal detoxification of the organophosphates paraoxon and chlorpyrifos oxon in the mouse. *Drug Metab Disposition.* 11: 232-238.
- Sultatos, L.G. y Murphy, S.D. (1983b). Kinetic analyses of the microsomal biotransformation of the phosphorothioate insecticides chlorpyrifos and parathion. *Fundam Appl Toxicol.* 3: 16-21.

- Sultatos, L.G., Shao, M. y Murphy, S.D. (1984). The role of hepatic biotransformation in mediating the acute toxicity of the phosphorothionate insecticide chlorpyrifos. *Toxicol Appl Pharmacol.* 73: 60–68.
- Sultatos, L.G., Minor, L.D. y Murphy, S.D. (1985). Metabolic activation of phosphorothioate pesticides: role of the liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 232: 624-628
- Sunaga, M. yoshida, M. y Hara, I. (1989). Metabolism and urinary excretion of chlorpyrifos in rats. *Nippon Eiseigaku Zasshi.* 43: 1124-1129.
- Szutowicz, A., Bielarczyk, H., Gul, S., Ronowska, A., Pawełczyk, T. y Jankowska-Kulawy, A. (2006) Phenotype-dependent susceptibility of cholinergic neuroblastoma cells to neurotoxic inputs. *Met Brain Dis.* 21: 149-161.
- Tang, J., Carr, R.L. y Chambers, J.E. (1999). Changes in rat brain cholinesterase activity and muscarinic receptor density during and after repeated oral exposure to chlorpyrifos in early postnatal development. *Toxicol Sci.* 51: 265-272.
- Tarsa, L. y Goda, Y. (2002). Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 1012-1016.
- Terry, A.V., Jr., Gearhart, D.A., Beck, W.D., Jr., Truan, J.N., Middlemore, M.L., Williamson, L.N., Bartlett, M.G., Prendergast, M.A., Sickles, D.W. y Buccafusco, J.J. (2007). Chronic, intermittent exposure to chlorpyrifos in rats: protracted effects on axonal transport, neurotrophin receptors, cholinergic markers, and information processing. *J Pharmacol Exp Ther.* 322: 1117-1128.
- Terry, A.V., Jr., Stone, J.D., Buccafusco, J.J., Sickles, D.W., Sood, A. y Prendergast, M.A. (2003). Repeated exposures to subthreshold doses of chlorpyrifos in rats: hippocampal damage, impaired axonal transport, and deficits in spatial learning. *The J Pharmacol Exp Ther.* 305: 375-384.
- Thorburn A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal.* 16: 139-144.
- Toiber, D., Greenberg, D.S. y Soreq, H. (2009). Pro-apoptotic protein-protein interactions of the extended N-AChE terminus. *J Neural Transm.* 116: 1435-1442.
- Torres-Altoro, M. I., Mathur, B. N., Drerup, J. M., Thomas, R., Lovinger, D. M., O'Callaghan, J. P. y Bibb, J. A. (2011). Organophosphates dysregulate dopamine signaling, glutamatergic neurotransmission, and induce neuronal injury markers in striatum. *J Neurochem.* 119: 303-313.
- Traver, S., Salthun-Lassalle, B., Marien, M., Hirsch, E.C., Colpaert, F. y Michel, P.P. (2005). The neurotransmitter noradrenaline rescues septal cholinergic neurons in culture from degeneration caused by low-level oxidative stress. *Mol Pharmacol.* 67: 1882-1891.
- Vidair, C.A. (2004). Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: Extrapolation to the human. *Toxicol Appl Pharmacol.* 196: 287–.
- Vogler, M. (2012). BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ.* 19: 67-74.
- Voytko, M.L. (1996). Cognitive functions of the basal forebrain cholinergic system in monkeys: memory or attention? *Behav Brain Res.* 75: 13-25.
- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J. Jr. y Harris, C.C. (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 3706-3711.
- Ward, N.L. y Hagg, T. (2000). BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo. *Exp Neurol.* 162: 297-310.

- Whitney, K.D., Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (1995). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Cellular mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol.* 134: 53-62.
- Wright, C.L. y McCarthy, M.M. (2009). Prostaglandin E2-induced masculinization of brain and behavior requires protein kinase A, AMPA/kainate, and metabotropic glutamate receptor signaling. *J Neurosci.* 29: 13274-13282.
- Yang, D., Howard, A., Bruun, D., Ajua-Alemanj, M., Pickart, C. y Lein, P.J. (2008). Chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon inhibit axonal growth by interfering with the morphogenic activity of acetylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol.* 228: 32-41.
- Zhang, Q., Yu, Y. y Huang, X.F. (2016). Olanzapine Prevents the PCP-induced Reduction in the Neurite Outgrowth of Prefrontal Cortical Neurons via NRG1. *Sci Rep.* 6: 19581.
- Zheng, Q., Olivier, K., Won, Y.K. y Pope, C.N. (2000). Comparative cholinergic neurotoxicity of oral chlorpyrifos exposures in preweanling and adult rats. *Toxicol Sci.* 55:124-132.
- Zimmermann, M., Grosen, S., Westwell, M.S. y Greenfield, S.A. (2008). Selective enhancement of the activity of C-terminally truncated, but not intact, acetylcholinesterase. *J Neurochem.* 104: 221-232.

# **ANEXO I**

**9.1. Acute and long-term exposure to chlorpyrifos induces cell death of basal forebrain cholinergic neurons through AChE variants alteration.**

Javier del Pino<sup>1</sup>, **Paula Moyano**<sup>1</sup>, María José Anadon, José Manuel García, María Jesús Díaz, Jimena García, and María Teresa Frejo.

*<sup>1</sup>Estos autores contribuyeron de manera igualitaria al trabajo*

**Revista: Toxicology.**

Es la revista oficial de la Sociedad Alemana de Toxicología (Alemania).

Email: toxicology@elsevier.com

Naturaleza de la publicación: **Revista de Investigación Científica.**

Indexada: Journal Citation Reports

Categoría o materia de la revista: Toxicología

Posición relativa dentro de la materia: 16/87:

Índice de Impacto: 3.621



## Acute and long-term exposure to chlorpyrifos induces cell death of basal forebrain cholinergic neurons through AChE variants alteration



Javier del Pino<sup>a,\*</sup>, Paula Moyano<sup>b</sup>, María José Anadón<sup>b</sup>, José Manuel García<sup>b</sup>,  
María Jesús Díaz<sup>a</sup>, Jimena García<sup>c</sup>, María Teresa Frejo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Toxicology and Pharmacology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Toxicology and Legal Medicine, Medical School, Complutense University of Madrid, 28041 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Pharmacology, Health Sciences School, Alfonso X University, 28691 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 June 2015

Received in revised form 7 July 2015

Accepted 9 July 2015

Available online 22 July 2015

#### Keywords:

Basal forebrain neurons

Chlorpyrifos

Acetylcholine transferase

Acetylcholine esterase

Acetylcholine

Cell death

High-affinity choline transporter

### ABSTRACT

Chlorpyrifos (CPF) is one of the most widely used organophosphates insecticides that has been reported to induce cognitive disorders both after acute and repeated administration similar to those induced in Alzheimer's disease (AD). However, the mechanisms through which it induces these effects are unknown. On the other hand, the cholinergic system, mainly basal forebrain cholinergic neurons, is involved in learning and memory regulation, and an alteration of cholinergic transmission or/and cholinergic cell loss could induce these effects. In this regard, it has been reported that CPF can affect cholinergic transmission, and alter AChE variants, which have been shown to be related with basal forebrain cholinergic neuronal loss. According to these data, we hypothesized that CPF could induce basal forebrain cholinergic neuronal loss through cholinergic transmission and AChE variants alteration. To prove this hypothesis, we evaluated in septal SN56 basal forebrain cholinergic neurons, the CPF toxic effects after 24 h and 14 days exposure on neuronal viability and the cholinergic mechanisms related to it. This study shows that CPF impaired cholinergic transmission, induced AChE inhibition and, only after long-term exposure, increased CHT expression, which suggests that acetylcholine levels alteration could be mediated by these actions. Moreover, CPF induces, after acute and long-term exposure, cell death in cholinergic neurons in the basal forebrain and this effect is independent of AChE inhibition and acetylcholine alteration, but was mediated partially by AChE variants alteration. Our present results provide a new understanding of the mechanisms contributing to the harmful effects of CPF on neuronal function and viability, and the possible relevance of CPF in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Chlorpyrifos (CPF) is one of the organophosphate (OP) insecticides most widely used in agricultural and residential settings (Richardson and Chambers, 2005). CPF is able to cause developmental toxicity, immunological abnormalities, and

neurotoxicity (Ki et al., 2013). Moreover, OP occupational exposure has been related in human epidemiological studies with neurological and neuro-behavioral deficits including impairments of cognition (Hernandez et al., 2015; Rohlman et al., 2011). In this regard, CPF has been shown to produce learning deficits in rats after acute and repeated administration similar to those induced in Alzheimer's disease (AD) (Lopez-Granero et al., 2013b; Middlemore-Risher et al., 2010; Moser et al., 2005). However, the complete mechanisms through which CPF induces these cognitive alterations are unknown.

Cholinergic neurons and their projections are widely distributed throughout the central nervous system (CNS) with an essential role in regulating many vital functions, such as learning, memory, cortical organization of movement and cerebral blood flow control (Mesulam et al., 2002). CPF toxicity is typically initiated by inhibition of acetylcholinesterase (AChE) (Rush et al., 2010), with the consequent alteration of cholinergic neurotransmission, which

*Abbreviations:* Ach, achetylcholine; AChE, acetylcholine esterase; CHT, high-affinity choline transporter; ChAT, acetylcholine transferase; VAcHT, vesicular acetylcholine transporter; DMSO, dimethylsulphoxide; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FBS, fetal bovine serum; MTT, 3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; BSA, bovine serum albumin; iso-OMPA, tetraisopropylpyrophosphoramidate; PBS, phosphate-buffered saline; OP, organophosphates; CPF, chlorpyrifos; AD, Alzheimer's disease.

\* Corresponding author at: Department of Toxicology and Pharmacology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain. Fax: +34 916716224.

E-mail address: [jdelpino@pdi.ucm.es](mailto:jdelpino@pdi.ucm.es) (J.d. Pino).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2015.07.004>

0300-483X/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**9.2. Apoptotic and necrotic basal forebrain cholinergic neuronal loss and dendritic spines alteration after acute and long-term chlorpyrifos exposure: Legal implications of the use of toxicogenomic profile as a biomarker of harmful effects induced under subclinical doses.**

**Paula Moyano**, Javier del Pino, María José Anadon, José Manuel García, María Jesús Díaz, Gloria Gómez, Jimena García, María Teresa Frejo y Miguel Andrés Capó.

**Revista: Medicina Balear.**

Es la revista oficial de la Real Academia de Medicina de las Islas Baleares (España).

Email: [www.medicinabaleares.org](http://www.medicinabaleares.org)

Naturaleza de la publicación: **Revista de Investigación Científica.**

Indexada: Latindex.

Criterios de valoración:

-Características cumplidas: 36.

-Características no cumplidas: 0.

## Apoptotic and necrotic basal forebrain cholinergic neuronal loss and dendritic spines alteration after acute and long-term chlorpyrifos exposure: Legal implications of the use of toxicogenomic profile as a biomarker of harmful effects induced under subclinical doses

*Muerte de neuronas colinérgicas de la región basal por necrosis y apoptosis, así como alteración de la densidad de espinas dendríticas tras la exposición aguda y a largo plazo a clorpirifos: Implicaciones legales del uso del perfil toxicogenómico como biomarcador de efectos dañinos inducidos a dosis subclínicas*

Paula Moyano<sup>1</sup>, Javier del Pino<sup>1</sup>, María José Anadón<sup>1</sup>, José Manuel García<sup>1</sup>, María Jesús Díaz<sup>1</sup>, Gloria Gómez<sup>1</sup>, Jimena García<sup>2</sup>, María Teresa Frejo<sup>1</sup> and Miguel Andrés Capo<sup>1</sup>

1. Department of Toxicology and Pharmacology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.

2. Department of Pharmacology, Health Sciences School, Alfonso X University, 28691, Madrid, Spain.

### Correspondencia

Javier del Pino PhD

Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria

Departamento de Toxicología y Farmacología

Avda. Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid, Spain

Tel.: 91 355 09 20 – E-mail: jdelpino@pdi.ucm.es

Recibido: 17 – VIII – 2015

Aceptado: 25 – IX – 2015

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.30.03.12

### Abstract

**Introduction:** Chlorpyrifos (CPF) is an organophosphate insecticide reported to induce both after acute and repeated exposure learning and memory dysfunctions, although the mechanism is not completely known. CPF produces basal forebrain cholinergic neuronal loss, involved on learning and memory regulation, which could be the cause of such cognitive disorders. This effect was reported to be mediated through apoptotic process, although neuronal necrosis was also described after CPF exposure. Otherwise, neuronal dendritic spines were reported to be also involved on learning and memory process regulation and their alteration could also contribute to this effect. In this regard, CPF has been reported to induce an alteration in the dendritic spines density in the prefrontal cortex and hippocampus after acute and repeated exposure to subclinical doses respectively, thus their alteration in basal forebrain cholinergic neurons could also mediate cognitive disorders.

**Objectives and methods:** Accordingly, we hypothesized that CPF induces basal forebrain cholinergic dendritic spine alteration at low concentrations and at higher concentrations produces necrotic and apoptotic cell death. We evaluated in septal SN56 basal forebrain cholinergic neurons, the CPF effect after 24 h and 14 days exposure on dendritic spines, the necrosis induction and the apoptotic and necrotic gene expression pathways.

**Results:** This study shows that CPF induces after acute and long-term exposure an alteration of dendritic spines at lower concentrations than which induces cell death. Evaluation of cell death pathways and genes related to dendritic spine plasticity revealed that some of them are altered at lower concentrations than which produces the effects observed and below the No Observed Adverse Effect (NOAEL).

**Conclusions:** The present finding suggest that the use of gene expression profile could be a more sensitive and accurate way to determine the NOAEL.

**Keywords:** Basal forebrain cholinergic neurons, chlorpyrifos, necrosis, apoptosis, dendritic spines, LOATEL, health legislation

### Resumen

**Introducción:** El clorpirifos (CPF) es un insecticida organofosforado que tras la exposición aguda y repetida, induce disfunciones de los procesos de aprendizaje y memoria, aunque el mecanismo por el cual se produce este efecto no se conoce por completo. El CPF produce en la región cerebral basal anterior la pérdida de neuronas colinérgicas, que participan en la regulación de los procesos de aprendizaje y la memoria, pudiendo ser esta la causa de tales trastornos cognitivos. Se ha observado que este efecto está mediado a través del proceso de apoptosis, aunque también se ha descrito que se produce necrosis neuronal tras la exposición a CPF. Por otra parte, también se ha demostrado que las espinas dendríticas participan en la regulación de los procesos de aprendizaje y memoria y su disrupción también podría contribuir a la alteración de dichos procesos. En este sentido, se ha descrito que el CPF altera la densidad de las espinas dendríticas en la corteza prefrontal y el hipocampo tras la exposición aguda y repetida a dosis subclínicas, respectivamente, por lo que su perturbación en las neuronas colinérgicas de la región basal anterior también podría mediar estos trastornos cognitivos.

**Objetivos y métodos:** De acuerdo con lo expuesto, nosotros hipotetizamos que el CPF induce, en las neuronas colinérgicas de la región basal anterior, una alteración de las espinas dendríticas a bajas concentraciones y a concentraciones más altas produce muerte celular por apoptosis y necrosis. Evaluamos en neuronas colinérgicas SN56 de la región basal anterior, el efecto del CPF

después de 24 horas y 14 días de exposición sobre las espinas dendríticas, la inducción de necrosis y las vías de expresión génica que median la inducción de apoptosis y necrosis.

**Resultados:** Este estudio demuestra que el CPF induce, tras la exposición aguda y a largo plazo, una alteración de las espinas dendríticas, a concentraciones más bajas de aquellas a las que induce la muerte celular. La evaluación de las vías de muerte celular y los genes relacionados con la plasticidad de la espina dendrítica reveló que algunos de estos genes están alterados a concentraciones más bajas de aquellas a las que producen muerte celular o alteración de las espinas dendríticas y por debajo del Nivel sin efecto adverso observable (NOAEL).

**Conclusiones:** El presente estudio sugiere que el uso del perfil de expresión génica podría ser una manera más sensible y precisa para la determinación del NOAEL.

**Palabras clave:** Neuronas colinérgicas de la región basal anterior, clorpirifos, necrosis, apoptosis, espinas dendríticas, LOATEL, regulación sanitaria

## Introduction

Chlorpyrifos (CPF) is an organophosphate (OP) insecticide widely used in domestic, agricultural, and industrial applications<sup>1</sup>. Human epidemiological studies have related OPs occupational exposure with neurological and neuro-behavioral deficits including impairments of learning and memory process<sup>2,3</sup>. In this regard, CPF has been shown to produce learning deficits in rats, after acute and repeated administration<sup>4,6</sup>. It has been suggested that inhibition of cholinesterase activity by CPF could be involved in these effects<sup>7</sup>. However, human studies of occupational exposure to OPs often fail to find a significant correlation between blood cholinesterase activity and neuro-behavioral deficits<sup>2,3</sup>.

Otherwise, degeneration of septal cholinergic neurons that project to hippocampus has been linked to memory deficits that result from cholinergic modulation of hippocampal synaptic circuit loss<sup>8</sup>. Degeneration of septo-hippocampal cholinergic neurons, as seen in AD and other neurodegenerative diseases, results in loss of cholinergic modulation of septo-hippocampal synaptic circuits that leads to memory deficits<sup>9</sup>. In fact, the severity of memory deficit is strongly correlated with the degree of cholinergic cell loss<sup>9</sup>. Thus, cholinergic neuronal loss in this region could be related with CPF impairment of memory function among other actions<sup>10</sup>.

In this regard, Lopez-Granero et al<sup>4</sup> reported that chronic dietary exposure in rats produced cognitive and emotional disorders related with changes in AChE forms. In addition, Del Pino et al<sup>1</sup> reported that CPF induced, after acute and long-term exposure, apoptotic cell death in cholinergic neurons from the basal forebrain and this effect was independent of AChE inhibition and acetylcholine level alteration, but was mediated partially by AChE-R and AChE-S overexpression, supporting the idea that the cognitive disorders reported after CPF exposures may be produced by induction of basal forebrain cholinergic cell loss mediated partially through AChE forms alteration. In addition, CPF has also been reported to induce neuronal cell death through necrosis process after CPF acute and long-term exposure<sup>12,13</sup>, thus the cell death observed could be also mediated through necrosis induction by CPF. In this regard, previously Del Pino et al<sup>14</sup> reported

that AChE-R and AChE-S overexpression induces at low concentrations apoptosis and necrosis at high concentrations in basal forebrain cholinergic neurons, supporting our hypothesis.

Otherwise, loss of dendritic spines has been reported in neurodegenerative disorders as AD affecting mostly selective neuronal networks of critical importance for memory and cognition, such as the basal forebrain cholinergic system, the medial temporal regions, the hippocampus and many neocortical association areas<sup>15</sup> inducing cognitive disorders<sup>16,17</sup>. In this regard, CPF has been reported to induce an alteration in the dendritic spines density in the prefrontal cortex and hippocampus after acute and repeated exposure to subclinical doses respectively<sup>18,19</sup>. Moreover, cognitive disorder has been reported to be produced from subclinical doses and from a lower doses from which basal forebrain cholinergic cell loss has been reported<sup>20</sup>, as happens with dendritic spines alteration.

According to these data, we hypothesized that CPF induces basal forebrain cholinergic dendritic spine alteration at low concentrations and at higher concentrations produces neuronal loss through necrosis and apoptosis. The present work intends to study the CPF mechanisms of basal forebrain cholinergic neuronal loss and dendritic spine alteration, due to the importance of these effects to explain CPF toxicity on cognitive disorders and neurodegenerative diseases symptoms like. To reach this aim we treated with CPF for 24 h or repeatedly for 14 days, wild type or transfected with siRNA for AChE, SN56 cells from basal forebrain as an *in vitro* model of cholinergic neuronal cells from this region to research the CPF effect on dendritic spines and expression of genes involved in dendritic outgrowth, the necrotic cell death induction through AChE splice variants alteration and the apoptotic and necrotic gene expression pathways related to cell death process.

## Materials and methods

### Chemicals

The compounds chlorpyrifos (99.99%), poly-L-lysine, dibutyl-cAMP, retinoic acid, 3,3'-diaminobenzidine-tetrachloride, anti-microtubule-associated protein-2 (MAP-2) monoclonal antibody and paraformaldehyde were obtained

ned from Sigma (Madrid, Spain). All other chemicals were reagent grade of the highest laboratory purity available.

#### **Culture of SN56 cells**

SN56 cells, a cholinergic murine neuroblastoma cell line derived from septal neurons<sup>21</sup>, were used as a model of cholinergic neurons from basal forebrain to evaluate CPF toxic effects on this specific type of neurons and the mechanisms through which they are induced. The cells were maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine (Sigma, Madrid, Spain), and 1 mM sodium pyruvate. Medium was changed every 48 h<sup>22</sup>. Differentiation of the cells was achieved by culturing for 3 days with 1 mM dibutyl-cAMP and 1 μM retinoic acid as described<sup>23,24</sup>, which produce morphological maturation and 3-4-fold increase of ChAT activity and acetylcholine level in the cells. Differentiated cells have been reported to be more sensitive to neurotoxic compound that affects cholinergic pathways<sup>23,24</sup>.

In order to determine the dendritic spine density, the cellular lactate dehydrogenase (LDH) content in wild type and siRNA AChE transfected cells, the apoptotic and necrotic main gene expression pathways, and the expression of the main genes related with dendritic spines plasticity, cells were seeded in 6-well plates at a density of 10<sup>6</sup> cells/well. Cells were treated for 24 h or for 14 days with CPF in concentrations between 0.01 μM to 70 μM and 0.01 μM to 40 μM respectively. At least 3 replicate wells/treatment were used. A vehicle group was employed in parallel for each experiment as a control.

In the literature, 10–100 μM chlorpyrifos has been routinely used to study chlorpyrifos toxicity<sup>25–28</sup>, although there are not enough data regarding the relative distribution or concentration of CPF in human brain after acute and chronic exposure. In addition, studies have shown that the blood plasma concentration of CPF from human volunteers were similar to 0.1 μM<sup>29</sup>. Moreover, whole-body molar concentrations associated with the doses of CPF (2.5–25.0 mg/kg/day) used in behavioral experiments have been reported to be calculated as ranging between approximately 7.0 and 8.0 to 70.0 and 80.0 μM<sup>29</sup>. The NOAEL set for CPF is 0.1 mg/kg bw per day<sup>30</sup>, which would be around 0.3 μM concentration in the tissues according to Terry et al<sup>30</sup>. The used doses appear to be relevant to study the cognitive disorders according to all described above. Furthermore, we chose CPF 30 μM concentration, which was the lowest concentration observed to induce cell death after acute exposure<sup>1</sup>, to study the CPF necrotic and apoptotic mechanisms.

#### **Lactate dehydrogenase (LDH) assay**

The necrotic cell death was assessed by measuring the LDH released into the culture medium using Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich, Madrid,

Spain) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the culture medium was removed and pipetted into 96-well plates. The Master Mix reagent was added, and after 3 min colorimetric intensity was determined at 450 nm over every 5 min using a microplate spectrophotometer (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain).

#### **Gene knockdown**

SN56 cells were transfected with siRNAs in 6-well plates (1 x 10<sup>6</sup> cells/well) using HiPerfect Transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Barcelona, Spain). Two sets of siRNA duplexes (Qiagen, Barcelona, Spain) homologous to mouse AChE sequence were designed using the Hi-Performance Design Algorithm (Novartis AG) and were purchased from Qiagen (catalog numbers GS11423 a). As a transfection control, an All Stars Negative Control siRNA (Qiagen, Barcelona, Spain) was used. 48 h after transfection, the efficiency of siRNA-mediated AChE was determined by RT-PCR using primers specific for mouse AChE mRNA (Qiagen, Barcelona, Spain). The effects of AChE knockdown on cell injury were tested by LDH cell viability assay. After 24 h of incubation with the siRNAs, the cells were washed with PBS and incubated for a further 24 h or 14 days in culture medium with or without CPF.

#### **Protein determination**

At the end of the treatments, SN56 cells were washed with pre-chilled PBS, collected by scraping, and lysed using RIPA buffer (Thermo Scientific, Madrid, Spain) with freshly added protease inhibitors cocktail (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain). After centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4°C, cell lysate supernatant was collected. Protein concentration was assayed using a BCA kit (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain) and normalized.

#### **Dendritic spines density determination.**

SN56 differentiated cell were suspended in DEMEM medium. Cells suspension was plated at a density of 10<sup>6</sup> cell/ml onto poly-L-lysine 0.10 mg/mL coated glass coverslips (22 mm diameter) placed in plastic Petri dishes (35 mm diameter) coated with poly-L-lysine. Coverslips with adhered SN56 cells were fixed with ice-cold 4% (w/v) paraformaldehyde for 15 min and then placed into 0.5 M potassium/PBS (KPBS) until use. Coverslips were washed three times in KPBS, and cells were permeabilized with 50% ethanol for 1 h and blocked with 10% normal goat serum in 0.1% Triton X-100-supplemented KPBS (0.1% KPBST). After three 15 min KPBS washes, coverslipped cells were then incubated overnight in primary anti-microtubule-associated protein-2 (MAP-2) monoclonal antibody at 1:1000 dilution in 0.1% KPBST at 4°C. Three washes of 0.1% KPBST was then followed by immersion for 2 h in secondary anti-mouse antibody conjugated to biotin (Vector Laboratories) diluted 1:500 in 0.1% KPBST, washed in 0.1% KPBST, and visualized using Vectastain-avidin-biotin horseradish peroxidase complex (Vector

Laboratories, Barcelona, Spain) at 1:1000 dilution in 0.1% KPBST for 1 h before staining with 0.05% (w/v) 3,3'-diaminobenzidinetetrachloride, 0.005% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 2.5% (w/v) nickel (II) sulfate in 0.175 M sodium acetate<sup>31</sup>. MAP-2 protein is not localized in dendritic spines but allows for accurate quantification of dendritic spine density.

### Real-time PCR analysis

Total RNA was extracted using the Trizol Reagent method (Invitrogen, Madrid, Spain). The final RNA concentration was determined using a spectrophotometer Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain) and the quality of total RNA samples was assessed using an ExperionLabChip (Bio-Rad, Madrid, Spain) gel. First-strand cDNA was synthesized with 1000 ng of cRNA by using a PCR array first strand-synthesis kit (C-02; SuperArray-Bioscience, Madrid, Spain) following the manufacturer's instructions and including a genomic DNA elimination step and external RNA controls. After reverse transcription, we performed QPCR using the mouse Cell Death PathwayFinder PCR Array (PAMM-212Z) used to analyze mRNA levels of 84 key genes involved in cell death, in a 96-well format, according to the manufacturer's instructions (SABiosciencesInc). Reactions were run on a CFX96 using Real-Time SYBR Green PCR master mix PA-012 (SABiosciencesInc). The thermocycler parameters were 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Relative changes in gene expression were calculated via SuperArray PCR Array Data Analysis Software using the cycle threshold (Ct) method with normalization of the raw data to several housekeeping genes. The expression data are presented as actual change multiples. We also performed QPCR using prevalidated primer sets (SuperArray Bioscience) for mRNAs encoding Postsynaptic Density Protein 95 (PSD95; PPH01848A), Spinophilin (SPN; PPM34114A), Synaptophysin (SYP; PPM03241A), N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit NR1 (NMDAR1; PPH01823F), AChE (PPM35356A), and ACTB (PPM02945B). We used ACTB as an internal control for normalization. Reactions were run on a CFX96 using Real-Time SYBR Green PCR master mix PA-012 (SuperArray Bioscience). The thermocycler parameters were 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 72°C for 30 seconds. Relative changes in gene expression were calculated using the Ct (cycle threshold) method. The expression data are presented as actual change multiples<sup>32</sup> (Livak and Schmittgen 2001).

We chose PSD95, NMDAR1, SPN and SYP genes to determine the effect of CPF on dendritic spine density, because both genes are the main regulators of dendritic spine plasticity<sup>23,35</sup>.

### Statistical analysis

At least three replicates for each experimental condition were performed, and the presented results were representative of these replicates. Data are represented as

means  $\pm$  standard deviation (SD). Comparisons between experimental and control groups were performed by Student's *t* test and ANOVA analyses followed by the Tukey post-hoc test. Statistical difference was accepted when  $p \leq 0.05$ . Statistical analysis of data was carried out by computer using GraphPad software.

## Results

### Effect of CPF on SN56 cell viability

We used the LDH assay to evaluate cell survival after 24 h and 14 days exposure to CPF at increasing concentrations. LDH is released from cells as a result of loss of plasma membrane integrity and it is indicative of necrotic cell death mechanism. An increased LDH release to the medium was observed in a dose dependent way after 24 h and long-term CPF exposure from 50  $\mu$ M and 20  $\mu$ M concentrations respectively compared with vehicle-treated cells (control negative) (Figure 1). Moreover, after CPF treatment of SN56 AChE silenced cells amelioration in LDH release was also observed (Figure 1). There was no significant difference between data of vehicle-treated cells and control cells.

### AChE gene knockdown

To investigate the protection afforded by the knockdown of the AChE during cell death, we introduced siRNA oligonucleotides into SN56 cells by transfection directed against AChE. Transfection of cells with control siRNA showed no effect on AChE gene expression or cell viability, but the AChE siRNA caused large reductions in AChE gene expression (Figure 2). Cultures transfected with control siRNA compared with culture transfected against AChE, showed no effect in cell viability by LDH assays (Figure 2).

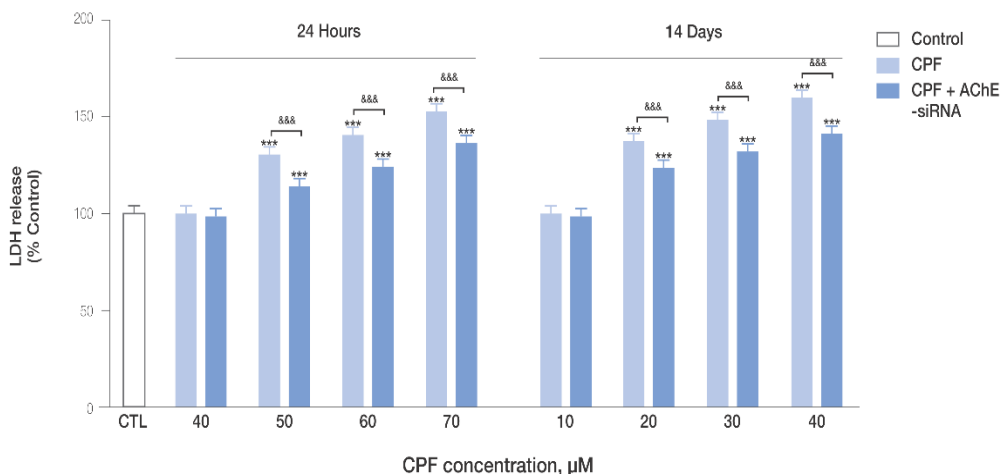
### Effect of CPF on dendritic spine density

We observed that CPF induces acute (from 1  $\mu$ M) and long-term (from 0.1  $\mu$ M), concentration-dependent, reduction in the number of dendritic spine-like processes per length of neurite compared with vehicle treated on SN56 cultured neurons (Figure 3). There was no effect of treatment on mean soma size or the number of neurites per neuron (Data not shown).

### Real-time PCR analysis

After incubation for 24 h and 14 days with 0.01  $\mu$ M and 30  $\mu$ M concentrations of CPF in SN56 cells, necrotic and apoptotic gene expression profile of CPF was analyzed with our Real-time PCR arrays. Moreover, the CPF effect on AChE and the main regulator dendritic spines synaptic plasticity gene expression in AChE silenced Cells and wild type respectively were analyzed. The gene expression profile of CPF was significantly different from normal control. The results show that after 24 h and 14 days exposure at 0.01  $\mu$ M concentration of CPF only the expression of TNF, TNFRSF1A, TNFRSF10A, TNFRSF11B proapoptotic

**Figure 1:** CPF (0.01 to 70  $\mu$ M) effect on cell viability of SN56 wild type or AChE silenced was determined by LDH release assays. Results are expressed as percentages of LDH release after subtracting the control values. Data represents the mean  $\pm$  SD of three separate experiments from cells of different cultures, each one performed in triplicate. \*\*\* $p$ <0.001 compared to control. \*\*\*\* $p$ <0.001 compared to CPF treatment.

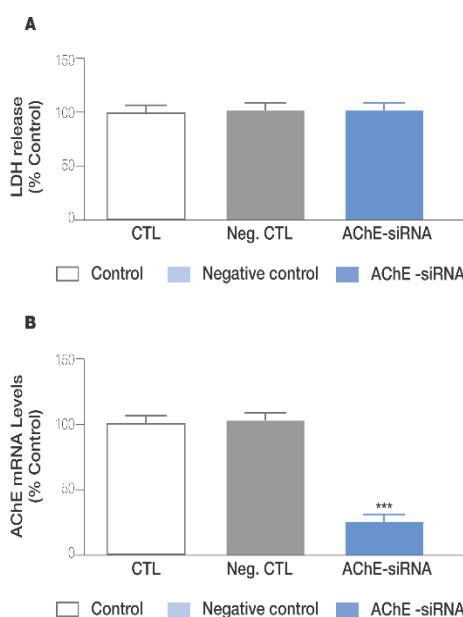


genes, TRAF2, BIRC2 and BIRC3 antiapoptotic genes and MAG, S100A7A and KCN1P1 genes related with necrosis process was induced (Table I and II). Moreover, after 24 h exposure at 30  $\mu$ M concentration of CPF 27 genes were up-regulated and 5 genes were down-regulated with a fold change higher and lower than 1.5 respectively for CPF compared with normal control (Table I). In addition, after and 14 days exposure at 30  $\mu$ M concentration of CPF 43 genes were up-regulated and 7 genes were down-regulated with a fold change higher and lower than 1.5 respectively for CPF compared with normal control (Table II). Finally, we observed that after acute (from 0.01  $\mu$ M) and long term (from 0.01  $\mu$ M) CPF exposure, a concentration-dependent reduction in PSD95 and SYP gene expression (Figure 4A and 4B), but we only observed a concentration-dependent gene expression reduction of SPN and NMDANR1 after acute exposure from 1  $\mu$ M CPF concentration and after long-term exposure from 0.1  $\mu$ M CPF concentrations (Figure 4C and 4D).

## Discussion

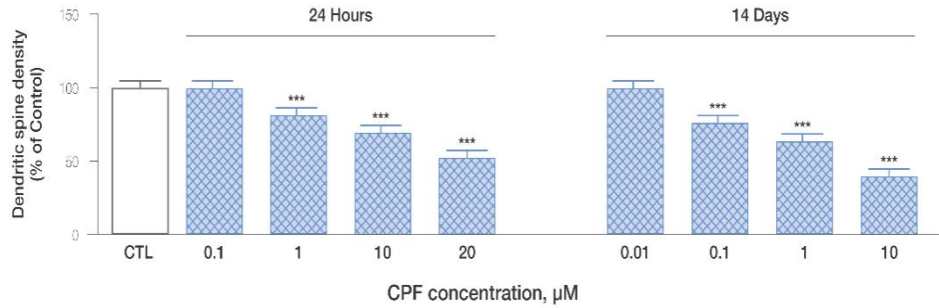
In the present work we show that CPF induces acute (from 50 $\mu$ M) and long-term (from 20  $\mu$ M), concentration-dependent, necrotic cell death on septal SN56 cholinergic basal forebrain neurons. These results are supported by previous works which showed that CPF induced neuronal cell death through necrosis process after CPF acute and long-term exposure<sup>12,13</sup>. Previously, we found that CPF induces acute (from 30 $\mu$ M) and long-term (from 1  $\mu$ M), concentration-dependent, cell death on septal SN56 cholinergic basal forebrain neurons, showing that apoptotic process is involved in this effect mediated partially by AChE variants overexpression<sup>11</sup>. Moreover, we show that the increase in LDH release was mediated partially by AChE overexpression. In this regard, Del Pino et

**Figure 2:** Downregulation of AChE in SN56 cells and its impact on cell viability and gene expression was determined. Control: SN56 cells transfected without siRNA. Negative (Neg.) control: SN56 cells transfected with scrambled siRNA. AChE-siRNA: transfected with siRNA against AChE. (A) LDH assays shows that AChE downregulation did not significantly induce cell damage after 48 h. (B) AChE downregulation could be detected by RT-PCR analysis 48 h after transfection. Values are given as mean  $\pm$  SD of three separate experiments from cells of different cultures, each one performed in triplicate. \*\*\* $p$ <0.001 compared to control.

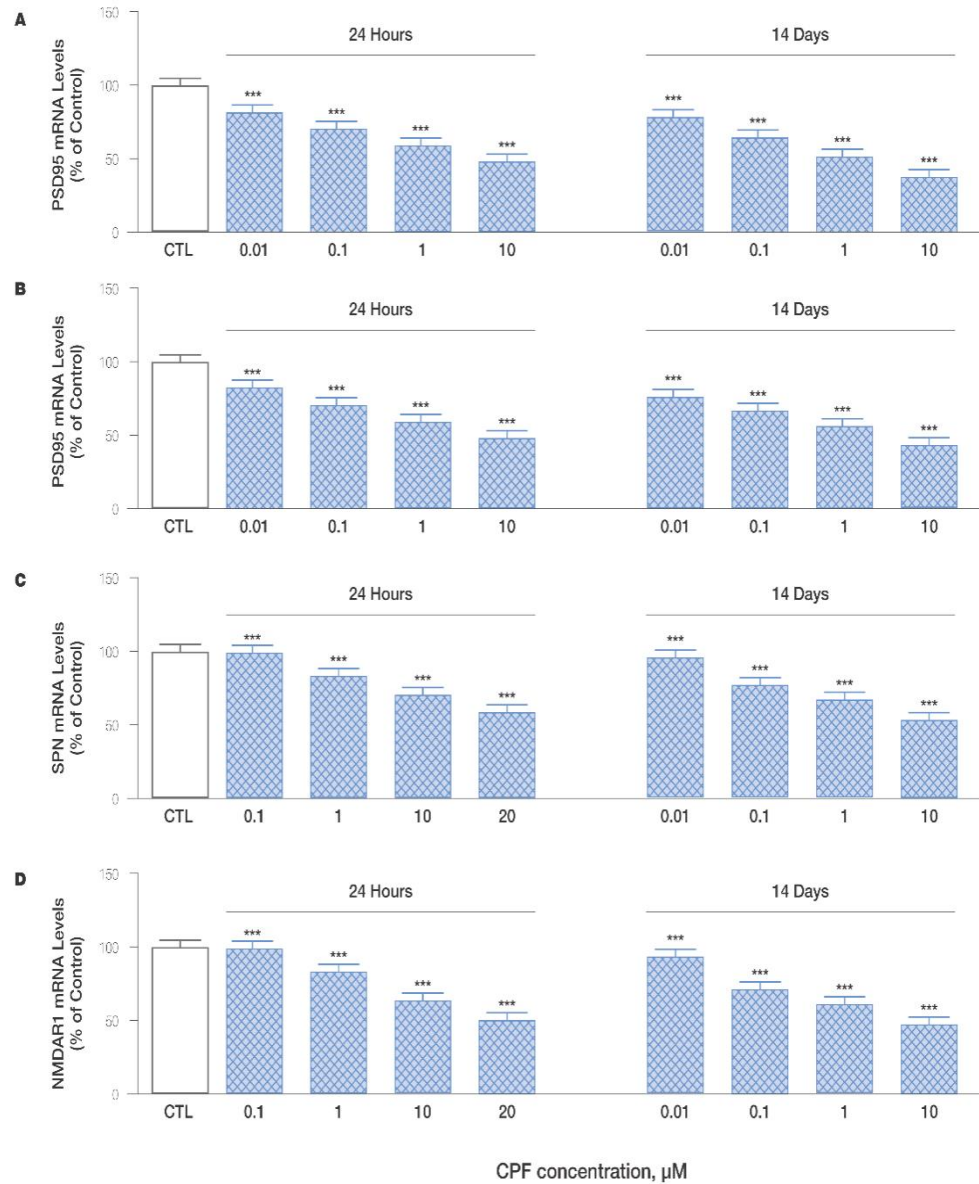


al<sup>1</sup> reported that AChE-R and AChE-S overexpression induces at low concentrations apoptosis and necrosis at higher concentrations in basal forebrain cholinergic neurons, supporting our results. Basal forebrain cholinergic neurons loss has been related with cognitive deficits<sup>38-40</sup>. In fact, the severity of memory deficit is strongly corre-

**Figure 3:** Effects of different CPF concentrations for 24 h or 14 days on dendritic spine density were determined in neurite SN56 cells. Dendritic spine density is indicated as % of control (CTL, white column). Data represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments in triplicate. \*\*\* $p < 0.001$  compared to control.



**Figure 4:** Shows results from real-time PCR arrays targeting (A) PSD95, (B) SYP, (C) SPN and (D) NMDAR1 genes after 24 h and 14 days CPF treatment. PSD95, SYP, SPN and NMDAR1 gene expression was compared with controls. Each bar represents mean  $\pm$  SD of 6 samples. Levels were measured using qPCR. ACTB was used as an internal control. \*\* $p < 0.001$ , significantly different from controls.



**Table 1:** Fold-change of cell death related genes after 24 h CPF treatment. Values on red or blue mean a fold change upper or downer than 2

Gene Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change		Gene Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change	
		0.01µM	30µM			0.01µM	30µM
ABL1	NM_005157	1,11 <sup>b</sup>	1,23 <sup>b</sup>	FOX11	NM_012188	1,12 <sup>a</sup>	0,07
AKT1	NM_005163	1,02	1,05	GAA	NM_000152	1,09	1,19 <sup>a</sup>
APAF1	NM_001160	1,15 <sup>b</sup>	2,52 <sup>c</sup>	GADD45A	NM_001924	1,11 <sup>a</sup>	2,24 <sup>b</sup>
APP	NM_000484	1,16 <sup>a</sup>	1,41 <sup>a</sup>	GALNT5	NM_014568	1,03	1,05
ATG12	NM_004707	1,17 <sup>a</sup>	1,13 <sup>b</sup>	GRB2	NM_002086	1,06	1,09
ATG16L1	NM_017974	1,21 <sup>a</sup>	1,16 <sup>b</sup>	HSPBAP1	NM_024610	1,05	1,13 <sup>b</sup>
ATG3	NM_022488	1,04	1,11 <sup>a</sup>	HTT	NM_002111	1,06	1,23 <sup>a</sup>
ATG5	NM_004849	1,01	1,21 <sup>a</sup>	IFNG	NM_000619	1,07	1,08
ATG7	NM_006395	1,04	1,04	IGF1	NM_000618	1,01	1,14 <sup>a</sup>
ATP6V1G2	NM_130463	1,02	1,02	IGF1R	NM_000875	1,02	1,09
BAX	NM_004324	1,05	2,54 <sup>c</sup>	INS	NM_000207	1,07	1,11 <sup>b</sup>
BCL2	NM_000633	1,10 <sup>b</sup>	1,15 <sup>b</sup>	IRGM	NM_001145805	1,13 <sup>b</sup>	1,28 <sup>a</sup>
BCL2A1	NM_004049	1,02	1,04	JPH3	NM_020655	1,09	1,06
BCL2L1	NM_138578	1,13 <sup>a</sup>	2,23 <sup>b</sup>	KCNIP1	NM_014592	2,51 <sup>a</sup>	3,21 <sup>a</sup>
BCL2L11	NM_006538	1,01	2,32 <sup>b</sup>	MAG	NM_002361	2,12 <sup>a</sup>	2,69 <sup>a</sup>
BECN1	NM_003766	1,03	1,06	MAP1LC3A	NM_181509	1,08	2,35 <sup>a</sup>
BIRC2	NM_001166	1,72 <sup>a</sup>	-1,43 <sup>a</sup>	MAPK8	NM_002750	1,07	1,17 <sup>b</sup>
BIRC3	NM_001165	1,69 <sup>a</sup>	-1,59 <sup>a</sup>	MCL1	NM_021960	1,14 <sup>a</sup>	1,27 <sup>a</sup>
BMF	NM_033503	1,06	1,06	NFKB1	NM_003998	1,02	1,06
C1orf159	NM_017891	1,13 <sup>a</sup>	1,16 <sup>b</sup>	NOL3	NM_003946	1,05	1,04
CASP1	NM_033292	1,05	2,21 <sup>a</sup>	OR10J3	NM_001004467	1,01	1,07
CASP2	NM_032982	1,01	1,09	PARP1	NM_001618	1,11 <sup>a</sup>	1,03
CASP3	NM_004346	1,05	1,57 <sup>a</sup>	PARP2	NM_005484	1,06	1,01
CASP6	NM_032992	1,06	1,25 <sup>a</sup>	PIK3C3	NM_002647	1,07	1,05
CASP7	NM_001227	1,02	2,31 <sup>a</sup>	PVR	NM_006505	1,06	1,10 <sup>a</sup>
CASP9	NM_001229	1,01	1,69 <sup>b</sup>	RAB25	NM_020387	1,03	1,02
CCDC103	NM_213607	1,07	1,05	RPS6KB1	NM_003161	1,27 <sup>a</sup>	1,31 <sup>a</sup>
CD40	NM_001250	1,08	3,31 <sup>a</sup>	S100A7A	NM_176823	2,17 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup>
CD40LG	NM_000074	1,06	3,56 <sup>b</sup>	SNCA	NM_000345	1,06	1,25 <sup>a</sup>
CFLAR	NM_003879	1,21 <sup>a</sup>	1,11 <sup>a</sup>	SPATA2	NM_006038	1,12 <sup>a</sup>	2,41 <sup>a</sup>
COMM4	NM_017828	1,02	1,02	SQSTM1	NM_003900	1,17 <sup>a</sup>	1,12 <sup>a</sup>
CTSB	NM_001908	1,13 <sup>a</sup>	1,05	SYCP2	NM_014258	1,03	1,66 <sup>a</sup>
CTSS	NM_004079	1,08	1,04	TMEM57	NM_018202	1,11 <sup>a</sup>	1,15 <sup>a</sup>
CYLD	NM_015247	1,12 <sup>a</sup>	1,08	TNF	NM_000594	1,53 <sup>a</sup>	1,69 <sup>a</sup>
DEFB1	NM_005218	1,01	1,01	TNFRSF10A	NM_003844	1,61 <sup>a</sup>	1,78 <sup>a</sup>
DENND4A	NM_005848	1,03	1,33 <sup>b</sup>	TNFRSF11B	NM_002546	2,01 <sup>b</sup>	2,37 <sup>b</sup>
DFFA	NM_004401	1,05	1,09	TNFRSF1A	NM_001065	1,75 <sup>a</sup>	1,91 <sup>a</sup>
DPYSL4	NM_006426	1,01	1,05	TP53	NM_000546	1,10	1,67 <sup>a</sup>
EIF5B	NM_015904	1,03	1,33 <sup>b</sup>	TRAF2	NM_021138	2,22 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup>
ESR1	NM_000125	1,04	1,07	TXNL4B	NM_017853	1,01	1,69 <sup>a</sup>
FAS	NM_000043	1,02	2,31 <sup>a</sup>	ULK1	NM_003565	1,02	1,04
FASLG	NM_000639	1,06	2,13 <sup>b</sup>	XIAP	NM_001167	1,05	1,01

<sup>a</sup>  $p < 0,001$  compared to the control. <sup>b</sup>  $p < 0,05$  compared to the control.

lated with the degree of cholinergic cell loss<sup>9</sup>. Thus, the observed effects on cholinergic basal forebrain neurons may be, in part, responsible for the learning deficits and neurodegenerative disease symptoms like observed after acute and long-term exposure to CPF.

Moreover, after acute (from 0.01 µM) and long-term (from 0.01 µM) CPF exposure we only observed an induction in the gene expression of TNF, TNFRSF1A, TNFRSF10A, TNFRSF11B proapoptotic genes, TRAF2, BIRC2 and BIRC3 antiapoptotic genes and MAG, S100A7A and KCN1P1 genes related with necrosis process. Apoptosis is triggered through the extrinsic pathway when extracellular stimuli and the cytokines CD40L, FASLG, TNFSF10 and TNF-α inducing cytokine receptors, including FAS receptor and tumor necrosis factor super family receptors (TNFRs) like TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF10B and CD40, are activated<sup>41,42</sup>. Inhibitors of apoptosis

BIRC3 and BIRC2, through TRAF2, can prevent its activation<sup>43</sup>. According to this, CPF could activate cell death through extrinsic pathway, but was blocked by activation of apoptosis inhibitors. Otherwise, MAG and S100A7A genes have been related with necrosis induction<sup>44</sup> and KChIP1 expression has been reported to play a protective role against cell death and its downregulation leads to the induction of necrotic cell death<sup>45</sup>. Therefore, KChIP1 overexpression after CPF exposure could be a protective mechanism against cell injury produced by CPF.

In addition, after acute (30 µM) CPF exposure the gene expression resultant showed a fold change greater or lower than 1.5 in the expression of the 29 genes related to apoptosis and necrosis for CPF treatment. Our research showed that CPF increased the expression of CD40, CD40LG, FAS, FASLG, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF1A, TNFRSF11B, which likely led to induce

**Table II:** Fold-change of cell death related genes after 14 days CPF treatment. Values on red or blue mean a fold change upper or downer than 2

Gene Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change		Gene Symbol	GenBank Accession No.	Fold Change	
		0.01µM	30µM			0.01µM	30µM
ABL1	NM_005157	1,15 <sup>a</sup>	1,32 <sup>b</sup>	FOX11	NM_012188	1,15 <sup>a</sup>	2,14 <sup>a</sup>
AKT1	NM_005163	1,07	1,08	GAA	NM_000152	1,04	1,32 <sup>b</sup>
APAF1	NM_001160	1,18 <sup>a</sup>	2,56 <sup>b</sup>	GADD45A	NM_001924	1,14 <sup>a</sup>	2,22 <sup>a</sup>
APP	NM_000484	1,19 <sup>a</sup>	1,31 <sup>e</sup>	GALNT5	NM_014568	1,06	-1,64
ATG12	NM_004707	1,18 <sup>a</sup>	1,24 <sup>e</sup>	GRB2	NM_002086	1,04	2,51 <sup>a</sup>
ATG16L1	NM_017974	1,19 <sup>a</sup>	1,33 <sup>b</sup>	HSPBAP1	NM_024610	1,07	1,69 <sup>a</sup>
ATG3	NM_022488	1,07	1,19 <sup>a</sup>	HTT	NM_002111	1,03	1,13 <sup>a</sup>
ATG5	NM_004849	1,04	1,62 <sup>b</sup>	IFNG	NM_000619	1,05	1,02
ATG7	NM_006395	1,03	1,84 <sup>e</sup>	IGF1	NM_000618	1,06	1,16 <sup>b</sup>
ATP6V1G2	NM_130463	1,01	1,59 <sup>b</sup>	IGF1R	NM_000875	1,03	1,05
BAX	NM_004324	1,09	2,69 <sup>b</sup>	INS	NM_000207	1,06	1,11 <sup>a</sup>
BCL2	NM_000633	1,13 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>	IRGM	NM_001145805	1,10 <sup>b</sup>	1,29 <sup>a</sup>
BCL2A1	NM_004049	1,05	1,08	JPH3	NM_020655	1,05	2,38 <sup>a</sup>
BCL2L1	NM_138578	1,08	2,27 <sup>b</sup>	KCNIP1	NM_014592	2,62 <sup>a</sup>	-3,67 <sup>a</sup>
BCL2L11	NM_006538	1,07	2,34 <sup>a</sup>	MAG	NM_002361	2,25 <sup>a</sup>	-3,42 <sup>a</sup>
BECN1	NM_003766	1,07	1,09	MAP1LC3A	NM_181509	1,04	2,42 <sup>a</sup>
BIRC2	NM_001166	1,86 <sup>a</sup>	-1,62 <sup>a</sup>	MAPK8	NM_002750	1,02	1,21 <sup>b</sup>
BIRC3	NM_001165	1,82 <sup>a</sup>	-1,53 <sup>a</sup>	MCL1	NM_021960	1,10 <sup>a</sup>	1,29 <sup>a</sup>
BMF	NM_033503	1,09	2,95 <sup>b</sup>	NFKB1	NM_003998	1,03	1,07
C1orf159	NM_017891	1,12 <sup>a</sup>	3,76 <sup>b</sup>	NOL3	NM_003946	1,06	1,02
CASP1	NM_033292	1,02	2,19 <sup>b</sup>	OR10J3	NM_001004467	1,05	-3,67 <sup>a</sup>
CASP2	NM_032982	1,03	1,15 <sup>b</sup>	PARP1	NM_001618	1,13 <sup>a</sup>	1,74 <sup>a</sup>
CASP3	NM_004346	1,07	1,72 <sup>b</sup>	PARP2	NM_005484	1,02	1,81 <sup>a</sup>
CASP6	NM_032992	1,04	1,23 <sup>b</sup>	PIK3C3	NM_002647	1,05	2,28 <sup>a</sup>
CASP7	NM_001227	1,03	2,22 <sup>a</sup>	PVR	NM_006505	1,08	1,49 <sup>a</sup>
CASP9	NM_001229	1,06	1,68 <sup>b</sup>	RAB25	NM_020387	1,04	1,04
CCDC103	NM_213607	1,13 <sup>a</sup>	2,31 <sup>b</sup>	RPS6KB1	NM_003161	1,15 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>
CD40	NM_001250	1,08	4,48 <sup>b</sup>	S100A7A	NM_176823	2,28 <sup>a</sup>	-2,73 <sup>a</sup>
CD40LG	NM_000074	1,06	3,16 <sup>b</sup>	SNCA	NM_000345	1,03	1,29 <sup>a</sup>
CFLAR	NM_003879	1,21 <sup>a</sup>	1,27 <sup>e</sup>	SPATA2	NM_006038	1,10 <sup>b</sup>	2,36 <sup>a</sup>
COMMD4	NM_017828	1,02	2,12 <sup>b</sup>	SQSTM1	NM_003900	1,12 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>
CTSB	NM_001908	1,13 <sup>a</sup>	2,52 <sup>b</sup>	SYCP2	NM_014258	1,05	1,67 <sup>a</sup>
CTSS	NM_004079	1,05	2,26	TMEM57	NM_018202	1,13 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>
CYLD	NM_015247	1,10 <sup>b</sup>	2,22 <sup>a</sup>	TNF	NM_000594	1,59 <sup>a</sup>	1,66 <sup>a</sup>
DEFB1	NM_005218	1,04	1,93 <sup>b</sup>	TNFRSF10A	NM_003844	1,72 <sup>a</sup>	1,79 <sup>a</sup>
DEND4A	NM_005848	1,01	1,35 <sup>b</sup>	TNFRSF11B	NM_002546	2,14 <sup>a</sup>	2,26 <sup>b</sup>
DFFA	NM_004401	1,03	1,03	TNFRSF1A	NM_001065	1,83 <sup>a</sup>	1,91 <sup>a</sup>
DPYSL4	NM_006426	1,06	2,81	TP53	NM_000546	1,18	1,85 <sup>a</sup>
EIF5B	NM_015904	1,01	1,33 <sup>b</sup>	TRAF2	NM_021138	2,31 <sup>a</sup>	3,14 <sup>a</sup>
ESR1	NM_000125	1,02	1,01	TXNL4B	NM_017853	1,11	1,69 <sup>a</sup>
FAS	NM_000043	1,05	2,36 <sup>b</sup>	ULK1	NM_003565	1,09	1,02
FASLG	NM_000639	1,03	2,46 <sup>b</sup>	XIAP	NM_001167	1,06	1,04

<sup>a</sup>  $p < 0.001$  compared to the control. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  compared to the control.

apoptosis through extrinsic pathway. CPF increased also the expression of TRAF2 and decreased BIRC3 and BIRC2 antiapoptotic genes allowing caspases activation which expression was increased. Besides, CPF induced GADD45A, and TP53 genes expression. The P53-GADD45A pathway has been shown to primarily play a role in the control of G2-M arrest following certain DNA-damaging agents<sup>46,47</sup>, thus their induction could lead to cell arrest. Moreover, CPF increased the expression of BAX and BCL2L11 proapoptotic genes and BCL2L1 antiapoptotic gene<sup>48</sup>, further decrease the ratio BCL2/BAX which regulated the induction of apoptosis<sup>49</sup> leading to apoptosis. Finally, CPF increased the expression of CASP1, CASP3, CASP7, CASP9 which executed apoptosis. Besides, CPF increased the expression of KCNIP1, MAG and S100A7A genes related to necrosis as happened at lower concentrations indicating that necrosis is prevented.

After long-term CPF exposure (30 µM), besides the effect on the same genes commented after acute exposure, CPF increased the expression of ATP6V2, BMF, CLORF159, CCDC103, COMMD4, CTSB, STSS, CYLD, DEFB1, DPYSL4, FOXL1, GRB2, HSPBAP1, JPH3, PARP1, PARP2, PIK3C3, PVR, TXNL4B and decreased the expression of GALNT5, OR10J3, KCNIP1, MAG and S100A7A genes related to necrosis according with the research of Hitomi et al<sup>44</sup>. Our study indicates that CPF exerts its cell death effects by involving apoptosis and necrosis pathways.

Otherwise, we observed that CPF induces acute (from 1 µM) and long-term (from 0.1 µM), concentration-dependent, reduction in the number of dendritic spine density on septal SN56 cholinergic basal forebrain neurons. In this regard, CPF has been reported to induce an alteration in the dendritic spines density in the prefrontal cortex and hip-

pocampus after acute and repeated exposure to subclinical doses respectively<sup>18,19</sup>, supporting our results. Dendritic spines loss has been reported in neurodegenerative disorders as AD, affecting mostly selective neuronal networks of critical importance for memory and cognition, such as the basal forebrain cholinergic system, the medial temporal regions, the hippocampus and many neocortical association areas<sup>15</sup> inducing cognitive disorders<sup>16,17</sup>. Moreover, cognitive disorders have been reported to be produced from subclinical doses and from lower doses from which basal forebrain cholinergic cell loss has been reported<sup>20</sup>, as happens with dendritic spines alteration, suggesting that both processes are implicated in cognitive disorders induction, at low doses only through dendritic spine alteration and at higher doses through both mechanisms.

In addition, we observed that after acute (from 0.01  $\mu\text{M}$ ) and long term (from 0.01  $\mu\text{M}$ ) CPF exposure, a concentration-dependent downregulation in PSD95 and SYP gene expression was produced. It has been suggested that SYP plays a role in formation and stabilization of synapses<sup>50</sup>, regulating dendritic spine density and shape<sup>51,52</sup>. Moreover, PSD95 was described to play a role in determining the size and the strength of synapses<sup>53,54</sup>, formation of synapse assemblies<sup>51</sup> and spine-maturation<sup>55,56</sup>. Therefore, both genes alteration could be implicated in the effects observed on dendritic spines. Our results show that PSD95 and SYP gene expression is altered below the concentration from which dendritic spine density disruption is evident, which indicates that the harmful effects of CPF exposure on dendritic spines could be started and detected before they would be manifest and these genes could be used as biomarker of this effect. Moreover, PSD95 and SYP are both involved in dendritic spine morphology regulation and their alteration by CPF exposure may be involved with a disruption of dendrite spine shape, contributing to the cognitive disorders observed. Otherwise, we only observed a concentration-dependent SPN and NMDANR1 gene expression downregulation after acute exposure from 1  $\mu\text{M}$  CPF concentration and after long-term exposure from 0.1  $\mu\text{M}$  CPF concentrations as seen with dendritic spines density reduction, suggesting both genes are directly correlated with this effect. In this regard, SPN, a key cytoskeletal protein in the formation and maintenance of dendritic spines, has been reported to modulate dendritic morphology and number<sup>53</sup> and an increase in dendritic spine density has been correlated with an increase in the spinophilin expression<sup>54</sup>. In addition, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, is also involved in synaptic plasticity as well as learning and memory processes regulation<sup>57</sup> and the N-methyl-D-aspartate receptor antagonists reduce dendritic spine density and neurite growth<sup>55</sup>. Future studies are needed to determine the implication of these genes in dendritic spine shape and density disruption mechanisms.

According to all exposed above, CPF induced changes on cell death and dendritic spines plasticity pathways were detected at doses below those required to induce manifest

apoptotic and necrotic cell death and alter dendritic spines plasticity. These results support the suggestion that gene expression changes could potentially be more sensitive measures of effects at early stages and at lower doses than many typical toxicological measures<sup>58</sup> and that altered toxicogenomic profiles contributing to toxicologically-relevant pathways provide useful tools for more precise determination of toxicological mechanisms as compared to traditional toxicological endpoints and for reducing uncertainty in establishing lowest observed adverse effect level (LOAEL), no observed adverse effect level (NOAEL), or benchmark dose (BMD)<sup>59,62</sup>. Therefore, the toxicogenomic profile analysis could offer means to improve human health risk assessment generally based on standard toxicity test results. Previously, this approach has been employed in different studies as the published by Lobenhofer et al<sup>60</sup> that examines *in vitro* transcriptional responses to very low concentrations of estrogen, confirming that estrogen concentrations below those which are physiologically relevant did not induce a measurable transcriptional response. That concentration threshold was referred to as the No Observable Transcriptional Effect Level (NOTEL). In our study, it was shown that the CPF Lowest Observed Adverse Transcriptional Expression Levels (LOATEL) for 12 responding genes was at least 100-fold lower than the NOAEL that was based on observable inhibition of erythrocyte acetylcholinesterase activity in humans<sup>60</sup>. Therefore, lower doses would be needed in order to observe no transcriptional effects. Examination of data from the group of 12 responding genes leads us to propose 0.003-0.004 mg/kg/day as LOATEL for CPF. The present study did not, therefore, establish a No Observed Adverse Transcriptional Effect Level (NOATEL) for CPF. These subclinical transcriptional changes may be employed as predictors of adverse effects from toxic compounds exposure and thereby used to improve risk assessment and safety evaluation. Further studies are required to confirm this LOATEL.

## Conclusion

Taking all together, it can be concluded that after acute and long-term exposure, CPF induces at low concentration a dendritic spine density reduction and at higher concentrations induces cell death on cholinergic neurons from basal forebrain through apoptotic and necrotic mechanisms, depending on the exposure concentration mediated in part through AChE variants overexpression and these effects were initiated at lower concentration that which they are manifest, as indicated by transcriptional alterations of key genes. Our results, particularly those for CPF treatment, suggest that toxicogenomic profiles provide a sensitive tool for identifying and characterizing thresholds of toxicity for potentially toxic compounds based upon a transcriptome-level of insight into their mechanisms. These effects could explain cognitive alterations and neurodegenerative diseases induced by CPF. In this regard, all the mechanisms that we reported to induce cholinergic cell loss in

basal forebrain have been described to be involved with the induction of cognitive disorders, which supports this hypothesis. Future studies should be developed to determine the other mechanisms implicated in these effects observed on cholinergic neurons. These results are of interest, since they provide new information on the mechanisms that mediate dendritic spine density alteration and cell death induce by CPF, and because they lead to a better understanding of some effects related to CPF toxicity and highlight the need for a new NOAEL and LOAEL and a new risk assessment of this pesticide.

## References

- Richardson JR, and Chambers JE. Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on cholinergic neurochemistry in developing rats. *Toxicol Sci.* 2006; 84 (2): 352-9.
- Hernandez CM, Beck WD, Naughton SX, Poddar I, Adam BL, Yanasak N, Middleton, C, and Terry AV Jr. Repeated exposure to chlorpyrifos leads to prolonged impairments of axonal transport in the living roent brain. *Neurotoxicology.* 2015; 47: 17-26.
- Rohlman DS, Anger WK, and Lein PJ. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology.* 2001; 32(2): 268-76.
- Lopez-Granero C, Cardona D, Gimenez E, Lozano R, Barril J, Sanchez-Santed F, and Canadas F. Chronic dietary exposure to chlorpyrifos causes behavioral impairments, low activity of brain membrane-bound acetylcholinesterase, and increased brain acetylcholinesterase-R mRNA. *Toxicology.* 2013; 308: 41-9.
- Middlemore-Risher ML, Buccafusco JJ, and Terry, AV Jr. Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats. *NeurotoxicolTeratology.* 2010; 32(4): 415-24.
- Moser VC, Phillips PM, McDaniel KL, Marshall RS, Hunter DL, and Padilla S. Neurobehavioral effects of chronic dietary and repeated high-level spike exposure to chlorpyrifos in rats. *ToxicolSci.* 2005; 86 (2): 375-86.
- Samsam TE, Hunter DL, and Bushnell PJ. Effects of chronic dietary and repeated acute exposure to chlorpyrifos on learning and sustained attention in rats. *Toxicol Sci.* 2005; 87(2): 460-8.
- Scheiderer CL, McCutchen E, Thacker EE, Kolasa K, Ward MK, Parsons D, Harrell L. E, Dobrunz LE, and McMahon LL. Sympathetic sprouting drives hippocampal cholinergic reinnervation that prevents loss of a muscarinic receptor-dependent long-term depression at CA3-CA1 synapses. *J Neurosci.* 2006; 26(14): 3745-56.
- Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, Knott PJ, Carlin LS, Purohit DP, Perl DP, Schmeidler J, Kanof P, and Davis KL. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem.* 1995; 64(2): 749-60.
- Andersson H, Petersson-Grawe K, Lindqvist E, Luthman J, Oskarsson A, and Olson L. Low-level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring. *NeurotoxicolTeratol.* 1997; 19: 105-15.
- Del Pino J, Moyano P, Anadon MJ, Garcia JM, Diaz MJ, Garcia J, and Frejo MT. Acute and long-term exposure to chlorpyrifos induces cell death of basal forebrain cholinergic neurons through AChE variants alteration. *Toxicology.* 2015; 336: 1-9.
- Kammon AM, Brar RS, Sodhi S, Banga HS, and Sandhu HS. Neuropathological Studies of Chickens Following Exposure to Chlorpyrifos. *Toxicology International.* 2010; 17, 78-81.
- Nasr HM, El-Demerdash FM, and El-Nagar WA. Neuro and renal toxicity induced by chlorpyrifos and abamectin in rats: Toxicity of insecticide mixture. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016; 23: 1852-9.
- Del Pino J, Zeballos G, Anadon MJ, Capo MA, Diaz MJ, Garcia J, and Frejo MT. Higher sensitivity to cadmium induced cell death of basal forebrain cholinergic neurons: a cholinesterase dependent mechanism. *Toxicology.* 2014; 325: 151-9.
- Babyannis SJ. Brain capillaries in Alzheimer's disease. *Hell J Nucl Med.* 2015; 1: 152.
- Hains AB, Yabe Y, and Arnsten AFT. Chronic Stimulation of Alpha-2A-Adrenoceptors With Guanfacine Protects Rodent Prefrontal Cortex Dendritic Spines and Cognition From the Effects of Chronic Stress. *Neurobiology of stress.* 2015; 2: 1-9.
- Mandolesi L, De Bartolo P, Foti F, Gelfo F, Federico F, Leggio MG, and Petrosini L. Environmental enrichment provides a cognitive reserve to be spent in the case of brain lesion. *J Alzheimers Dis.* 2008; 15: 11-28.
- Oostingh GJ, Wichmann G, Schmittner M, Lehmann I, and Duschl A. The cytotoxic effects of the organophosphates chlorpyrifos and diazinon differ from their immunomodulating effects. *J Immunotoxicol.* 2009; 6: 136-45.
- Speed HE, Blaiss CA, Kim A, Haws ME, Melvin NR, Jennings M, Eisch AJ, and Powell CM. Delayed reduction of hippocampal synaptic transmission and spines following exposure to repeated subclinical doses of organophosphorus pesticide in adult mice. *Toxicol Sci.* 2012; 125: 196-208.
- Terry AV Jr, Stone JD, Buccafusco JJ, Sickles DW, Sood A, and Prendergast MA. Repeated exposures to subthreshold doses of chlorpyrifos in rats: hippocampal damage, impaired axonal transport, and deficits in spatial learning. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 305(1): 375-84.
- Hammond DN, Lee, HJ, Tongsgard JH, and Wainer BH. Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res.* 1990; 512 (2): 190-200.
- Hudgens ED, Ji L, Carpenter CD, and Peterson SL. The gad2 promoter is a transcriptional target of estrogen receptor (ER) alpha and ER beta: a unifying hypothesis to explain diverse effects of estradiol. *J Neurosci.* 2009; 29(27): 8790-8797.
- Bielarczyk H, Jankowska A, Madziar B, Matecki A, Michno A, and Szutowicz A. Differential toxicity of nitric oxide, aluminum, and amyloid- $\beta$  peptide in SN56 cholinergic cells from mouse septum. *Neurochem Int.* 2003; 42: 323-31.
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul S, Rorowska A, Pawelczyk T, and Jankowska-Kulawy A. Phenotype-dependent susceptibility of cholinergic neuroblastoma cells to neurotoxic inputs. *Mol Brain Dis.* 2006; 21: 149-61.
- Crumpton TL, Seidler FJ, and Slotkin TA. Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos?. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000; 121: 189-95.
- Dam K, Garcia SJ, Seidler FJ, and Slotkin TA. Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999; 116 (1): 9-20.

27. Jett DA, and Navoa RV. In vitro and in vivo effects of chlorpyrifos on glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Neurotoxicology*. 2000; 21(1-2): 141-5.
28. Roy TS, Andrews JE, Seidler FJ, and Slotkin TA. Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos. *Teratology*. 1998; 58(2): 62-8.
29. Nolan RJ, Rick DL, Freshour NL, and Saunders JH. Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984; 73 (1): 8-15.
30. JMPR. Pesticide Residues in Food—1999, Evaluations Part II: Toxicological WHO/PCS/00.4, FAO/WHO Pesticide Residues in Food, No 154, Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1999.
31. Wright CL, and McCarthy MM. Prostaglandin E2-induced masculinization of brain and behavior requires protein kinase A, AMPA/kainate, and metabotropic glutamate receptor signaling. *J Neurosci*. 2009; 29: 13274-13282.
32. Livak KJ, and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.
33. Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, Allen PB, Oumet CC, and Greengard P. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 9287-92.
34. Hu J, Vucovic M, Chen MM, Lu QY, and Song, ZM. Activation of  $\alpha 2A$  adrenoceptors alters dendritic spine development and the expression of spinophilin in cultured cortical neurons. *Brain Res*. 2008; 1199: 37-45.
35. Zhang Q, Yu Y, and Huang XF. Olanzapine Prevents the PCP-induced Reduction in the Neurite Outgrowth of Prefrontal Cortical Neurons via NRG1. *Sci Rep*. 2016; 6: 19561.
36. Auld DS, Kornecook TJ, Baslanetto S, and Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol*. 2002; 68: 209-45.
37. Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, and Mount HT. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci*. 2004; 29(6): 427-41.
38. Kesner RP, Adelstein TB, and Crutcher KA. Equivalent spatial location memory deficits in rats with medial septum or hippocampal formation lesions and patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain Cogn*. 1989; 9: 289-300.
39. Madziar B, Lopez-Covella I, Zemelko V, and Berse B. Regulation of cholinergic gene expression by nerve growth factor depends on the phosphatidylinositol-3'-kinase pathway. *J Neurochem*. 2006; 92: 767-79.
40. Schliebs R. Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease—interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem Res*. 2006; 30 (6-7): 895-908.
41. Davies CC, Mason J, Wakelam MJ, Young LS, and Eliopoulos AG. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2004; 279 (2): 1010-9.
42. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*. 2004; 16: 139-44.
43. Mahul-Mellier AL, Pazarentzos E, Dattler C, Iwasawa R, AbuAli G, Lin B, and Grimm S. De-ubiquitinating protease USP2a targets RIP1 and TRAF2 to mediate cell death by TNF. *Cell Death Differ*. 2012; 19 (5): 891-9.
44. Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, and Yuan J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*. 2008; 135 (7): 1311-23.
45. Del Pino J, Frejo MT, Baselga MJ, Capo MA, Moyano P, Garcia JM, and Diaz MJ. Neuroprotective or neurotoxic effects of 4-aminopyridine mediated by KChIP1 regulation through adjustment of Kv 4.3 potassium channels expression and GABA-mediated transmission in primary hippocampal cells. *Toxicology*. 2015; 333: 107-17.
46. Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Kontny HU, Yu L, Hollander MC, O'Connor PM, Fornace AJ Jr, and Harris CC. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96 (7): 3706-11.
47. Jin S, Tong T, Fan W, Fan F, Antinore MJ, Zhu X, Mazzacurati L, Li X, Petrik KL, Rajasekaran B, Wu M, and Zhan Q. GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. *Oncogene*. 2002; 21 (57): 8696-704.
48. Vogler M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ*. 2012; 19 (1): 67-74.
49. Oltvai ZN, Millman CL, and Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74 (4): 609-19.
50. Tarsa L, and Goda Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 1012-6.
51. Glantz LA, Gilmore JH, Hamer RM, Lieberman JA, and Jarskog LF. Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood. *Neuroscience*. 2007; 149: 582-91.
52. Li Q, Deng Z, Zhang Y, Zhou X, Nagerl UV, and Wong ST. A global spatial similarity optimization scheme to track large numbers of dendritic spines in time-lapse confocal microscopy. *IEEE Trans Med Imaging*. 2011; 30: 632-41.
53. Ehrlich I, and Malinow R. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2004; 24: 916-27.
54. Garner CC, Nash J, and Hagan RL. PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol*. 2000; 10: 274-80.
55. El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, and Brecht DS. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*. 2000; 280: 1364-8.
56. Nikonenko I, Boda B, Steen S, Knott G, Welker E, and Muller D. PSD-95 promotes synaptogenesis and multinnervated spine formation through nitric oxide signaling. *J Cell Biol*. 2008; 183: 1115-27.
57. Kannangara TS, Bostrom CA, Ratzlaff A, Thompson L, Cater, RM, Gil-Mohapel J, and Christie, BR. Deletion of the NMDA receptor GluN2A subunit significantly decreases dendritic growth in maturing dentate granule neurons. *PLoS One*. 2014; 9: e103155.
58. Parfett C, Williams A, Zheng JL, and Zhou G (J). Gene batteries and synexpression groups applied in a multivariate statistical approach to dose-response analysis of toxicogenomic data. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013; 67: 63-74.
59. Goldberg Z, Schwietert CW, Lehnert B, Stern R, and Nami I. Effects of low-dose ionizing radiation on gene expression in human skin biopsies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004; 58: 567-74.
60. Lobenhofer EK, Cui X, Bennett L, Cable PL, Merrick BA, Churchill GA, and Afshari CA. Exploration of low-dose estrogen effects: identification of Not Observed Transcriptional Effect Level (NOTEL). *Toxicol Pathol*. 2004; 32: 482-92.
61. Schlecht C, Klammer H, Wulke W, and Jarry H. A dose-response study on the estrogenic activity of benzophenone-2 on various endpoints in the serum, pituitary and uterus of female rats. *Arch Toxicol*. 2006; 80: 656-61.
62. Zheng JL, Parfett C, Williams A, Yagminas A, Zhou G, Douglas GR, and Yauk CL. Assessment of subclinical, toxicant-induced hepatic gene expression profiles after low-dose, short-term exposures in mice. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011; 60: 54-72.

**9.3. SN56 basal forebrain cholinergic neuronal loss after acute and long-term chlorpyrifos exposure through oxidative stress generation, P75<sup>NTR</sup> and  $\alpha$ 7-nAChRs alterations mediated partially by AChE variants disruption.**

Javier del Pino<sup>1</sup>, **Paula Moyano**<sup>1</sup>, María José Anadon, José Manuel García, María Jesús Díaz, Gloria Gomez, Jimena García, and María Teresa Frejo.

*<sup>1</sup>Estos autores contribuyeron de manera igualitaria al trabajo*

**Revista: Toxicology.**

Es la revista oficial de la Sociedad Alemana de Toxicología (Alemania).

Email: toxicology@elsevier.com

Naturaleza de la publicación: **Revista de Investigación Científica.**

Indexada: Journal Citation Reports

Categoría o materia de la revista: Toxicología

Posición relativa dentro de la materia: 16/87:

Índice de Impacto: 3.621



## SN56 basal forebrain cholinergic neuronal loss after acute and long-term chlorpyrifos exposure through oxidative stress generation; P75<sup>NTR</sup> and $\alpha_7$ -nAChRs alterations mediated partially by AChE variants disruption



Javier del Pino<sup>a,\*</sup>, Paula Moyano<sup>b,1</sup>, María José Anadón<sup>b</sup>, José Manuel García<sup>b</sup>,  
María Jesús Díaz<sup>a</sup>, Gloria Gómez<sup>b</sup>, Jimena García<sup>c</sup>, María Teresa Frejo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Toxicology and Pharmacology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Toxicology and Legal Medicine, Medical School, Complutense University of Madrid, 28041 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Pharmacology, Health Sciences School, Alfonso X University, 28691 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 April 2016

Received in revised form 2 May 2016

Accepted 3 May 2016

Available online 6 May 2016

#### Keywords:

Basal forebrain neurons

Chlorpyrifos

P75<sup>NTR</sup>

$\alpha_7$ -nAChRs

Acetylcholine esterase

Acetylcholine

Cell death

Oxidative stress

### ABSTRACT

Chlorpyrifos (CPF) is an organophosphates insecticide reported to induce, both after acute and repeated exposure, cognitive disorders and basal forebrain cholinergic neuronal loss, involved on learning and memory regulation, which could be the cause of such cognitive disorders. This neuronal loss was mediated partially by AChE variants alteration, suggesting other mechanisms are involved. In this regard, CPF induces oxidative stress that is implicated in the induction of cognitive deficits, changes in AChE variants expression and neuronal loss. Otherwise, it has been shown that P75<sup>NTR</sup> and the  $\alpha_7$ -nAChRs expression is altered in basal forebrain of rats after CPF long-term exposure; this alteration has been related with oxidative stress induction, cholinergic cell loss, and disruption of learning and memory processes. According to these data, we hypothesized that CPF induces basal forebrain cholinergic neuronal loss through induction of oxidative stress produced by P75<sup>NTR</sup> and  $\alpha_7$ -nAChRs altered expression, which could mediate this action in part through AChE variants disruption. We evaluated this hypothesis in septal SN56 basal forebrain cholinergic neurons, after 24 h and 14 days CPF exposure in vitro. This study shows that CPF upregulated P75<sup>NTR</sup> and downregulated  $\alpha_7$ -nAChRs expression, which increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and malondialdehyde content and reduced cell viability partially through AChE variants induction. Alpha<sub>7</sub>-nAChRs repression induced oxidative stress and cell death partially through this mechanism, but P75<sup>NTR</sup> overexpression did not produce these effects, although it increased oxidative stress and cell death after CPF treatment, showing that its overexpression increases cell vulnerability. Our present results provide new understanding of the mechanisms contributing to the harmful effects of CPF.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Chlorpyrifos (CPF) is an organophosphates (OPs) insecticide widely used in domestic, agricultural, and industrial applications (Richardson and Chambers, 2005). Human epidemiological studies have related OPs occupational exposure with neurological and neuro-behavioral deficits including impairments of cognition (Hernandez et al., 2015; Rohlman et al., 2011). In this regard, CPF has been shown to produce learning deficits in rats, after acute and repeated administration (Lopez-Granero et al., 2013a; Middlemore-Risher et al., 2010; Moser et al., 2005). It has been suggested that inhibition of cholinesterase activity by CPF could be involved in these effects (Samsam et al., 2005). However, human studies of occupational exposure to OPs often fail to find a

**Abbreviations:** Ach, acetylcholine; AChE, acetylcholine esterase; AD, Alzheimer's disease;  $\alpha_7$ -nAChRs, 7-nicotinic acetylcholine receptors; BSA, bovine serum albumin; CPF, chlorpyrifos; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMSO, dimethylsulphoxide; FBS, fetal bovine serum; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; NAC, N-acetylcysteine; OP, organophosphates; P75<sup>NTR</sup>, P75 nerve growth factor receptors; PBS, phosphate-buffered saline; ROS, reactive oxygen species.

\* Corresponding author at: Departamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: [jdelpino@pdi.ucm.es](mailto:jdelpino@pdi.ucm.es) (J. del Pino).

<sup>1</sup> These authors have contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.05.007>

0300-483X/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.