



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCIÓN SALUD ANIMAL

**EFFECTOS DE LA APLICACIÓN REPETIDA
DE CIPERMETRINA “POUR-ON” EN PIEL
DE RATONES**

AUTOR: Enrique Clímaco Godoy

Esperanza, diciembre de 2011



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCIÓN SALUD ANIMAL

Autor: Enrique Clímaco Godoy

Directora: Dra. Bibiana Dallard

Co-directora: Dra. Florencia Rey

Miembros del Tribunal de Tesis:

M.Sc. María del Rocío Marini

Dr. Claudio Gustavo Barbeito

Dr. Eduardo Baroni

Esperanza, diciembre de 2011.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	6
RESUMEN	8
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	13
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. Objetivos	18
<i>1.1.1. General</i>	18
<i>1.1.2. Específicos</i>	18
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Piretrinas naturales	20
2.2. Estructura y propiedades insecticidas de los piretroides	21
2.3. Toxicidad de los piretroides	24
2.4. Penetración por piel	26
2.5. Estructura de la piel	29
2.5.1. Epidermis	30
<i>2.5.1.1. No queratinocitos de la epidermis</i>	38
2.5.2. Dermis (corion)	43
<i>2.5.2.1. Dermis Papilar</i>	43
<i>2.5.2.2. Dermis Reticular</i>	44
2.6. Balance proliferación/apoptosis	44
2.7. Marcadores de proliferación celular	49
2.8. Características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis.	51
<i>2.8.1. Concepto de muerte celular programada</i>	51
<i>2.8.2. Características morfológicas de la apoptosis versus necrosis</i>	53
<i>2.8.3. Mecanismos moleculares que rigen la apoptosis. Fases de la apoptosis</i>	55

2.8.3.1. <i>Fase de iniciación</i>	56
2.8.3.2. <i>Fase de ejecución</i>	62
2.8.3.3. <i>Fase de degradación celular</i>	67
2.9. Mecanismos reguladores de la apoptosis	68
2.9.1. <i>Inactivación de ligandos</i>	68
2.9.2. <i>Proteínas inhibidoras y favorecedoras de la apoptosis</i>	68
2.9.3. <i>Activación de factores de transcripción antiapoptóticos</i>	71
2.9.4. <i>Inhibición de las caspasas</i>	74
2.10. Mecanismos amplificadores de la apoptosis	75
3. MATERIALES Y MÉTODOS	76
3.1. Modelo experimental	77
3.2. Cálculo de la dosis aplicada	78
3.3. Toma y procesamiento de las muestras de piel	78
3.4. Inmunohistoquímica	79
3.4.1. <i>Procedimiento general</i>	80
3.4.2. <i>Controles de la técnica</i>	81
3.5. Análisis digital de imágenes	82
3.6. Análisis estadístico	84
3.7. Normas éticas y de bioseguridad	85
4. RESULTADOS	86
4.1. Caracterización macroscópica de las lesiones post tratamiento	87
4.2. Caracterización microscópica de las lesiones post tratamiento	87
4.3. Morfometría de la epidermis	90
4.3.1. <i>Estrato medio-basal</i>	90
4.3.2. <i>Estrato córneo</i>	91
4.3.3. <i>Epidermis</i>	92
4.4. Proliferación celular	94
4.4.1. <i>Inmunomarcación para PCNA</i>	94
4.5. Caracterización de la apoptosis	99

<i>4.5.1. Inmunomarcación para Bcl-2</i>	99
<i>4.5.2. Inmunomarcación para Bax</i>	103
<i>4.5.3. Inmunomarcación para caspasa-3 activa</i>	106
5. DISCUSION	111
5.1. Lesiones post tratamiento	112
5.2. Cambios morfométricos en la epidermis	113
5.3. Cambios en la proliferación celular con PCNA	115
5.4. Cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis	117
6. CONCLUSIONES	123
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
8. ANEXO	154

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mi Directora por su invaluable apoyo, ya que siempre que la necesité estuvo a mi lado para guiarme en el trabajo motivándome permanentemente a seguir.

También al Dr. Hugo Ortega quien fue el que programó el experimento poniendo a disposición el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL) adquiriendo práctica para el trabajo en la técnica histológica de rutina.

Al Dr. Rafael Althaus quien colaboró con la parte Estadística y cálculos matemáticos.

A todo el equipo que comprende el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, quien siempre mostraron buena predisposición para guiarme sobre las técnicas de Inmunohistoquímica: Natalia Salvetti, Celina Baravalle.

A la Dra. Florencia Rey que siempre estuvo en reemplazo de la Dra. Dallard con gran predisposición y cuando la necesité su presencia fue importante.

Quiero mencionar también al Dr. Guglielmone que en un primer momento fue mi Director.

A mis compañeros de Cátedra de Histología y Embriología por el apoyo y la incentivación permanente a terminar mi tesis.

A mis compañeros de la Cátedra de Anatomía II que en reiteradas oportunidades me tuvieron que relevar en mi actividad frente al alumno, teniendo la posibilidad de dedicarle más tiempo a la realización de este proyecto: Dra. María del Carmen

AGRADECIMIENTOS

Miglietta, Dra. María del Carmen Ferraro, Dra. María Angélica Althaus. A la Dra. María Estela Galván por el estímulo brindado permanentemente.

Agradezco a la alumna pasante en Investigación quien colaboró en reiteradas oportunidades para la realización de las técnicas de Inmunohistoquímica, Srta. Vanesa Monje.

Puedo decir: objetivo cumplido, a pesar de tantos años, destacando que fueron interrumpidos por problemas personales (salud y trabajo). Si bien no es una justificación es la realidad de los hechos ya que tuve que interrumpir muchas veces mi trabajo, destacando que nunca pedí licencia para poder finalizar las tareas.

La motivación a finalizar impulsada por Mi Directora Dra. Bibiana Dallard, hace cumplir con una meta, que un principio por la cantidad de obstáculos presentados parecía inalcanzable.

Gracias

Méd. Vet. Enrique Godoy

RESUMEN

El objetivo general del presente trabajo fue determinar los efectos producidos por la aplicación repetida de cipermetrina o de sus agentes de formulación *pour-on*, sobre la piel de ratones, evaluando aspectos morfométricos, alteraciones en la proliferación celular y de proteínas relacionadas con la apoptosis en las células de la epidermis.

Se utilizaron 3 grupos experimentales cada uno formado por 30 ratones machos adultos de 8 semanas de edad, mantenidos con ciclos de luz y oscuridad, temperatura y alimentación controlada. Un grupo fue tratado con solución fisiológica (control) y los 2 restantes con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina en solución fisiológica (5%), en dosis de 32 mg x kg en aplicación *pour-on* en la región interescapular. Cada grupo de animales recibió 5 tratamientos consecutivos a intervalos de 15 días, y se sacrificaron 6 animales de cada grupo, a los 4 días luego de cada aplicación. Los diferentes tratamientos se aplicaron según el siguiente esquema: día 0, día 15, día 30, día 45 y día 60; mientras que los sacrificios se realizaron al día 4, 19, 34, 49 y 64 posteriores al inicio del tratamiento.

Para caracterizar las lesiones producidas en la epidermis se realizaron estudios histológicos y morfométricos. Se evaluó el porcentaje de proliferación celular en la epidermis mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal específico (antígeno nuclear de proliferación celular- PCNA). Para evaluar la apoptosis de las células epiteliales de la epidermis se realizó la inmunomarcación de proteínas pro y antiapoptóticas (Bax y Bcl-2) y proteasas apoptogénicas (caspasa-3 activa). Se determinaron similitudes y diferencias entre los diferentes grupos experimentales evaluados, identificando los efectos producidos por la cipermetrina o de los agentes de formulación utilizados en la dilución de fármacos para uso percutáneo.

Se observaron lesiones macroscópicas (escaras, alopecías) post tratamiento en el punto de aplicación en los grupos tratados con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina diluida en solución fisiológica (5%) luego de la cuarta y quinta aplicación. El análisis microscópico de las lesiones reveló un engrosamiento pronunciado del estrato medio-basal y del estrato córneo de la epidermis, áreas de hiperqueratosis y visualización de figuras mitóticas en el estrato basal luego de la cuarta y quinta aplicación de cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina diluida en solución fisiológica (5%). En la dermis se observó colagenólisis y abundante infiltrado de eosinófilos.

La aplicación de cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina diluida (5 %) causó un aumento significativo en el espesor del estrato córneo (EC) y medio basal de la epidermis y en consecuencia, en el espesor total de la epidermis que se hizo evidente a partir de la cuarta aplicación y fue progresivo en el tiempo. Los agentes utilizados en la formulación de la cipermetrina comercial (5%) contribuyeron a disminuir el espesor de la epidermis de manera transitoria ya que luego de la quinta aplicación los valores en el espesor de la epidermis para la cipermetrina comercial y la diluida con solución fisiológica fueron similares.

En relación a la proliferación celular, el tratamiento con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina diluida (5%) aumentó en forma significativa la proliferación de las células epiteliales del estrato basal de la epidermis evidenciadas con PCNA a partir de la cuarta aplicación y el efecto fue progresivo en el tiempo de muestreo. Los agentes de formulación empleados en la cipermetrina comercial no contribuyeron a modificar los porcentajes de proliferación celular del estrato basal de la epidermis en ninguno de los periodos evaluados.

El tratamiento con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina diluida (5%) disminuyó en forma significativa la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en las

células epiteliales de la epidermis a partir de la cuarta aplicación y el efecto fue progresivo en el tiempo de muestreo. El tratamiento con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina diluida (5%) aumentó en forma significativa la expresión de la proteína proapoptótica Bax y de caspasa-3 activa en las células epiteliales de la epidermis a partir de la cuarta aplicación y el efecto fue progresivo en el tiempo de muestreo. Los agentes de formulación empleados en la cipermetrina comercial no contribuyeron a modificar la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 ni de la proteína proapoptótica Bax en las células epiteliales de la epidermis en ninguno de los periodos evaluados. Los agentes utilizados en la formulación de la cipermetrina comercial (5%) contribuyeron a aumentar de manera significativa la expresión de caspasa-3 activa en las células de la epidermis, aunque de manera transitoria ya que al día 64 pt los valores en la expresión de esta proteasa efectora fueron similares a los hallados con la cipermetrina diluida en solución fisiológica.

Como conclusión general de esta tesis podemos decir que la aplicación repetida de cipermetrina *pour-on* en piel de ratones induce cambios en el espesor de la epidermis con un aumento significativo en de la proliferación celular que se hace evidente a partir de la cuarta aplicación del compuesto químico. Por otra parte, a los fines de mantener un equilibrio en la proliferación y muerte de las células epiteliales, se expresan proteínas proapoptóticas como Bax en detrimento de las antiapoptóticas como Bcl-2 y la consecuente activación de proteasa apoptogénica caspasa-3. Posiblemente el excipiente en las formulaciones comerciales cipermetrina al 5% tenga relevancia en las alteraciones producidas.

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1	Piretrinas naturales.	21
2	Estructura química de la cipermetrina.	24
3	Capas de la piel gruesa.	32
4	Fotomicrografía de la piel que demuestra los estratos basal y espinoso.	33
5	Diagrama de la barrera epidérmica.	36
6	Fotomicrografía óptica de la epidermis que muestra la distribución y la índole dendrítica de las células de Langherhans que se tiñeron inmunohistoquímicamente con anticuerpos contra el antígeno de superficie CD1a.	40
7	Diagrama de la epidermis que muestra la interacción de un melanocito con varias células del estrato basal y el estrato espinoso.	42
8	Regulación de la transición de las fases G1 a S del ciclo celular por ciclinas, ciclinas dependientes de quinasa (cdk) e inhibidores de cdk en queratinocitos.	45
9	Ciclo de división celular y sus marcadores.	50
10	Representación esquemática de la vía de señalización extrínseca mediada por receptor.	58
11	Activación de procaspasas.	63
12	Formación del apoptosoma.	65
13	Imagen microscópica de piel de ratones del grupo control tratado con solución fisiológica a los 64 días post tratamiento. 10x	88
14	Imagen microscópica de piel de ratones del grupo control tratado con solución fisiológica a los 64 días post tratamiento.40x	88
15	Imagen microscópica de piel de ratones del grupo tratado con cipermetrina comercial (5%) a los 64 días post tratamiento.	89
16	Imagen microscópica de piel de ratones del grupo tratado cipermetrina diluída al 5% a los 64 días post tratamiento.	89
17	Imagen microscópica de piel de ratones del grupo tratado cipermetrina diluída al 5% a los 64 días post tratamiento.	90
18	Ecuación matemática y gráficas obtenidas con el modelo lineal general (GLM) que expresan la evolución del espesor de la epidermis (μm) para cada grupo.	93
19	Inmunomarcación para PCNA en piel de ratones tratados con solución fisiológica (controles) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	96
20	Inmunomarcación para PCNA en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5% luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	97
21	Inmunomarcación para PCNA en piel de ratones tratados con cipermetrina diluída (5%) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	97
22	Ecuación matemática y gráficas obtenidas con el modelo lineal general (GLM) que expresan la evolución de los porcentajes de células PCNA positivas para cada grupo.	98
23	Inmunomarcación para Bcl-2 en piel de ratones tratados con solución fisiológica (controles) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	100
24	Inmunomarcación para Bcl-2 en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5% luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	100
25	Inmunomarcación para Bcl-2 en piel de ratones tratados con cipermetrina (5%) luego	101

	de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	
26	Ecuación matemática y gráficas obtenidas con el modelo lineal general (GLM) que expresan la evolución de los porcentajes de área inmunomarcada para Bcl-2 para cada grupo.	102
27	Inmunomarcación para Bax en piel de ratones tratados con solución fisiológica (controles) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	104
28	Inmunomarcación para Bax en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5% luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	104
29	Inmunomarcación para Bax en piel de ratones tratados con cipermetrina diluída (5%) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	105
30	Ecuación matemática y gráficas obtenidas con el modelo lineal general (GLM) que expresan la evolución de los porcentajes de área inmunomarcada para Bax para cada grupo.	105
31	Inmunomarcación para caspasa-3 activa en piel de ratones tratados con solución fisiológica (controles) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	107
32	Inmunomarcación para caspasa-3 activa en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5% luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	107
33	Inmunomarcación para caspasa-3 activa en piel de ratones tratados con cipermetrina diluída (5%) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento).	108
34	Ecuación matemática y gráficas obtenidas con el modelo lineal general (GLM) que expresan la evolución de los porcentajes de área inmunomarcada para caspasa-3 activa para cada grupo.	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla.		Pág.
1	Diferencias entre necrosis y apoptosis.	55
2	Procedencia y condiciones de uso de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.	82
3	Medias del espesor del estrato medio-basal, del estrato córneo y de la epidermis (μm) en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial (5%), cipermetrina diluída (5%) y en controles hasta el día 64 post tratamiento.	91
4	Efectos del tratamiento, tiempo y su interacción sobre las variables analizadas.	94
5	Medias de los porcentajes de células de la epidermis inmunomarcadas con PCNA en ratones tratados con cipermetrina comercial (5%), cipermetrina diluída (5%) y en controles hasta el día 64 post tratamiento.	95
6	Porcentajes de áreas inmunomarcadas para Bcl-2 en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial (5%), cipermetrina diluída (5%) y en controles hasta el día 64 post tratamiento.	99
7	Porcentajes de áreas inmunomarcadas para Bax en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5%, cipermetrina diluída (5%) y en controles hasta el día 64 post tratamiento.	103
8	Porcentajes de áreas inmunomarcadas para caspasa-3 activa en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5%, cipermetrina diluída (5%) y en controles hasta el día 64 post tratamiento.	108

1. INTRODUCCIÓN



Los piretroides sintéticos son insecticidas lipofílicos cuya actividad biológica dependería directamente de su estructura química (Flannigan et al., 1985; Flannigan y Tucker, 1985). Entre estos compuestos se encuentra la cipermetrina, que se utiliza sola o combinada con otros productos y se ha convertido en uno de los insecticidas más importantes de uso a gran escala. La cipermetrina actúa por contacto e ingestión. Su estructura se basa en la piretrina, componente activo de un insecticida natural contenido en las flores de crisantemo, aunque posee una actividad biológica más elevada y mayor estabilidad que su modelo natural. En 1974 fue sintetizada por primera vez y ha sido introducida al mercado en 1977 por Shell (Leahay, 1985).

El tratamiento de bovinos con piretroides a través de formulaciones *pour-on* ha sido ampliamente utilizado desde que la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) invadió la provincia de Santa Fe, a finales de 1991 (Anziani et al., 1993). Durante el periodo comprendido entre 1992-1993 se han realizado ensayos a campo donde se observó que dosis de 0,6 a 2 mg de cipermetrina *pour-on* por kilogramo de peso corporal, permitían mantener a los animales libres de moscas durante 26 a 28 días (Guglielmone et al., 1993a, b). Este período de control de invasión se redujo a menos de una semana hacia octubre de 1996 y la resistencia a la cipermetrina fue confirmada en febrero de 1997 (Guglielmone et al., 1998). La pérdida de eficacia de los piretroides resultó en una situación paradójica, dado que su actividad se redujo, consecuentemente el uso de piretroides para el control de la mosca de los cuernos se incrementó, probablemente como resultado de la falta de tratamientos alternativos (Guglielmone et al., 1999; Anziani et al., 2000).

En forma paralela al incremento del uso de piretroides, se observó un marcado aumento de consultas a veterinarios, referidas a la aparición de dermatitis en bovinos, luego de la aplicación *pour-on* de cipermetrina. Esta información de campo, hasta la

fecha no ha sido confirmada experimentalmente, así como tampoco se han registrado antecedentes sobre trastornos similares provocados por la cipermetrina en bovinos u otras especies animales (datos no publicados, extraídos de la casuística del Hospital de Salud Animal (FCV-UNL) de la última década.

En nuestro país existe una vasta cantidad de productos químicos disponibles para combatir la mosca, sin embargo, la experiencia demuestra que el uso irracional de los mismos ha dado lugar a la aparición de problemas de resistencia a los tratamientos (Guglielmone et al., 1999). Por otro lado, el impacto ambiental de estos insecticidas no sólo incide sobre el parásito sino que además afecta los productos obtenidos del animal, detectándose restos tóxicos en la leche o en la carne (Leahey, 1985; Bissacot y Vassilieff, 1997).

A pesar de haberse postulado que el metabolismo, degradación y toxicidad de los piretroides sintéticos resulta en una baja toxicidad dérmica (Miyamoto, 1976), esto ha sido puesto en duda en trabajos posteriores.

Existen reportes de lesiones en piel de ovinos ocasionadas por la aplicación *pour-on* de piretroides sintéticos, describiéndose alteraciones en el estrato córneo y la dermis subyacente al sitio de aplicación, que varían desde un leve eritema a una dermatitis exudativa con formación de costras (Money y Scroggie, 1981; Jenkinson et al., 1986).

En humanos y conejos, la exposición cutánea repetida a piretroides sintéticos produjo una inflamación dérmica, con eritema, edema y vesiculación (Flannigan et al., 1985; Flannigan y Tucker, 1985; He et al., 1988). Se ha descrito una dermatitis de contacto ocasional en humanos por la aplicación tópica de permetrina para el tratamiento de la sarna sarcóptica (Elgart, 1996). Además, una forma llamativa de toxicidad por exposición a concentraciones elevadas de piretroides sintéticos provocada

por la irritación de las terminaciones nerviosas de la piel, ha sido asociada a una parestesia cutánea (Desi et al., 1985; Luty et al., 1998; Müller-Mohnssen, 1999). En adición a las lesiones mencionadas, posiblemente causadas por los piretroides, se ha establecido que los agentes de formulación utilizados en la dilución para uso percutáneo pueden alcanzar una mayor toxicidad que los piretroides (Lepeshkin et al., 1992).

En base a lo expuesto previamente, en este proyecto se propone profundizar los conocimientos actuales sobre el tema, aplicando técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, para tratar de determinar alteraciones atribuibles a la aplicación repetida de cipermetrina *pour-on* en piel de ratones.

En el marco de los antecedentes citados, la hipótesis general planteada postula que la aplicación repetida de cipermetrina *pour-on* en la piel de ratones produciría alteraciones en la proliferación celular y en la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis afectando el proceso de renovación celular normal de la epidermis. Asimismo, las alteraciones producidas podrían relacionarse con el empleo de agentes de dilución en las formulaciones comerciales para uso percutáneo.

1.1. Objetivos

1.1.1. General:

Determinar los efectos producidos por la aplicación repetida, *pour-on*, de cipermetrina o de sus agentes de formulación sobre la piel de ratones, evaluando aspectos morfométricos, alteraciones en la proliferación celular y de proteínas relacionadas con la apoptosis de las células de la epidermis.

1.1.2. Específicos:

- a) Determinar las características macroscópicas y microscópicas de las lesiones observadas.
- b) Evaluar aspectos morfométricos de la epidermis luego de la aplicación experimental.
- c) Evaluar el grado de proliferación celular de la epidermis, cuantificando la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) por inmunohistoquímica.
- d) Estudiar el grado de apoptosis de la epidermis a través de la identificación y cuantificación de proteínas pro y antiapoptóticas y de proteasas apoptogénicas por inmunohistoquímica.
- f) Determinar similitudes y diferencias entre los grupos experimentales, con el fin de identificar posibles efectos atribuibles a la cipermetrina o a los agentes de formulación utilizados en la dilución de fármacos para uso percutáneo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2.1. Piretrinas naturales

Las piretrinas naturales son drogas obtenidas a partir de la molienda de las flores del crisantemo (*Chrysanthemum cinerariifolium* o piretro) extraídas posteriormente por medio de solventes adecuados. El extracto obtenido contiene los principios activos presentes en las cubiertas de las semillas de la flor que incluyen: piretrinas, cinerinas y jasmolinas. Químicamente las piretrinas son ésteres del ácido crisantémico (piretrinas I) o del ácido pirétrico (piretrinas II) (Abbassy et al., 1983). En la figura 1 se observan las seis piretrinas naturales descritas actualmente (Soderlund et al., 2002).

Estos compuestos poseen excelentes propiedades medioambientales por su rápido efecto sobre el sistema nervioso de insectos y, a su vez, baja toxicidad en mamíferos (Philogene et al., 2002). A causa de la unión éster son fácilmente degradadas, tanto en el medioambiente (luz, calor, oxígeno, álcalis) como en sistemas enzimáticos de insectos y mamíferos (Meyer Jones, 1959) resultando, por lo tanto, poco letales para los primeros y de baja toxicidad para los últimos. Dichos inconvenientes han limitado su eficacia en la protección de cultivos y en el control de insectos donde la actividad residual del compuesto es esencial (Soderlund et al., 2002).

Las piretrinas naturales pueden ser formuladas con butóxido de piperonilo o con sulfóxido de piperonilo, cuyo efecto consiste en mejorar la toxicidad para los insectos y acelerar la acción comparativamente a la de las piretrinas solas (Liu et al., 1986). Estas formulaciones se conocen como piretrinas sinergizadas. A concentraciones elevadas, este compuesto puede ser acaricida o insecticida por sí mismo (Devine y Denholm, 1998).

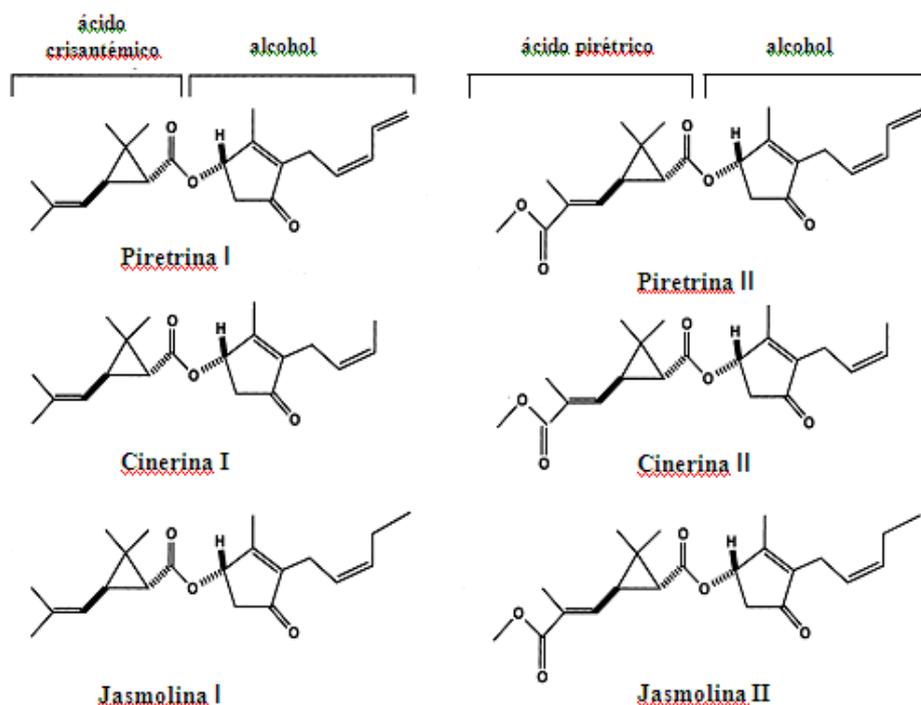


Figura 1: Piretrinas naturales (Soderlund et al., 2002).

Actualmente, las piretrinas naturales no se utilizan como ectoparasiticidas en veterinaria, ya que el complejo proceso de obtención de estas drogas sumado al escaso efecto letal y reducido poder residual, encarecen su uso (Meyer Jones; 1959; Núñez et al., 1982; Wester et al., 1984).

2.2. Estructura y propiedades insecticidas de los piretroides

El término piretroide es comúnmente utilizado para designar a insecticidas sintéticos derivados estructuralmente de las piretrinas naturales, que incluyen los seis insecticidas constituidos por el extracto del piretro. Décadas de investigaciones y desarrollos en la industria agroquímica, gobiernos y laboratorios de investigación académica han resultado en un amplio rango de estructuras piretroides de múltiples usos

en la agricultura, ganadería, medicina humana y control de plagas domiciliarias (Soderlund et al., 2002).

El desarrollo de los piretroides sintéticos es el resultado de los esfuerzos para modificar la estructura de las piretrinas naturales (Figura 1) con el objetivo de aumentar la fotoestabilidad, manteniendo al mismo tiempo, la potente y relativamente rápida actividad insecticida y la baja toxicidad aguda del piretro.

La mayoría de los piretroides sintéticos fueron creados por la sustitución secuencial de elementos estructurales de las piretrinas por nuevas fracciones seleccionadas para la conservación de la forma molecular y propiedades físicas de la estructura molde. Debido a que las piretrinas son ésteres del ácido ciclopropanocarboxílico y del alcohol ciclopentenolone (Figura 1), las modificaciones estructurales sintéticas suelen realizarse en uno de estos grandes dominios constantes de la molécula (Soderlund et al., 2002).

La amplia familia de los piretroides sintéticos de uso corriente pueden clasificarse en: tipo I, cuya molécula carece del grupo α -ciano, e incluye: permetrina, aletrina, tetrametrina, cismetrina, d-fenotrina; y tipo II: cuya estructura química posee el grupo α -ciano y engloba a: deltametrina, cipermetrina, fenvalerato y fenpropanato, entre otros (Soderlund et al., 2002). Estos compuestos presentan características estructurales que le confieren diversas propiedades insecticidas, en general favorecen su potencia, confieren fotoestabilidad y otros tipos de características deseables, en comparación con las piretrinas naturales o los primeros piretroides sintéticos (Leahay, 1985).

La cipermetrina (combinación de isómeros α y β del compuesto ciano (3-fenoxifenil) metil 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato) (Figura 2) es un pesticida piretroide de contacto, ampliamente utilizado en la Argentina en la

agricultura y la ganadería para el control de plagas (Lynen et al., 1982; Guglielmone et al., 1993b; Guglielmone et al., 2002).

El tratamiento de los bovinos con piretroides a través de formulaciones *pour-on* ha sido ampliamente utilizado a partir de la invasión de la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) en la provincia de Santa Fe, en noviembre de 1991 (Anziani et al., 1993).

A pesar de la existencia de una importante cantidad de productos químicos para combatir la mosca de los cuernos y otras plagas que afectan a la ganadería en nuestro país, la experiencia demostró que el uso irracional de los mismos condujo a la generación de resistencia a los tratamientos (Guglielmone et al., 1999; Soderlund, 2008).

En un estudio realizado por Guglielmone et al. (2006) donde se evaluó la susceptibilidad y/o resistencia de 83 poblaciones argentinas de la garrapata *Rhipicephalus microplus* a la cipermetrina, se determinó que 19 poblaciones no fueron alteradas frente a la acción de la cipermetrina, concluyendo que los focos de resistencia de *R. microplus* a los piretroides en zonas de alta capacidad ganadera como Corrientes, norte de Santa Fe y noroeste de Córdoba, constituyen un motivo de preocupación en la actualidad.

Existen publicaciones donde se demuestra que el uso prolongado e indiscriminado de la cipermetrina es capaz de provocar toxicidad aguda y crónica en diversas especies incluso el humano (Aldridge, 1990; Cantalamessa, 1993). En el hombre la exposición a dicho pesticida ocurre principalmente durante su utilización, sea en aplicaciones o a través de residuos de piretroides detectados en leche de vaca, pan, frutas y vegetales (Dikshit, 2000).

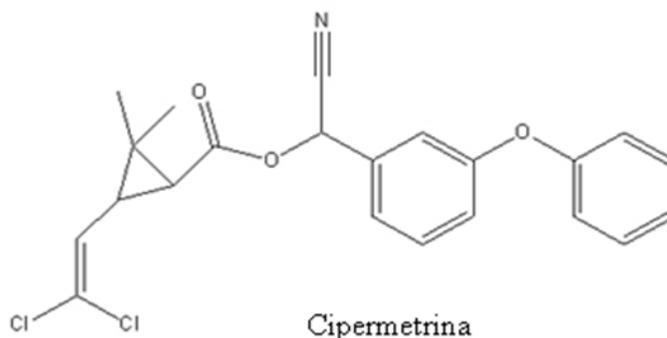


Figura 2: Estructura química de la cipermetrina (Suderland et al., 2002)

2.3. Toxicidad de los piretroides

Es conocido que los piretroides provocan una actividad repetitiva pronunciada debido a una estimulación en el sistema nervioso central, en los órganos de los sentidos y en las uniones neuromusculares. Las sinapsis presentan mayor sensibilidad a los piretroides que las fibras nerviosas, en función de la estructura química del compuesto. Los piretroides tipo I (carentes del grupo ciano), causan impulsos nerviosos de corta duración; mientras que, los piretroides tipo II (presentan el grupo ciano), inducen impulsos repetitivos de larga duración en nervios periféricos lo que puede conducir a depresión dependiendo de la frecuencia del impulso nervioso (Latuszynska et al., 2003).

Los piretroides en general, poseen una baja toxicidad en mamíferos y aves pero son extremadamente tóxicos para los artrópodos y peces, con valores de DL₅₀-96hs generalmente menores de 10 µg/L para estos últimos (Bradbury y Coats, 1989; Coats et al., 1989; Haya, 1989).

Los mecanismos mediante los cuales los piretroides producen toxicidad son complejos y se tornan más complicados aún al conjugarse con butóxido de piperonilo o bien con insecticidas organofosforados, o ambos, ya que estos compuestos inhiben el

metabolismo de los piretroides (Meyer Jones, 1959; Núñez et al., 1982; Wester et al., 1984).

Los piretroides interfieren en la función de la membrana nerviosa, en forma similar a los insecticidas organoclorados. Varios mecanismos de acción se encontrarían implicados, entre ellos se destacan: (1) inactivación de los canales de sodio, (2) inhibición de la Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPasa, (3) inhibición de la calmodulina, y (4) por unión a los receptores GABA (Haya, 1989; Soderlund et al., 2002; Soderlund, 2008). Sin embargo, el principal efecto se da a partir de retrasar el cierre de los canales de sodio provocando la persistencia de este ión después de la polarización de la membrana nerviosa (Bradberry et al., 2005; Latuszynska, et al., 2001; Soderlund, 2008). De esta manera, al prolongar la conductancia del sodio y reducir la del potasio, resultan descargas repetitivas de los nervios. Este efecto de los piretroides determina una toxicidad selectiva respecto a insectos y mamíferos. En insectos, los canales de sodio permanecen abiertos durante un mayor período que en mamíferos lo que provoca un aumento en el potencial de acción luego de la despolarización produciendo hiperexcitación en animales intoxicados. Sólo el 1% de los canales de sodio deben mantenerse abiertos para producirse hiperexcitación. Los piretroides son 1000 veces más potentes sobre los canales de sodio en insectos que en ratas lo que constituye un factor importante para explicar la toxicidad selectiva en dichas especies (Narahashi et al., 2007).

La toxicidad de los piretroides aumenta a medida que la temperatura disminuye, lo que explicaría la alta toxicidad para peces y anfibios (Abbassy et al., 1983; Nishimura et al., 1984; Narahashi et al., 2007).

Además, se ha demostrado que la toxicidad aguda de algunos piretroides se encuentra relacionada con el sexo, difiriendo en ratones hembras y machos (Bradbury y Coats, 1989).

Con respecto a la composición química los piretroides halogenados como teflutrina y flucitrinato, tienden a ser más tóxicos en los mamíferos que aquellos con menor contenido de halógenos como permetrina o ciflutrina (Suderland et al., 2002).

Un estudio epidemiológico realizado en una población humana expuesta a cipermetrina en plantaciones de algodón mostró síntomas nerviosos, vértigo severo, enfermedades en la piel y ojos, muertes neonatales y defectos congénitos (Rupa et al., 1991). Se ha demostrado además, que la cipermetrina en sistemas experimentales diversos es capaz de producir efectos neurotóxicos (Latuszynska et al., 2001; Latuszynska et al., 2003), inmunotóxicos y genotóxicos (Suralles et al., 1995; Chauhan et al., 1997; Santoni et al., 1998).

2.4. Penetración por piel

La piel es una barrera natural que normalmente previene la exposición sistémica a químicos ambientales. La primera barrera funcional de la piel está representada por el estrato córneo (EC), la capa más externa de la piel (Elias y Menon, 1991; Holleran et al., 1991). Dicho estrato está compuesto por múltiples capas de queratinocitos aplanados unidos por una capa continua de lípidos conformando una barrera fuerte, altamente flexible y con capacidad de auto reparación (Elias, 2005).

La penetración de compuestos químicos a través del EC es un proceso pasivo (Elias et al., 1987) y depende fundamentalmente de la composición fisicoquímica del compuesto, particularmente de su lipofilia y del vehículo utilizado como solvente.

Además, la penetración de los compuestos depende de las características de la piel según la especie.

En roedores, el EC tiene un espesor de 5 a 15 μm y está formado por 2 o 3 capas de corneocitos. Los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y los conductos de las glándulas sudoríparas (apéndices) pueden aumentar la penetración percutánea de los compuestos. Dicha penetración percutánea puede ocurrir por tres vías: intercelular, intracelular o a través de los apéndices (vía corta, donde la difusión de moléculas pueden alcanzar directamente la dermis) (Lauer et al., 1995). La piel constituye, evidentemente, una de las principales vías de exposición para usuarios de productos agroquímicos, con posibilidades de contacto que se suscitan durante el mezclado, la carga o durante el proceso de aplicación del producto (Benford et al., 1999).

Aunque Miyamoto (1976), describe el metabolismo, degradación y toxicidad de los piretroides sintéticos, determinando una baja toxicidad dérmica de los mismos, esto ha sido puesto en discusión en trabajos posteriores.

En un estudio realizado por Luty et al. (1998) se aplicaron dos dosis de alfa-cipermetrina en piel de la cola de ratas hembras durante 28 días y se observó que la actividad bactericida y fagocítica de los neutrófilos se estimuló luego de la aplicación de 50 mg/kg de cipermetrina lo que sugeriría un efecto inmunotóxico. Además, en el mismo estudio se observaron cambios histológicos en hígado, cerebro, riñón y pulmón.

Recientemente se demostró que la cipermetrina posee efectos nefrotóxicos en mamíferos. Inayat et al. (2007) observaron que la aplicación repetida de cipermetrina en dosis de 15 mg/kg y 30 mg/kg en piel de ratones albinos adultos por un período de 6 semanas causó una marcada infiltración de linfocitos y congestión vascular en los riñones de los ratones estudiados.

Por otro lado, se determinó que las cipermetrinas poseen compuestos con efecto potenciador cancerígeno en piel y promotor de tumores en ratones albinos suizos de ambos sexos (Shukla y Taneja, 2002).

Estudios preliminares demostraron que la cipermetrina aplicada tópicamente en la superficie dorsal en ovejas se absorbe rápidamente a través del EC de la epidermis a una velocidad que excede los 11 cm por hora. Esta propagación está acompañada por infiltración celular en la dermis que es mayor en el sitio de aplicación (Jenkinson et al., 1986). En la misma especie se han realizado estudios que evidencian lesiones en la piel por la aplicación *pour-on* de piretroides sintéticos, describiéndose alteraciones en el EC y dermis subyacente al sitio de aplicación, que varían desde un leve eritema a una dermatitis exudativa con formación de costras (Money y Scroggie, 1981).

En humanos y conejos, la exposición cutánea repetida a piretroides produjo una inflamación dérmica, con eritema, edema y vesiculación (Flannigan et al., 1985; Flannigan y Tucker, 1985; He et al., 1988). Además, una forma llamativa de toxicidad por exposición a concentraciones elevadas de piretroides ha sido asociada a una parestesia cutánea provocada por la irritación de las terminaciones nerviosas de la piel en humanos (Desi et al., 1985; Luty et al., 1998; Müller-Mohnssen, 1999).

En estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio en ratones tratados con dos dosis de cipermetrina *pour-on* (16 y 32 mg/kg) a intervalos de 15 días, observamos alopecias y escaras en el área de aplicación a partir de la cuarta dosis. Microscópicamente, las lesiones se detectaron a partir de la segunda aplicación observándose reducción de la epidermis con pérdida de los estratos intermedios, proliferación y vacuolización del estrato malpighiano e hiperqueratosis con formación de perlas córneas. En la dermis se observó abundante infiltrado de eosinófilos (Godoy et al., 2004).

Por otra parte, utilizando PCNA para evaluar el grado de proliferación celular en la epidermis, observamos que en el grupo tratado con dosis de 16 mg/kg de cipermetrina *pour-on* la proliferación celular se incrementó significativamente con respecto a los controles ($p < 0.05$) a partir de la cuarta aplicación del producto con un promedio de 81.55% de células intensamente marcadas con PCNA. Para el grupo tratado con 32 mg/kg de cipermetrina, el incremento de la proliferación fue altamente significativo ($p < 0.05$) a partir de la segunda aplicación con un porcentaje de proliferación celular promedio de 96.76%. Estos resultados preliminares, indican que dosis repetidas de cipermetrina *pour-on* producen un aumento en la proliferación celular del estrato basal de la epidermis, sugiriendo que no sólo la dosis aplicada, sino la exposición reiterada a la droga, podrían ser causantes de las dermatitis observadas (Godoy et al., 2006).

La bibliografía disponible acerca de las posibles lesiones causadas luego de la aplicación de dosis repetidas de cipermetrina *pour-on* en piel de ratones es escasa. Además, no existen antecedentes sobre los posibles efectos en la proliferación y apoptosis de las células que constituyen la epidermis. Por lo tanto, es importante considerar que el presente trabajo aporta información acerca de las posibles alteraciones causadas por la cipermetrina, o sus vehículos, en las estructuras cutáneas promoviendo de esta manera, el desarrollo de nuevas formulaciones químicas con menor grado de toxicidad y más seguras para los animales y la salud humana.

2.5. Estructura de la piel

La piel recubre prácticamente todo el organismo y debe considerarse como la frontera que separa el medio interno del medio externo. Aunque su función principal

sigue siendo la de protección contra los factores nocivos del medio exterior, también constituye un complejo metabólico, inmunológico y sensorial (Berti y Lipsky, 1995).

Se trata de un sistema heterogéneo constituido por dos tejidos, uno epitelial que recibe el nombre de epidermis y uno conjuntivo especializado que recibe el nombre de dermis. Debajo de los mismos, se encuentra el tejido subcutáneo o hipodermis, que es otra variedad de tejido conjuntivo en el que predominan los adipocitos (Williams y Barry, 1991).

La característica fundamental que diferencia la epidermis de la dermis e hipodermis, es que en la primera (tejido epitelial) predominan los elementos celulares, mientras que en la dermis e hipodermis (tejido conjuntivo) predomina la sustancia intercelular (Ross et al., 2005).

La piel asume varias funciones importantes: conforma una barrera contra la invasión de microorganismos y confiere protección contra acciones mecánicas, compuestos químicos, el calor, el frío y las radiaciones. Además, posee gran importancia en la regulación del calor y el mantenimiento del equilibrio hídrico (Geneser, 2000).

2.5.1. Epidermis

La epidermis es el tejido más externo de la piel y posee numerosas funciones siendo una de las más importantes, la generación del EC. El espesor de la epidermis es de aproximadamente 0.2 mm (Ross et al., 2005).

Según Bouwstra y Ponc (2006), la epidermis está formada por tejido epitelial, plano, estratificado y queratinizado, derivado del ectodermo embrionario. Está constituida por células ordenadas distribuidas en distintas capas o estratos que, por sus características diferenciales, se agrupan en dos zonas: a) **epidermis muerta** (estrato más externo) que constituye el EC conformado por células muertas, y b) **epidermis viva**

(ubicado debajo del estrato anterior) formada por células viables. Al salir de la capa basal, los queratinocitos comienzan su diferenciación y durante su migración a través del estrato espinoso y granuloso, experimentan modificaciones en su estructura y composición.

La epidermis está compuesta por dos grupos celulares: los **queratinocitos o células no dendríticas** y **células dendríticas**, entre las cuales se incluyen a las células de Langerhans, células de Merkel y melanocitos (Navarrete et al., 2003).

Los queratinocitos a su vez se organizan en estratos que del más profundo al más superficial son:

- a) Estrato Basal
- b) Estrato Espinoso
- c) Estrato Granuloso
- d) Estrato Lúcido
- e) Estrato Córneo

En la figura 3 se observan las diferentes capas de la piel y la organización en estratos de la epidermis.

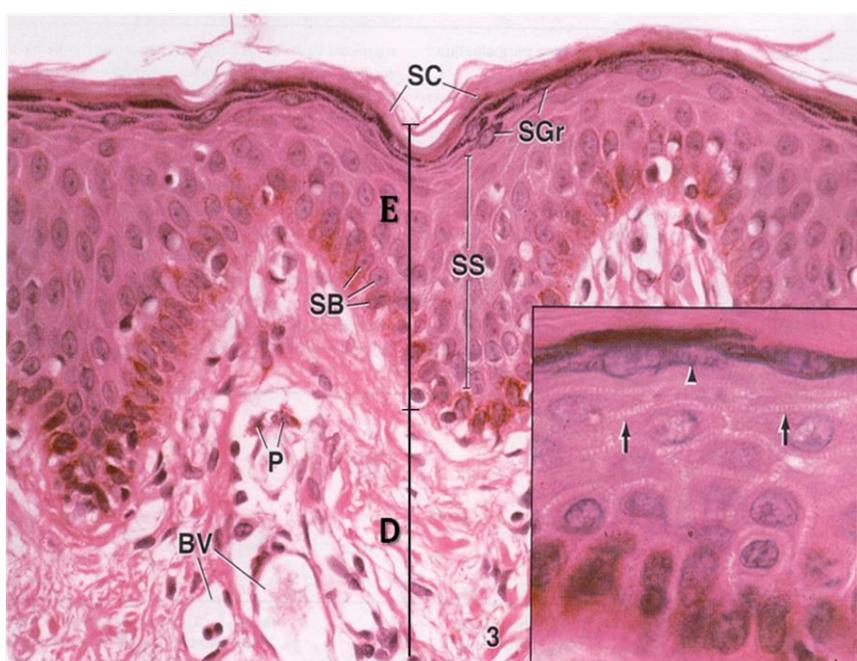


Figura 3: Capas de la piel fina. **E:** epidermis; **D:** dermis; **SB:** estrato basal; **SS:** estrato espinoso, está conformado por células que poseen proyecciones que parecen “espinas” en su superficie que entran en contacto con las espinas de células vecinas y juntas se ven como puentes intercelulares (*flechas, detalle*); **SGr:** estrato granuloso, cuyas células poseen gránulos de queratohialina (*punta de flecha, detalle*); **SC:** estrato córneo. El pigmento que se observa en las células del estrato basal es melanina; este pigmento (**P**) también aparece en algunas células del tejido conjuntivo de la dermis. **BV:** vaso sanguíneo. X640 (Ross et al., 2005).

a) Estrato Basal:

También denominado **estrato germinativo** o **proliferante** por la presencia de actividad mitótica por parte de las células madres (*stem cells*) de la epidermis (Webb et al., 2004). Este estrato se encuentra en contacto con una membrana constitutiva de la unión dermo-epidérmica en la zona de separación entre la dermis y la epidermis (Figura 4). Se compone de una única capa de células cilíndricas bajas o cúbicas con núcleos ovoides y citoplasma basófilo que además presenta tonofibrillas. Las células se relacionan entre sí mediante desmosomas y están ancladas a la membrana basal subyacente mediante hemidesmosomas (Geneser, 2000). Las células basales contienen en su citoplasma gran cantidad de melanina que es transferida desde los melanocitos vecinos dispersos en este estrato celular (Ross et al., 2005).

Las células que constituyen este estrato son indiferenciadas y carecen de marcadores bioquímicos característicos de las células más diferenciadas de las capas superiores. En los queratinocitos basales se encuentran diversas proteínas estructurales, integrantes del citoesqueleto, que colaboran en el proceso mitótico y facilitan los cambios celulares propios del proceso de diferenciación. Además de microtúbulos y microfilamentos, es importante la presencia de los filamentos intermedios de queratina que se hallan agrupadas en fibras cuyo diámetro oscila entre 7 y 10 nm (Ross et al., 2005).

Tras su proliferación las células del estrato basal ascienden para situarse en una posición suprabasal, pierden su capacidad proliferativa e inician el complejo proceso de

diferenciación para dar origen al estrato espinoso. En la figura 4 se observan los estratos basal y espinoso de la epidermis (Geneser, 2000).

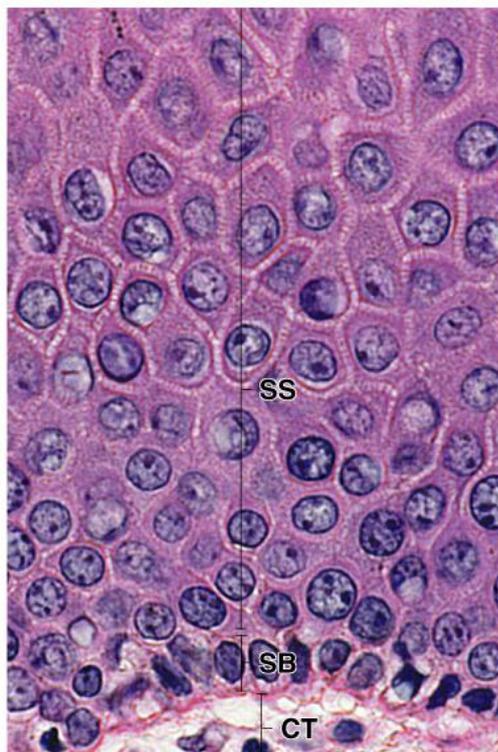


Figura 4: Fotomicrografía de la piel que demuestra los estratos basal y espinoso. **CT:** Tejido conectivo; **SB:** Estrato basal; **SS:** Estrato espinoso. X640 (Ross et al., 2005).

b) Estrato Espinoso:

Las células que conforman este estrato adoptan forma poligonal, con ligero aplanamiento horizontal en la parte superior de la capa (Figura 4). Los núcleos son redondeados y de ubicación central, y el citoplasma posee moderada basofilia, con mayor contenido de tonofibrillas que las células basales. Las células se encuentran separadas por una angosta hendidura clara en la que se distinguen delgadas líneas oscuras entre las células, los puentes intercelulares. Estos puentes se forman cuando pequeñas prolongaciones citoplasmáticas que provienen de dos células adyacentes se unen extremo a extremo, en la mitad de la distancia que separa ambas células, mediante un desmosoma, que se puede distinguir con el microscopio óptico como una pequeña

condensación en forma de nudo. Las prolongaciones citoplasmáticas se asemejan a espinas y han conferido a las células el nombre de células espinosas, y a toda la capa la denominación, de estrato espinoso (Geneser, 2000).

Diversas glicoproteínas, denominadas cadherinas, podrían ser las responsables de la eficacia de los corneodesmosomas. La interacción de componentes extracelulares de las cadherinas garantiza la adherencia selectiva de células que poseen el mismo nivel de diferenciación (Hunt et al., 1999).

c) Estrato Granuloso

El proceso de diferenciación de las células del estrato espinoso conduce a la formación del estrato granuloso (Bouwstra y Ponec, 2006). Este estrato consiste en 3 a 5 capas de queratinocitos aplanados, siendo la capa más superficial de la epidermis en la que aún sus células poseen núcleos. En las células granulosas de la epidermis, abundan estructuras ovoides, bien delimitadas y de reducido tamaño, que poseen gran cantidad de lípidos que forman **cuerpos laminares**. Estos cuerpos laminares contienen vesículas lipídicas aplanadas formadas por bicapas en contacto, constituidas por glicosilceramidas, como componente mayoritario, y acil-ceramidas, cuya presencia probablemente, contribuye a estabilizar esta disposición. Además, los cuerpos laminares contienen otros lípidos, proteínas estructurales y diversos enzimas (Bouwstra et al., 2003; Bouwstra y Ponec, 2006).

Cuando las células epidérmicas ingresan en la última fase de diferenciación se cubren no sólo de cuerpos laminares de naturaleza lipídica, sino además de agregados densos de contorno irregular conocidos como **gránulos de queratohialina** (Ross et al., 2005). Estas estructuras contienen proteínas insolubles no queratínicas y permiten identificar a las células que las contienen como pertenecientes al estrato granuloso.

Aunque no se conocen todos los componentes proteicos que integran los gránulos de queratohialina, los más representativos son los que se mencionan a continuación:

- **Profilagrina:** proteína rica en histidina, que se caracteriza por su elevado grado de fosforilación y por contener numerosas subunidades proteicas iguales, alineadas y enlazadas entre sí por segmentos de unión (Jackson et al., 2005).
- **Involucrina:** proteína rica en glicina y ácido glutámico (Marekov y Steinert, 1998).
- **Loricrina:** proteína rica en cisteína, serina y glicina (Mehrel et al., 1990).
- **Queratinina** (Steinert et al., 1999).
- **PRP:** proteína rica en prolina (Steinert et al., 1999).

El espacio citoplasmático de la célula granulosa se convertirá en un entramado proteico denso, formado por fibras de queratina y filagrina, encargado de ensamblar las queratinas dentro del corneocito. Tanto la profilagrina, precursor de las moléculas de filagrina, como la involucrina y la loricrina, destinadas a formar la envoltura proteica del corneocito, son fundamentales en la función barrera que realiza el EC. De dichos componentes depende la adecuada hidratación de los corneocitos y el control de la pérdida de agua por vía transepidérmica.

La célula del estrato granuloso se transforma en un corneocito a través de un proceso complejo que supone una transformación cualitativa y cuantitativa de los componentes proteicos y lipídicos. Este proceso recibe el nombre de **queratinización** y ocurre en 2 a 6 horas, el tiempo que tardan las células en abandonar el estrato granuloso y entrar en el EC (Steinert y Marekov, 1997). El primer paso corresponde a la exocitosis de los cuerpos laminares que se han acumulado en las células del estrato granuloso. Esos corpúsculos se desplazan hacia la cara apical de la célula granulosa, fundiéndose su propia membrana con la membrana plasmática de la célula, de composición similar.

La incorporación de los cuerpos laminares permite no sólo el vertido de los lípidos y las proteínas almacenados al espacio intercelular, sino que posibilita la introducción de lípidos de membrana y de ciertas enzimas en la propia membrana plasmática (Figura 5).

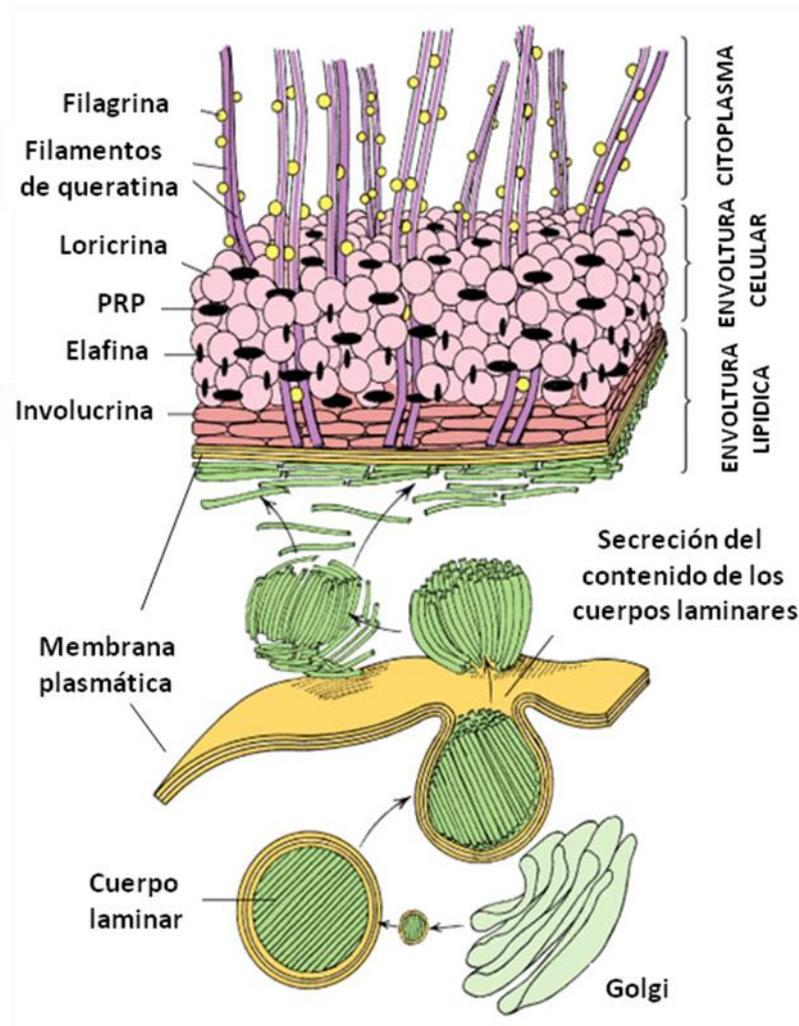


Figura 5: Diagrama de la barrera epidérmica. Una mezcla heterogénea de glucoesfingolípidos, fosfolípidos y ceramidas forman las laminillas de los cuerpos laminares. Los cuerpos laminares producidos en el aparato de Golgi son secretados por exocitosis hacia los espacios intercelulares que hay entre las células del estrato granuloso y del EC donde forman la envoltura lipídica. La disposición laminar de las moléculas de lípidos se ilustra en el espacio intercelular debajo de la membrana plasmática engrosada que forma la envoltura celular del queratinocito queratinizado. La parte más interna de la envoltura celular consiste primariamente en moléculas de loricrina (esferas rosadas) que están interconectadas a través de elafina y pequeñas proteínas ricas en prolina (PRP). La capa contigua a la superficie citosólica de la membrana plasmática está compuesta por dos proteínas comprimidas entre sí, la involucrina y la cistatina alfa. En la envoltura celular están fijados filamentos de queratina (tonofilamentos) unidos por filagrina (Ross et al., 2005).

La transformación de una célula granulosa en una célula cornificada comprende la desintegración del núcleo y otras organelas y el engrosamiento de la membrana plasmática. Por último las células se exfolian (descaman) de la superficie del EC.

d) Estrato Lúcido

La capa de células delgada, clara y homogénea, cuya tinción es débil y se extiende superficial al estrato granuloso, es el estrato lúcido. Aquí las células carecen de organelas y núcleos, contiene filamentos de queratina agrupados en forma densa y orientada en dirección paralela a la superficie de la piel, además de **eleidina**, un producto de transformación de la queratohialina. La superficie citoplasmática de la membrana plasmática de estas células posee un aspecto engrosado debido al depósito de una proteína sin queratina, la **involucrina**, cuya función se desconoce (Geneser, 2000).

Algunos histólogos consideran al estrato lúcido como una subdivisión del EC y que sólo se encuentra en zonas de piel gruesa. Con microscopía óptica a menudo se observa un aspecto refráctil y débil tinción. Este estrato contiene células eosinófilas en un avanzado proceso de queratinización. El núcleo y los orgánulos citoplasmáticos se destruyen y desaparecen conforme la célula se llena de queratina (Ross et al., 2005).

e) Estrato Córneo

El EC es la capa más externa y heterogénea de la piel. En humanos, está constituido por 10-15 capas de células hexagonales, aplanadas, anucleadas con alto contenido de filamentos de queratina, de 10-20 μm de espesor, embebidas en una matriz formada por lípidos intercelulares. El espesor de este estrato constituye la principal diferencia entre la epidermis de la piel gruesa y la de la piel fina. Esta capa cornificada se tornará aún más gruesa en los sitios sometidos a una fricción mayor que la habitual.

Por lo general, hay una transición brusca entre las células nucleadas del estrato granuloso y las células anucleadas, planas y desecadas del EC (Bouwstra y Ponec, 2006).

El espesor de esta capa constituye la diferencia principal entre la epidermis de la piel gruesa y la de piel fina tornándose más gruesa en los sitios sometidos a mayor fricción. Otra característica del EC es su débil hidratación, sólo el 15% frente al 70%, que es la cifra normal en el resto del cuerpo. Esta es una de las razones que explican su función como barrera a la penetración de fármacos a través de la piel. Además, influye el escaso espacio intercelular (del orden de 0.1 μm) y el reducido valor de área superficial. Sin embargo, se ha observado que es a través de esos espacios por donde pasan la mayoría de las sustancias. Esos espacios intercelulares, existentes entre los corneocitos, están formados fundamentalmente por lípidos y desmosomas que contribuyen a la cohesión de esas células. Otro motivo que explica la función de barrera del EC es la total renovación de células que se produce cada 2-3 semanas. El EC también actúa como barrera frente a la pérdida de fluidos corporales y agua endógena (Ross et al., 2005).

2.5.1.1. No queratinocitos de la epidermis

Además de los queratinocitos, la epidermis contiene otros tres tipos de células: de Langerhans, de Merkel, y Melanocitos.

a) Células de Langerhans

Las células de Langerhans, también llamadas células dendríticas por sus múltiples prolongaciones largas, se localizan principalmente en el estrato espinoso. Asimismo, estas células pueden hallarse en la dermis y epitelios escamosos

estratificados de la cavidad bucal, el esófago y la vagina. Sin embargo, prevalecen en la epidermis, donde pueden llegar a 800 células por mm² (Ross et al., 2005). Con microscopía óptica, las células de Langerhans muestran un núcleo denso, citoplasma pálido y prolongaciones delgadas largas que se irradian desde el cuerpo celular a los espacios intercelulares entre los queratinocitos. Aunque el núcleo de contorno irregular y la ausencia de tonofilamentos diferencian a las células de Langerhans de los queratinocitos circundantes, la característica más singular de las células de Langerhans son los gránulos de Birbeck (gránulos vermiformes) unidos a la membrana, que en un corte histológico semejan paletas de ping-pong. Dichos gránulos se forman como resultado de la endocitosis asistida por clatrina y su función aún es desconocida (Stoitzner et al., 2002).

Las células de Langerhans son células presentadoras de antígenos de aspecto dendrítico que captan y presentan antígenos que penetran a través de la piel. Al igual que los macrófagos, expresan moléculas de CMH I y del CMH II, así como receptores de Fc para la inmunoglobulina G (IgG) (Ross et al., 2005).

Estas células también expresan receptores para el componente C3b del complemento y cantidades fluctuantes de moléculas CD1a (Figura 6). Participan en las reacciones de hipersensibilidad retardada (Ej. dermatitis alérgica de contacto y otras repuestas inmunitarias cutáneas mediadas por células) a través de la captación de antígenos en la piel y su transporte hacia ganglios linfáticos (Gartner and Hiatt, 2008).

Se conoce que las células de Langerhans, proceden de precursores localizados en la médula ósea y son parte del sistema fagocítico mononuclear. Aunque son capaces de realizar mitosis, esta actividad está disminuida; por consiguiente se reemplaza de manera continua por células precursoras que provienen del torrente sanguíneo para ingresar a la epidermis y diferenciarse en células de Langerhans (Stoitzner et al., 2002).

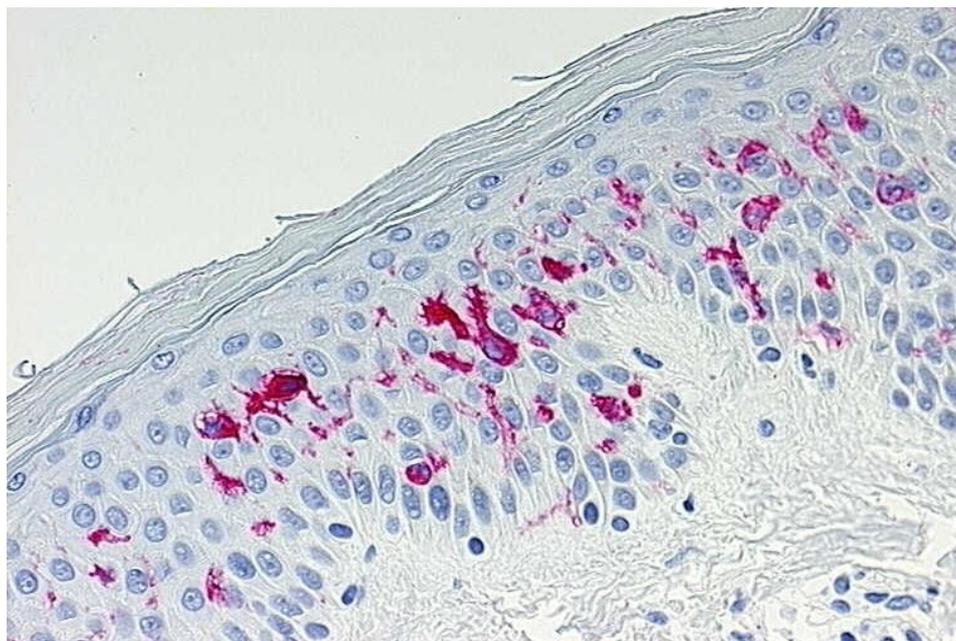


Figura 6: Fotomicrografía óptica de la epidermis que muestra la distribución y la índole dendrítica de las células de Langerhans que se tiñeron inmunohistoquímicamente con anticuerpos contra el antígeno de superficie CD1a. X400. Extraído de <http://www.dermopath.de/unser.htm>

b) Células de Merkel

Las células de Merkel son células epidérmicas modificadas que están localizadas en el estrato basal. Son muy abundantes en la piel donde la percepción sensorial es aguda, como en los pulpejos de los dedos. Las células de Merkel están unidas a los queratinocitos contiguos a través de desmosomas y contienen filamentos intermedios (de queratina) en su citoplasma. El núcleo es lobulado y el citoplasma se caracterizan por presentar gránulos de neurosecreción de centro denso de 80 nm (Ross et al., 2005).

Las células de Merkel están íntimamente asociadas con los bulbos terminales expandidos de fibras nerviosas mielínicas aferentes. La terminación nerviosa pierde su cubierta de células de Schwann y a continuación perfora la lámina basal para expandirse en una estructura con la forma de disco que se ubica en contacto estrecho con la base de

la célula de Merkel. La combinación de fibra nerviosa y célula epidérmica, llamada corpúsculo o disco de Merkel, forma un mecanoreceptor sensorial (Geneser, 2000).

c) Melanocitos

Los melanocitos también conocidos como células claras o células de Masson, se ubican principalmente en el estrato basal de la epidermis, aunque también pueden localizarse en las porciones superficiales de la dermis y extender sus prolongaciones hacia la epidermis entre los queratinocitos (Ross et al., 2005).

Durante la vida embrionaria, las células precursoras de los melanocitos migran desde las crestas neurales y se introducen en la epidermis en desarrollo. Así se establece una asociación funcional específica, la unidad melanoepidérmica, en la cual un melanocito mantiene una relación con una cantidad dada de queratinocitos. Esta relación varía en las diferentes regiones de la superficie corporal (Figura 7) (Ross et al., 2005).

Se denominan células dendríticas porque el cuerpo celular redondeado que se sitúa en el estrato basal emite prolongaciones largas entre los queratinocitos del estrato espinoso. Carecen de desmosomas, tienen pocos microfilamentos internos y presentan en su citoplasma melanosomas, cuerpos de melanina que se originan en la cresta neural (Lázaro-Ochaita, 1993). Los melanocitos actúan como una glándula exocrina que suministra melanina, pigmento pardo sintetizado en el interior de los melanosomas que proporciona diversas tonalidades a la piel y posee funciones protectoras contra las radiaciones UV. La población de melanocitos se renueva lentamente mediante divisiones mitóticas.

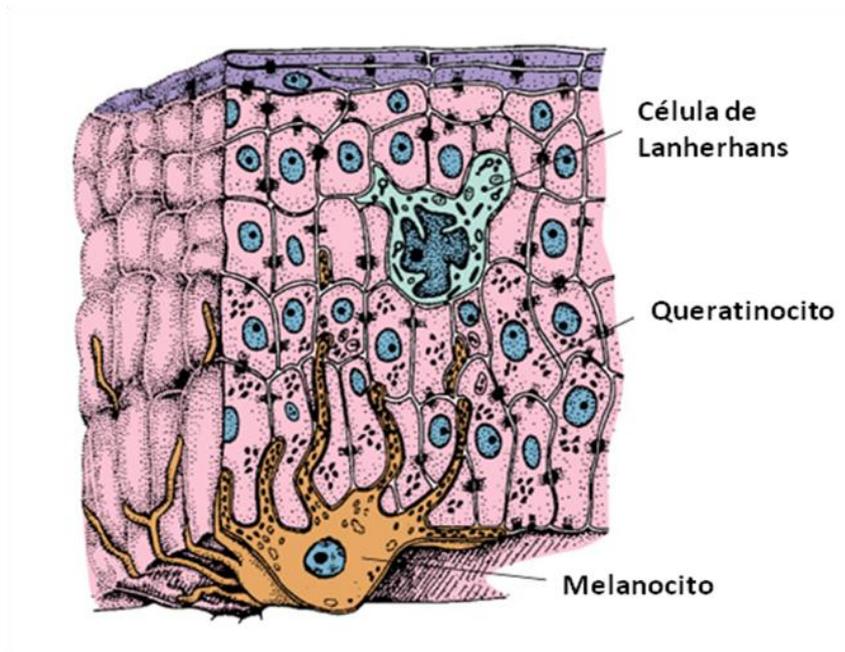


Figura 7: Diagrama de la epidermis que muestra la interacción de un melanocito con varias células del estrato basal y el estrato espinoso (Ross et al., 2005).

La tirosinasa, enzima que poseen los melanocitos, es esencial para la síntesis de melanina. Se encuentra localizada en melanosomas, orgánulos citoplasmáticos de los melanocitos. La tirosina que se transporta hacia los melanosomas se convierte en melanina por acción de la tirosinasa, mediante reacciones que progresan en la formación de 3,4-dihidroxifenilalanina y dopaquinona. Los melanosomas que contienen melanina se transfieren por medio de procesos dendríticos del melanocito por un proceso secretor denominado secreción citocrina. Al parecer los melanosomas se desplazan hasta la punta de las prolongaciones del melanocito, y a continuación los engloban los queratinocitos y lo incorporan a su citoplasma (Gartner and Hiatt, 2008).

La tinción especial con nitrato de plata (Fontana-Masson) permite observar más fácilmente a los melanocitos con sus proyecciones dendríticas ya que la melanina es argirófila y argentafin (Gartner and Hiatt, 2008).

2.5.2. Dermis (corion)

La región de la piel que está directamente basal a la epidermis, llamada **dermis**, deriva del mesodermo y se divide en dos capas: la superficial, **capa papilar** entretejida de manera laxa, y la **capa reticular** más profunda y más densa.

Los cortes de piel perpendiculares a la superficie dejan ver abundantes evaginaciones digitiformes de tejido conjuntivo, llamadas papilas dérmicas, que presionan la parte profunda de la epidermis. Las papilas se complementan con las que parecen ser proyecciones similares de la epidermis, llamadas crestas epidérmicas o redes de crestas epidérmicas, que se introducen en la dermis. En un plano de corte paralelo a la superficie de la epidermis y que pasa a través de las papilas dérmicas, el tejido epidérmico se observa como una lámina continua de epitelio dentro de la que aparecen islotes circulares de tejido conjuntivo. Estos islotes, son los cortes transversales de las papilas dérmicas digitiformes verdaderas, que empujan la superficie basal de la epidermis. Donde la tensión mecánica es mayor, las crestas epidérmicas son más profundas y las papilas dérmicas son más largas y están más juntas, creando una interfaz más extensa entre la dermis y la epidermis. (Ross et al., 2005).

2.5.2.1. Dermis Papilar

Consiste en tejido conjuntivo laxo, ubicado inmediatamente basal a la epidermis. Aquí, los haces de fibras colágenas son más delgados que en la porción profunda. Esta red colágena contiene en forma predominante moléculas de colágeno I y de tipo III. De modo similar, las fibras elásticas son filiformes y se organizan en una red irregular. La dermis papilar es relativamente delgada e incluye la sustancia de las papilas y las crestas dérmicas.

Contiene vasos sanguíneos que irrigan la epidermis sin introducirse en ella. Además, contiene prolongaciones nerviosas que terminan en la epidermis o perforan la lámina basal para introducirse en el compartimiento epitelial. Dado que están concentrados en esta capa, los vasos sanguíneos y las terminaciones nerviosas sensoriales son bien visibles en las papilas dérmicas (Ross et al., 2005).

2.5.2.2. Dermis Reticular

La dermis reticular es más profunda que la dermis papilar. Aunque su espesor varía en diferentes porciones de la superficie corporal, siempre es más gruesa y contiene más células que la dermis papilar. Posee gruesos haces irregulares de fibras colágenas principalmente de tipo I y fibras elásticas. Las fibras colágenas y elásticas forman las líneas regulares de tensión de la piel, que se conocen con el nombre de líneas de Langer. Cuando cicatrizan las incisiones cutáneas paralelas a las líneas de Langer dejan las cicatrices menos prominentes (Ross et al., 2005).

La dermis reticular contiene también estructuras derivadas de la epidermis, entre ellas glándulas sudoríparas, folículos pilosos y glándulas sebáceas. La interfaz entre la capa papilar y la reticular no se distinguen por que se continúan una con otra. Las fibras elásticas aparecen con mayor abundancia cerca de las glándulas sudoríparas y sebáceas. Los intersticios de la capa reticular poseen alto contenido de proteoglicanos con abundancia de dermatán sulfato (Ross et al., 2005).

2.6. Balance proliferación/apoptosis

Como se ha mencionado anteriormente, la epidermis es una estructura dinámica cuya integridad depende de la producción constante de nuevas células en la capa basal y su posterior migración y diferenciación. El entendimiento de la regulación de la

proliferación de los queratinocitos de la epidermis es importante debido a que los disturbios en el crecimiento de los queratinocitos son responsables de la patogénesis de diversas enfermedades cutáneas crónicas y el cáncer de piel.

El descubrimiento de las quinasas dependientes de ciclinas (cdks), enzimas que regulan la progresión del ciclo celular, fue un gran avance en la comprensión de los inhibidores de cdk en la epidermis normal *in vivo* (Missero et al., 1996). En queratinocitos, el ciclo celular está regulado principalmente en la fase G1. Las cdks claves en la fase de G1 son cdk4, cdk6 y cdk2 (Figura 8) (Sherr, 1993).

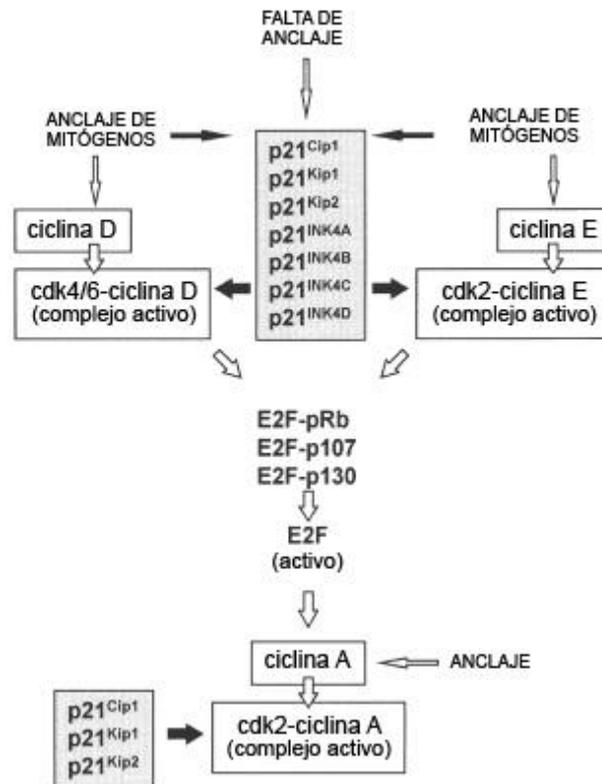


Figura 8: Regulación de la transición de las fases G1 a S del ciclo celular por ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (cdk) e inhibidores de cdk en queratinocitos. Las flechas sólidas indican inhibición y las flechas transparentes indican estimulación (Modificado de Gniadecki, 1997).

Estas cdks comienzan su activación al unirse a las ciclinas apropiadas. Las ciclinas D (D1, D2, y D3) se unen a cdk2. Se ha demostrado que la ciclina D1 posee un

papel fundamental en la epidermis de ratones transgénicos, donde se determinó que la sobreexpresión de ciclina D1 causa hiperplasia celular basal conduciendo a un incremento en la tasa de proliferación celular en esta capa (Robles et al., 1996).

El objetivo principal de los complejos cdk-ciclinas activados es fosforilar las proteínas de la familia retinoblastoma (Rb): la proteína retinoblastoma (pRb), la proteína p107 y la proteína p130. En células en reposo, estas proteínas están hipofosforiladas y forman complejos con factores de transcripción de la familia E2F. Las proteínas pRb y p107 forman complejos con E2F1, E2F2 y E2F3, mientras que E2F4 y E2F5 forman complejos con p130 (Sardet et al., 1995). Estos complejos actúan como represores transcripcionales. Durante la progresión a la fase G1, pRb, p107 y p130 son fosforiladas por cdk4/6-ciclina D y cdk2-ciclina E, resultando en la liberación de los factores de transcripción E2F e inducción de la síntesis de otras ciclinas dependientes de proteínas como ciclina A. Esta ciclina forma complejos con cdk2 y es responsable de la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular (Ivanova et al., 2005; 2006).

El queratinocito de la capa basal, no diferenciado y con capacidad mitótica, migra hacia las capas superiores a la vez que pierde completamente su capacidad proliferativa y se diferencia de forma gradual para transformarse en queratinocito córneo, célula muerta, anucleada, con forma de escama y altamente diferenciada (Eckert y Rorke, 1989; Fuchs, 1990; Leigh et al., 1994). Éste, se desprende de manera continua a medida que se produce el recambio celular proveniente de capas inferiores. Dicho recambio necesita de un balance cuidadosamente regulado entre los diferentes procesos de proliferación y diferenciación que afectan al queratinocito basal.

Mientras que los cambios morfométricos que están asociados con la estratificación de la epidermis han sido ampliamente estudiados, los mecanismos moleculares que

orquestan la diferenciación de la piel permanecen pobremente entendidos (Kern et al., 2011). Estudios genéticos en ratón han identificado múltiples vías de señalización que son esenciales para la correcta estratificación de la epidermis y la adquisición de las funciones de barrera de la piel (Blanpain y Fuchs, 2006; Koster y Roop, 2007). Estas vías de señalización involucran Notch, *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), el factor nuclear- κ B (NF- κ B) y el factor regulador de transcripción p63 (el cual se relaciona con p53), la familia AP2, reguladores transcripcionales CCAAT/*enhancer-binding protein* (C/EBP), factor regulador de interferón 6 (IRF6), *grainyhead-like 3* (GRHL3) y *Kruppel-like factor 4* (KLF4). El estudio de la interrelación entre estas vías de señalización y factores transcripcionales está comenzando a emerger (Blanpain y Fuchs, 2009; Kern et al., 2011).

En los queratinocitos, la actividad de las cdks y la progresión del ciclo celular está determinada por tres factores principales: (1) la diferenciación, (2) adhesión a la matriz y (3) factores de crecimiento e inhibidores del crecimiento. Los queratinocitos terminales que residen en niveles suprabasales no proliferan. El compartimento proliferativo de la epidermis está restringido a los queratinocitos basales, los cuales se subdividen en **células madre** y en **células amplificadoras de tránsito**. Las células madre poseen amplia capacidad proliferativa, pero se dividen con poca frecuencia en la epidermis (Jones et al., 1995). En la epidermis normal, la tasa de proliferación está probablemente determinada por las células amplificadoras en tránsito, la progenie de las células madres. Las células amplificadoras en tránsito son más maduras que las células madre y luego de completar varias rondas de mitosis, se diferencian en células terminales. Según Galimberti et al. (2009) en la epidermis se describen tres compartimentos celulares, a saber:

- **Células madre o *stem cells***, localizadas en la membrana basal a nivel de los nichos epidérmicos, específicamente en la región superior de las papilas dérmicas. Se encuentran en estado quiescente (G0). Poseen potencial proliferativo ante ciertos estímulos.
- **Células amplificadoras en tránsito**. Derivan de las células madre, poseen capacidad de migración a través de la membrana basal, de proliferación y de diferenciación hacia células queratinocíticas.
- **Queratinocitos de la membrana basal**. Migran hacia la zona suprabasal, presentan diferenciación terminal (pérdida de la capacidad proliferativa) con transformación degenerativa celular hacia la superficie (descamación).

A su vez, desde el punto de vista histológico, la epidermis se organiza en columnas que se denominan unidades proliferativas epidérmicas (EPU, *epidermal proliferative units*) que son estables en el tiempo, presentan una única célula madre en medio de un conglomerado de 10 células basales y representan un proceso controlado de proliferación celular y de migración a través de la membrana basal (Potten y Booth, 2002).

Diversos estudios en cultivos de queratinocitos y modelos animales han llevado a la identificación de factores de crecimiento y otras sustancias como vitaminas liposolubles y sus derivados, ceramidas, neuropéptidos, neurotransmisores, hormonas peptídicas y esteroides, mediadores inflamatorios, interleuquinas, etc. potencialmente involucradas en la regulación del crecimiento de los queratinocitos. La vía final de señalización lleva a la estimulación del crecimiento lo que involucra regulación negativa en la expresión de las ciclinas D, E y A e inhibición de Cip1 y Kip1, lo que resulta conjuntamente en la progresión a través de G1 (Gniadecki, 1997).

Numerosos investigadores concuerdan en que los factores de crecimiento de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) son reguladores clave en el desarrollo y crecimiento epidérmico (Hashimoto, 2000; Werner y Grose, 2003; Shirakata, 2010). Estos factores comprenden: EGF, factor transformante del crecimiento- α (TGF- α), amfiregulina, factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), betacelulina, entre otras proteínas. Ellos se unen a receptores de membrana de tipo tirosina quinasa de la familia de ErbB como EGFR. La señal transmitida vía este receptor es fundamental para el desarrollo normal de la epidermis (Shirakata, 2010). Ratones deficientes en el gen para EGFR han mostrado disturbios severos en el desarrollo de la piel y la atrofia epidérmica (Miettinen et al., 1995).

La unión de EGF, TGF- α e IGF-I al EGFR promueve la proliferación de los queratinocitos. En contraste, ligandos inhibitorios de EGFR, como Lrig1 y Mig6 están involucrados en el mantenimiento de la quiescencia de las células madres; la ablación de estas proteínas lleva a la hiperproliferación de los queratinocitos (Fuchs, 2009). La estimulación del EGFR, activa Ras e induce la proliferación de queratinocitos e inhibe la diferenciación (Khavari y Rinn, 2007).

2.7. Marcadores de proliferación celular

La fracción de crecimiento de un tejido está definida como el cociente entre las células que se están dividiendo y el número total de células de ese tejido. Diversas metodologías han sido utilizadas para determinar el índice de proliferación celular, entre las que se encuentran el conteo de figuras mitóticas, citometría de flujo, incorporación de nucleótidos modificados en el ADN sintetizado de *novo* [timidina tritiada y bromodeoxyuridina (BrdU)] y la identificación de antígenos asociados al ciclo de

división celular (PCNA y Ki-67 entre otros) (Woosley, 1991). En la Figura 9 se muestran las fases del ciclo de división celular donde pueden ser encontrados algunos de dichos marcadores de proliferación.

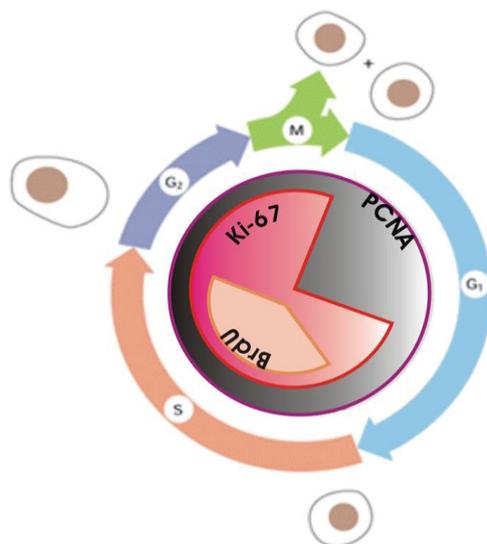


Figura 9: Ciclo de división celular y sus marcadores. La replicación del ADN está confinada a la fase S del ciclo. La fase G₁ está comprendida entre las fases M (mitosis) y S, en cambio G₂ está comprendido entre S y M. La célula incorpora BrdU en la fase S, expresa Ki-67 desde el final de G₁ hasta la M inclusive y expresa PCNA durante todo el ciclo de división celular encontrándose en la fase S su mayor concentración.

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext

PCNA es una proteína nuclear de 36-kDa que tiene un papel esencial en la regulación del ciclo celular (Xiong et al., 1991). Durante la fase S del ciclo celular, PCNA se aparea con la ciclina D (Xiong et al., 1992), otro regulador importante de proliferación celular. Este complejo es modulado por varios factores de crecimiento y otros estímulos de crecimiento (Xiong et al., 1991). Si durante la fase G₁ las células reciben los estímulos apropiados, ellas entran a la fase S del ciclo, y la expresión de PCNA aumenta a lo largo de G₁/S de la interfase, alcanzando una meseta durante G₂. (Liu et al., 1989). La expresión de PCNA declina bruscamente en la fase M y en

quiescencia. Estas características hacen del PCNA un marcador muy útil para células proliferantes.

PCNA es un proteína evolutivamente bien conservada que ha sido hallada en todas las especies eucariotas así como también en Archaea (Strzalka y Ziemienowicz, 2011). PCNA fue inicialmente descrito como un cofactor de la polimerasa delta requerido para la síntesis de ADN durante la replicación (Tan et al., 1986; Bravo et al., 1987; Prelich et al., 1987). Además de su papel en la replicación del ADN, se ha demostrado su participación en otros procesos celulares vitales como la remodelación de la cromatina, la reparación del ADN, cohesión de las cromátides hermanas y control del ciclo celular (Maga y Hubscher, 2003; Naryzhny et al., 2005; Pluciennik et al., 2010; Strzalka y Ziemienowicz, 2011).

Existen pocos estudios que identifiquen células PCNA positivas en piel normal de ratón, no así en condiciones patológicas donde se ha usado ampliamente como marcador de proliferación celular en humanos y animales.

2.8. Características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis

2.8.1. Concepto de muerte celular programada

Durante la década de 1960, con la utilización del microscopio electrónico, la embriología tuvo un gran impulso. Saunders Jr y Gasseling (1962) postularon, a partir de sus estudios con embriones de pollo, que los patrones de muerte eran reproducibles. En la Universidad de Harvard, Lockshin y Williams (1965), adaptan esta idea y basándose en sus estudios sobre los estadios de los insectos y los cambios ocurridos durante el desarrollo larval, publican en 1965 su artículo titulado “Muerte celular programada (MCP)”, en el cual postulan que las células siguen una secuencia controlada, con elementos codificados genéticamente, hacia su propia muerte.

Con el descubrimiento de la apoptosis por Kerr et al. (1972), esta idea se reafirmó, siendo el término MCP regularmente utilizado como sinónimo de apoptosis.

La nomenclatura utilizada en relación a la muerte celular ha sido confusa. Uno de los primeros intentos por clasificar los fenotipos de muerte celular, basado en el análisis morfológico de modelos del desarrollo, fue hecho por Schweichel y Merker (1973), quienes identificaron 3 tipos de muerte celular (Tipo 1, 2 y 3). La tipo 1 se manifiesta por condensación nuclear y picnosis, con reducción del volumen citoplasmático, fragmentación celular tardía y fagocitosis. La tipo 2 o degeneración autofágica, se caracteriza por la vacuolización autofágica del citoplasma. La tipo 3 o muerte citoplasmática, se caracteriza por una desintegración general con pérdida de las organelas. De esta manera, la tipo 1 correspondería a la apariencia descrita por Kerr (1972) para la apoptosis, la tipo 2 a Autofagia y la 3 muestra características asociadas a la necrosis. En 1990, Clarke recapituló esta clasificación distinguiendo dos subtipos de muerte citoplasmática, quedando 3A o desintegración no lisosomal y la 3B citoplasmática, aunque actualmente, se considera a la muerte tipo 3 como sólo necrosis, sin subdivisiones. Algunos sugieren, que las distintas morfologías sólo reflejan los distintos tipos celulares y distintos estímulos iniciales.

Leist y Jaattela (2001) han propuesto un modelo descriptivo, que clasifica a la muerte celular en 4 subclases según su morfología nuclear. La apoptosis es definida por una cromatina condensada en figuras compactas, a menudo globulares o con forma de medialuna. Levemente diferente es la MCP Apoptosis-símil, que se caracteriza por una cromatina condensada más laxamente. En contraste, la MCP necrosis-símil no presenta condensación de la cromatina, sino que su apariencia va desde una cromatina agrupada a una con gránulos laxos, mientras que la necrosis se caracteriza por el edema celular con ruptura de la membrana.

En el año 2005, la revista *Cell Death and Differentiation* convocó a un panel de expertos para elaborar una propuesta sobre la clasificación de la muerte celular y su nomenclatura, publicando en noviembre de 2005, un artículo con sus recomendaciones (Kroemer et al., 2005). En una nueva reunión en el año 2009, el comité de expertos denominado, *Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)* propuso un conjunto de recomendaciones y definiciones sobre la morfología de los diferentes tipos de muerte celular y el uso apropiado de la terminología, incluyendo la “apoptosis”, “necrosis” y “catástrofe mitótica”. En base a los sustanciales avances en la exploración bioquímica y genética de la muerte celular que se han producido en los últimos años, el comité de expertos ha propuesto recientemente una clasificación funcional de la muerte celular que se aplica tanto a trabajos *in vitro* como *in vivo* (*Cell Death and Differentiation*, 2012). Esta clasificación incluye a la “apoptosis extrínseca”, “apoptosis intrínseca dependiente o independiente de caspasas”, “necrosis regulada”, “muerte celular autofágica” y “catástrofe mitótica”.

2.8.2. Características morfológicas de la apoptosis versus necrosis

La apoptosis es un proceso fisiológico en el cual estímulos del desarrollo o ambientales activan un programa genético para llevar a cabo una serie específica de eventos que culminan en la muerte celular, sin alteraciones de la arquitectura o de la fisiología tisular (Hockenbery, 1995). El recambio regular de las células dentro de un tejido implica esta forma de muerte celular, cuidadosamente controlada y no-inflamatoria que no produce daño al tejido y por la cual células excedentes, enfermas o lesionadas son eliminadas. La apoptosis juega un papel vital en procesos fisiológicos del desarrollo de eucariotas, por ejemplo, durante la embriogénesis al eliminarse el tejido

interdigital, o durante la maduración del sistema nervioso cuando se produce la muerte de las neuronas supernumerarias (Vaux, 1993).

La apoptosis también puede provocarse ante situaciones patológicas (Vaquero, 2000), siendo innumerables las enfermedades en las que se ha demostrado una alteración de la apoptosis, bien por exceso o por defecto.

Inicialmente se produce una pérdida de contacto entre células debido a una constricción de la membrana. En consecuencia, el tamaño celular disminuye y los orgánulos se agrupan confiriendo al citoplasma un aspecto de mayor densidad. Los cambios nucleares son los rasgos más característicos: la cromatina se condensa en la periferia, por debajo de la membrana nuclear, en masas densas bien definidas. Posteriormente se produce una fragmentación del ADN nuclear en múltiplos de 200 pb debido a la activación de una endonucleasa dependiente de Ca^{+2} que cliva el ADN internucleosomal. Además, ocurre un desensamblaje celular hasta formar vesículas rodeadas de membrana denominadas “cuerpos apoptóticos” que se componen de citoplasma y orgánulos muy agrupados, pudiendo contener también fragmentos nucleares (Kanzler y Galle, 2000).

Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células sanas adyacentes del parénquima o por macrófagos, donde se degradan con rapidez dentro de los lisosomas. Seguidamente las células adyacentes son capaces de migrar o proliferar reemplazando así el espacio ocupado por la célula apoptótica suprimida (Cohen, 1993).

La necrosis implica un aumento del volumen celular y de sus orgánulos intracelulares, con pérdida de la integridad de la membrana plasmática, alterándose la regulación de la homeostasis celular lo que culmina en una ruptura de la membrana plasmática y la consecuente liberación al espacio extracelular de su contenido intracelular y disolución de los orgánulos. A diferencia de la apoptosis, la necrosis

produce una respuesta inflamatoria localizada que puede causar un mayor daño al tejido. En la necrosis hay liberación de sustancias nocivas desde el citosol desencadenando una reacción inflamatoria en el tejido circundante que es fácilmente detectado morfológicamente (Majno y Joris, 1995). La tabla 1 resume las características más sobresalientes que distinguen a la muerte celular por apoptosis de aquella que ocurre por necrosis.

Tabla 1: Diferencias entre necrosis y apoptosis (Cascales Angosto, 2003).

Características	Necrosis	Apoptosis
Volumen celular	Aumenta	Se reduce
Cromatina nuclear	Condensación laxa y localización difusa	Condensación compacta con marginación nuclear
Núcleo	Fragmentado	Fragmentado
ADN	Fragmentación irregular, patrón de barrido	Fragmentación internucleosomal, patrón de escalera
ARN ribosomal	Degradación irregular	Fragmentación regular, aparición de bandas específicas
Organelas	Se hinchan y tienden a fusionarse con lisosomas	Permanecen integra y no se fusionan con lisosomas
Membrana celular	Conserva asimetría de fosfolípidos y se pierde la integridad	Aparición de fosfatidilserina en la lámina extracelular y se conserva la impermeabilidad
Citoesqueleto	Se desorganiza	Conserva estructura
Citoplasma	Se vierte al espacio intersticial	Se conserva en los cuerpos apoptóticos
Activación de proteasas	Inespecífica y asociada a disfunción lisosomal	Específica de la familia de las caspasas
Reacción inflamatoria	Presente	Ausente

2.8.3. Mecanismos moleculares que rigen la apoptosis. Fases de la apoptosis

El número de células del organismo está estrictamente controlado. Debe existir un balance entre la proliferación celular y las pérdidas de células, fundamentalmente por muerte, emigración o diferenciación. Desde el punto de vista molecular podemos considerar la existencia de tres fases en el proceso de muerte celular programada que son: **fase de iniciación, fase de ejecución y fase de degradación celular**. Durante las

dos primeras fases es posible revertir el proceso, gracias a mecanismos bloqueadores o reguladores (Elmore, 2007).

2.8.3.1. Fase de iniciación

Existen múltiples factores inductores de apoptosis, algunos de ellos relacionados con condiciones ambientales adversas como pérdida de factores tróficos o de crecimiento, radicales libres, virus, agentes quimioterapéuticos, radiaciones UV, etc. Las dos vías mejor estudiadas en el proceso de apoptosis incluyen: *Vía de activación de receptores especializados de la membrana celular (vía extrínseca)* y *la vía de alteración mitocondrial (vía intrínseca)* (Elmore, 2007).

Los mecanismos de apoptosis son altamente complejos y sofisticados e involucran una cascada de eventos moleculares dependientes de energía. La vía extrínseca e intrínseca convergen en la misma vía, la de ejecución. Esta vía se inicia con el clivaje de la caspasa-3 y resulta en la fragmentación del ADN nuclear, degradación del citoesqueleto y proteínas nucleares, entrecruzamiento de proteínas, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas y finalmente captación por célula fagocíticas (Elmore, 2007).

- *Vía extrínseca o de activación de receptores especializados de la membrana celular*

La vía extrínseca de señalización que inicia la apoptosis involucra la interacción mediada por receptores transmembranales. Involucra receptores de muerte miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (Locksley et al., 2001). Los miembros de la familia del receptor de TNF comparten dominios extracelulares

similares ricos en cisteína y poseen un dominio citoplasmático de 80 aminoácidos llamado “dominio de muerte” (Ashkenazi y Dixit, 1998). Este dominio juega un rol crítico en la transmisión de la señal de muerte de la superficie de las células a la vía de señalización intracelular. Los ligandos y sus correspondientes receptores de muerte mejor caracterizados incluyen: FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (Chicheportiche et al., 1997; Suliman et al., 2001; Rubio-Moscardo et al., 2005).

La secuencia de eventos que definen la fase extrínseca de la apoptosis ha sido bien caracterizada en modelos con FasL/FasR y TNF- α /TNFR1. En estos modelos, se produce el agrupamiento de los receptores y unión con su ligando trimérico homólogo. Tras la unión del ligando, se desencadena el reclutamiento de proteínas citoplasmáticas adaptadoras las cuales exhiben dominios de muerte que se unen con los receptores. La unión del ligando Fas a su receptor resulta en la unión de la proteína adaptadora FADD (*Fas-associated protein with death domain*) y la unión del ligando TNF al receptor resulta en la unión de la proteína adaptadora TRADD con reclutamiento de FADD y RIP (Wajant, 2002). La FADD luego se asocia con procaspasa-8 vía dimerización del dominio efector de muerte. En este punto, se forma un complejo de señalización inductor de muerte (DISC, *death-inducing signaling complex*) que resulta en la activación autocatalítica de la procaspasa-8 (Kischkel et al., 1995) (Figura 10).

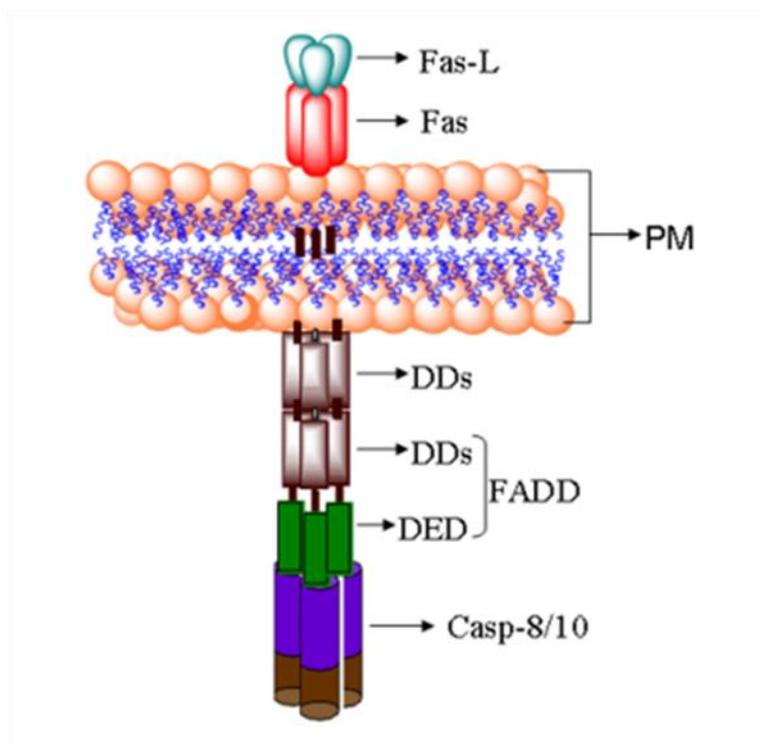


Figura 10: Representación esquemática de la vía de señalización extrínseca mediada por receptor. La unión del ligando Fas a su receptor resulta en la unión de la proteína adaptadora FADD. Esta proteína se asocia con procaspasa-8 vía dimerización del dominio efector de muerte (DED). PM: membrana plasmática (Rastogi et al., 2009).

- *Vía intrínseca o mitocondrial.*

La vía de señalización intrínseca que inicia la apoptosis involucra una gran variedad de estímulos no mediados por receptor que producen señales intracelulares que actúan directamente sobre un blanco dentro de la célula iniciando los eventos mitocondriales. El estímulo que inicia la vía intrínseca produce señales intracelulares que pueden actuar en forma positiva o negativa. Las señales negativas involucran ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas que pueden conducir al fracaso de la supresión del programa de muerte, iniciando así apoptosis. Otros estímulos que actúan de forma positiva incluyen, radiaciones, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y radicales libres. Todos estos estímulos causan cambios en la membrana mitocondrial interna lo que resulta en la apertura de canales no

selectivos (PTP, *permeability transition pore*), pérdida del potencial de membrana y liberación de dos grupos principales de proteínas proapoptóticas del espacio intermembranoso al citosol (Saelens et al., 2004).

El primer grupo consiste en citocromo c, el Smac (*Second mitochondria-derived activator of caspases*)/DIABLO (*Direct IAP-Binding protein with low pI*) y la serina proteasa HtrA2/Omi (Du et al., 2000; van Loo et al., 2002; Garrido et al., 2006). Estas proteínas activan la vía mitocondrial dependiente de caspasas. El citocromo c (citosólico) forma un complejo con el factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1: *Apoptotic protease activating factor-1*) y procaspasa-9 en presencia de dATP. Este complejo, denominado “apoptosoma” produce la activación de la caspasa-9, que a su vez corta y activa otras caspasas, como las caspasas -3 y -7. Esto constituye la fase de ejecución de la apoptosis y parece ser el punto de no retorno de la apoptosis (Martinou, 1999; Hill et al., 2004). Los complejos Smac/DIABLO y HtrA2/Omi además de actuar activando las caspasas se unen a la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP, *inhibitor of apoptosis proteins*), inhibiendo su actividad anti-apoptótica (van Loo et al., 2002; Schimmer, 2004).

El segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas como el factor inductor de la apoptosis (AIF, *apoptosis-induced factor*), endonucleasa G y DNasa activada por caspasas (CAD, *caspase-activated DNase*) son liberadas de la mitocondria durante la apoptosis, pero este es un evento tardío que ocurre luego de que la célula ha sido comprometida a morir (Rastogi et al., 2009).

El AIF fue identificado y clonado en 1999 como una proteína que se trasloca de la mitocondria al citosol y luego al núcleo, donde favorece la condensación de la cromatina y la ruptura del ADN en fragmentos grandes (~50–300 kb) (Lorenzo y Susin,

2004). Esta forma temprana de condensación nuclear es conocida como “estadio I” de condensación (Susin et al., 2000).

Otra proteína mitocondrial que se trasloca al núcleo tras un estímulo apoptótico es la endonucleasa G, que degrada el ADN nuclear en fragmentos oligonucleosomales similares a los generados por CAD (Parrish et al., 2001). El AIF y endonucleasa G funcionan en de manera independiente de caspasas. El CAD, luego de ser liberado de la mitocondria se trasloca al núcleo donde después de ser clivado por caspasa-3 conduce a la fragmentación oligonucleosomal del ADN y a una más pronunciada y avanzada condensación de la cromatina (Enari et al., 1998). A esta tardía y más pronunciada condensación de la cromatina se la conoce como “estadio II” de condensación (Susin et al., 2000).

El control y regulación de los eventos apoptóticos mitocondriales ocurre a través de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Cory y Adams, 2002). La proteína supresora de tumores p53 tiene un rol crítico en la regulación de la familia de proteínas Bcl-2, sin embargo, el mecanismo exacto aún no ha sido completamente dilucidado (Elmore, 2007).

La familia de proteínas Bcl-2 controla la permeabilidad de la membrana mitocondrial y pueden actuar promoviendo o inhibiendo la apoptosis. A la fecha, 25 genes han sido identificados en la familia Bcl-2. Algunas proteínas antiapoptóticas incluyen: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG y algunas proteínas proapoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk. Estas proteínas tienen especial significancia dado que pueden determinar si la célula se compromete a la apoptosis o aborta el proceso. Se cree que el principal mecanismo de acción de la familia de proteínas Bcl-2 es la regulación de la liberación del citocromo c de la mitocondria vía alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. La fosforilación de serina

de Bad se asocia con 14-3-3, un miembro de la familia de moléculas de unión multifuncionales de fosfoerina. Cuando Bad se fosforila, es atrapado por 14-3-3 y secuestrado en el citosol, pero cuando Bad no está fosforilado, éste puede traslocarse a la mitocondria y liberar citocromo c (Zha, et al., 1996). Bad puede formar heterodímeros con Bcl-Xl o Bcl-2, neutralizando sus efectos protectivos y promoviendo la muerte celular (Yang et al., 1995). Cuando no son secuestrados por Bad, ambos Bcl-2 y Bcl-XL, inhiben la liberación de citocromo c de la mitocondria, aunque el mecanismo no está completamente entendido (Elmore, 2007).

Estudios previos indican que Bcl-2 y Bcl-XL inhiben la apoptosis principalmente por el control de la activación de las proteasas caspasas (Newmeyer et al., 2000). Una proteína adicional designada como “Aven” podría unirse a Bcl-XL y Apaf-1, previniendo la activación de la procaspasa-9 (Chau et al., 2000). Existen evidencias que la sobreexpresión de Bcl-2 o de Bcl-XL podría regular negativamente a la otra indicando una regulación recíproca entre estas dos proteínas (Elmore, 2007).

Puma y Noxa son dos miembros de la familia Bcl-2 que actúan promoviendo la apoptosis. Puma juega un importante rol en la apoptosis mediada por p53. Se ha observado *in vitro* que la sobreexpresión de Puma está acompañada por un incremento en la expresión de Bax y en los cambios conformacionales de esta proteína, también en la traslocación de Bax a la mitocondria y en la liberación de citocromo c y consecuente reducción del potencial de membrana mitocondrial (Liu et al., 2003). Noxa también interviene en la inducción de la apoptosis mediada p53. Estudios previos han mostrado que esta proteína se localiza en la mitocondria e interactúa con miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, resultando en la activación de la caspasa-9 (Oda et al., 2000).

2.8.3.2. Fase de ejecución

Una vez que la célula ha tomado la decisión de morir, en su interior se producen una serie de procesos bioquímicos que conducen a la degradación de proteínas y de la cromatina. La proteólisis, a diferencia de la mayoría de las modificaciones postranslacionales, es irreversible y quizás por ello es altamente específica. Regula fenómenos biológicos críticos en los que se ve involucrado un grupo reducido de sustratos. La mayoría de las proteasas son sintetizadas como precursores de muy baja actividad catalítica que son activados por procesamiento proteolítico mediado por la unión a un cofactor o por la retirada de un inhibidor (Elmore, 2007).

Las caspasas son una familia de cisteína-proteasas que han sido reconocidas como los homólogos en mamíferos del producto del gen proapoptótico *ced-3* del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Hasta la fecha se han identificado 14 caspasas de mamíferos. En base a la similitud de la secuencia entre los dominios de las subunidades, estas caspasas se dividen en tres grupos (Rastogi et al., 2009):

- **Grupo inflamatorio** que comprende a las caspasas -1, -4, -5, -11, -12, -13 y -14.
- **Grupo iniciador** de la apoptosis que incluye las caspasas -2, -8, -9 y -10.
- **Grupo efector o ejecutor** de la apoptosis que incluye a las caspasas -3, -6 y -7

Estas proteasas inicialmente se expresan en la célula como zimógenos o proenzimas (30-50 kDa) que contienen un prodominio N- terminal seguido de dos subunidades: una grande (20 kDa) que contiene el centro activo con cisteína dentro de un motivo conservado QACXG y otra pequeña (10 kDa) en el C-terminal (Degterev et al., 2003). Las caspasas son unas de las proteasas más específicas con un requerimiento inusual y absoluto de cortar después de un residuo de ácido aspártico (Asp) (Stennicke et al., 1998). El prodominio y la subunidad grande están separados por un lugar de corte con Asp, y la subunidad grande está separada de la pequeña por uno o dos motivos de

corte con Asp. La presencia de Asp en los motivos de corte para la maduración es consistente con la habilidad de las caspasas de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación (Figura 11).

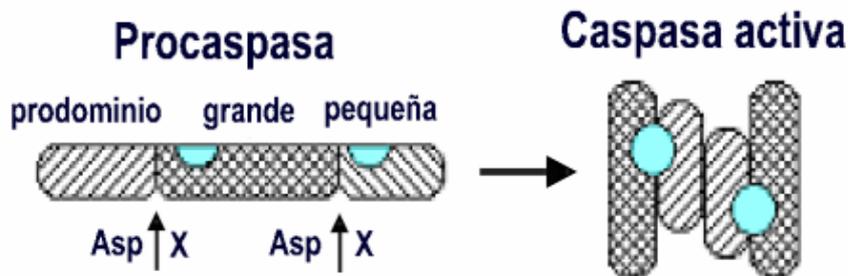


Figura 11. Activación de procaspasas. La procaspasa es inactiva y una vez que sufre dos clivajes proteolíticos se separa en tres subunidades (prodominio, subunidad grande y subunidad pequeña). La subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero por unión de sus sitios activos. La unión de dos heterodímeros se verifica en dirección opuesta con dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las subunidades grandes (Cascales Angosto, 2003).

Las caspasas inflamatorias y las iniciadoras poseen prodominios largos, excepto la -14 que no lo tiene o lo tiene muy corto. El prodominio largo contiene el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD). El DED y CARD se parecen al dominio de muerte (DD); y los tres pertenecen a la superfamilia de los dominios de muerte. Estos dominios median las interacciones proteína-proteína entre las procaspasas y sus adaptadores, y juegan importantes papeles en la activación de las procaspasas. Por el contrario, se cree que los prodominios cortos de las caspasas ejecutoras son incapaces de mediar interacciones entre proteínas.

Las caspasas efectoras, que presentan un prodominio más pequeño, son las responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis (Sun et al., 1999). Tras su activación por una señal apoptótica, ya sea mediada por receptores específicos de la superficie celular o bien a través de mecanismos de señalización intracelular, las caspasas actúan concertadamente en cascada produciendo

la ruptura de sustratos celulares clave como la poli (ADP-ribosa) polimerasa, citoqueratinas y proteínas láminas, lo que conduce a un desensamblaje celular y a la muerte de la célula (Cohen, 1997).

La cascada de activación de las caspasas finaliza con la activación de la caspasa-3 que ocurre al inicio de la apoptosis, mucho antes de que tenga lugar la fragmentación del ADN. Una vez que se ha activado la caspasa-3 es imposible que la célula vuelva a ser viable y el programa para la muerte celular se activa irreversiblemente. Las caspasas no se unen indiscriminadamente a las proteínas sobre las que actúan sino que existen proteínas diana, ya que la ruptura ocurre sobre secuencias de péptidos específicas (Thornberry y Lazebnik, 1998). La destrucción de estas proteínas está programada genéticamente y se lleva a cabo sistemáticamente para asegurar la correcta muerte de la célula.

Basándose en un análisis de su función celular, las proteínas diana de las caspasas pueden clasificarse en seis categorías: (1) proteínas directamente implicadas en la regulación de la apoptosis (Bid, Bcl-2, Bcl-XL, etc.), (2) proteínas reguladoras de la señal de transducción apoptótica (proteínas quinasas, FAK, Akt), (3) proteínas estructurales (actina, gelsolina, fodrina), (4) proteínas necesarias para los sistemas de reparación celulares (PARP, ATM), (5) proteínas reguladoras del ciclo celular (p27, p21, Mdm2) y (6) proteínas implicadas en enfermedades humanas (ataxina-3, huntingtina, etc.) (Utz y Anderson, 2000; Degterev et al., 2003).

Como ya se ha comentado, cada caspasa es sintetizada como zimógeno, por lo que requiere ser procesada para generar la enzima activa; las caspasas que se activan en primer lugar serán las responsables de iniciar la cascada proteolítica. Para su activación necesitan proteínas mediadoras que concentran los zimógenos en cantidad suficiente para que se produzca la autocatálisis (Salvesen y Dixit, 1999) o bien activan

alostéricamente al zimógeno sin procesarlo (Adams y Cory, 2002). Estos mediadores de la activación de las caspasas, que actúan en un gran complejo denominado **apoptosoma**, incluyen ced-4 en *C. elegans* y su homólogo en mamíferos, Apaf-1 (Zou et al., 1997; Adams y Cory, 2002).

Se han propuesto dos modos distintos de activación de las caspasas “iniciadoras”:

- La procaspasa-8 es activada por la agregación de receptores en la membrana plasmática: al unirse el ligando a los receptores de membrana de la familia del TNF la procaspasa-8 es reclutada por el FADD hasta el receptor; la elevada concentración a nivel local de este zimógeno promueve su autocatálisis, activándolo (Strasser et al., 2000).

- Por el contrario, la procaspasa-9 requiere de la formación de un complejo citoplásmico para su activación. Este complejo, denominado apoptosoma está formado por la procaspasa-9, Apaf-1 y citocromo c proveniente de mitocondrias dañadas. Por tanto esta procaspasa sólo se activaría cuando se utiliza la vía mitocondrial, necesitando además citocromo c y ATP (Bao y Shi, 2007) (Figura 12).

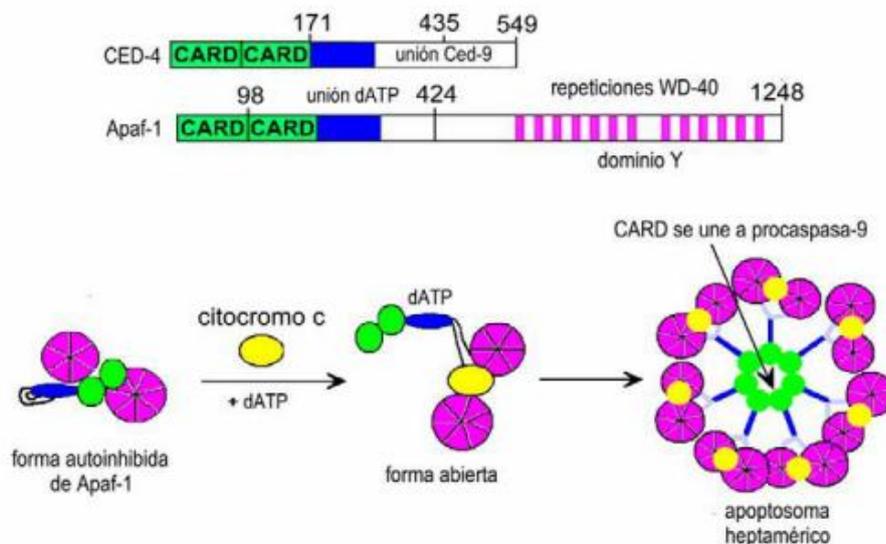


Figura 12. Formación del apoptosoma. El factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1), está formado por tres dominios: dominio CARD o de reclutamiento de caspasas, dominio de unión al dATP y dominio Y de repeticiones WD-40. En

condiciones normales se encuentra en el citosol en forma inerte. Una vez recibidas por la célula las señales de muerte, el citocromo c sale de la mitocondria. Al unirse el citocromo c y el dATP a la molécula de Apaf-1, ésta se activa y se abre dejando al exterior la superficie de oligomerización. Varias unidades Apaf-1 se unen formando el apoptosoma. En esta figura son siete moléculas de Apaf-1 que se han unido dejando la zona CARD en el centro que es donde va a unirse el prodominio N-terminal de las procaspasas-9 (Cascales Angosto, 2003).

Una vez activadas las caspasas pueden actuar de forma directa o indirecta:

a) Mecanismo indirecto:

Las caspasas actuarían inactivando proteínas que protegen a la célula de la muerte celular. Por ejemplo, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL son digeridas por las caspasas, originándose factores proapoptóticos (Cheng et al., 1997). Es interesante destacar aquí el mecanismo de acción de la nucleasa responsable de la fragmentación internucleosomal del ADN, típica de la apoptosis (Enari et al., 1998). Esta degradación del material genético constituye un “punto de no retorno” en el proceso apoptótico: el mecanismo subyacente a la condensación de la cromatina, consiste en una fragmentación del ADN nuclear existente en las regiones de unión entre los nucleosomas. El producto de dicha degradación son fragmentos de ADN con longitudes múltiples de 180-200 pares de bases que originan un patrón en escalera típico de las células apoptóticas mediante electroforesis en gel de agarosa. Dicha nucleasa, denominada CAD (ADNasa activada por caspasa), está presente en las células de forma constitucional e inactiva, formando un complejo con una subunidad inhibitoria, denominada inhibidor de CAD (ICAD) que posee sitios de corte por caspasa-3. Durante el proceso de apoptosis ICAD es degradado por la caspasa-3 y esto libera y permite la activación de la nucleasa CAD que realiza su función sobre el núcleo de la célula (Sakahira et al., 1998).

b) Mecanismo directo:

Las caspasas también realizan su función en forma directa, alterando distintas estructuras celulares, como por ejemplo la destrucción de la lámina nuclear o del citoesqueleto. La lámina nuclear es una estructura rígida que se localiza por debajo de la membrana nuclear, constituida por polímeros del filamento intermedio denominado laminina y que está involucrado en la organización de la cromatina (Rao et al., 1996). Ante las caspasas, los filamentos intermedios se anclan por un solo sitio, produciendo el colapso de la lámina nuclear lo que favorece la condensación de la cromatina. En el caso del citoesqueleto, las caspasas inactivan a proteínas que regulan la homeostasis, como la fodrina o la gelsolina, que despolimerizan los filamentos de actina por lo que son clave en la rápida aparición de los cambios morfológicos (Kothakota et al., 1997). Además, modifican la quinasa de adhesión focal (FAK) y la quinasa 2 p21-activada (PAK2), pudiendo colaborar en los cambios estructurales de la membrana citoplasmática (Rudel y Bokoch, 1997). En resumen, las caspasas participan en la apoptosis de un modo muy organizado: cortan los contactos con las células adyacentes, reorganizan el citoesqueleto, entorpecen la replicación y reparación del ADN, interrumpen el *splicing* y rompen la estructura nuclear, inducen la liberación de señales que favorecerán la fagocitosis y desintegran la célula en cuerpos apoptóticos (Chang y Yang, 2000).

2.8.3.3. Fase de degradación celular

En la superficie de los macrófagos y de las células apoptóticas han sido identificadas moléculas que actuarían como mediadores en el proceso de reconocimiento y adhesión, facilitando así la desintegración de los cuerpos apoptóticos (Savill y Fadok, 2000). Los receptores presentes en los macrófagos pueden clasificarse

como de clase A, a los que pertenecen el receptor de macrosialina, ABC 1 y receptor de vitronectina ($\alpha\beta 3$ integrin), y los de clase B, donde se incluyen los receptores CD14 y CD36 (Elmore, 2007). Los cambios que se producen en la membrana de las células apoptóticas favorecen que los lípidos de la misma queden expuestos (fosfatidilserina) lo que permite que los cuerpos apoptóticos puedan ser reconocidos por los receptores situados sobre los macrófagos. Estos receptores pueden unirse a la trombospondina, una molécula que forma puente con la fosfatidilserina y la molécula de adhesión intercelular 3 (ICAM 3, *intercellular adhesion molecule 3*) de la célula apoptótica (Marguet et al., 1999).

2.9. Mecanismos reguladores de la apoptosis

Existen procesos moduladores de la apoptosis que actúan a diferentes niveles:

2.9.1. Inactivación de ligandos

Este nivel de regulación se produciría al inicio de la apoptosis y consiste en la proteólisis o inactivación de los ligandos de los receptores de membrana, específicos de la apoptosis, a través de algunos polipéptidos. Por ejemplo, la proteína silenciadora del dominio de muerte (SODD, *silencer of death domain*) se une a uno de los dominios de TNFR1 y previene la oligomerización del receptor. Otro ejemplo es la tirosina fosfatasa, que al unirse al dominio citoplasmático de Fas atenúa la muerte celular mediada por Fas (Elmore, 2007).

2.9.2. Proteínas inhibidoras y favorecedoras de la apoptosis

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas de la familia Bcl-2 son capaces de formar heterodímeros cuya relación dentro de la célula resulta en una

estimulación o inhibición de la apoptosis. El gen Bcl-2 (*B-cell Lymphoma 2*) fue el primer miembro de una familia de genes implicados en la regulación de la apoptosis que, a diferencia de otros oncogenes, prolonga la supervivencia celular bloqueando específicamente la muerte celular por apoptosis (Chetty et al., 1997). El producto de este gen es una proteína de 26 kDa que se localiza principalmente en la membrana externa de la mitocondria, aunque también en la nuclear y en el citosol a nivel del retículo endoplásmico liso (De Jong et al., 1994). La amplia expresión *in vivo* de Bcl-2 en tejidos normales, embriológicos, fetales y adultos, sugiere que este gen tiene un importante papel en la homeostasis tisular normal (LeBrun et al., 1993).

Las proteínas de esta familia poseen, al menos, uno de cuatro dominios homólogos al Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 y BH4); las inhibidoras de la apoptosis contienen los dominios BH1 y BH2, incluso las de mayor homología con Bcl-2 presentan los cuatro dominios (Reed, 1997). Sin embargo, las proteínas proapoptóticas pueden subdividirse en dos grupos, en relación a la homología estructural que comparten con Bcl-2: i) el grupo Mdt, que incluye Bax, Bak y Bok, contiene tres dominios (BH1, BH2 y BH3) homólogos al Bcl-2; ii) el grupo proteico que sólo coinciden estructuralmente con una pequeña región central (9 a 16 residuos) del dominio BH3 incluye a Bik, Blk, Hrk, Bad, Bid y EGL-1 (Elmore, 2007).

- **Bax:** constituye la primera proteína que se descubrió asociada al Bcl-2 *in vivo* (Bax: *Bcl-2 associated protein x*). Es una proteína de 21 kDa con la habilidad de suprimir la capacidad de Bcl-2 para bloquear la apoptosis (Antonsson y Martinou, 2000). En algunos tejidos, entre los que se incluyen mama, estómago, piel, ganglios linfáticos, colon e intestino delgado, los patrones de expresión de Bax y Bcl-2 están regulados de forma paralela, lo que sugiere que existe un antagonismo activo entre ambas proteínas (Krajewski et al., 1994). Por otro lado, también se ha observado que la expresión de Bax

se localiza en aquellas zonas con una alta tasa de apoptosis (Zhan et al., 1994), por lo que se han propuesto varios mecanismos para explicar el papel regulador de esta interacción proteína-proteína en el control de la apoptosis (Elmore, 2007): i) Bax podría funcionar como una molécula inductora de muerte celular que es neutralizada por Bcl-2; ii) Bcl-2 podría funcionar como un represor de muerte celular que es neutralizado, por competencia, con una molécula inerte de Bax o iii) Bcl-2 podría tener una función bioquímica totalmente opuesta a la acción de Bax.

- **Bcl-X:** Los transcritos del gen Bcl-X pueden originar dos productos: una forma larga (L) y otra corta (S). La proteína producida por la forma larga, Bcl-XL tiene un 47% de homología con Bcl-2 y una distribución celular similar a ésta, lo que sugiere que ambas proteínas funcionan de una manera similar. Por el contrario, el producto derivado de la forma corta, Bcl-XS, antagoniza la acción de los dos anteriores y es proapoptótico (Boise et al., 1993).

- **Bak:** La proteína Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/ killer*) aumenta la tasa de apoptosis inducida por la privación de los factores de crecimiento de fibroblastos, neuronas y células linfoides murinas, lo que sugiere que funciona principalmente como un promotor de apoptosis (Chittenden et al., 1995). Bak se expresa ampliamente en epitelios complejos, incluyendo nasofaringe, esófago, colon y vejiga, en los cuales tiene un papel proapoptótico.

- **Mcl-1:** El producto del gen Mcl-1 (*Mieloid cell leukemia-1*), descubierto en células de la leucemia mieloblástica, funciona de manera similar a Bcl-2 bloqueando la apoptosis en células hematopoyéticas diferenciadas. Este gen codifica una proteína de 37 kDa que posee una homología significativa con Bcl-2, pero al contrario de ésta su expresión es mayor en las células más diferenciadas de la epidermis, intestino, colon, próstata,

nasofaringe y vía aérea superior. Por tanto, es posible que ambos desempeñen funciones diferentes en la regulación *in vivo* de la apoptosis (Krajewski et al., 1995).

Los miembros de la familia pueden formar homo o heterodímeros, antagonizando o potenciando sus funciones; de esta forma, la proporción entre inhibidores y activadores existente en la célula puede determinar el destino de la misma (Kanzler y Galle, 2000). Por ejemplo, cuando Bax forma un homodímero aumenta la sensibilidad de las células ante el estímulo apoptótico, sin embargo, si forma heterodímeros con proteínas antiapoptóticas actúa protegiendo a la célula de la apoptosis. Por otro lado, Bad puede formar heterodímeros con las moléculas antiapoptóticas, permitiendo a Bax aumentar su función proapoptótica (Yin et al., 1997). Pese a todo, las proteínas de esta familia del grupo Mtd tienen un impacto citotóxico e incluso ante la presencia de inhibidores de caspasas las proteínas Bax o Bax-like conducen a la muerte celular, por aumento de la permeabilidad mitocondrial, formando canales iónicos en su membrana y facilitando así la liberación de los factores mitocondriales apoptogénicos (Elmore, 2007).

2.9.3. Activación de factores de transcripción antiapoptóticos

Los factores de transcripción son proteínas reguladoras que se unen a lugares específicos del ADN y modulan la expresión de genes. Existen factores de transcripción proapoptóticos y antiapoptóticos que activan o reprimen la transcripción de genes implicados en la apoptosis:

- **Gen supresor tumoral p53:** El gen p53 es un regulador fundamental en el normal crecimiento y la homeostasis de las células y tejidos (Lane, 1992). Se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17 p13) en humanos y está constituido por 11 exones dentro de un dominio cromosómico de 20Kb. En condiciones normales actúa como

“guardián del genoma” ya que previene la proliferación de células que presentan su ADN dañado. Esta función es realizada por la proteína p53, una fosfoproteína nuclear de 53 kDa, constituida por 393 aminoácidos. Contiene tres dominios con funciones diferentes: la región N-terminal controla la transactivación transcripcional, mientras que la región C-terminal controla la oligomerización, modulando la unión de los tetrámeros al ADN (Kern et al., 1991). Además, dentro de la región C-terminal, existe otra zona adicional que regula el cambio de la forma latente a la forma activa de la proteína, permitiendo así su unión con secuencias específicas (Jayaraman y Prives, 1995). Por último, el dominio central es la región por la que se une la proteína como tetrámero, a las secuencias dianas de los genes en el ADN. Esta zona, muy conservada entre las especies, es el sitio donde se encuentran la mayoría de las mutaciones en tumores humanos (Prives y Hall, 1999). Dichas mutaciones interfieren con el plegamiento tridimensional de la proteína y por lo tanto, con la interacción con el ADN, evitando así la activación transcripcional de genes diana (Vogelstein y Kinzler, 1992).

El p53 ejerce un papel crucial en la inducción de la apoptosis en respuesta a un daño en el ADN. Si el daño es extenso e irreparable entonces el p53 activa los mecanismos de apoptosis, para evitar la proliferación de células que han sufrido la mutación (Evan y Littlewood, 1998). La proteína p53 activa en forma directa la transcripción de los genes que codifican para las proteínas Bax, NOXA y p53AIP1 y sus proteínas a nivel mitocondrial poseen una acción inductora de la apoptosis (Oda et al., 2000). Entre otros mediadores de la apoptosis inducida por p53 encontramos proteínas similares a los receptores de apoptosis TNF y Fas, como la PIDD (Lin et al., 2000). La proteína p53 también puede actuar directamente sobre la mitocondria, produciendo un exceso de tóxicos con potencial redox, sin inducir la translocación de Bax.

- **Factores de crecimiento:** Los factores de crecimiento evitan la apoptosis ya que la activación de sus receptores activa a la quinasa Akt que, a su vez, fosforila la proteína proapoptótica Bad. El Bad fosforilado permanece inactivo en el citosol y no interfiere con las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Brunet et al., 1999).
- **Receptores apoptóticos:** Los receptores TNFR1 y TNFR2 son capaces de activar factores transcripcionales que favorecen la supervivencia celular, siendo el más importante el NF- κ B. El dominio citosólico del receptor TNFR activado se une a una familia de proteínas citosólicas que activan al gen NF- κ B que favorece la producción de moléculas antiapoptóticas, inhibiendo la activación de la procaspasa 9 (Baker y Reddy, 1998).
- **Proteínas myc y ras:** El gen c-myc es un elemento importante en el control de la proliferación celular. La sobreexpresión de c-myc puede inducir tanto proliferación como apoptosis (Amati et al., 1993) y la decisión celular entre estas dos respuestas está determinada por señales externas; por ejemplo, en ausencia de factores de crecimiento, oxígeno o ante determinados factores citotóxicos, c-myc podría secuestrar un hipotético factor proapoptótico conocido como Saf (*supressor of apoptosis by Fas*) favoreciendo así la apoptosis (Green, 1997; Green, 1998a). Además es capaz de activar la vía apoptótica de p53 (Green, 1998b; Green, 2000). Por lo tanto, el efecto de c-myc, como el de p53, está en función del tipo celular y de estímulos específicos y no es necesario para todas las formas de apoptosis. La inducción de la apoptosis por ras es independiente de p53 y se produce mediante la activación de factores de transcripción específicos (c-Jun) que pueden ser suprimidos, a su vez, por la activación del NF- κ B (Mayo et al., 1997).

2.9.4. Inhibición de las caspasas

Las caspasas son las únicas proteasas que no se encuentran compartimentalizadas dentro de la célula; debido a sus efectos catastróficos sobre el microambiente celular es crucial que la activación y la actividad de las caspasas estén estrechamente reguladas. Este proceso está controlado por varios mecanismos, como la localización subcelular, la regulación de los niveles de procaspasas (por ejemplo el factor de transcripción Stat1 regula la expresión de las procaspasas-1, -2 y -3) o, más probablemente, por la actividad de una familia de inhibidores de las caspasas: los inhibidores de las proteínas apoptóticas (IAP) (Richter y Duckett, 2000).

Las IAPs se identificaron por primera vez en baculovirus y con posterioridad se observó que constituyen un grupo de proteínas evolutivamente muy conservadas entre múltiples especies (Holcik et al., 2001). Presentan dos dominios importantes: el BIR (*Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*) y el RING Zn “finger”, implicados en la interacción con el ADN. La expresión de las cIAPs 1 y 2 está regulada por el factor de transcripción NF- κ B y su función es inhibir la activación de la procaspasa-9. Otras IAPs, como la XIAP y la survivina, inhiben la activación de las procaspasas-3, -7 y -9. Además de bloquear la activación de las caspasas, esta familia de proteínas IAP puede tener un papel en la eliminación de las caspasas vía su ubiquitinización y degradación mediada por el proteosoma (Huang et al., 2000).

La regulación de las caspasas por la familia de proteínas IAP se ve complicada por una interesante observación en *Drosophila melanogaster* donde siete únicas caspasas y al menos dos IAPs, DIAP1 y DIAP2, han sido identificadas (Doumanis et al., 2001). En este sistema se ha visto que una de las dos caspasas identificadas (STRICA) está fuertemente asociada a DIAP2, lo que sugiere una única función celular para esta caspasa y este complejo. Este tipo de asociación inusual también se ha

observado de una forma ligeramente diferente en otra proteína, survivina, que parece funcionar como una proteína antiapoptótica. La survivina es una proteína nuclear que se expresa en el límite G2/ M donde controla la citoquinesis. En el núcleo esta proteína se asocia con caspasa-3 y p21WAF1/CIP1 (Cdk1) en los centrómeros. Tras la ruptura de este complejo trimérico se activa la caspasa-3 que rompe p21WAF1/CIP1 y otras dianas. Además, se sabe que la survivina interacciona con la caspasa-9 en el núcleo, donde existe en un estado fosforilado mantenido por p34CDK2/ciclina B. Tras la defosforilación, el complejo se disocia y la caspasa-9 es activada para iniciar la apoptosis (O'Connor et al., 2000).

Estas últimas observaciones podrían indicar que las caspasas participan no sólo en la respuesta apoptótica sino que además estarían directamente implicadas en la regulación del ciclo celular (Los et al., 2001).

2.10. Mecanismos amplificadores de la apoptosis

Cuando una célula entra en apoptosis se produce una amplificación local y propagación del estímulo apoptótico a las células vecinas. Los mecanismos por los que las células vecinas podrían verse afectadas parecen implicar la vía de la quinasa Akt: si faltan factores de crecimiento la citada vía deja de funcionar y el factor FKHR-1 sin fosforilar se transloca al núcleo activando la transcripción de factores proapoptóticos como Bax, TNF y FasL (Earnshaw, 1999).

Otra vía implica a la proteína proapoptótica Bid, que actúa creando un circuito amplificador entre la vía Fas y la mitocondrial. La activación de la procaspasa-8 transloca Bid hasta la mitocondria, donde libera el cocktail de factores letales como el citocromo c, que amplifica la señal apoptótica utilizando la vía mitocondrial (Chou et al., 1999).

3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1. Modelo experimental

Los procedimientos con animales de experimentación fueron realizados, de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals - National Research Council, 1996*).

Para esta experiencia se utilizaron ratones machos adultos, de 8 semanas de edad, de la cepa Balb/c provenientes del Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Los animales fueron mantenidos con un ciclo de luz-oscuridad controlado (luces encendidas entre las 6:00 y las 20:00 hs), y a una temperatura de 20-22 °C con libre acceso a agua y alimento balanceado comercial. Inicialmente se constituyeron 3 grupos experimentales:

Grupo C: Grupo control, al que se le aplicó en la región dorsal solución fisiológica *pour-on*.

Grupo E1: Grupo tratado *pour-on* con una solución comercial de cipermetrina al 5% (dosis: 32 mg/kg).

Grupo E2: Grupo tratado *pour-on* con cipermetrina al 5% en solución fisiológica (dosis: 32 mg/kg).

Cada grupo se constituyó por 30 animales. Los cuales recibieron 5 tratamientos consecutivos a intervalos de 15 días, y se sacrificaron 6 animales de cada grupo, luego de 4 días de cada aplicación. Los diferentes tratamientos se aplicaron según un esquema propuesto por Inayat et al. (2007) con algunas modificaciones: día 0, día 15, día 30, día 45 y día 60; mientras que los sacrificios se realizaron al día 4, 19, 34, 49 y 64 post tratamiento. Como sitio de aplicación se seleccionó el área de piel comprendida entre las escápulas.

3.2. Cálculo de la dosis aplicada

La dosis de aplicación para las soluciones de cipermetrina empleadas, se obtuvo tomando como base la dosis utilizada en bovinos (165 mg/100 kg) para aplicación *pour on* recomendada por los fabricantes, la que fue extrapolada a ratones en base al cálculo de una dosis equivalente según la superficie corporal.

Para ello se consideraron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Calculo del área corporal en bovinos: } m^2 = 0,13 P^{0.556}$$

P= peso corporal

Aplicando la ecuación anterior, cada 100 kg hay 1,68 m² de superficie corporal, por lo que la dosis sería equivalente a 98,21 mg/m² (165 mg / 1,68 m² = 98,21 mg/m²).

Para extrapolar la dosis en ratones, se utilizó la siguiente fórmula (Reagan-Shaw et al., 2007):

$$\text{Dosis en mg/kg} = \text{a dosis en mg/ m}^2 / 3$$

En consecuencia, la dosis aproximada utilizada en ratones fue de **32 mg/kg** (98,21 mg/m² / 3 = 32 mg/kg). La misma está alejada de la dosis letal 50 (DL50) aguda de 1600 mg/kg de peso corporal en administración cutánea (Tomnlin, 2000).

3.3. Toma y procesamiento de las muestras de piel

Para obtener las muestras destinadas a los estudios histológicos, los animales fueron anestesiados y sacrificados por exanguinación. Antes de la toma de muestras de piel, los animales fueron sometidos a un examen macroscópico minucioso a los fines de

caracterizar los cambios que pudieran suscitarse. Luego de rasurar la zona tratada, se tomaron muestras de piel de aproximadamente 1 cm², se disecaron e inmediatamente se fijaron en formol bufferado al 4% durante 12 hs a temperatura ambiente. Para su procesamiento histológico, las muestras fueron lavadas con agua corriente y buffer fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,2, luego se deshidrataron en concentraciones graduales crecientes de alcohol etílico, se aclararon en xilol y se incluyeron en parafina siguiendo protocolos de rutina (Woods and Ellis, 1994). Posteriormente, se realizaron cortes seriados de aproximadamente 4 µm de espesor en un micrótomo rotativo manual y se los dispuso sobre portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Por último, los cortes fueron secados a 37°C durante 24 hs y se almacenaron a 4°C hasta su utilización en técnicas histológicas e inmunohistoquímicas (IHQ). Para realizar una caracterización inicial y evidenciar la morfología general de la piel se utilizó la coloración de hematoxilina-eosina.

3.4. Inmunohistoquímica

En la tabla 2 se detallan los anticuerpos utilizados y las concentraciones de uso para cada uno. Para todos los antígenos se utilizó el método streptavidina-biotina-peroxidasa según descripciones previas (Dallard et al., 2011), con algunas variantes específicas en el procedimiento según el anticuerpo utilizado. Brevemente, las secciones de tejido fueron desparafinadas, hidratadas y tratadas con recuperación antigénica o no, dependiendo del anticuerpo primario utilizado. La actividad de la enzima peroxidasa endógena fue inactivada con 1% de H₂O₂ y las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con suero normal de cabra al 10%. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo

primario 18 hs a 4°C y posteriormente lavadas con PBS. Luego fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado por 30 minutos a temperatura ambiente (TA), seleccionado específicamente de acuerdo a los dos tipos de anticuerpos primarios utilizados (monoclonal o policlonal). Ambos anticuerpos se diluyeron en PBS-BSA al 1% (ANEXO, 169). La visualización del antígeno se realizó por el método streptavidina-peroxidasa (BioGenex, San Ramón, CA) utilizándose como cromógeno 3,3-diaminobencidina (DAB) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Por último, los cortes fueron lavados en agua destilada, contracolorados con hematoxilina (Biopur, Bubendorf, Suiza), deshidratados y montados.

3.4.1. Procedimiento general

1. Colocar los cortes 10 minutos en la estufa a 60°C
2. Xilol A (Desparafinar), 15 minutos.
3. Xilol B (Desparafinar), 10 minutos.
4. Alcohol 100 A (Hidratar), 2 minutos.
5. Alcohol 100 B (Hidratar), 2 minutos.
6. Alcohol 96 (Hidratar), 2 minutos.
7. Alcohol 70 (Hidratar), 2 minutos.
8. Lavar en PBS, 5 minutos (ANEXO, 169).
9. Recuperación antigénica^a.
10. Lavar en PBS 5 minutos.
11. Inactivación de la peroxidasa endógena. Solución de H₂O₂^b en metanol durante 20 minutos (10+10).
12. Lavar en PBS 5 minutos.
13. Secar los cortes y cubrirlos con Solución de Bloqueo^c durante 15 minutos.
14. Escurrir el exceso de solución y sin lavar cubrir con el anticuerpo primario, de acuerdo al procedimiento correspondiente.
15. Lavar en PBS (2 lavados de 5 minutos cada uno).
16. Secar los cortes y cubrirlos con el anticuerpo secundario biotinilado (de acuerdo al procedimiento correspondiente) durante 30 minutos.
17. Lavar en PBS (2 lavados de 5 minutos cada uno).
18. Secar los cortes y cubrirlos con la estreptavidina-peroxidasa, 30 minutos.
19. Lavar en PBS (2 lavados de 5 minutos cada uno).
20. Secar y cubrir con la solución de cromógeno (DAB) 1 a 10 minutos (Según el Ac. Primario, ajustar en microscopio).
21. Lavar en agua destilada (2 lavados de 5 minutos cada uno).
22. Hematoxilina BIOPUR[®] Diluida 1:2 en Agua destilada, 5 a 30 segundos.
23. Lavar en agua destilada
24. Virar en agua corriente.
25. Alcohol 70°, 3 minutos.

26. Alcohol 96°, 3 minutos.
27. Alcohol 100° (A), 3 minutos.
28. Alcohol 100° (B), 3 minutos.
29. Xilol (A), 5 minutos.
30. Xilol (B), 5 minutos.
31. Montar

^aRecuperación antigénica:

En la tabla 2 se especifica el método de recuperación antigénica empleado para cada anticuerpo primario.

- *En microondas:*

- a) Llenar el coplin con buffer citrato 0,01M pH 6.0 (ANEXO, página 169)
- b) Colocar los preparados en el buffer citrato, tapar (tapa perforada) y calentar 3 minutos al 100%.
- c) Calentar 12 minutos al 40%.
- d) Dejar enfriar 20 minutos.

- *Con Buffer EDTA en baño María:*

- a) Precalear el coplin conteniendo el Buffer EDTA (ANEXO, página 169) hasta 90-100°C.
- b) Colocar los preparados en el Buffer EDTA, tapar (tapa perforada) y mantener a temperatura durante 30 minutos.
- c) Dejar enfriar 20 minutos.

^bSolución de H₂O₂:

Se incuban las muestras en H₂O₂ al 10% en metanol. A los 10 minutos agrega 10% de volumen de H₂O₂ adicional y se incuba 10 minutos.

^cSolución de Bloqueo:

ANEXO (Página 169).

3.4.2. Controles de la técnica

Para verificar la especificidad de la técnica utilizada se realizaron diferentes controles:

Como controles negativos, por un lado se reemplazó el anticuerpo primario por suero normal de cabra al 10% y por el otro, se omitió el anticuerpo secundario biotinilado. Para excluir la posibilidad de la no supresión de la actividad de la peroxidasa endógena, algunas secciones fueron incubadas con el reactivo DAB solo.

Tabla 2: Procedencia y condiciones de uso de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

	Origen	Dilución	Recuperación antigénica (RA)	Incubación	Procedencia
<i>Anticuerpos primarios</i>					
Bcl-2 (ab7973); policlonal	Rabbit	1:100	Microondas	18 hs 4°C	Abcam
Bax (PU347-UP); policlonal	Rabbit	1:30	Microondas	18 hs 4°C	BioGenex
Caspasa-3 activa (AF835); policlonal	Rabbit	1:400	Baño María con EDTA	18 hs 4°C	R&D Systems
PCNA (clon PC-10); monoclonal	Ratón	1:100	Microondas	18 hs 4°C	Novocastra
<i>Anticuerpos secundarios</i>					
Anti-conejo IgG (65-6140)	Cabra	1:200		30 min a TA	L.E.T.H
Anti-ratón IgG (AP181B)	Cabra	1:50		30 min a TA	L.E.T.H.

3.5. Análisis digital de imágenes

El análisis de las imágenes obtenidas de los cortes histológicos se realizó mediante el programa Image Pro-Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA). Las imágenes fueron digitalizadas con una cámara de video color CCD Moticam 2000 (Mikron Instrument Inc., California, USA) montada en un microscopio convencional Olympus CX31, (Olympus Co., Japón) utilizando objetivos de 10X y 40X. Se digitalizaron campos microscópicos que cubrieron toda el área a analizar y se almacenaron bajo el formato TIFF con una definición de 1200 x 1600 píxeles y 24 bits de color. La resolución de las imágenes fue fijada en 640 x 480 píxeles. A la magnificación usada, cada píxel de la imagen correspondía a 0,13 μm , y cada campo representaba un área de tejido de 0,032 mm^2 .

Cuantificación de las proteínas relacionadas con la apoptosis

La inmunomarcación de bcl-2, bax y caspasa-3 activa se cuantificó mediante análisis digital de imágenes. Los detalles metodológicos del mismo, como un método

validado para cuantificar niveles de expresión, fueron previamente descriptos (Dallard et al., 2010; Dallard et al., 2011; Rey et al., 2010). Brevemente, el área marcada por IHQ por la reacción del anticuerpo, fue calculada como porcentaje del área total evaluada a través de análisis de segmentación de colores, localizando todos los objetos de color específico (marcación marrón). La marcación marrón fue seleccionada con una sensibilidad de 4 (máximo 5) y luego se aplicó una máscara para separar los colores de forma permanente. El porcentaje de área inmunomarcada (máscara negra) fue calculado para al menos 50 imágenes de la epidermis obtenidas a partir de las preparaciones histológicas.

Evaluación y cuantificación de la proliferación celular

La proliferación celular se evaluó a través de la expresión de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). El PCNA es una proteína de 36 kDa altamente conservada entre especies que funciona como un cofactor de la ADN polimerasa- δ , tanto en la fase S del ciclo celular como así también en la síntesis de ADN, asociado con los mecanismos de reparación del daño del mismo. La expresión de PCNA se evaluó por IHQ utilizando un anticuerpo monoclonal específico (Tabla 2).

Todas las células inmunomarcadas para PCNA se consideraron positivas. Éstas presentaron reacción nuclear positiva con alta heterogeneidad en la intensidad de la tinción. Por ello, mediante el análisis de las imágenes almacenadas, se establecieron tres rangos de intensidad: débil (+), moderado (++) e intenso (+++). Se contaron en cada preparado, como mínimo 2000 células epiteliales en 40X en un mínimo de 20 campos. Sólo se cuantificaron las que mostraron la tinción nuclear más intensa (PCNA +++) y el resultado se expresó como porcentaje de estas células intensamente marcadas.

Evaluación morfométrica

Para la evaluación morfométrica se digitalizaron 40 imágenes al azar utilizando el objetivo de 40X, de los diferentes grupos experimentales, coloreados con hematoxilina-eosina (Biopur, Bubendorf, Suiza). Se calculó el espesor en μm del estrato medio-basal y del estrato córneo. El espesor de la epidermis se calculó sumando el espesor del estrato medio-basal y el estrato córneo.

3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron test estadísticos paramétricos, convenientemente seleccionados de acuerdo con Spiegel (1991) y Norman y Streiner (1996). Los parámetros cuantificados fueron:

Media y desvío estándar (DS). La tendencia central se expresó por medio de la media (\bar{X}) y la dispersión por el desvío estándar (DS).

Análisis de la varianza de una vía (ANOVA). El análisis de varianza se realizó para determinar la existencia de diferencias significativas entre las medias de los grupos estudiados en los diferentes tiempos post tratamiento.

Previo al ANOVA, a los fines de detectar la homogeneidad de las varianzas se realizaron los siguientes test: Cochran, Bartlett y Hartley. Para identificar cuáles medias difirieron significativamente entre sí, se realizó un post test de rangos múltiples. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics Plus 5.1. El nivel de significancia se fijó en $p < 0.05$.

Con el propósito de mostrar los efectos de los tratamientos aplicados y el tiempo, se aplicó un modelo lineal general (*General Linear Model: GLM*) contenido en el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1. Para ello se contempló un modelo de primer

orden con respecto al tiempo que contiene la interacción entre el tiempo y el tipo de tratamiento aplicado según la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 * t_i + \beta_{1,1} t * T_1 + \beta_{1,2} t * T_2 + e_{ij}$$

Y = Variable respuesta o dependiente.

β_0 = Intercepto u ordenada de origen.

β_1 = Pendiente, t_i = tiempo (i= 4, 14, 34, 49, 64 días).

β_2 = Corrección en la pendiente debido a los tratamientos.

T = tratamiento, en términos de variable Dummy. Control : $T_1=0$ y $T_2=0$; Cipermetrina comercial : $T_1=1$ y $T_2=0$ y Cipermetrina 5% : $T_1=0$ y $T_2=1$.

e_{ij} = Error residual del modelo.

3.7. Normas éticas y de bioseguridad

Los procedimientos realizados con animales de experimentación fueron realizados, de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals - National Research Council, 1996*). Se prestó especial atención en el uso y manejo de residuos de drogas o reactivos potencialmente contaminantes.

4. RESULTADOS



4.1. Caracterización macroscópica de las lesiones post tratamiento

En los grupos de ratones que recibieron 3 dosis consecutivas de cipermetrina comercial (5%), cipermetrina al 5% y solución fisiológica (grupo control) no se observaron cambios macroscópicos en la piel. Luego de la cuarta y quinta aplicación de cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina al 5% se observaron áreas alopécicas enrojecidas y escaras en el sitio de aplicación. En los grupos control, tratados con solución fisiológica, no se observaron cambios macroscópicos en el área de aplicación.

Por otra parte, no se observó ningún tipo de comportamiento anormal en ninguno de los grupos evaluados.

4.2. Caracterización microscópica de las lesiones post tratamiento

En los grupos de ratones que recibieron 3 dosis consecutivas de cipermetrina comercial (5%), cipermetrina al 5% y solución fisiológica (grupo control) no se observaron cambios microscópicos en la epidermis y dermis (Fig. 13 y 14). Luego de la cuarta y quinta aplicación de cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina al 5% se observó una hiperplasia pronunciada del estrato medio-basal con visualización de figuras mitóticas e hiperqueratosis (Fig.15 y 16). En la dermis se observó, hiperemia, abundante infiltrado de eosinófilos perianexiales, edema, dilatación de vasos linfáticos y colagenólisis (Fig. 17).

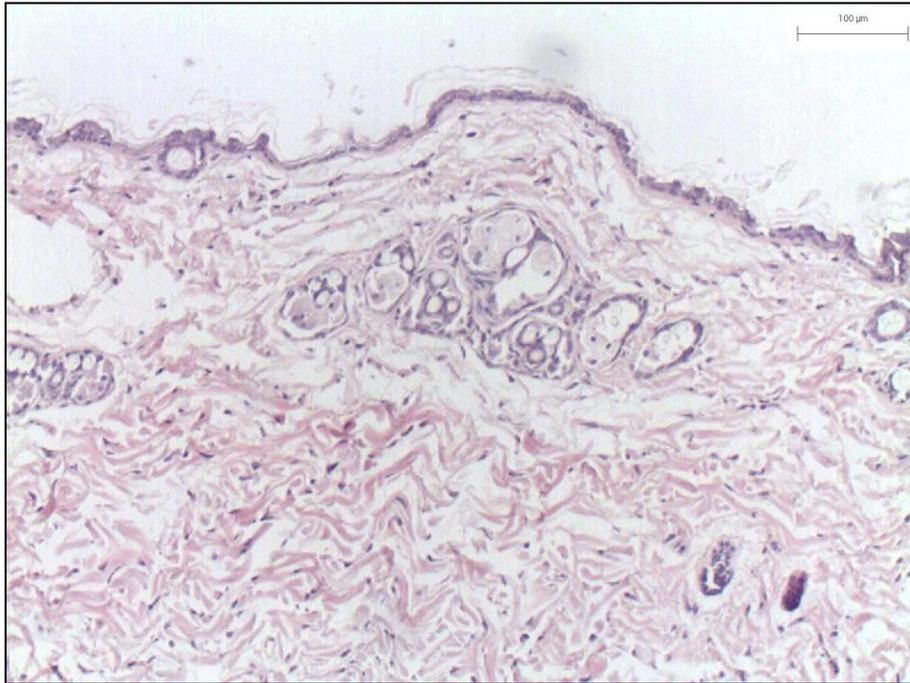


Figura 13: Imagen microscópica de piel de ratones del grupo control tratado con solución fisiológica a los 64 días post tratamiento. Coloración: hematoxilina-eosina. X100.

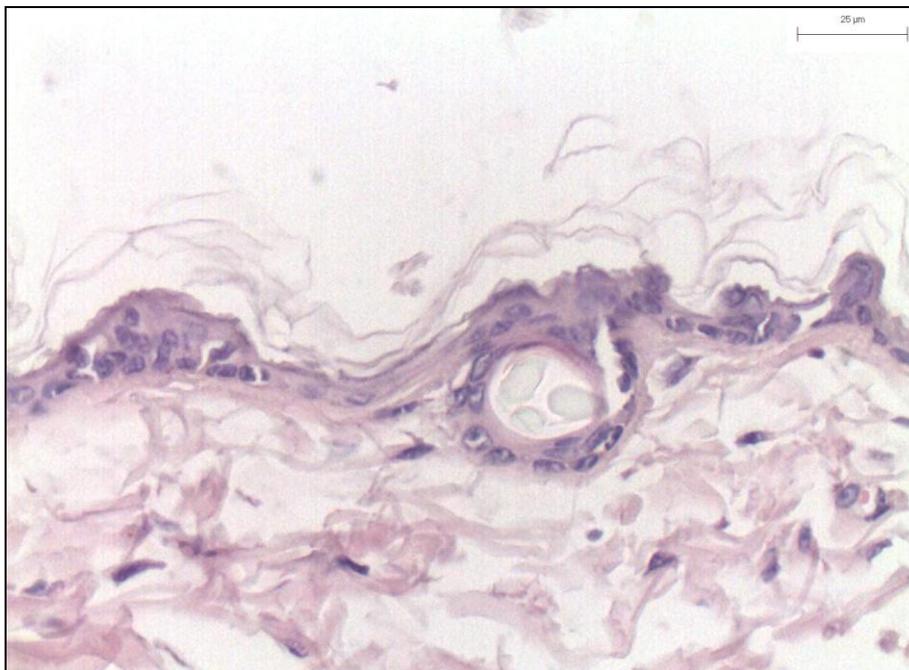


Figura 14: Imagen microscópica de piel de ratones del grupo control tratado con solución fisiológica a los 64 días post tratamiento. Coloración: hematoxilina-eosina. X400.

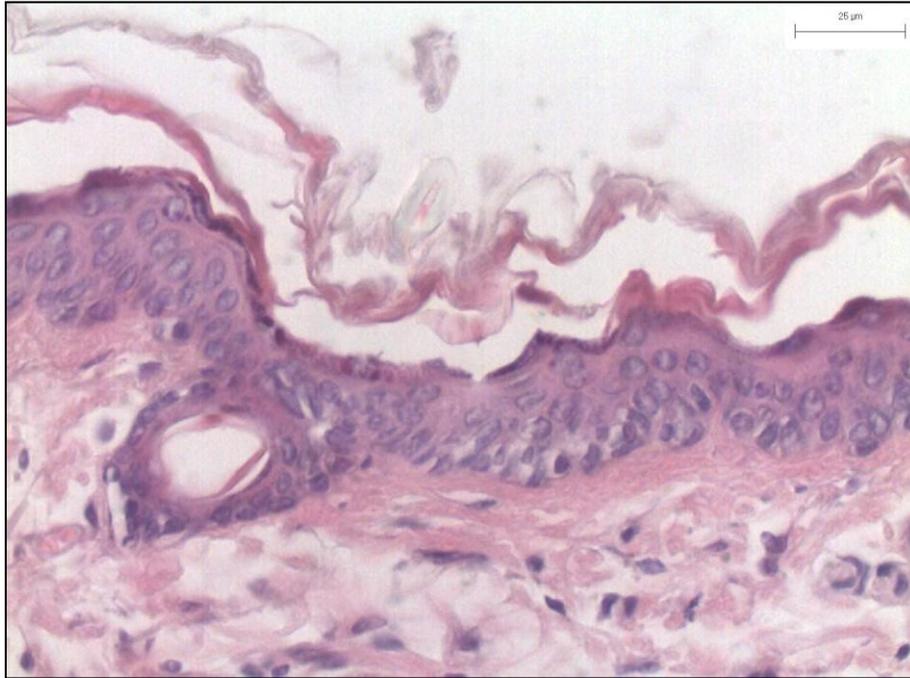


Figura 15: Imagen microscópica de piel de ratones del grupo tratado con cipermetrina comercial (5%) a los 64 días post tratamiento. Coloración: hematoxilina-eosina. X400.

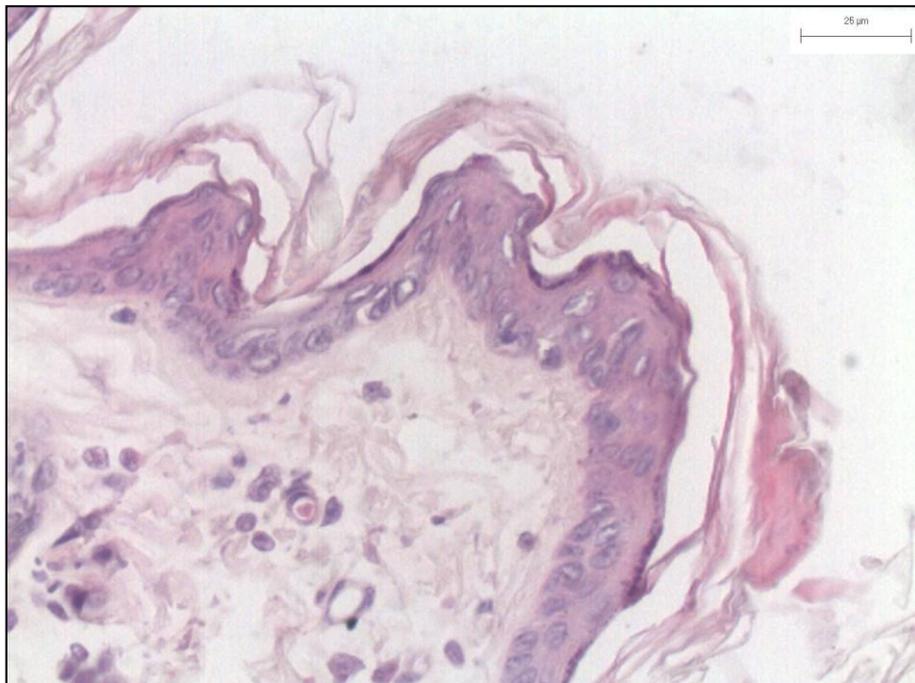


Figura 16: Imagen microscópica de piel de ratones del grupo tratado cipermetrina al 5% a los 64 días post tratamiento. Coloración: hematoxilina-eosina. X400.

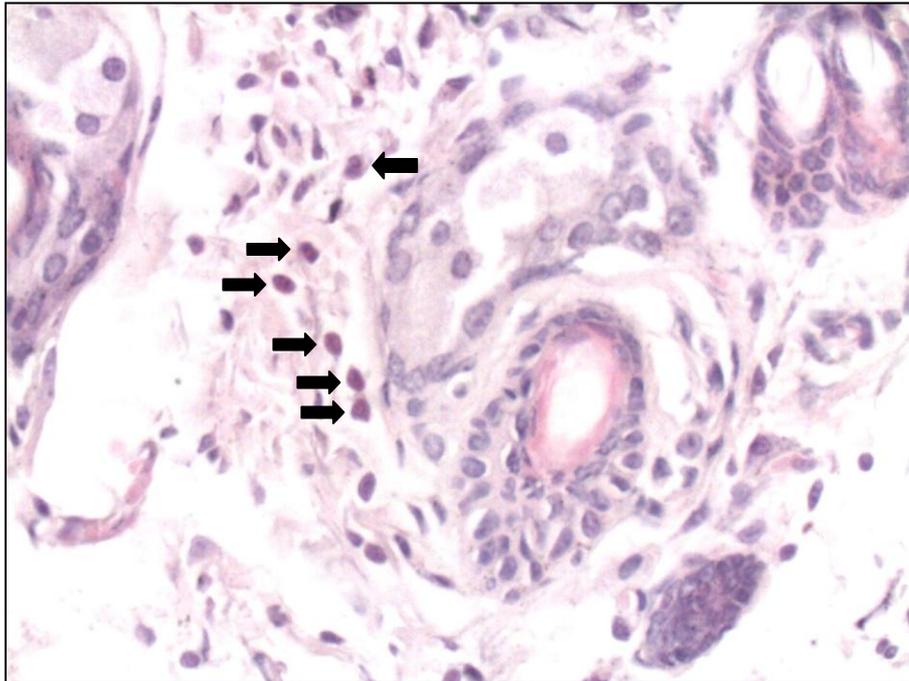


Figura 17: Imagen microscópica de piel de ratones del grupo tratado cipermetrina al 5% a los 64 días post tratamiento. Las flechas indican eosinófilos perianexiales coloreados con hematoxilina-eosina. X400.

4.3. Morfometría de la epidermis

4.3.1. Estrato medio-basal

Las medias en μm del espesor del estrato medio-basal de la epidermis para los tres tratamientos se observan en la tabla 3.

Al día 4 y 19 post tratamiento (pt), el espesor del estrato medio-basal de la epidermis fue significativamente mayor en ratones tratados con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina al 5% con respecto a los controles ($p < 0,05$). Al día 34 pt, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos administrados hallándose valores mayores en el grupo tratado con cipermetrina al 5% ($p < 0,05$). Luego de la cuarta y quinta aplicación (días 49 y 64 pt) el espesor del estrato medio-basal fue significativamente mayor en los grupos de ratones tratados con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina al 5% con respecto a los controles ($p < 0,05$).

Tabla 3: Medias del espesor del estrato medio-basal, del estrato córneo y de la epidermis (μm) en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial (5%), cipermetrina (5%) y en controles hasta el día 64 post tratamiento.

	Control	Cipermetrina comercial (5%)	Cipermetrina (5%)
Estrato medio-basal			
Día 4	7,96 ^a (0,98)	12,55 ^b (1,08)	11,62 ^b (1,55)
Día 19	10,01 ^a (0,69)	11,69 ^b (0,85)	12,05 ^b (0,93)
Día 34	8,31 ^a (1,26)	13,92 ^b (0,88)	18,24 ^c (0,86)
Día 49	10,05 ^a (1,70)	23,22 ^b (1,57)	22,71 ^b (0,65)
Día 64	9,31 ^a (1,61)	22,98 ^b (1,36)	24,20 ^b (1,24)
Estrato córneo			
Día 4	6,79 ^a (1,41)	6,54 ^a (0,87)	8,31 ^b (0,97)
Día 19	6,61 ^a (1,16)	8,48 ^b (0,81)	8,82 ^b (0,77)
Día 34	7,11 ^a (1,77)	11,33 ^b (0,93)	10,74 ^b (1,27)
Día 49	7,64 ^a (1,37)	13,82 ^b (1,78)	11,33 ^c (1,45)
Día 64	6,33 ^a (1,02)	12,33 ^b (1,03)	11,74 ^b (1,13)
Epidermis			
Día 4	14,76 ^a (1,69)	19,09 ^b (0,99)	19,93 ^b (1,76)
Día 19	16,62 ^a (1,76)	20,17 ^b (1,33)	20,88 ^b (1,38)
Día 34	15,42 ^a (2,73)	25,22 ^b (1,73)	28,99 ^c (1,91)
Día 49	17,70 ^a (1,63)	37,05 ^b (2,13)	34,04 ^c (1,95)
Día 64	15,64 ^a (1,62)	35,32 ^b (1,53)	35,94 ^b (1,69)

Los valores representan las medias en $\mu\text{m} \pm$ desvíos estándar (DS). Diferentes letras para cada periodo de tiempo, indican diferencias significativas ($p < 0,05$). El espesor de la epidermis se calculó sumando el espesor del estrato medio-basal y el estrato córneo.

4.3.2. Estrato córneo

Las medias en μm del espesor del estrato córneo de la epidermis para los tres tratamientos se observan en la tabla 3.

Luego de la primera aplicación de los diferentes tratamientos (4 días pt) se observó un aumento significativo en el espesor del estrato córneo de la epidermis en los ratones

tratados con cipermetrina 5% con respecto a los tratados con cipermetrina comercial al 5% y en los controles ($p < 0,05$).

Al día 19 y 34 pt el espesor del estrato córneo de la epidermis fue similar entre los tratados con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina 5% pero los valores hallados fueron significativamente mayores a los de los controles ($p < 0,05$).

Al día 49 pt se observaron diferencias significativas entre los tres tratamientos administrados hallándose los mayores valores de espesor del estrato córneo en el grupo de ratones tratados con cipermetrina comercial (5%) ($p < 0,05$).

Luego de la quinta aplicación de los diferentes tratamientos (día 64 pt), se observó un aumento significativo en el espesor del estrato córneo de la epidermis en el grupo de ratones tratados con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina al 5% con respecto al grupo control ($p < 0,05$).

4.3.3. Epidermis

Las medias en μm del espesor de la epidermis para los tres tratamientos se observan en la tabla 3.

Al día 4 y 19 pt, el espesor de la epidermis fue similar en el grupo de ratones tratados con cipermetrina comercial (5%) y en el grupo tratado con cipermetrina 5% pero los valores promedios obtenidos fueron significativamente mayores a los hallados en el grupo control ($p < 0,05$). Al día 34 y 49 pt, el espesor de la epidermis fue significativamente mayor en el grupo de ratones tratados con cipermetrina al 5% ($p < 0,05$) en relación al grupo tratado con cipermetrina comercial (5%) y al grupo control.

Luego de la quinta aplicación de los diferentes tratamientos (día 64 pt), el espesor de la epidermis fue similar entre los tratados con cipermetrina comercial (5%) y

cipermetrina 5% pero los valores hallados fueron significativamente mayores a los de los controles ($p < 0,05$).

En la Fig. 18 se observa el efecto del tiempo de inoculación sobre el espesor de la epidermis (μm) en piel de ratones.

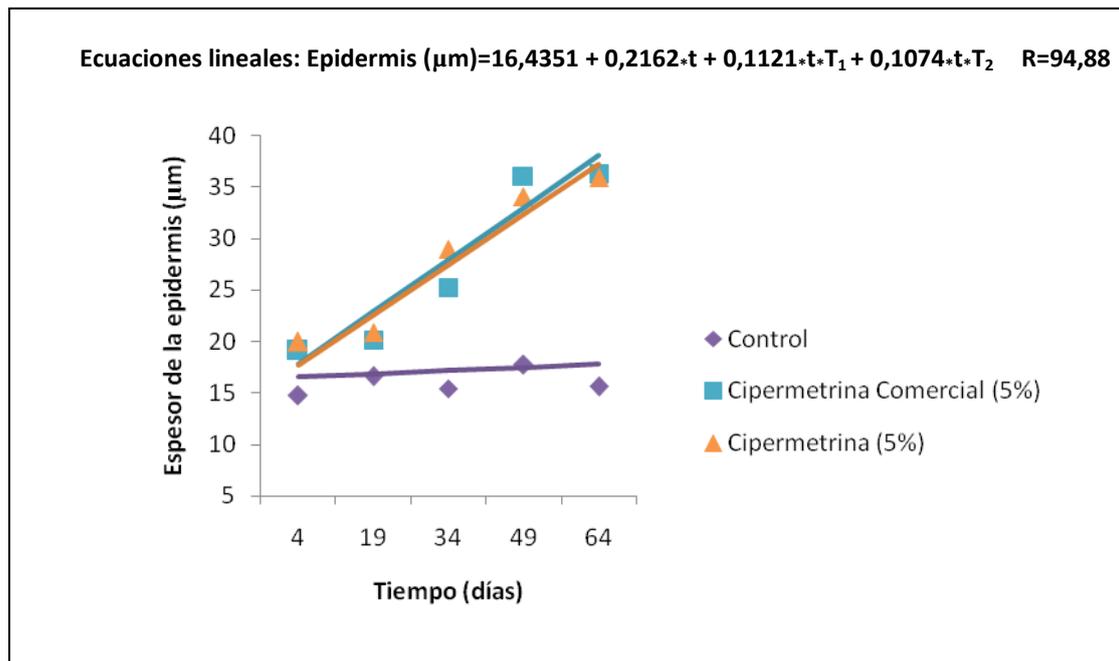


Figura 18: Ecuación matemática y gráficas obtenidas con el modelo lineal general (GLM) que expresan la evolución del espesor de la epidermis (μm) para cada grupo: control ($T_1=0$ y $T_2=0$), cipermetrina comercial al 5% ($T_1=1$ y $T_2=0$), y cipermetrina al 5% ($T_1=0$ y $T_2=1$).

Los resultados de la aplicación del GLM mostraron efectos significativos para la variable tiempo pt y para la interacción entre los tratamientos con el tiempo ($p < 0,01$). El efecto de la variable tratamiento como efecto principal no resultó significativo ($p=0,1363$) (Tabla 4). El hecho que no resulte significativo el efecto del tratamiento señala la equivalencia de los tres grupos al inicio del experimento y en la medida que transcurre el tiempo comienza a manifestarse el efecto del tratamiento.

De la Fig. 18 se desprende que el espesor de la epidermis en el grupo de ratones control aumenta levemente (pendiente 0,2162) durante el experimento, mientras que en los grupos tratados con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina (5%) se observa un

aumento significativo a lo largo del tiempo ($p < 0,01$). Además, el ajuste logrado mediante la aplicación del GLM fue muy bueno obteniéndose un coeficiente de regresión porcentual de 94,88%.

Tabla 4: Efectos del tratamiento, tiempo y su interacción sobre las variables analizadas.

Variables	Tratamiento		Tiempo		Tratamiento*Tiempo	
	Valor F	Valor P _T	Valor F	Valor P _t	Valor F	Valor P _{Tt}
Espesor de la epidermis	2,03	0,1363	321,18	0,0001	295,28	0,0001
PCNA	0,35	0,7044	98,36	0,0001	13,56	0,0001
Bcl-2	0,52	0,0598	66,85	0,0001	9,88	0,0001
Bax	3,15	0,0510	334,69	0,0001	85,95	0,0001
Caspasa-3	0,61	0,5463	167,13	0,0001	25,17	0,0001

4.4. Proliferación celular

4.4.1. Inmunomarcación para PCNA

La proliferación celular en ratones tratados con cipermetrina comercial al 5%, cipermetrina (5%) y controles se evaluó mediante la expresión de PCNA en el epitelio que tapiza la piel. Las medias de los porcentajes de células PCNA intensamente positivas (+++) para los tres tratamientos se observan en la tabla 5.

En todos los grupos evaluados, la marcación positiva intensa con PCNA estuvo restringida a los núcleos de las células epiteliales del estrato basal de la epidermis; sin embargo, también se observó reacción débil y moderada en los núcleos de las células inmediatamente superiores a este estrato.

Tabla 5: Medias de los porcentajes de células de la epidermis inmunomarcadas con PCNA en ratones tratados con cipermetrina comercial (5%), cipermetrina (5%) y en controles hasta el día 64 post tratamiento.

Tiempo post tratamiento	Control	Cipermetrina comercial (5%)	Cipermetrina 5%
Día 4	18,12 ^a ± 3,95	18,56 ^a ± 3,50	18,83 ^a ± 2,85
Día 19	16,40 ^a ± 3,33	20,38 ^a ± 2,23	18,99 ^a ± 2,71
Día 34	18,20 ^a ± 2,81	19,71 ^a ± 2,12	20,20 ^a ± 2,41
Día 49	18,66 ^a ± 2,27	28,66 ^b ± 3,08	28,26 ^b ± 2,02
Día 64	20,29 ^a ± 2,65	30,12 ^b ± 3,47	32,36 ^b ± 4,27

Los valores representan las medias de los porcentajes de células PCNA intensamente positivas a la inmunomarcación ± desvíos estándares (DS). Diferentes letras para cada periodo de tiempo, indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En los grupos de ratones que recibieron tres tratamientos consecutivos (días 4, 19 y 34 pt) no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de proliferación celular entre los diferentes tratamientos ($p > 0,05$). Luego de la cuarta y quinta aplicación (días 49 y 64 pt) las diferencias entre los tratamientos administrados fueron significativas con un mayor porcentaje de proliferación celular en el estrato basal de la epidermis de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5% y cipermetrina (5%) con respecto a los controles ($p < 0,05$). Al día 49 pt, los porcentajes promedios de células PCNA (+) para los tratados con cipermetrina comercial al 5% y cipermetrina (5%) fueron similares con valores de $28,66 \pm 3,08\%$ y $28,26 \pm 2,02\%$, respectivamente. Al día 64 pt los porcentajes de células PCNA positivas promedio fueron mayores a los hallados al día 49 con valores de $30,12 \pm 3,47\%$ para los tratados con cipermetrina comercial al 5% y $32,36 \pm 4,27\%$ para los tratados con cipermetrina (5%) (Fig. 19, 20 y 21).

En todos los periodos evaluados los porcentajes de proliferación fueron similares para la cipermetrina comercial al 5% y para la cipermetrina diluida con solución fisiológica al 5 %.

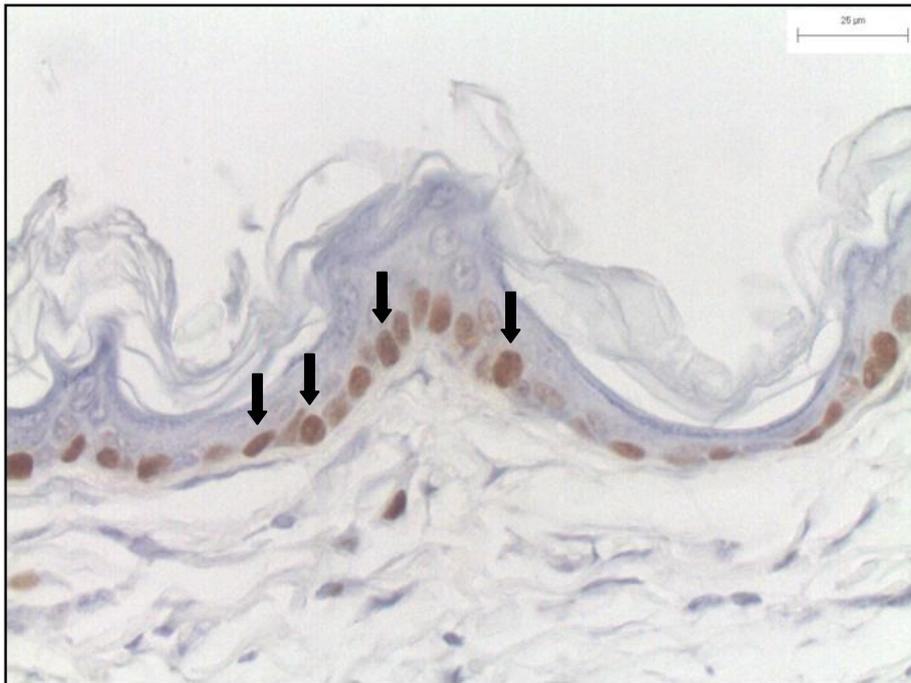


Figura 19: Inmunomarcación para PCNA en piel de ratones tratados con solución fisiológica (controles) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Las flechas indican células PCNA intensamente marcadas en el estrato basal de la epidermis. X400.



Figura 20: Inmunomarcación para PCNA en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5% luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Las flechas indican núcleos de células PCNA intensamente marcadas en el estrato basal de la epidermis. X400.

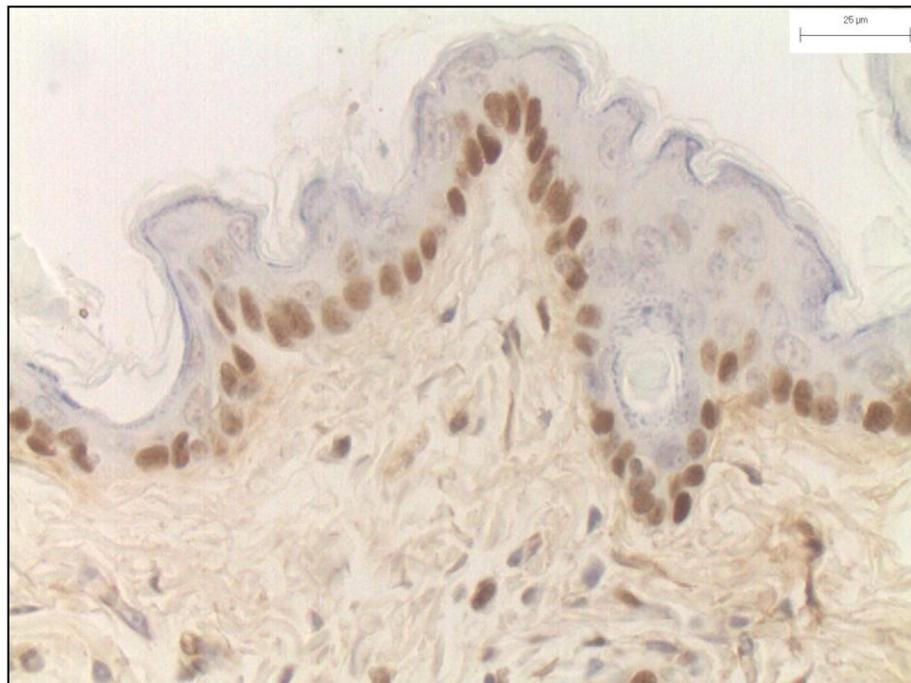


Figura 21: Inmunomarcación para PCNA en piel de ratones tratados con cipermetrina (5%) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Las flechas indican células PCNA intensamente marcadas en el estrato basal de la epidermis. X400.

En la Fig. 22 se observa el efecto del tiempo de inoculación sobre los porcentajes de proliferación celular en piel de ratones.

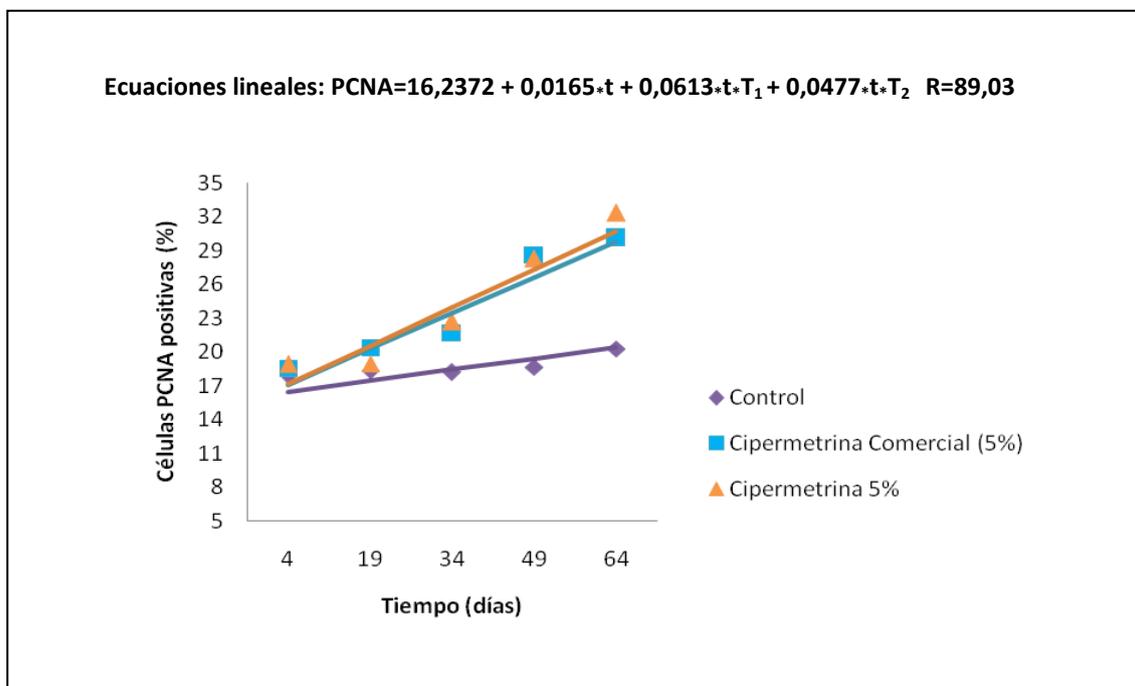


Figura 22: Ecuación matemática y gráficas obtenidas con el modelo lineal general (GLM) que expresan la evolución de los porcentajes de células PCNA positivas para cada grupo: control ($T_1=0$ y $T_2=0$), cipermetrina comercial al 5% ($T_1=1$ y $T_2=0$), y cipermetrina al 5% ($T_1=0$ y $T_2=1$).

Los resultados de la aplicación del GLM mostraron efectos significativos para la variable tiempo t y para la interacción entre los tratamientos con el tiempo ($p < 0,01$). Sin embargo el efecto de la variable tratamiento como efecto principal no resultó significativo ($p=0,7044$) (Tabla 4). El hecho que no resulte significativo el efecto del tratamiento señala la equivalencia de los tres grupos al inicio del experimento y en la medida que transcurre el tiempo comienza a ponerse de manifiesto el efecto del tratamiento.

De la Fig. 22 se desprende que los porcentajes de células PCNA (+) en el grupo control aumentaron levemente (pendiente 0,0165) durante el experimento, mientras que los porcentajes de células inmunomarcadas con PCNA en los grupos tratados con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina (5%) mostraron un aumento más acentuado

a lo largo del tiempo ($p < 0,01$). Además, el ajuste logrado mediante la aplicación del GLM fue bueno ya que el coeficiente de regresión porcentual calculado fue de 89,03%.

4.5. Caracterización de la apoptosis

4.5.1. Inmunomarcación para Bcl-2

Los efectos de los diferentes tratamientos administrados *pour-on* en piel de ratones sobre los porcentajes de áreas inmunomarcadas para Bcl-2 (proteína antiapoptótica) en la epidermis se visualizan en la tabla 6.

Tabla 6: Porcentajes de áreas inmunomarcadas para Bcl-2 en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial (5%), cipermetrina (5%) y en controles hasta el día 64 post tratamiento.

Tiempo post tratamiento	Control	Cipermetrina comercial (5%)	Cipermetrina 5%
Día 4	21,01 ^a ± 3,96	21,05 ^a ± 5,08	18,62 ^a ± 2,45
Día 19	23,76 ^a ± 3,08	19,37 ^a ± 5,27	19,80 ^a ± 5,15
Día 34	20,77 ^a ± 1,89	22,26 ^a ± 1,70	22,84 ^a ± 2,35
Día 49	19,18 ^a ± 2,31	9,61 ^b ± 2,55	11,32 ^b ± 1,76
Día 64	20,73 ^a ± 1,96	10,55 ^b ± 1,92	11,15 ^b ± 2,69

Los valores representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada para Bcl-2 ± los desvíos estándares (DS). Diferentes letras para cada periodo de tiempo, indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La expresión de la proteína Bcl-2 se evidenció en todos los grupos evaluados variando de débil a intensa. La reacción positiva se observó en el citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis (Fig. 23, 24 y 25).

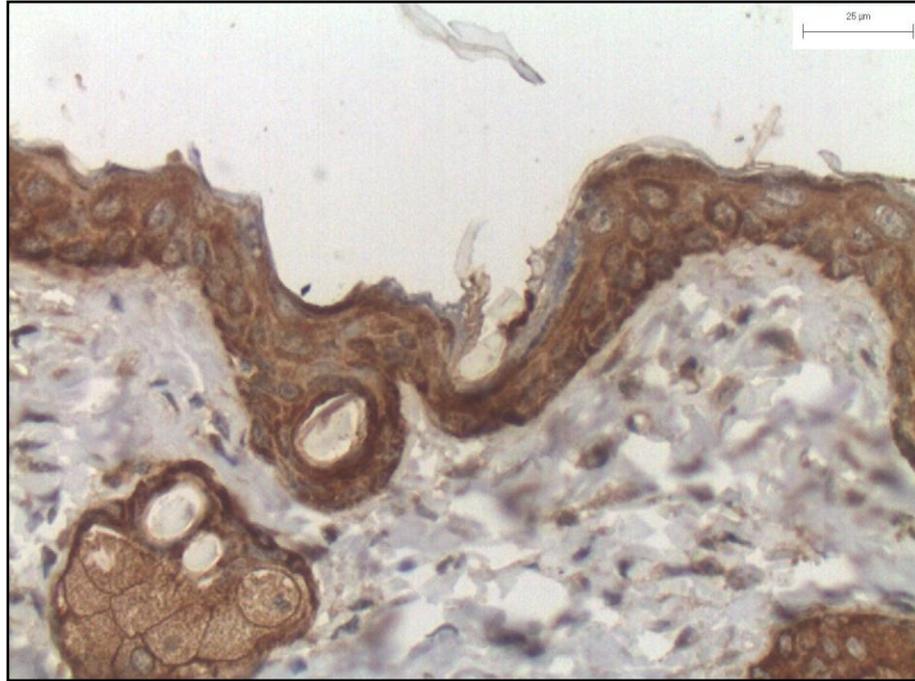


Figura 23: Inmunomarcación para Bcl-2 en piel de ratones tratados con solución fisiológica (controles) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Se observa reacción positiva (coloración marrón) en el citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis. X400.

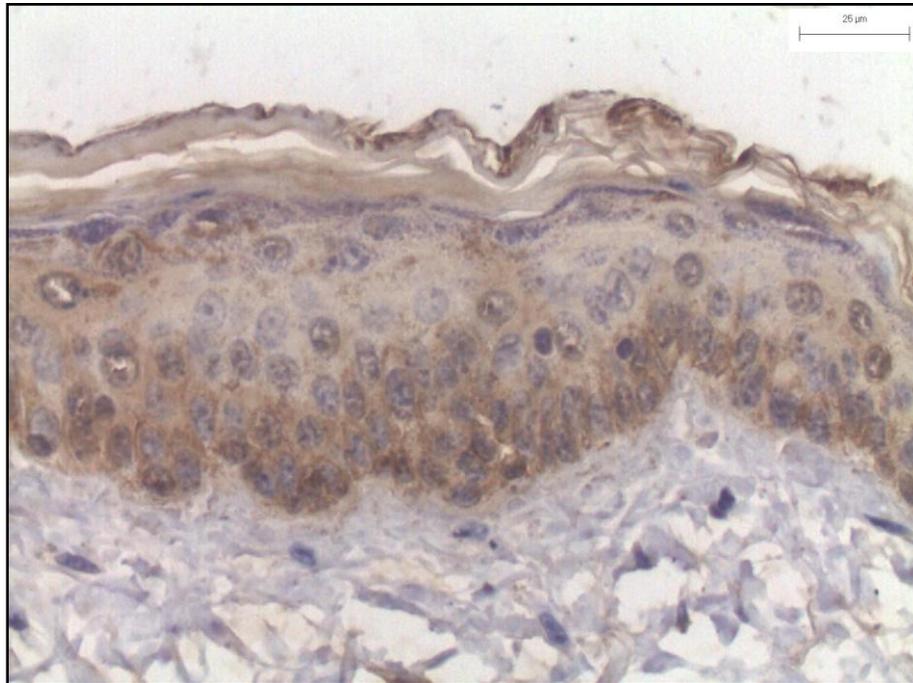


Figura 24: Inmunomarcación para Bcl-2 en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5% luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Se observa reacción positiva (coloración marrón) en el citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis. X400.

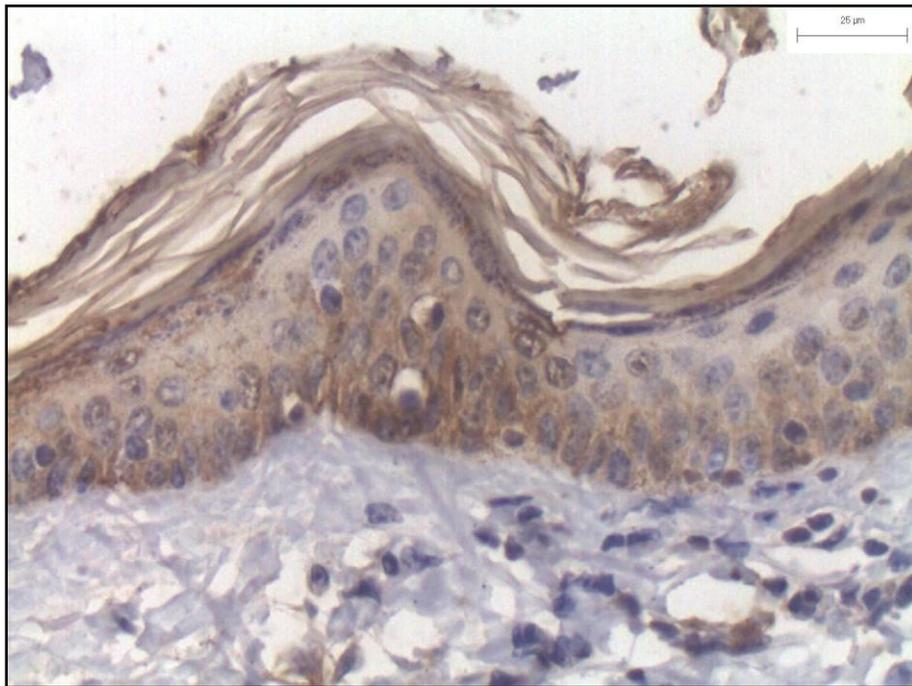


Figura 25: Inmunomarcación para Bcl-2 en piel de ratones tratados con cipermetrina (5%) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Se observa reacción positiva (coloración marrón) en el citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis. X400.

En los grupos de ratones que recibieron tres dosis consecutivos (días 4, 19 y 34) de los diferentes tratamientos los porcentajes de área inmunomarcada para Bcl-2 fueron similares. Al día 49 pt (grupo de ratones que recibieron cuatro aplicaciones repetidas de los diferentes tratamientos), los porcentajes de área inmunomarcada para Bcl-2 en los tratados con cipermetrina comercial al 5% y en los tratados con cipermetrina (5%) fueron significativamente menores a los hallados en el grupo control ($p < 0,05$). Al día 64 pt (grupo de ratones que recibieron cuatro aplicaciones repetidas de los diferentes tratamientos), se observó un comportamiento similar con porcentajes de expresión para Bcl-2 significativamente menores en los grupos tratados con ambas cipermetrinas con respecto a los controles ($p < 0,05$).

En la Fig. 26 se observa el efecto del tiempo de inoculación sobre los porcentajes de área inmunomarcada para la proteína antiapoptótica Bcl-2 en piel de ratones.

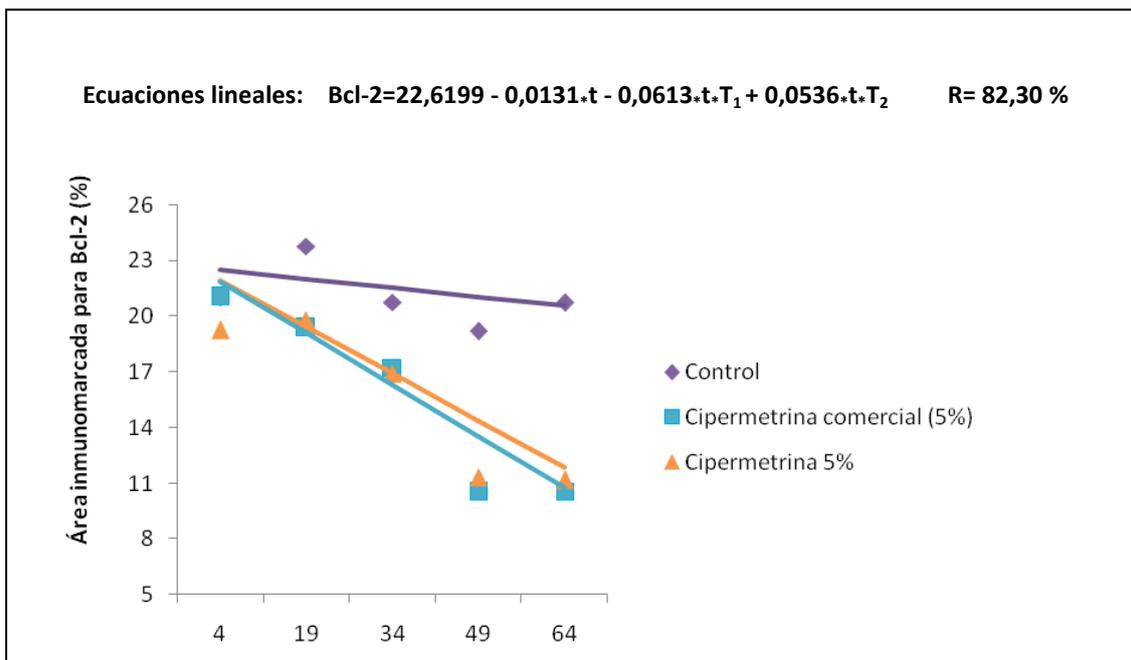


Figura 26: Ecuación matemática y gráficas obtenidas con el modelo lineal general (GLM) que expresan la evolución de los porcentajes de área inmunomarcada para Bcl-2 para cada grupo: control ($T_1=0$ y $T_2=0$), cipermetrina comercial al 5% ($T_1=1$ y $T_2=0$) y cipermetrina al 5% ($T_1=0$ y $T_2=1$).

Los resultados de la aplicación del GLM mostraron efectos significativos para la variable tiempo pt y para la interacción entre los tratamientos con el tiempo ($p < 0,01$). El efecto de la variable tratamiento como efecto principal no resultó significativo ($p = 0,0598$) (Tabla 4), lo que señala la igualdad de los tres grupos al inicio del experimento y el efecto del tratamiento a lo largo del tiempo.

De la Fig. 26 se desprende que los porcentajes de área inmunomarcada para Bcl-2 en el grupo control disminuyeron levemente (pendiente 0,0131) durante el experimento, mientras que los porcentajes de marcación para esta proteína en los grupos tratados con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina (5%) mostraron una disminución más acentuada a lo largo del tiempo ($p < 0,01$). Además, el ajuste logrado mediante la aplicación del GLM fue bueno ya que el coeficiente de regresión porcentual fue de 82,30%.

4.5.2. Inmunomarcación para Bax

Los efectos de los diferentes tratamientos administrados *pour-on* en piel de ratones sobre los porcentajes de áreas inmunomarcadas para Bax (proteína proapoptótica) en la epidermis se visualizan en la tabla 7. La expresión de la proteína Bax se evidenció en todos los grupos evaluados variando de débil a intensa. La reacción positiva se observó en el citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis (Fig. 27, 28 y 29).

Al día 4 pt no se observaron diferencias en la inmunoexpresión de Bax entre los diferentes tratamientos administrados. A partir de la segunda aplicación de los diferentes tratamientos (14 ds pt) y hasta la quinta aplicación (64 ds pt), los porcentajes de área inmunomarcada para Bax fueron significativamente mayores en los grupos tratados con cipermetrina comercial al 5% y cipermetrina (5%) que en los controles.

Tabla 7: Porcentajes de áreas inmunomarcadas para Bax en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5%, cipermetrina (5%) y en controles hasta el día 64 post tratamiento.

Tiempo post tratamiento	Control	Cipermetrina comercial (5%)	Cipermetrina 5%
Día 4	18,12 ^a ± 3,95	18,56 ^a ± 3,50	18,83 ^a ± 2,85
Día 19	16,40 ^a ± 3,33	20,38 ^a ± 2,23	18,99 ^a ± 2,71
Día 34	18,20 ^a ± 2,81	19,71 ^a ± 2,12	20,20 ^a ± 2,41
Día 49	18,66 ^a ± 2,27	28,66 ^b ± 3,08	28,26 ^b ± 2,02
Día 64	20,29 ^a ± 2,65	30,12 ^b ± 3,47	32,36 ^b ± 4,27

Los valores representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada para Bax ± los desvíos estándares (DS). Diferentes letras para cada periodo de tiempo, indican diferencias significativas (p<0,05).

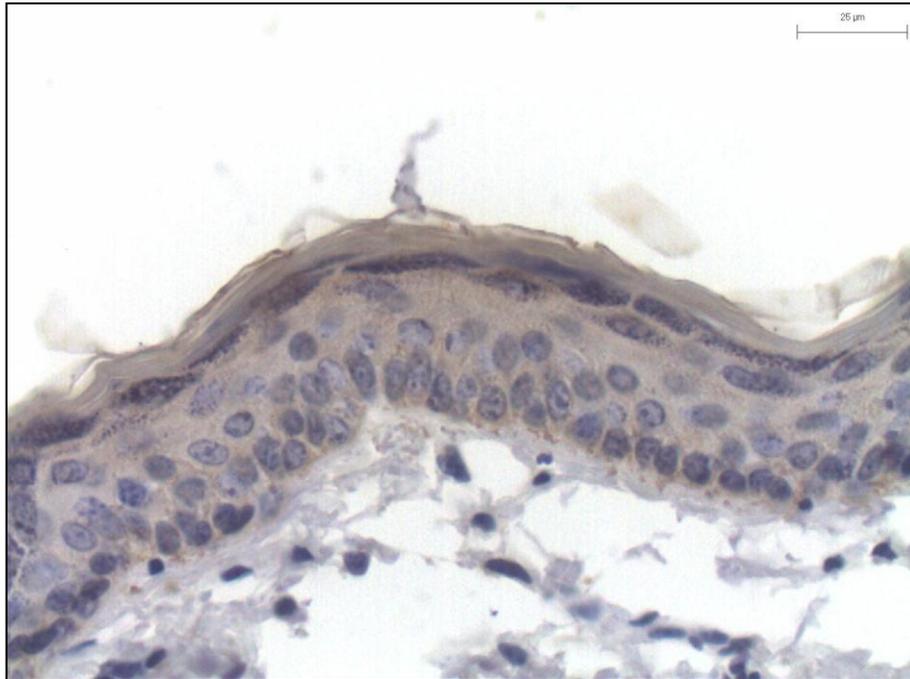


Figura 27: Inmunomarcación para Bax en piel de ratones tratados con solución fisiológica (controles) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Se observa reacción positiva (coloración marrón) en el citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis. X400.

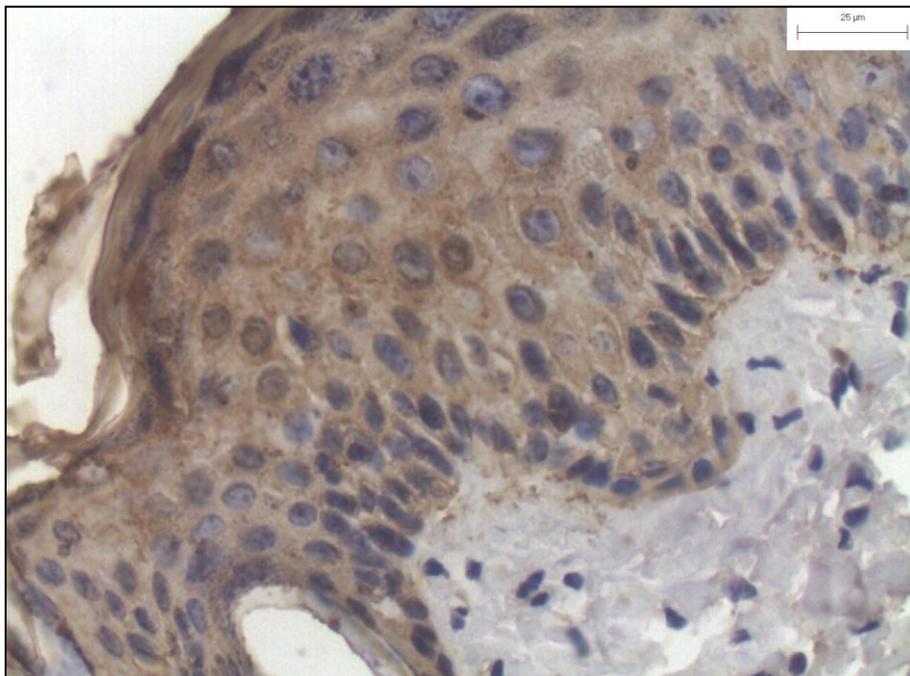


Figura 28: Inmunomarcación para Bax en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5% luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Se observa reacción positiva (coloración marrón) en el citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis. X400.

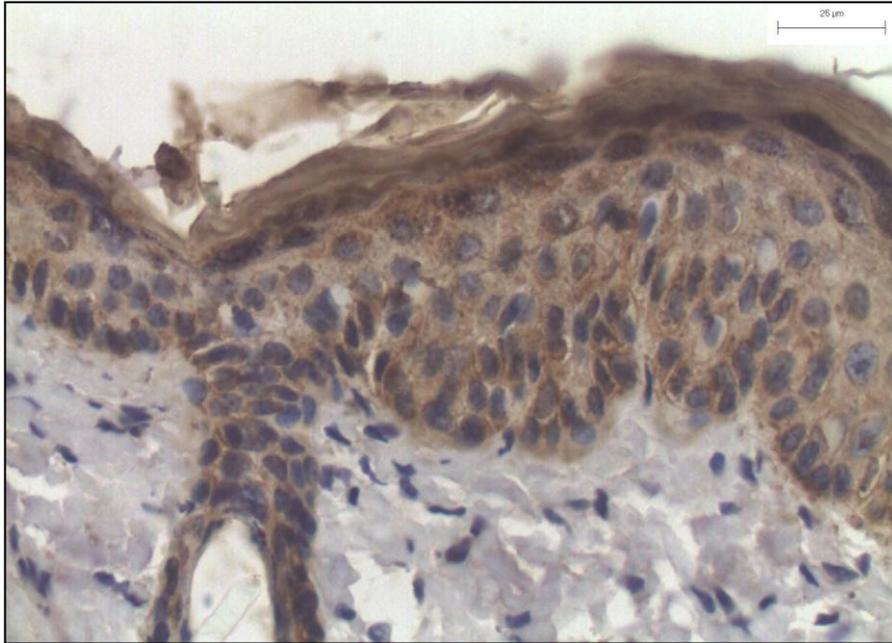


Figura 29: Inmunomarcación para Bax en piel de ratones tratados con cipermetrina (5%) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Se observa reacción positiva (coloración marrón) en el citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis. X400.

En la Fig. 30 se observa el efecto del tiempo de inoculación sobre los porcentajes de área inmunomarcada para la proteína proapoptótica Bax en piel de ratones.

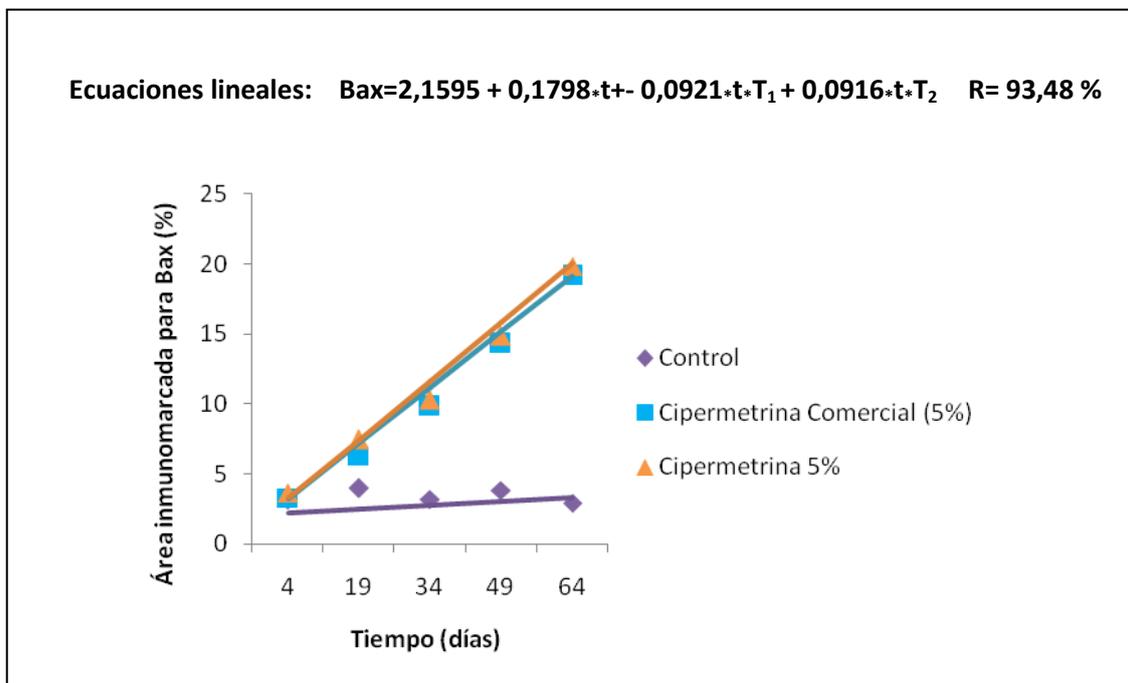


Figura 30: Ecuación matemática y gráficas obtenidas con el modelo lineal general (GLM) que expresan la evolución de los porcentajes de área inmunomarcada para Bax para cada grupo: control ($T_1=0$ y $T_2=0$), cipermetrina comercial al 5% ($T_1=1$ y $T_2=0$) y cipermetrina (5%) ($T_1=0$ y $T_2=1$).

Los resultados de la aplicación del GLM mostraron efectos significativos para la variable tiempo pt y para la interacción entre los tratamientos con el tiempo ($p < 0,01$). El efecto de la variable tratamiento como efecto principal no resultó significativo ($p = 0,0510$) (Tabla 4). El hecho que no resulte significativo el efecto del tratamiento señala la equivalencia de los tres grupos al inicio del experimento. En la medida que transcurre el tiempo luego de la aplicación de dosis sucesivas comienza a evidenciarse el efecto del tratamiento.

De la Fig. 30 se desprende que los porcentajes de área inmunomarcada para Bax en el grupo de ratones control aumenta levemente (pendiente 0,1798) durante el experimento, mientras que en los grupos tratados con cipermetrina comercial al 5% y cipermetrina (5%) se observa un aumento significativo a lo largo del tiempo ($p < 0,01$). Además, el ajuste logrado mediante la aplicación del GLM fue muy bueno obteniéndose un coeficiente de regresión porcentual de 93,48%.

4.5.3. Inmunomarcación para caspasa-3 activa

Los efectos de los diferentes tratamientos administrados en ratones sobre los porcentajes de áreas inmunomarcadas para caspasa-3 activa (proteasa apoptogénica) en el epitelio que tapiza la piel se visualizan en la tabla 8. En forma similar a lo observado para las proteínas Bcl-2 y Bax, la expresión de caspasa-3 activa se evidenció en todos los grupos evaluados variando de débil a intensa. La reacción positiva se observó en el núcleo y citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis.

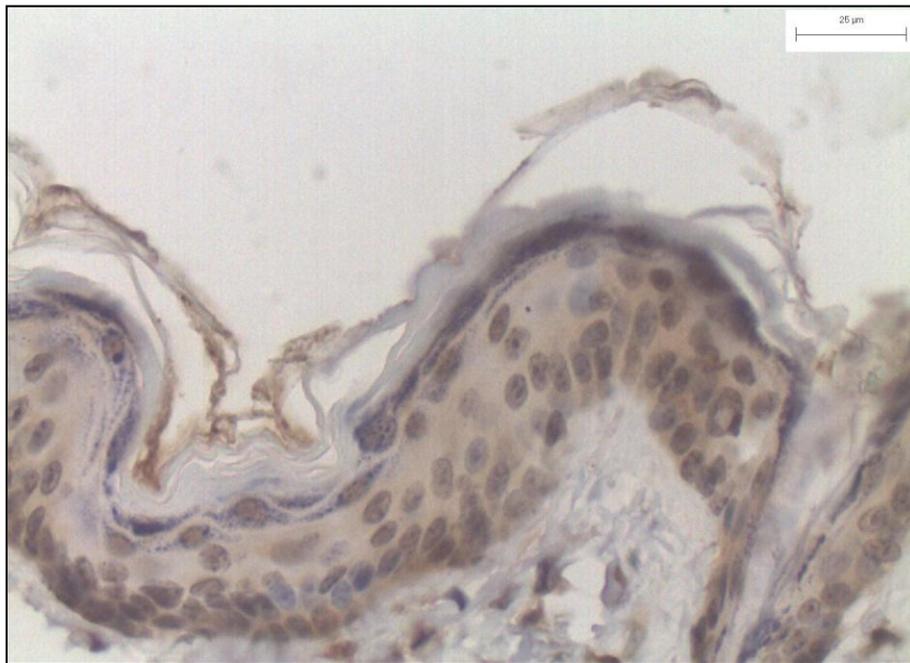


Figura 31: Inmunomarcación para caspasa-3 activa en piel de ratones tratados con solución fisiológica (controles) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Se observa reacción positiva (coloración marrón) en los núcleos y citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis. X400.

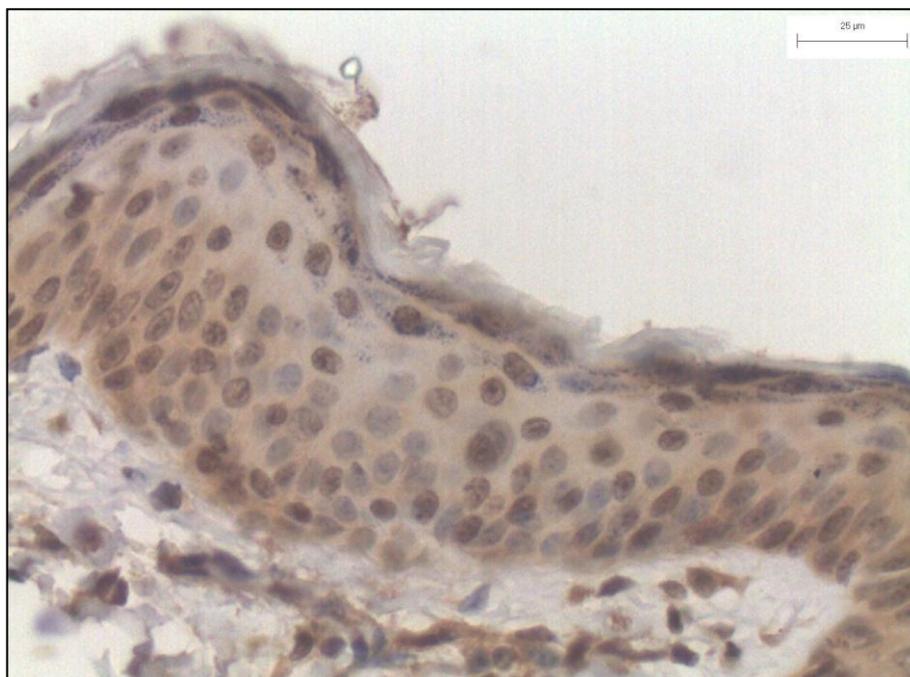


Figura 32: Inmunomarcación para caspasa-3 activa en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5% luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Se observa reacción positiva (coloración marrón) en los núcleos y citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis. X400.

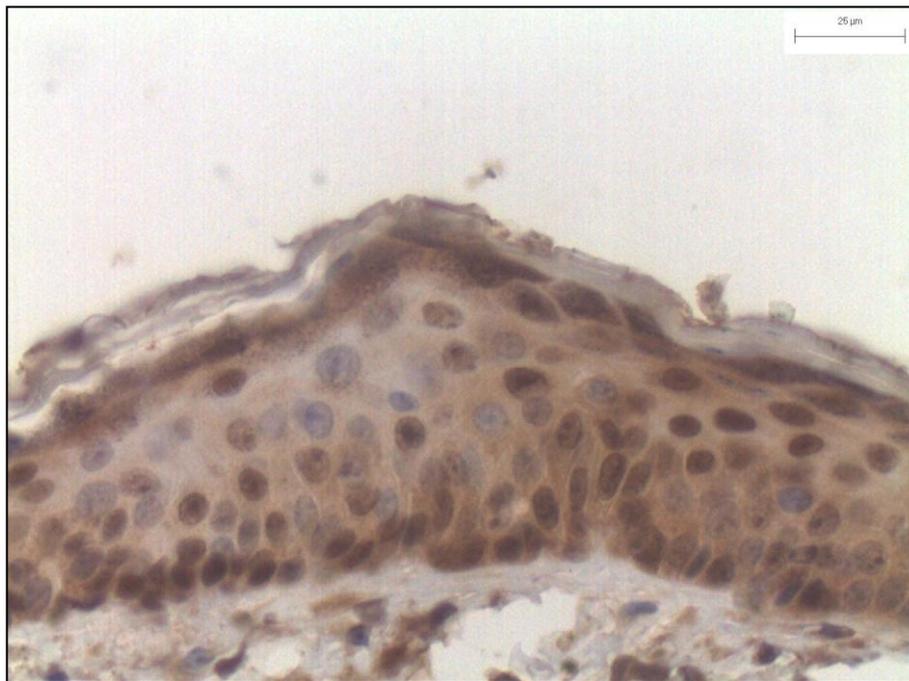


Figura 33: Inmunomarcación para caspasa-3 activa en piel de ratones tratados con cipermetrina (5%) luego de la quinta aplicación (día 64 post tratamiento). Se observa reacción positiva (coloración marrón) en los núcleos y citoplasma perinuclear de las células epiteliales de la epidermis. X400.

Tabla 8: Porcentajes de áreas inmunomarcadas para caspasa-3 activa en piel de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5%, cipermetrina (5%) y en controles hasta el día 64 post tratamiento.

Tiempo post tratamiento	Control	Cipermetrina comercial (5%)	Cipermetrina 5%
Día 4	10,56 ^a ± 2,81	15,19 ^a ± 2,39	13,14 ^a ± 2,08
Día 19	9,55 ^a ± 2,84	15,12 ^b ± 4,06	14,24 ^b ± 2,23
Día 34	11,58 ^a ± 3,22	17,72 ^b ± 2,63	14,00 ^a ± 2,69
Día 49	11,01 ^a ± 2,68	26,57 ^b ± 2,64	22,05 ^c ± 2,02
Día 64	13,73 ^a ± 3,46	33,38 ^b ± 5,83	31,51 ^b ± 4,26

Los valores representan las medias de los porcentajes de área inmunomarcada para caspasa-3 activa ± los desvíos estándares (DS). Diferentes letras para cada periodo de tiempo, indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Luego de la primera aplicación (día 4 pt), los porcentajes de área inmunomarcada para los diferentes tratamientos administrados fueron similares. Al día 19 pt los

porcentajes de expresión para caspasa-3 activa fueron significativamente mayores en los ratones tratados con cipermetrina comercial al 5% y cipermetrina (5%) con respecto a los controles ($p < 0,05$). En este periodo, para ambas cipermetrinas los porcentajes de expresión fueron similares con valores promedios de $15,12 \pm 4,06\%$ y $14,24 \pm 2,23\%$, respectivamente.

Luego de la tercera aplicación (día 34 pt), en el grupo de ratones tratados con cipermetrina comercial al 5% se observaron los mayores porcentajes de inmunomarcación con un valor promedio de $17,72 \pm 2,63\%$ mostrando diferencias significativas con respecto a los porcentajes observados en el grupo de ratones tratados con cipermetrina (5%) y en controles ($p < 0,05$).

En los ratones que recibieron cuatro aplicaciones de los diferentes tratamientos (día 49 pt), los mayores porcentajes de expresión de caspasa-3 activa se observaron en los tratados con cipermetrina comercial al 5% con un valor promedio de $26,57 \pm 2,64\%$ difiriendo en forma significativa con el grupo de ratones tratados con cipermetrina al 5% y con los controles ($p < 0,05$).

Luego de la quinta aplicación de los diferentes tratamientos (día 64 pt) los porcentajes de inmunomarcación para caspasa-3 activa fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los tratados con cipermetrina comercial al 5% y cipermetrina (5%) con respecto a los controles, arrojando valores promedio de $33,38 \pm 5,83\%$, para la cipermetrina comercial al 5% y de $31,51 \pm 4,26\%$ para la cipermetrina (5%).

En la Fig. 34 se observa el efecto del tiempo de inoculación sobre los porcentajes de área inmunomarcada para caspasa-3 activa en piel de ratones.

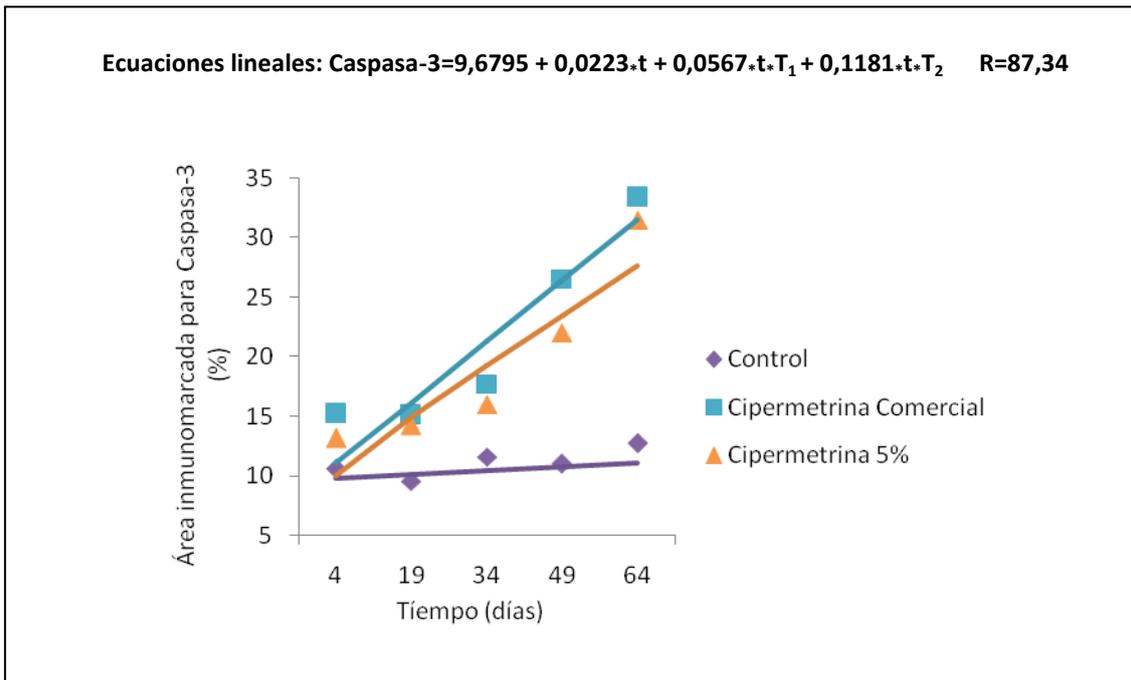


Figura 34: Ecuación matemática y gráficas obtenidas con el modelo lineal general (GLM) que expresan la evolución de los porcentajes de área inmunomarcada para caspasa-3 activa para cada grupo: control ($T_1=0$ y $T_2=0$), cipermetrina comercial al 5% ($T_1=1$ y $T_2=0$) y cipermetrina (5%) ($T_1=0$ y $T_2=1$).

Los resultados de la aplicación del GLM mostraron efectos significativos para la variable tiempo pt y para la interacción entre los tratamientos con el tiempo ($p<0,01$). El efecto de la variable tratamiento como efecto principal no resultó significativo ($p=0,5453$) (Tabla 4), lo que señala la igualdad de los tres grupos al inicio del experimento y el efecto del tratamiento a lo largo del tiempo.

De la Fig. 34 se desprende que los porcentajes de área inmunomarcada para caspasa-3 activa en el grupo control aumentaron levemente (pendiente 0,0223) durante el experimento, mientras que los porcentajes de marcación para esta proteína en los grupos tratados con cipermetrina comercial al 5% y cipermetrina (5%) mostraron un incremento significativo a lo largo del tiempo ($p<0,01$). Además, el ajuste logrado mediante la aplicación del GLM fue bueno ya que el coeficiente de regresión porcentual hallado fue de 87,34%.

5. DISCUSIÓN



5.1. Lesiones post tratamiento

Uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar posibles lesiones cutáneas evaluando las características macroscópicas y microscópicas de las mismas luego de la aplicación repetida, *pour-on*, de cipermetrina o de sus agentes de formulación sobre la piel de ratones.

Trabajos previos han postulado que el metabolismo, degradación y toxicidad de los piretroides sintéticos resulta en una baja toxicidad dérmica (Miyamoto, 1976). Sin embargo, este concepto en trabajos más recientes resulta controvertido.

Se han reportado lesiones en piel de ovinos ocasionadas por la aplicación *pour-on* de piretroides sintéticos, describiéndose alteraciones en el estrato córneo y dermis subyacente al sitio de aplicación, que varían desde un leve eritema a una dermatitis exudativa con formación de costras (Money y Scroggie, 1981; Jenkinson et al., 1986). En nuestro estudio, los resultados demostraron que luego de la cuarta aplicación (49 días pt) de cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina (5%) se observaron áreas alopecicas y escaras en el sitio de aplicación, y la observación microscópica de las lesiones determinó un engrosamiento del estrato medio-basal y del estrato córneo de la epidermis con áreas de hiperqueratosis y visualización de figuras mitóticas en el estrato basal. En la dermis se observó colagenólisis y abundante infiltrado de eosinófilos.

En humanos y conejos, la exposición cutánea repetida a piretroides sintéticos produjo una inflamación dérmica con eritema, edema y vesiculación (Flannigan et al., 1985; Flannigan y Tucker, 1985; He et al., 1988). Además, se ha descrito una dermatitis de contacto ocasional en humanos por la aplicación tópica de permetrina para el tratamiento de la sarna sarcoptica (Elgart, 1996). Una forma llamativa de toxicidad por exposición a concentraciones elevadas de piretroides sintéticos provocada por la

irritación de las terminaciones nerviosas de la piel, ha sido asociada a una parestesia cutánea (Desi et al., 1985; Luty et al., 1998; Müller-Mohnssen, 1999).

En adición a las lesiones mencionadas, posiblemente causadas por los piretroides, se ha establecido que los agentes de formulación utilizados en la dilución para uso percutáneo pueden alcanzar una mayor toxicidad que los piretroides (Lepeshkin et al., 1992). En nuestro estudio, las lesiones ocasionadas por la cipermetrina comercial y la cipermetrina diluida con solución fisiológica fueron similares, por lo que los cambios observados no pueden ser atribuidos a los agentes de formulación comercial.

En un estudio realizado por Inayat et al. (2007) en el cual realizaron aplicaciones diarias durante seis semanas de dos dosis de cipermetrina (15 y 30 mg/kg) en piel de ratones, observaron que luego de la segunda y tercera aplicación el área se presentaba enrojecida e hinchada y que los animales mostraban un comportamiento alterado con signos de nerviosismo e irritación, con mordidas, arañazos e intentos de raspado sobre el sitio de aplicación de la droga. Un comportamiento similar ha sido reportado por otros autores luego de la aplicación dérmica de piretroides (Aldridge, 1990; Vijverberg y van den Bercken, 1990). En nuestro estudio, no se observó ningún tipo de comportamiento anormal en ninguno de los grupos evaluados.

5.2. Cambios morfométricos en la epidermis

La piel es una barrera natural que normalmente previene la exposición sistémica a químicos ambientales. La primera barrera funcional de la piel está representada por el EC, la capa más externa de la piel (Elias y Menon, 1991; Holleran et al., 1991). Dicho estrato está compuesto por múltiples capas de queratinocitos aplanados unidos por una

capa continua de lípidos conformando una barrera fuerte, altamente flexible y con capacidad de auto reparación (Elias, 2005).

La penetración de químicos a través del EC es un proceso pasivo (Elias et al., 1987) y depende fundamentalmente de la composición fisicoquímica del compuesto, particularmente de su lipofilia y del vehículo utilizado como solvente. Además, la penetración de los compuestos depende de las características de la piel según la especie.

En roedores, el EC tiene un espesor de 5 a 15 μm y está formado por 2 o 3 capas de corneocitos. Los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y los conductos de las glándulas sudoríparas (apéndices) pueden aumentar la penetración percutánea de los compuestos. Dicha penetración percutánea puede ocurrir por tres vías: intercelular, intracelular o a través de los apéndices (vía corta, donde la difusión de moléculas pueden alcanzar directamente la dermis) (Lauer et al., 1995). La piel constituye, evidentemente, una de las principales vías de exposición para usuarios de productos agroquímicos, con posibilidades de contacto que se suscitan durante el mezclado, la carga o durante el proceso de aplicación del producto (Benford et al., 1999).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que a partir de la cuarta aplicación (49 días pt) comienzan a manifestarse cambios significativos en el espesor del EC y medio basal de la epidermis y en consecuencia en el espesor total de la epidermis en los animales tratados con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina diluida (5%) con respecto a los animales que recibieron como tratamiento solución fisiológica (controles). Por otra parte, se observó un efecto progresivo en el tiempo luego del tratamiento con ambas cipermetrinas observándose los mayores valores en el espesor de la epidermis luego de la quinta aplicación de cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina (5%, día 64 pt).

Al día 34 y 49 pt, el espesor de la epidermis fue significativamente mayor en el grupo de ratones tratados con cipermetrina diluida (5%) en relación al grupo tratado con cipermetrina comercial (5%) y al grupo control. Estos resultados demuestran que los agentes utilizados en la formulación de la cipermetrina comercial (5%) contribuyeron a disminuir el espesor de la epidermis si lo comparamos con los valores observados para la cipermetrina (5%) aunque el efecto fue transitorio, ya que al día 64 pt los valores en el espesor de la epidermis para ambas cipermetrinas fueron similares.

5.3. Cambios en la proliferación celular con PCNA

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína ácida de 36 kDa que se encuentra en el núcleo de todas las células. Es un co-factor de la ADN polimerasa- δ y es esencial para la síntesis de ADN. Se activa durante el final de la etapa G1 y hasta el inicio de la fase S del ciclo celular (Prelich et al., 1987; Galand y Degraef, 1989). Por lo tanto, el PCNA conocido por promover el ciclo celular y ser un indicador de proliferación. En condiciones normales, existen pocos estudios que identifiquen células PCNA positivas en piel de ratón, no así en condiciones patológicas donde se ha usado ampliamente como marcador de proliferación celular en humanos y animales.

La epidermis es un tejido que se auto-renueva y mantiene por la regulación precisa de la proliferación de los queratinocitos, migración, diferenciación y apoptosis (Shirakata, 2010). En el presente estudio, en todos los grupos evaluados, la marcación positiva con PCNA estuvo restringida a los núcleos de las células epiteliales del estrato basal de la epidermis lo que demuestra que estas células están constantemente proliferando con la finalidad de generar las capas diferenciadas de la epidermis (Bacchi y Gown, 1993; Onuma et al., 2001). Los porcentajes de proliferación celular hallados en

piel de los animales control se mantuvieron dentro de los rangos observados por otros autores en piel de ratón (Joseph et al., 2011).

La epidermis constituye la primera línea de defensa contra las agresiones del ambiente y como hemos mencionado, posee la habilidad de renovarse continuamente y regenerarse ante la injuria. Esta habilidad depende principalmente de los queratinocitos, los cuales proliferan y responden a las señales de diferenciación. En efecto, la epidermis es un tejido multilaminar compuesto por queratinocitos, células madre y sus progenitoras indiferenciadas. Trabajos relacionados demuestran que las heridas en la piel provocan una gran proliferación de células madres epidérmicas (Ivanova et al., 2005). La re-epitelización de la piel luego de una herida, es un proceso complejo que requiere de señales de células inflamatorias, fibroblastos dérmicos y queratinocitos. El control central de la proliferación está determinado por el factor de transcripción E2F. La red de señalización también incluye ciclinas, cdk, inhibidores de cdk y la familia de proteínas retinoblastoma (pRb) (Harvat et al., 1998; Paramio et al., 1998).

La vía E2F/pRb ha sido reconocida como crucial en la regulación de los tejidos en desarrollo, la remodelación y la homeostasis. Se ha sugerido la participación de alteraciones en la red E2F/pRb en la formación de tumores epidérmicos, por lo tanto, la modulación de esta vía podría representar una herramienta eficaz para una variedad de trastornos de la epidermis (Ivanova et al., 2005).

Otros trabajos de investigación en piel de humanos han demostrado que en ciertas enfermedades inflamatorias de la piel como la dermatitis por contacto, se produce un aumento en la proliferación celular de las células de la capa basal de la epidermis (Kawahira, 1999).

En el presente trabajo no se observaron diferencias en los porcentajes de proliferación entre los tratados con cipermetrina comercial y cipermetrina diluida (5%)

hasta la tercera aplicación. Sin embargo, luego de la cuarta y quinta aplicación (días 49 y 64 pt) las diferencias entre los tratamientos administrados fueron significativas con un mayor porcentaje de proliferación celular en la epidermis de ratones tratados con cipermetrina comercial y cipermetrina diluida con respecto a los controles. El aumento en la proliferación durante estos periodos de muestreo coincidió con un aumento concomitante en el espesor de la epidermis. Por otra parte, se observó un efecto progresivo en el tiempo luego del tratamiento con ambas cipermetrinas observándose los mayores porcentajes de proliferación luego de la quinta aplicación de cipermetrina comercial y cipermetrina diluida (5%) (64 días pt). Estos resultados indicarían, que el tratamiento con ambas cipermetrinas estimuló la proliferación de las células del estrato basal de la epidermis siendo progresivo en el tiempo, posiblemente como un mecanismo reparador en respuesta a la liberación de señales inflamatorias causadas por la aplicación repetida del químico.

Los porcentajes de proliferación fueron similares para la cipermetrina comercial al 5% y para la cipermetrina diluida con solución fisiológica al 5 % en todos periodos evaluados lo que sugiere que el vehículo utilizado en la elaboración de cipermetrina comercial no contribuyó a modificar los porcentajes de proliferación celular.

5.4. Cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis

En la piel, la muerte celular por apoptosis ha sido descrita en una amplia variedad de condiciones, como procesos inflamatorios, dermatosis, tumores cutáneos, infecciones virales, desórdenes autoinmunes, etc. (Weedon, 1990; Raskin, 1997). Existe suficiente evidencia de que la apoptosis juega un importante rol, no sólo en la patogénesis de enfermedades de la piel sino además, en los mecanismos homeostáticos en la piel sana.

En este sentido, se piensa que la diferenciación terminal de los queratinocitos es una forma especial de apoptosis, debido a la similitud entre los queratinocitos diferenciados y las células apoptóticas como por ejemplo, en los signos de activación de endonucleasa y fragmentación del ADN que muestran los queratinocitos granulares (Elmore, 2007). El equilibrio entre la muerte y proliferación constante de los queratinocitos mantiene el espesor normal de la epidermis.

El control y regulación de los eventos apoptóticos ocurre a través de los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Cory y Adams, 2002). Estas proteínas controlan la permeabilidad de la membrana mitocondrial y pueden actuar promoviendo o inhibiendo la apoptosis. A la fecha, 25 genes han sido identificados en la familia Bcl-2. Algunas proteínas antiapoptóticas incluyen: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG y algunas proteínas proapoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk. Estas proteínas tienen especial significancia dado que pueden determinar si la célula se compromete a la apoptosis o aborta el proceso. Se conoce que el principal mecanismo de acción de la familia de proteínas Bcl-2 es la regulación de la liberación del citocromo C de la mitocondria vía alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Galluzzi et al., 2012).

Las proteínas proapoptóticas Bax/Bak son reguladores esenciales de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis (Ranger et al., 2001). Se ha demostrado que cuando las señales letales para la célula prevalecen, se desencadena el fenómeno de permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) que puede ocurrir en esta membrana debido a la actividad formadora de poros de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 como Bak y Bax, o puede resultar de un fenómeno que se origina en la membrana mitocondrial interna, llamado permeabilidad transitoria mitocondrial (MPT) debido a la apertura de un complejo multiproteico conocido como complejo del

poro de permeabilidad transitoria (PTVC) (Galluzzi et al., 2012). La permeabilización de la membrana mitocondrial externa conduce a la liberación al citosol de numerosas proteínas que normalmente están confinadas en el espacio intermembranoso mitocondrial, como el citocromo C, que junto con Apaf-1 y dATP conforman el apoptosoma. Este complejo multiproteico activa la caspasa-9 y la caspasa-3 en una cascada proteolítica (Galluzzi et al., 2012).

Ha sido demostrado que el estrés dentro del retículo endoplasmático (RE) activa una compleja serie de complejos celulares, impactando en los patrones de expresión génica, en las vías de señalización celular, síntesis de proteínas e incluso en las decisiones de muerte de la célula. La relación mecánica entre el estrés en el RE y la apoptosis ha sido caracterizada con el descubrimiento de una clara dependencia entre la liberación de Ca^{2+} del RE y la activación de la apoptosis dependiente de la vía mitocondrial (Scorrano et al., 2003), la capacidad del estrés en el RE para inducir la actividad de Jnk (Urano et al., 2000), y la presencia de procaspasa-12 en el RE (Nakagawa et al., 2000).

Los mediadores clave de la señalización por stress se localizan dentro del lumen del RE y en la membrana. Una señal de estrés clave activada por RE, es la salida de Ca^{2+} al citosol que induce un mecanismo de apoptosis dependiente de la mitocondria conocido como transición de permeabilidad mitocondrial (mPT) (Scorrano et al., 2003). Las proteínas del complejo de membrana mitocondrial forman el poro de mPT que permite la difusión del citocromo C y otros factores desde el espacio intermembranoso al citosol. El citocromo C se une a Apaf-1 y a procaspasa-9 para formar el apoptosoma, induciendo activación de las caspasas efectoras -3, -6 y -7 (Li et al., 1997; Saleh et al., 2000).

El RE es capaz de inducir apoptosis a través de un mecanismo independiente de la mitocondria. Ha sido recientemente demostrado que la caspasa-12 residente en el RE, puede activar caspasa-7 y -9 en ausencia de liberación de citocromo C (Rao et al., 2001; Morishima et al., 2002). Se ha demostrado que células que sobre expresan una forma catalíticamente inactiva de procaspasa-12, disminuyen la respuesta apoptótica a algunas drogas que inducen estrés en RE (Rao et al., 2002; Hetz et al., 2003).

Trabajos previos han demostrado que los piretroides perturban la función de los canales de sodio dependientes de voltaje en neuronas de vertebrados y e invertebrados (Vijverberg y van den Bercken, 1990), y además, que los piretroides perturban el flujo de Ca^{2+} a la célula neuronal (Imamura et al., 2000). En células no neuronales, el sitio de acción para los piretroides se encuentra menos estudiado, aunque existe evidencia de que la cipermetrina retrasaría la inducción de la apoptosis en células tratadas con thapsigargina, un inhibidor de la enzima ATP-asa Ca^{+2} dependiente responsable de introducir Ca^{+2} en los reservorios intracelulares en contra de gradiente de concentración, y su uso conlleva el vaciado de los reservorios intracelulares (Mukerjee et al., 2000).

Niederer et al. (2005) en un modelo de muerte celular por estrés por temperatura desarrollado con una línea de células denominada tsBN7 derivada de células BHK21 (fibroblastos de riñón de hámster), han estudiado la capacidad de la cipermetrina para rescatar células tsBN7 inducidas a morir por apoptosis. Estos autores demostraron que los piretroides tipo II pueden servir como potentes inhibidores de señales proapoptóticas dirigidas a la activación del poro PT mitocondrial. Las células tsBN7 tratadas con cipermetrina y sometidas a estrés térmico no exhibieron inducción de Gadd153, liberación de citocromo C o inducción de apoptosis en cultivos a 39.5 °C.

En el presente trabajo con la finalidad de evaluar la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis en piel de ratones tratados con piretroides sintéticos, se

utilizaron dos anticuerpos específicos, uno que marca Bcl-2 (proteína inhibidora de la apoptosis) y otro que es específico para Bax (proteína proapoptótica). Contrariamente a los resultados obtenidos por Niederer et al. (2005), el presente trabajo se demuestra que la aplicación repetida de las dos formulaciones de cipermetrina incrementaron en forma significativa la expresión de la proteína proapoptótica Bax, a partir de la cuarta aplicación. Además, se obtuvo una disminución concomitante de la proteína antiapoptótica Bcl-2, siendo ambos efectos, acumulativos en el tiempo. Estas diferencias podrían deberse al modelo utilizado *in vitro* versus *in vivo* y posiblemente, el desencadenamiento de la apoptosis luego de aplicación de cipermetrina no se debería a una situación de estrés celular sino a una respuesta a señales inflamatorias. No obstante, se necesitarían mayores estudios para corroborar esta hipótesis.

Asimismo, la poca variación entre el grupo tratado con cipermetrina comercial y la cipermetrina diluida (5%) con respecto a la expresión de las proteínas Bax y Bcl-2, indicaría que el excipiente utilizado no ejercería influencia en los efectos producidos.

El incremento en la expresión de la proteína proapoptótica Bax a partir de la cuarta aplicación de ambas cipermetrinas se relacionó con un aumento significativo en los porcentajes de inmunomarcación para caspasa-3 activa y la misma estuvo influenciada por el tiempo de aplicación. La caspasa-3 es una cisteína proteasa efectora que posee un importante rol en la apoptosis (Ruff y Dillman, 2007). Las caspasas actuarían inactivando proteínas que protegen a la célula de la muerte celular. Por ejemplo, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL son digeridas por las caspasas, originándose factores proapoptóticos (Cheng et al., 1997). Según los resultados obtenidos en este trabajo, podríamos hipotetizar que la aplicación repetida de cipermetrina en piel de ratones desencadena señales letales en la célula epitelial que al prevalecer en el tiempo podrían estimular la expresión de proteínas proapoptóticas como

Bax en detrimento de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, promoviendo la permeabilidad de la membrana mitocondrial en la célula epitelial lo que conduciría a la ejecución de la apoptosis a través de la activación de caspasa-3 (apoptosis desencadenada por señales intrínsecas). Sin embargo futuros estudios son necesarios para corroborar esta hipótesis.

Al día 49 pt, los porcentajes de área inmunomarcada para caspasa-3 activa fueron significativamente mayores en el grupo de ratones tratados con cipermetrina comercial (5%) en relación al grupo tratado con cipermetrina diluida en solución fisiológica (5%) y al grupo control. Estos resultados muestran que los agentes utilizados en la formulación de la cipermetrina comercial (5%) contribuyeron a aumentar de manera significativa la apoptosis de las células epiteliales, aunque de manera transitoria ya que al día 64 pt los valores en la expresión de esta caspasa efectora fueron similares a los hallados con la cipermetrina diluida en solución fisiológica.

Los resultados más relevantes obtenidos en este trabajo indican que la aplicación repetida de cipermetrina *pour-on* en piel de ratones induce un incremento significativo de la proliferación celular que se hace evidente a partir de la cuarta aplicación del químico y que este incremento estaría relacionado con un intento de reparar el daño ocasionado en el tejido. Por otra parte, a los fines de balancear y mantener un equilibrio en la proliferación y muerte de las células epiteliales, se expresan proteínas proapoptóticas como Bax en detrimento de las antiapoptóticas como Bcl-2 y la consecuente activación de proteasa apoptogénica caspasa-3.

6. CONCLUSIONES

A decorative horizontal bar consisting of two overlapping purple rectangles. The top rectangle is a darker shade of purple, and the bottom one is a lighter shade, creating a layered effect.

- La aplicación de cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina diluida (5 %) provocó lesiones macroscópicas y microscópicas en el sitio de aplicación que se evidenciaron a partir de la cuarta aplicación.
- La aplicación de cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina diluida (5 %) causó un aumento significativo en el espesor del EC y medio basal de la epidermis y en consecuencia, en el espesor total de la epidermis que se hizo evidente a partir de la cuarta aplicación y fue progresivo en el tiempo.
- Los agentes utilizados en la formulación de la cipermetrina comercial (5%) contribuyeron a disminuir el espesor de la epidermis de manera transitoria ya que luego de la quinta aplicación los valores en el espesor de la epidermis para la cipermetrina comercial y la diluida con solución fisiológica fueron similares.
- El tratamiento con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina diluida (5%) aumentó en forma significativa la proliferación de las células epiteliales del estrato basal de la epidermis evidenciadas con PCNA a partir de la cuarta aplicación y el efecto fue progresivo en el tiempo de muestreo.
- Los agentes de formulación empleados en la cipermetrina comercial no contribuyeron a modificar los porcentajes de proliferación celular del estrato basal de la epidermis en ninguno de los periodos evaluados.

CONCLUSIONES

- El tratamiento con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina (5%) disminuyó en forma significativa la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en las células epiteliales de la epidermis a partir de la cuarta aplicación y el efecto fue progresivo en el tiempo de muestreo.
- El tratamiento con cipermetrina comercial (5%) y cipermetrina (5%) aumentó en forma significativa la expresión de la proteína proapoptótica Bax y de caspasa-3 activa en las células epiteliales de la epidermis a partir de la cuarta aplicación y el efecto fue progresivo en el tiempo de muestreo.
- Los agentes de formulación empleados en la cipermetrina comercial no contribuyeron a modificar la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 ni de la proteína proapoptótica Bax en las células epiteliales de la epidermis en ninguno de los periodos evaluados.
- Los agentes utilizados en la formulación de la cipermetrina comercial (5%) contribuyeron a aumentar de manera significativa la expresión de caspasa-3 activa en las células de la epidermis, aunque de manera transitoria ya que al día 64 pt los valores en la expresión de esta proteasa efectora fueron similares a los hallados con la cipermetrina diluida en solución fisiológica.

CONCLUSIONES

Como conclusión general de esta tesis podemos expresar que la aplicación repetida de cipermetrina *pour-on* en piel de ratones induce cambios en el espesor de la epidermis con un incremento significativo en de la proliferación celular que se hace evidente a partir de la cuarta aplicación del químico. Por otra parte, a los fines de mantener un equilibrio en la proliferación y muerte de las células epiteliales, se expresan proteínas proapoptóticas como Bax en detrimento de las antiapoptóticas como Bcl-2 y la consecuente activación de proteasa apoptogénica caspasa-3.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASSY, M.A.; ELDEFRAWI, M.E.; ELDEFRAWI, A.T. (1983). Influence of the alcohol moiety of pyrethroids on their interactions with the nicotinic acetylcholine receptor. *J Toxicol Environ Health*. 12:575-590.
- ADAMS, J.M.; CORY, S. (2002). Apoptosomes: Engines for caspase activation. *Curr Opin. Cell Biol*. 14: 715-720.
- ALDRIDGE, W.N. (1990). An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol*; 21: 89-104.
- AMATI, B.; LITTLEWOOD, T.D.; EVANS, G.I.; LAND, H. (1993). The c-myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *EMBO J*. 12:5083-5087.
- ANTONSSON, B.; MARTINOU, J.C. (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res*. 256:50- 57.
- ANZIANI, O.S.; GUGLIELMONE, A.A.; SIGNORINI, A.R.; AUFRANC, C.; MANGOLD, A.J. (1993). *Haematobia irritans* in Argentina. *Vet Rec*. 132:588-594.
- ANZIANI, O.S.; ZIMMERMANN, G.; GUGLIENMONE, A.A.; FORCHIERI, M.; VOLPOGNI, M.M. (2000). Evaluation of insecticide ear tags containing ethion for control of pyrethroid resistant *Haematobia irritans* (L.) on dairy cattle. *Vet Parasitol*. 91:147-151.
- ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 281:1305-1308.
- BACCHI, C.E.; GOWN, A.M. (1993). Detection of cell proliferation in tissue sections. *Braz J Med Biol Res*. 26:677-687.
- BAKER, S.J.; REDDY, E.P. (1998). Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene*. 17:3261-3270.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAO, Q.; SHI, Y. (2007). Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.* 14:56-65.
- BENFORD, D.J.; COCKER, J.; SARTORELLI, P.; SCHNEIDER, T.; VAN HEMMEN, J.; FIRTH, J.G. (1999). Dermal route in systemic exposure. *Scand J Work Environ Health.* 25:511-520.
- BERTI, J.J.; LIPSKY, J.J. (1995). Transcutaneous drug delivery: a practical review. *Clin Proc.* 70:581-586.
- BISSACOT, D.Z.; VASSILIEFF, I. (1997). Pyrethroid residues in milk and blood of dairy cows following single topical applications. *Vet Hum Toxicol.* 39:6-8.
- BLANPAIN, C.; FUCHS, E. (2006) Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:339-373.
- BLANPAIN, C.; FUCHS, E. (2009) Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10: 207-217.
- BOISE, L.H.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M.; POSTEMA, C.E.; DING, L., LINDSTEN, T.; TURKA, L.A.; MAO, X.; NÚÑEZ, G. y THOMPSON, C.B. (1993). Bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell deaths. *Cell.* 74: 609-619.
- BOUWSTRA, J.A.; DE GRAAFF, A.; GOORIS, G.S.; NIJSSE, J.; WIECHERS, J.W.; VAN AELST, A.C. (2003). Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *J Invest Dermatol.* 120:750-758.
- BOUWSTRA, J.A.; PONEC, M. (2006). The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta.* 1758:2080-2095.
- BRADBERRY, S.M.; CAGE, S.A.; PROUDFOOT, A.T.; VALE, J.A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol Rev.* 24:93-106.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADBURY, S.P.; COATS, J.R. (1989). Comparative toxicology of the pyrethroid insecticide. *Rev Environ Contam Toxicol.* 108:133-177.
- BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P.A.; MACDONALD-BRAVO, H. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature.* 326:515-517.
- BRUNET, A.; BONNI, A.; ZIGMOND, M.J.; LINZ, M.Z.; JUO, P.; HU, L.S. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell.* 96:857-868.
- CANTALAMESSA, F. (1993) Acute toxicity of two pyrethroids: permethrin and cypermethrin in neonatal and adult rats. *Arch Toxicol.* 67:510–513.
- CASCALES ANGOSTO, M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anal Real Acad Nal Farm.* 69:36-64.
- CHANG, H.Y.; Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:821-846.
- CHAUHAN, L.K.; AGARWAL, D.K.; SUNDARARAMAN, V. (1997) *In vivo* induction of sister chromatid exchange in mouse bone marrow following oral exposure to commercial formulations of alpha cyano pyrethroids. *Toxicol Lett.* 93:153-157.
- CHAU, B.N.; CHENG, E.H.; KERR, D.A.; HARDWICK, J.M. (2000). Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell* .6:31-40.
- CHENG, E.H.; KIRSCH, D.G.; CLEM, R.J.; RAVI, R.; KASTAN, M.B.; BEDI, A.; UENO, K.; HARDWICH, J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science.* 278:1966-1968.
- CHETTY, R.; DADA, M.A.; GATTER, K. (1997). Bcl-2: Longevity personified! *Adv Anat Pathol.* 4:134-138.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHICHEPORTICHE, Y.; BOURDON, P.R.; XU, H.; HSU, Y.M.; SCOTT, H.; HESSION, C.; GARCIA, I., BROWNING, J.L.; TWEAK, (1997). A new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem.* 272:32401-32410.
- CHITTENDEN, T.; HARRINGTON, E.A.; O'CONNORS, R.; FLEMINGTON, C., LUTZ, R.J.; EVAN, G.I.; GUILD, B.C. (1995). Induction of apoptosis by the bcl-2 homologue bak. *Nature.* 374:733-736.
- CHOU, J.J.; Li, H.; SALVESEN, G.S.; YUANG, J.; WAGNER, G. (1999) Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell.* 7:615-624.
- CLARKE, P.G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol.* 181:195-213.
- COATS, J.R.; SYMONIK, D.M.; BRADBURY, S.P.; DYER, S.D.; TIMSON, L.K.; ATCHISON, G.J. (1989) Toxicology of synthetic pyrethroids in aquatic organisms: an overview. *Environ Toxicol Chem.* 8:671-679.
- COHEN, J.J. (1993). Overview: mechanisms of apoptosis. *Immunol Today.* 14:126-130.
- COHEN, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326:1-16.
- CORY, S.; ADAMS, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2:647-656.
- DALLARD, B.E.; ORTEGA, H.H.; IGUZQUIZA, I.A.; SALVETTI, N.R.; QUAINO, O.A.; CALVINHO, L.F. (2010). The effect of a single intramammary infusion of a biological response modifier in cows at drying off. *Vet Res Commun.* 34:519-532.
- DALLARD, B.E.; BARAVALLE, C.; ANDREOTTI, C.; ORTEGA, H.H.; NEDER, V.; CALVINHO, L.F. (2011). Intramammary inoculation of *Panax ginseng* extract in cows at drying off enhances early mammary involution. *J Dairy Res.* 78:63-71.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE JONG, D.; PRINS, F.; MASON, D.Y.; REED, J.C.; VAN OMMEN, G.B.; KLUIN, P.M. (1994). Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res.* 54:256-260.
- DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22:8543-8567.
- DESI, I.; VARGA, L.; DOBRONYI, I.; SZKLENARIK, G. (1985). Immunotoxicological investigation of the effects of a pesticide; cypermethrin. *Arch Toxicol Suppl.* 8:305-309.
- DEVINE, G.; DENHOLM, I. (1998). An unconventional use of piperonyl butoxide for managing the cotton whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bull Entomol Res.* 88:601-610.
- DIKSHIT, A.K. (2000) Cypermethrin and Deltamethrin concentration and contamination in pulses from application to jute sacks. *Bull Environ Contamin Toxicol.* 65:337-342.
- DOUMANIS, J.; QUINN, L.; RICHARDSON, H.; KUMAR, S. (2001). STRICA, a novel *Drosophila melanogaster* caspase with an unusual serine/threonine-rich prodomain, interacts with DIAP1 and DIAP2. *Cell Death Differ.* 8:387-394.
- DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102:33-42.
- EARNSHAW, W.C. (1999). Apoptosis. A cellular poison cupboard. *Nature.* 397: 441-446.
- ECKERT, R.L.; RORKE, E.A. (1989). Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environ Health Perspect.* 80:109-116.
- ELGART, M.L. (1996). A risk-benefit assessment of agents used in the treatment of scabies. *Drug Saf.* 14:386-393.

- ELIAS, P.M. (2005) Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol.* 125:183-200.
- ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K.R.; MENON, G.K.; GRAYSON, S.; WILLIAMS, M.L.; GRUBAUER, G. (1987) The stratum corneum two-compartment model and its functional implications. In: Shroot, B., Schaefer, H. (Eds.), *Skin Pharmacokinetics*, vol. 1. Karger, Basel, pp. 1-9.
- ELIAS, P.M.; MENON, G.K. (1991). Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res.* 24:21-26.
- ELMORE, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35:495-516.
- ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H. (1998). A caspase activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391:43-50.
- EVAN, G.; LITTLEWOOD, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science.* 281:1317-1321.
- FLANNIGAN, S.A.; TUCKER, S.B. (1985). Variation in cutaneous perfusion due to synthetic pyrethroid exposure. *Br J Ind. Med.* 42:773-776.
- FLANNIGAN, S.A.; TUCKER, S.B.; KEY, M.M. ROSS, C.E.; FAIRCHILD, E.J 2nd ; GRIMES, B.A.; HARRIST, R.B. (1985). Synthetic pyrethroid insecticides: a dermatological evaluation *Br J Ind. Med.* 42:363-372.
- FUCHS, E. (2009) Finding one's niche in the skin. *Cell Stem Cell.* 4:499-502.
- FUCHS, E. (1990). Epidermal differentiation: The bare essentials. *J Cell Biol* 111:2807-2814.
- GALAND, P.; DEGRAEF, C. (1989). Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues. *Cell Tissue Kinet.* 22:383-392

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GALIMBERTI, R.L.; RODRIGUEZ, M.; CHIAPPETTA, D.F.; GALIMBERTI, M.L. (2009). *Dermatol Argent.* 15:246-254.
- GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V. et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19:107-120.
- GARRIDO, C.; GALLUZZI, L.; BRUNET, M.; PUIG, P.E.; DIDELOT, C.; KROEMER, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 13:1423-1433.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. (2008). *Texto Atlas de Histología. Tercera Edición.* McGraw-Hill Interamericana, México.
- GENESER, F. (2000). *Histología, Tercera edición, Editorial Médica Panamericana.*
- GNIADHECKI, R. (1997). Effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D and its 20-epi analogues (MC 1288, MC1301, KH 1060), on clonal keratinocyte growth: evidence for differentiation of keratinocyte stem cells and analysis of the modulatory effects of cytokines. *Br J Pharmacol.* 120:1119-1127.
- GODOY, E.C.; LORENTE, J.A.; DALLARD, B.E.; ORTEGA, H.H. (2004) Lesiones cutáneas producidas por la aplicación repetida de cipermetrina *pour on* en ratones. IV Reunión Argentina de Patología Veterinaria (IV-RAPAVE). La Plata, Argentina.
- GODOY, E.C.; DALLARD, B.E.; SALVETTI, N.R.; LORENTE, J.A.; ORTEGA, H.H. (2006). Efecto de la aplicación repetida de cipermetrina *pour-on* sobre la expresión de PCNA en piel de ratones. V Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE). Esperanza, Santa Fe, Argentina.
- GREEN, D.R. (1997). A myc-induced apoptosis pathway surfaces. *Science.* 278:1246-1247.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GREEN, D.R. (1998a). Apoptotic pathways: the roads to win. *Cell*. 94:695-698.
- GREEN, D.R. (1998b). Death receiver. *Nature*. 396:629-630.
- GREEN, D.R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunt scissors. *Cell*. 102:1-4.
- GUGLIELMONE, A.A.; ANZIANI, O.S.; MANGOLD, A.J.; MOLFINO, G. (1993a)
Cipermetrina *pour-on* para el control de infestaciones con *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) en vaquillonas *Bos taurus* X *Bos indicus* mantenidas bajo condiciones de campo. *Vet Arg*. 10: 176-181.
- GUGLIELMONE, A.A.; VOLPOGNI, M.M.; ANZIANI, O.S.; MANGOLD, A.J. (1993b)
El control de la *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) con una formulación experimental de cipermetrina *pour-on* al 3%. *Vet Arg*. 10:613-617.
- GUGLIELMONE, A.A.; KUNZ, S.E.; VOLPOGNI, M.M.; ANZIANI, O.S.; FLORES, S.G. (1998) Diagnóstico de poblaciones de la *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) resistentes a la cipermetrina en Santa Fe, Argentina. *Rev Med Vet*. 79: 353-356.
- GUGLIELMONE, A.A.; CASTELLI, M.E.; VOLPOGNI, M.M.; ANZIANI, O.S.; FLORES, S.G. (1999). Cypermethrin *pour-on* synergized with piperonyl butoxide: effects on *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) natural populations resistant to cypermethrin. *Vet Parasitol*. 83:65-72.
- GUGLIELMONE, A.A.; CASTELLI, M.E.; VOLPOGNI, M.M.; ANZIANI, O.S.; MANGOLD, A.J. (2002). Dynamics of cypermethrin resistance in the field in the horn fly, *Haematobia irritans*. *Med Vet Entomol*. 16:310-315.
- GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; CASTELLI, M.E.; SUÁREZ, V.H.; AGUIRRE, D.H.; ALCARAZ, E.; CAFRUNE, M.M.; CETRÁ, B.; FADER, O.W.; LUCIANI, C.A.; MEDUS, P.D.; NAVA, S. (2006) Toxicidad *in vitro* de la

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- cipermetrina para *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (can.) y del diazinón para *Haematobia irritans* (l.) en la Argentina. RIA. 35: 31-41.
- HARVAT, B.L.; WANG, A.; SETH, P.; JETTEN, A.M. (1998). Up-regulation of p27Kip1, p21WAF1/Cip1 and p16Ink4a is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation. J Cell Sci. 111:1185-1196.
- HASHIMOTO, K. (2000). Regulation of keratinocyte function by growth factors. J Dermatol Sci. 24:S46-S50.
- HAYA, K. (1989) Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. Environ Toxicol Chem. 8:381-391.
- HE, F.; SUN, J.; HAN, K.; WU, Y.; YAO, P.; WANG, S.; LIU, L. (1988) Effects of pyrethroid insecticides on subjects engaged in packaging pyrethroids. Br J Ind Med. 45:548-551.
- HETZ, C; RUSSELAKIS-CARNEIRO, M.; MAUNDRELLI, K.; CASTILLA, J. SOTO, C. (2003). EMBO J. 22:5435-5445.
- HILL, M.M.; ADRAIN, C.; DURIEZ, P.J.; CREAGH, E.M.; MARTIN, S.J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. EMBO J. 23:2134-2145.
- HOCKENBERY, D.M (1995). Defining apoptosis. Am J Pathol. 146:16-19.
- HOLCIK, M.; GIBSON, H.; KORNELUK, R.G. (2001). XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. Apoptosis. 6:253-261.
- HOLLERAN, W.M.; MAN, M.Q.; GAO, W.N.; MENON, G.K.; ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K.R. (1991). Sphingolipids are required for mammalian epidermal barrier function. Inhibition of sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation. 88:1338-13345.
- HUANG, H.; JOAZEIRO, C.A.; BONFOCO, E.; KAMADA, S.; LEVERSON, J.D. y HUNTER T. (2000). The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-

- protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem.* 275:26661-26664.
- HUNT, D.M.; SAHOTA, V.K.; TAYLOR, K.; SIMRAK, D.; HORNIGOLD, N.; ARNEMANN, J.; WOLFE, J.; BUXTON, R.S. (1999). Clustered cadherin genes: a sequence-ready contig for the desmosomal cadherin locus on human chromosome 18. *Genomics.* 62:445-455.
- IMAMURA, L.; HASEGAWA, H.; KURASHINA, K.; HAMANISHI, A.; TABUCHI, A. TSUDA, M. (2000). Repression of activity-dependent c-fos and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression by pyrethroid insecticides accompanying a decrease in Ca(2+) influx into neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 1175–1182.
- INAYAT, Q.; ILAHI, M.; KHAN, J. (2007). A morphometric and histological study of the kidney of mice after dermal application of cypermethrin. *J Pak Med Assoc.* 57:587-591.
- IVANOVA, I.A.; D'SOUZA, S.J.; DAGNINO, L. (2005). Signalling in the epidermis: the E2F cell cycle regulatory pathway in epidermal morphogenesis, regeneration and transformation. *Int J Biol Sci.* 1:87-95.
- IVANOVA, I.A.; D'SOUZA, S.J.; DAGNINO, L. (2006). E2F1 stability is regulated by a novel-PKC/p38beta MAP kinase signaling pathway during keratinocyte differentiation. *Oncogene.* 25:430-437.
- JACKSON, B.; TILLI, C.M.; HARDMAN, M.J. (2005). Late cornified envelope family in differentiating epithelia--response to calcium and ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol.* 124:1062-1070.
- JAYARAMAN, L.; PRIVES, C. (1995). Activation of sequence specific DNA binding by short single strands of DNA require of p53 c-terminus. *Cell.* 81:1021-1029.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- JENKINSON, D.M.; HUTCHISON, G.; JACKSON, D.; MCQUEEN, L. (1986). Route of passage of cypermethrin across the surface of sheep skin. *Res Vet Sci.* 41:237-41.
- JONES, P. H.; HARPER, S.; WATT, F. M. (1995). Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell.* 73:713-724.
- JORDAN, R.C.; KAHN, H.J.; FROM, L.; JAMBROSIC, J. (1991). Immunohistochemical demonstration of actinically damaged elastic fibers in keratoacanthomas: an aid in diagnosis. *J Cutan Pathol.* 18:81-86.
- JOSEPH, L.B.; GERECKE, D.R.; HECK, D.E.; BLACK, A.T.; SINKO, P.J.; ERVELLI, J.A.; CASILLAS, R.P.; BABIN, M.C.; LASKIN, D.L.; LASKIN, J.D. (2011). Structural changes in the skin of hairless mice following exposure to sulfur mustard correlate with inflammation and DNA damage. *Exp Mol Pathol.* 91:515-527.
- KANZLER, S.; GALLE, P.R. (2000). Apoptosis and the liver. *Semin Cancer Biol.* 10:173-184.
- KAWAHIRA, K. (1999). Immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in malignant and nonmalignant skin diseases. *Arch Dermatol Res.* 291:413-418.
- KERN, F.; NIAULT, T.; BACCARINI, M. (2011) Ras and Raf pathways in epidermis development and carcinogenesis. *Br J Cancer.* 104:229-234.
- KERN, S.E.; KINZLER, K.W.; BRUSKIN, A. (1991). Identification of p53 as a sequence specific DNA binding protein. *Science.* 252:1708-1711.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-257.
- KHAVARI, T.A.; RINN, J. (2007) Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia. *Cell Cycle.* 6:2928-2931.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KISCHKEL, F.C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I.; GERMER, M.; PAWLITA, M.; KRAMMER, P.H.; PETER, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-5588.
- KOSTER, M.I.; ROOP, D.R. (2007). Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:93-113.
- KOTHAKOTA, S.; AZUMA, T.; REINHARD, C.; KLIPPEL, A.; TANG, J.; CHU, K. (1997). Caspase 3 generated fragment of gelsolin: effector of morphological changes in apoptosis. *Science.* 278:294-298.
- KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; SHABAIK, A.; MIYASHITA, T.; WANG, H-G.; REED, J.C. (1994). Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol.* 145:1323-1333.
- KRAJEWSKI, S.; BLOMQVIST, C.; FRANSSILA, K.; KRAJEWSKA, M.; WASENIUS, V.M, NISKANEN, E.; NORDLING, S.; REED, J.C. (1995). Reduced expression of proapoptotic gene Bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res.* 55:4471-4478.
- KROEMER, G.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M.E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; et al. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 12:1463-1467.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H. et al. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16:3-11.
- LANE, D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 358:15-16.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LATUSZYNSKA, J.; LUTY, S.; RASZEEWSKI, G.; PRZEBIROWSKA, D.; TOKARSKA-RODAK, M. (2003). Neurotoxic effect of dermally applied chlorpyrifos and cypermethrin. Reversibility of changes. *Ann Agric Environ Med.* 10:197-201.
- LATUSZYNSKA, J.; LUTY, S.; RASZEWSKI, G.; TOKARSKA-RODAK, M.; PRZEBIROWSKA, D.; PRZYLEPA, E.; HARATYM-MAJ, A. (2001). Neurotoxic effect of Dermally-Applied Chlorpyrifos and Cypermethrin en Wistar rats. *Ann agric Envirom Med.* 8:163-170.
- LAUER, A.C.; LIEB, L.M.; RAMACHANDRAN, C.; FLYNN, G.L.; WEINER, N.D. (1995). Transfollicular drug delivery. *Pharm Res.* 12:179-186.
- LÁZARO-OCHAITA P. (1993) *Dermatología Texto y Atlas.* Gráficas Reunidas, Madrid. Pp:1-17.
- LEAHAY, J.P. (1985). *The Pyrethroid Insecticides,* Taylor & Francis, London.
- LEBRUN, D.P.; WARNKE, R.A.; CLEARY, M.L. (1993). Expression of Bcl-2 in fetal tissue suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol.* 142:743-753.
- LEIGH, I.M.; BIRGITTE LANE, E.; WATT, F.M. (eds.) (1994). *The keratinocyte handbook.* p.131-152.
- LEIST, M.; JAATTELA, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:589-598.
- LEPESHKIN, I.V.; MOKOV, I.I.; MURASHKO, S.V.; KAGAN, L.S. (1992). The effect of solvents and emulsifiers on the toxicity of synthetic pyrethroids. *Lik Sprava.* 10:67-69.
- LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHardjo, I.; SRINIVASULA, S.M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E.S. WANG, X. (1997). *Cell.* 91: 479-489.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LIN, Y.; MA, W.; BENCHMOL, S. (2000). PIDD a new death domain containing protein is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nature Genet.* 26: 122-127.
- LIU, W.; TODD, R.G.; GERBERG, E.J. (1986). Effect of three pyrethroids on blood feeding and fecundity of *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc.* 2:310-313.
- LIU, F.T.; NEWLAND, A.C.; JIA, L. (2003). Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 310:956-962.
- LIU, Y.C.; MARRACCINO, R.L.; KENG, P.C.; BAMBARA, R.A.; LORD, E.M.; CHOU, W.G.; ZAIN, S.B. (1989). Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the Chinese hamster ovary cell cycle. *Biochemistry.* 28:2967-2974.
- LOCKSHIN, R.A.; WILLIAMS, C.M. (1965). Programmed cell death—I. cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J Insect Physiol.* 11:123-133.
- LOCKSLEY, R.M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 104:487-501.
- LORENZO, H.K.; SUSIN, S.A. (2004). Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Letters.* 557:14-20.
- LOS, M.; STROH, C.; JANICKE, R.U.; ENGELS, I.H.; SCHULZE-OSTHOFF, K. (2001). Caspases: more than just killers. *Trends Immunol.* 22:31-34.
- LUTY, S.; LATUSZYNSKA, J.; HALLIOP, J.; TOCHMAN, A.; OBUCHOWSKA, D.; PRZYLEPA, E.; KORCZAK, E. (1998). Toxicity of dermally applied alpha-cypermethrin in rats. *Ann Agric Environ Med.* 5:109-116.
- LYNEN, G.R.; SÁNCHEZ, M.F.; SOTELO, R. (1982) La cipermetrina. Nuestra opción en piretroides. Edit. Chemotechnia Sinttyal S.A.587-591.

- MAGA, G.; HUBSCHER, U. (2003) Proliferation cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci.* 116:3051-3060.
- MAJNO, G.; JORIS, I. (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146:3-15.
- MAREKOV, L.N.; STEINERT, P.M. (1998). Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem.* 273:17763-17770.
- MARGUET, D.; LUCIANI, M.F.; MOYNAULT, A.; WILLIAMSON, P.; CHIMINI, G. (1999). Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey. *Nature Cell Biol.* 1:454-456.
- MARTINO, J.C. (1999). Key to the mitochondrial gate. *Nature.* 397: 479-480.
- MAYO, H.W.; WANG, C.Y.; COGSWELL, P.C.; ROGERS-GRAHAM, K.S.; LOWE, S.W.; DER, C.J. (1997). Requirement of NF- κ B activation suppress p53-independent apoptosis. induced by oncogenetic Ras. *Science.* 278:1812-1825.
- MEHREL, T.; HOHL, D.; ROTHNAGEL, J.A.; LONGLEY, M.A.; BUNDMAN, D.; CHENG, C.; LICHTI, U.; BISHOP, M.E.; STEVEN, A.C.; STEINERT, P.M.; (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell.* 61:1103-1112.
- MEYER JONES, L. (1959). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Primera Ed. en español trad. de segunda Ed. En inglés. Edit. Uthea, Mexico.
- MIETTINEN, P.J.; BERGER, J.E.; MENESES, J.; PHUNG, Y.; PEDERSED, R.A.; WERB, Z.; DERYNCK, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature.* 376:337-341.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MISSERO, C.; Di CUNTO, F.; KIYOKAWA, H.; KOFF, A.; DOTTO, G. P. (1996). The absence of p21 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev.* 10:3065-3075.
- MIYAMOTO, J. (1976). Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroid. *Environ Healt Perspect.* 14:15-28.
- MONEY, C.A.; SCROGGIE, J.G. (1981). The effect of *pour-on* veterinary products on sheep skins. Report MT20. Common wealth Scientific and Industrial Research Organization. Parkville.
- MORISHIMA, N.; NAKANISHI, K.; TAKENOUCHI, H.; SHIBATA, T.; YASUHIKO, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem.* 277: 34287-34294.
- MUKERJEE, N.; MC GINNIS, K.M.; PARK, Y.H.; GNEGY, M.E.; WANG, K.K. (2000). Caspase-mediated proteolytic activation of calcineurin in thapsigargin-mediated apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 379:337-343.
- MÜLLER, H.; MOHNSEN. (1999). Chronic sequelae and irreversible injuries following acute pyrethroid intoxication. *Toxicol Lett.* 107:161-175.
- NAKAGAWA, T. ; ZHU, H.;MORISHIMA, N.; LI, E.; XU, J.; YANKER, B.A.; YUAN, Y. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 403:98-103.
- NARAHASHI, T.; ZHAO, X.; IKEDA, T.; NAGATA, K.; YEH, J.Z. (2007). Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Hum Exp Toxicol.* 26:361-366.

- NARYZHNY, S.N.; ZHAO, H.; LEE, H. (2005) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) may function as a double homotrimer complex in the mammalian cell. *J Biol Chem.* 280:13888-13894.
- NAVARRETE, C.V.; GOMEZ, J.; BORRAS, F.E. (2003). Cord blood dendritic cells: subsets, functional characteristics and *in vitro* generation. *Leuk Lymphoma.* 44:923-928.
- NEWMAYER, D.D.; BOSSY-WETZEL, E.; KLUCK, R.M.; WOLF, B.B.; BEERE, H.M. GREEN, D.R. (2000). Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ* 7:402-407.
- NIEDERER, K.E.; MORROW, D.K.; GETTINGS, J.L.; IRICK, M.; KRAWIECKI, A.; BREWSTER, J.L. (2005). Cypermethrin blocks a mitochondria-dependent apoptotic signal initiated by deficient N-linked glycosylation within the endoplasmic reticulum. *Cell Signal.* 17:177-186.
- NISHIMURA, K.; OMATSU, M.; FUJITA, T. (1984) Physicochemical properties of pyrethroids and specific action potential changes Abstracts of the third international Conference of Neurotoxicology of Selected Chemical: Pyrethroids and Neuroactive Pesticide, Little Rock. Arkansas. USA.
- NORMAN, G.; STREINER, D. (1996). *Bioestadística*. Editorial Harcourt Brace, Barcelona, España.
- NUÑEZ, J.L.; MUÑOZ COBENAS, M.; MOLTEDO, H.L. (1982) *Boophilus microplus*, la garrapata común del ganado vacuno. Primera edición. Edit. Hemisferio Sur.
- O'CONNOR, D.S.; GROSSMAN, D.; PLESCIA, J.; Li, F.; ZHANG, H.; VILLA, A.; TOGNIN, S.; MARCHISIO, P.C.; ALTIERI, D.C. (2000). Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci.* 97:13103-13107.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ODA, K.; AVAKAWA, H.; TANAKA, T.; MATSUDA, K.; TANIKANA, C.; MORI, T.; NISHIMORI, H.; TAMAI, K.; TOKINO, T.; Nakamura, Y.; Taya, Y. (2000). p53AIP1, a potencial mediator of p53 dependent apoptosis and its regulation by ser46 phosphorylated p53. *Cell*. 102:849-862.
- ONUMA, H.; MASTUI, C.; MOROHASHI, M. (2001). Quantitative analysis of the proliferation of epidermal cells using a human skin organ culture system and the effect of DbcAMP using markers of proliferation (BrdU, Ki-67, PCNA). *Arch Dermatol Res*. 293:133-138.
- PARAMIO, J.M.; LAÍN, S.; SEGRELLES, C.; LANE, E.B.; JORCANO, J.L. (1998). Differential expression and functionally co-operative roles for the retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene*. 17:949-957.
- PARRISH, J.; LI, L.; KLOTZ, K.; LEDWICH, D.; WANG, X.; XUE, D. (2001). Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature*. 412: 90-94.
- PHILOGÈNE, B.J.R.; REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C. (2002) Produits phytosanitaires insectides d'origine végétale: promesses d'hier et d'aujourd'hui. En: *Biopesticides d'origine végétale*. (Regnault-Roger, C, Philogène, B.J.R., Vincent, C. Eds.). Tec&Doc Editions. Londres, pp.1-18.
- POTTEN, C.S.; BOOTH, C. (2002). Keratinocyte stem cells: a commentary. *J Invest Dermatol* .119:888-899.
- PLUCIENNIK, A.; DZANTIEV, L.; IYER, R.R.; CONSTANTIN, N.; KADYROV, F.A., MODRICH P. (2010). PCNA function in the activation and strand direction of MutL α endonuclease in mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:16066-16071.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PRELICH, G.; TAN, C.K.; KOSTURA, M.; MATHEWS, M.B.; SO, A.G.; DOWNEY, K.M.; STILLMAN, B. (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature*. 326:517-520.
- PRIVES, C.; HALL, P. (1999). The p53 pathway. *J Pathol*. 187: 112-126.
- RAO, L.; PEREZ, D.; WHITE, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*. 135:1441-1445.
- RAO, R.V; HERMEL, E.; CASTRO-OBREGON, S.; DEL RIO, G.; ELLERBY, L.; ELLERBY, H.M; BREDESEN, D. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*. 276:33869-33874.
- RAO, R.V.; CASTRO-OBREGON, S.; FRANKOWSKI, H.; SCHULER, M. STOKA, V.; DEL RIO, G.; BREDESEN, D.E.; ELLERBY, H.M. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 277:21836–21842.
- RASKIN, C.A. (1997). Apoptosis and cutaneous biology. *J Am Acad Dermatol*. 36:885-896.
- RASTOGI, R.P; RICHA; SINHA, R.P. (2009). Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI J*. 8:155-181.
- REAGAN-SHAW. S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. (2007). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 22:659-661.
- REED, J.C. (1997). Double identity for protein of the Bcl-2 family. *Nature*. 387:773-776.
- REY, F.; RODRÍGUEZ, F.M.; SALVETTI, N.R.; PALOMAR, M.M.; BARBEITO, C.G.; ALFARO, N.S.; ORTEGA, H.H. (2010). Insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine cystic ovarian disease. *J Comp Pathol*. 142:193-204.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- RICHTER, B.W.; DUCKETT, C.S. (2000). The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond. *Sci. STKE*. (44): PE1.
- ROBLES, A.I.; LARCHER, F.; WHLIN, R.B.; MURILLAS, R.; RICHIE, E.; GIMENEZ-CONTIL. B.; JORCANO, J.L.; CONTI, C.J. (1996). Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:7634-7638.
- ROSS, M.H.; KAYE, G.I.; PAWLINA, W. (2005). *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 4ta Edición. Pp. 863.
- RUBIO-MOSCARDO, F.; BLESA, D.; MESTRE, C., SIEBERT, R.; BALASAS, T.; BENITO, A.; ROSENWALD,A.; CLIMENT, J.; MARTINEZ, J.I.; SCHILHABEL,M.; IRAN E.L.; GESK, S.; ESTELLER, M.; DELEEuw, R.; STAUDT, L.M.; FERNANDEZ-LUNA, J.L.; PINKEL, D.; DYER, M.J.; MARTINEZ-CLIMENT, J.A. (2005). Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* .106:3214-3222.
- RUDEL, T.; BOKOCH, G.M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK 2. *Science*. 276:1571-1574.
- RUFF, A.L.; DILLMAN J.F. (2007). Signaling molecules in sulfur mustard-induced cutaneous injury. *Eplasty*. 8:e2.
- RUPA, D.S.; REDDY, P.P.; REDDI, O.S (1991). Clastogenic effect of pesticides in peripheral lymphocytes of cotton-field workers. *Mutat Res*. 261:177-180.
- SAELENs, X.; FESTJENS, N.; VANDE; WALLE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDNABEELE, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 23:2861-2874.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SAKAHIRA, H.; ENARI, M.; NAGATA, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 391:96-99.
- SALEH A.; SRINIVASULA, S.M.; BALKIR, L.; ROOBINS, P.D.; ALNEMRI, E.S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*. 2:476-483.
- SALVESEN G.S.; DIXIT, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:10964-10967.
- SANTONI, G.; CANTALAMESSA, F.; CAVAGNA, R.; ROMAGNOLI, S.; SPREGHINI, E, PICCOLI, M. (1998). Cypermethrin-induced alteration of thymocyte distribution and functions in prenatally-exposed rats. *Toxicology*.125:67-78.
- SARDET, C.; VIDAL, M.; COBRINIK, D.; GENG, ONUFRYK, C.; CHEN, A.; WEINBERG, R. A. (1995). E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:2403-2407.
- SAUNDERS, J.W. J.R.; GASSELIING, M.T. (1962). Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Dev Biol*. 5:147-178.
- SAVILL, J.; FADOK, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 407:784-788.
- SCHIMMER AD. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*. 64:7183-7190.
- SCHWEICHEL, J.U.; MERKER, H.J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 7:253-266.
- SCORRANO, L.; OAKES, S.A.; OPFERMAN, J.T.; CHENG, E.H.; SORCINELLI, M.D.; POZZAN, T.; KORSMEYER, S.J. (2003). Bax and Bak regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*. 300:135-139.

- SHERR, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73:1059–1065.
- SHIMIZU, H.; NISHIKAWA, T.(1993). Application of an image analyzer to gold labeling in immunoelectron microscopy to achieve better demonstration and quantitative analysis. *J Histochem Cytochem.* 41:123-128.
- SHIRAKATA, Y. (2010). Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *J Dermatol Sci.* 59:73-80.
- SHUKLA, Y.; TANEJA, P. (2002). Mutagenic potential of cypermethrin in mouse dominant lethal assay. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 21:259-265.
- SÖDERLUND, V.; TANI, E.; DOMANSKI, H.; KREICBERGS, A. (2002). Representativeness of radiologically guided fine-needle aspiration biopsy of bone lesions. *2:61-68.*
- SODERLUND, D.M. (2008). Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Manag Sci.* 64:610-616.
- SPIEGEL, M.R. (1991). Probabilidad y estadística. Editorial McGraw Hill, Buenos Aires.
- STEINERT, P.M.; CANDI, E.; TARCSA, E., MAREKOV, L.N.; SETTE, M.; PACI, M.; CIANI, B.; GUERRIERI, P.; MELINO, G. (1999). Transglutaminase crosslinking and structural studies of the human small proline rich 3 protein. *Cell Death Differ.* 6:916-930.
- STEINERT, P.M.; MAREKOV. (1997). Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J Biol Chem.* 272:2021-2030.
- STENNICKE, H.R.; JURGENSMEIER, J.M; SHIN, H.; DEVERAUX, Q.; WOLF, B.B; YANG, X.; ZHOU, Q.; ELLEERBY, H.M, ELLERBY, L.M.; BREDESEN, D.; GREEN, D.R; REED, J.C.; FROELICH, C.J; SALVESEN, G.S. (1998). Procaspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem.* 273:27084-27090.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- STOITZNER, P.; PFALLER, K.; STOSSEL, H.; ROMANI, N. (2002). A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol.* 118:117-125.
- STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V.M. (2000). Apoptosis signalling. *Ann Rev Biochem.* 69:217-245.
- STRZALKA, W.; ZIEMIENOWICZ, A. (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot.* 107:1127-1140.
- SULIMAN, A.; LAM, A.; DATTA, R.; SRIVASTAVA, R.K. (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene.* 20:2122-2133.
- SUN, X.M.; MACFARLANE, M.; ZHUANG, J.; WOLF, B.B.; GREEN, D.R.; COHEN, G.M. (1999). Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 274:5053-5060.
- SURALLES, N.; XAMENA, A.; CREUS, J.; CATALAN, H.; NORPPA, R.; MARCOS, S. (1995) Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 341:169-184.
- SUSIN, S.A.; DAUGAS, E.; RAVAGNAN, L.; SAMEJIMA, K.; ZAMZAMI, N.; OEFFLER, M.; COSTANTINI, P.; FERRI, K.F., IRINOPOULOU, T.; PREVOST, M.C.; BROTHERS G.; MAK, T.W. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 192:571-580.
- TAN, C.K.; CASTILLO, C.; SO, A.G.; DOWNEY, K.M. (1986) An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *J Biol Chem.* 261:12310-12316.
- THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1326.

- TOMNLIN, C. (1994) A World Compendium the Pesticide Manual. Incorporating the agrochemical handbook (10th Ed.). Bungay Suffolk, U.K.: Crop Protection Publications.
- URANO, F.; WANG, X.Z. BERTOLOTTI, A.; ZHANG, Y.; CHUNG, P.; HARDING, D. RON, H.P. (2000). Science. 287:664-666.
- UTZ, P.J.; ANDERSON, P. (2000). Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signalling molecules. Cell Death Differ. 7:589-602.
- VAN LOO, G.; VAN GURP, M.; DEPUYDT, B.; SRINIVASULA, S.M.; RODRIGUEZ, I.; ALNEMRI, E.S.; GEVAERT, K.; VANDEKERCKHOVE, J.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. Cell Death Differ. 9:20-26.
- VAQUERO, M. (2000). Apoptosis: ser o no ser, ésa es la cuestión. Med Clin. 114:144-156.
- VAUX, D.L. (1993). Towards an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. Proc Natl Acad Sci USA. 90:786-792.
- VIJVERBERG, H.P.; VAN DEN BERCKEN, J. (1990) Neurotoxicological effects and mode of action of pyrethroid insecticides. Crit Rev Toxicol. 21:105-126.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. (1992). Carcinogens leave fingerprints. Nature. 355:209-210.
- WAJANT, H. (2002). The Fas signalling pathway: more than a paradigm. Science. 296:1635-1636.
- WEBB, A.; LI, A.; KAUR, P. (2004). Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. Differentiation. 72:387-395.

- WEEDON, D. (1990). Apoptosis: its nature and implications for dermatopathology. *Am J Dermatopathol.* 1:133-144.
- WERNER, S.; GROSE, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 83:835-870.
- WESTER, R.C.; MAIBACH, H.I.; BUCKS, D.A.; AUFRERE, M.B. (1984) In vivo percutaneous absorption of paraquat from hand, leg, and forearm of humans. *J Toxicol Environ Health.* 14:759-762.
- WILLIAMAS, A.C.; BARRY B.W. (1991). Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharm Res.* 8:17-24.
- WOOSLEY, J.T. (1991). Measuring cell proliferation. *Arch Pathol Lab Med.* 115:555-557.
- XIONG, Y.; CONNOLLY, T.; FUTCHER, B.; BEACH, D. (1991). Human D-type cyclin. *Cell.* 65:691-699.
- XIONG, Y.; ZHANG, H.; BEACH, D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell.* 71:505-514.
- YANG, E.; ZHA, J.; JOCKEL, J.; BOISE, L.H.; THOMPSON, C.B.; KORMEYER, S.J.; AD. (1995). A heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2 displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* 80:285-291.
- YIN, C.; KNUDSON, C.M.; KORMEYER, S.J.; VAN DYKE, T. (1997). Bax supresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo*. *Nature.* 385:637-640.
- ZHA, J.; HARADA, H.; YANG, E.; JOCKEL, J.; KORSMEYER, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist Bax in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-xL. *Cell.* 87:619-628.
- ZHAN, Q.; FAN, S.; BAE, I.; GUILLOUF, C.; LIEBERMANN, D.A.; O'CONNOR, P.M.; FORNACE, A.J. (1994). Induction of Bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene.* 9:3743-3751.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZOU, H.; HENZEL, W.J.; LIU, X.; LUTSCHG, A.; WANG, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome-c-dependent activation of Caspase-3. *Cell*. 90:405-413.

8. ANEXO



PREPARACION DE BUFFER Y SOLUCIONES**1. Buffer Salino de Fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2**Preparación solución stock (PBS 10X):

Na ₂ HPO ₄	11,4 g
(o Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O)	28,75 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	3,3 g
(o NaH ₂ PO ₄)	2,54 g
Agua destilada	1.000 ml

Preparación solución de trabajo (PBS 1X):

NaCl	8 g
Solución Stock	100 ml
Completar con agua destilada hasta	1.000 ml

Observación:

Controlar pH y ajustar con NaOH 1N o HCl 1N gota a gota.

2. Buffer Citrato 0,01M, pH 6,00Preparación solución stock:

Ácido Cítrico (C₆H₈O₇ PM 192.13) 19,2 g

Disolver en 500 ml de agua destilada

Controlar pH y ajustar con NaOH 2N gota a gota.

Completar con agua destilada hasta 1.000 ml

Preparación solución de trabajo:

Solución Stock	1 volumen (Congelado X 50ml)
Completar con agua destilada hasta	500 ml
Controlar pH	

3. Buffer EDTA 1mM, 0,0 5% Tween 20, pH8.0.

Preparación solución de trabajo:

EDTA	0,37g
Agua destilada	1000ml
(Agitar hasta que se disuelva)	
Ajustar pH a 8.0 con NaOH 1N	
Agregar 0,5 ml de Tween 20	

Almacenamiento:

Solución de trabajo en heladera

4. Solución de Bloqueo para IHQ (Suero Normal de Cabra al 10%)

Preparación solución de trabajo:

Buffer Salino de Fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2	90 ml
Suero Normal de Cabra	10 ml
Azida Sódica	0,1 g
Azul de metileno	trazas hasta lograr un leve color azul

5. PBS-BSA para dilución de anticuerpos

Preparación solución de trabajo:

Buffer Salino de Fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,2	100 ml
Albúmina Sérica Bovina	1 g
Azida Sódica	0,1 g