

PLAGUICIDAS DISRUPTORES ENDÓCRINOS, USO DEL NEMATODO CAENORHABDITIS ELEGANS COMO MODELO BIOLÓGICO

THE NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS AS AN EMERGING BIOLOGICAL
MODEL TO STUDY ENDOCRINE DISRUPTOR PESTICIDES

Aldana Moya (Cátedra de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires)*, **Florencia Kronberg** (Instituto de Biociencias Agrícolas y Ambientales, CONICET. / Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires)*, **Araceli Clavijo** (Instituto de Biociencias Agrícolas y Ambientales, CONICET / Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires), **Daniel Mazzarella** (Cátedra de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires / Dirección de Agroquímicos y Biológicos, Senasa), **Eduardo Pagano** (Instituto de Biociencias Agrícolas y Ambientales, CONICET / Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires) y **Eliana R. Munarriz** (Instituto de Biociencias Agrícolas y Ambientales, CONICET / Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires) - Argentina

*Estos autores contribuyeron equitativamente en este trabajo.

Resumen

Un disruptor endócrino (DE) es una sustancia exógena capaz de desbalancear el sistema endócrino, afectando funciones vitales como la reproducción, el metabolismo, el crecimiento, la función cardíaca y el balance de minerales.

La complejidad del tema obliga a los investigadores, a la industria y a los entes reguladores a estudiar de manera conjunta los efectos potenciales de la exposición a DE. Para esclarecer las problemáticas asociadas, es necesario proponer un modelo experimental alternativo al de mamíferos, que les permitirá adecuarse a las futuras normativas internacionales.

Este proyecto plantea el uso del nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico para el estudio de los mecanismos de acción de los plaguicidas con potencial actividad disruptora endócrina. Este organismo ha resultado un excelente modelo *in vivo* en disciplinas como biología del desarrollo, genética, ciencias médicas y toxicología. Su ciclo de vida corto, su fácil y bajo costo de mantenimiento y la abundante bibliografía acerca de su fisiología posibilitan el desarrollo de pruebas toxicológicas eficientes y económicas.

La información alcanzada en este estudio aportará datos importantes para la estimación de riesgo de plaguicidas con actividad disruptora endócrina y para la innovación de las políticas reguladoras de protección de la salud humana y del medioambiente.

Palabras claves: *Caenorhabditis elegans*, disrupción endócrina, plaguicidas, modelo biológico.

Abstract

An endocrine disruptor (ED) is an exogenous substance that causes an imbalance in the endocrine system and adversely affects many biological functions such as reproduction, metabolism, growth, heart rate and fluid balance.

The complexity of this matter requires an interdisciplinary approach from researchers, industry societies and control organizations to fully understand the potential effects of ED compounds. On top of that more important issues that are pending to be solved like the large amount of compounds to be tested for endocrine disruption activity and to establish an *in vivo* biological model that embrace animal protection regulation to perform all these new set of experiments.

This project suggests the nematode *Caenorhabditis elegans* as a biological model to study the mechanisms of action of pesticides with putative endocrine disrupting activity. *C. elegans* has been studied and used as a model organism in several disciplines such as developmental biology, genetics, medical sciences and toxicology. Its short life cycle, simplicity and low cost maintenance together with the large amount of literature on its biology makes *C. elegans* a perfect tool to develop protocols for efficient and economical compounds screening.

The results obtained in this study would provide important data that will help to estimate the risk of pesticides in relation with its endocrine disrupting activity. This information will be useful to modify regulatory policies in order to protect the environment and human health.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, endocrine disruption, pesticides, biological model.

El presente proyecto se desarrollará en el marco de los Premios Senasa a la Investigación, Transferencia y Comunicación 2014-2015, convocatoria en la cual ha resultado galardonado con el primer puesto en la categoría de Protección Vegetal para grupos en formación. La ejecución se llevará a cabo en el Instituto de Biociencias Agrícolas y Ambientales del CONICET y en la cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de Buenos Aires.

Relevancia y justificación del proyecto

La potencial actividad disruptora endócrina que poseen ciertas sustancias ha recibido una gran atención de expertos clínicos e investigadores, de la industria y de organizaciones gubernamentales de todo el mundo. Sin embargo, los resultados científicos y las observaciones realizadas respecto a las alteraciones en el sistema endócrino son controversiales, generando una mayor preocupación por estos compuestos.

Debido a la importancia de la incidencia de desórdenes y enfermedades causados por los disruptores endócrinos (DE), es que surge la necesidad de incluir en la evaluación técnica realizada habitualmente a los plaguicidas para su registro y comercialización, ensayos toxicológicos que examinen la homeostasis y la funcionalidad del sistema hormonal. Esto trae aparejado por un lado, la dificultad de analizar miles de nuevos compuestos por año; y, por el otro, la reevaluación de los plaguicidas que se encuentran en el mercado actual. Asimismo, el daño que ocasionan los DE frecuentemente no es apreciado hasta un tiempo después de la exposición y puede afectar incluso la descendencia de los organismos expuestos. Consecuentemente, los ensayos toxicológicos que evalúen DE deberían incluir observaciones en las distintas fases del desarrollo del organismo estudiado y con minuciosa observación de los efectos transgeneracionales.

Para abordar estas problemáticas, este plan de trabajo propone el uso del nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico para el estudio toxico-molecular de los mecanismos por los cuales actúan los DE.

Introducción

Sistema endócrino y disruptores endócrinos

El sistema endócrino es una compleja red de glándulas, hormonas y receptores que provee la llave de comunicación y enlace entre el sistema nervioso y las funciones vitales del cuerpo, como la reproducción, la inmunidad, el metabolismo y el comportamiento (Lintelmann *et al.*, 2003). Como las hormonas regulan tres procesos biológicos esenciales (la reproducción, la óptima supervivencia y un desempeño biológico normal), el mantenimiento y conservación de las especies depende del correcto funcionamiento del sistema endócrino.

Existen agentes exógenos, como es el caso de ciertos plaguicidas, que pueden actuar como pseudohormonas, interfiriendo con el normal funcionamiento del sistema endócrino en humanos y animales (Figura 1). A estas sustancias se las denomina “disruptores endócrinos” (DE) (Lintelmann *et al.*, 2003; Colborn *et al.*, 1993).

Un DE es definido por la Comunidad Económica Europea como una “sustancia exógena que causa efectos adversos sobre la salud de los organismos o de su progenie, como resultado de cambios en la función endócrina” (European Commission, 1997). A su vez, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos detalla este concepto y lo describe como “un agente exógeno que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de hormonas naturales que están presente en el cuerpo y son responsables de la homeostasis, reproducción, desarrollo o comportamiento” (U. S. EPA, 1997). En conclusión, estas sustancias químicas, exógenas al organismo, actúan como agonistas o antagonistas hormonales pudiendo alterar la homeostasis del sistema endócrino (Olea *et al.*, 2002). En forma potencial pueden causar enfermedades o deformidades en los organismos y su descendencia (McKinlay *et al.*, 2008).

Los DE pueden actuar en diferentes pasos claves dentro de los mecanismos hormonales, imitando la acción de la hormona natural, uniéndose y activando receptores hormonales (acción agonista). También pueden unirse a los receptores sin activarlos. Esta acción antagonista

bloquea los receptores e inhibe su acción (Figura 1). Finalmente, los DE pueden interferir con la síntesis, transporte, metabolismo y eliminación de hormonas, disminuyendo de este modo la concentración de la hormona natural.

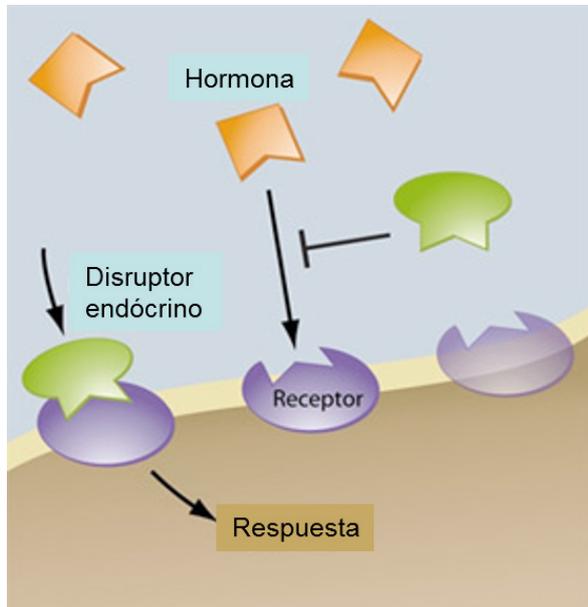


Figura 1: Mecanismo de acción de los disruptores endócrinos que mimetizan hormonas. Imagen modificada de Erbach (2012).

gran número de países debido a que poseen actividad disruptora endócrina en humanos y animales.

Como consecuencia de la creciente preocupación por el efecto que producen los plaguicidas DE en la función del sistema hormonal de la población humana y animal, los gobiernos de diferentes países desarrollados han elaborado una lista de plaguicidas identificándolos como sustancias sospechosas o de comprobada actividad disruptora endócrina (PAN UK, 2009). Se han enumerado al menos 105 sustancias potenciales DE, de las cuales un 46 % son insecticidas, un 21 % herbicidas y un 31 % fungicidas (Minf *et al.*, 2011). En la Tabla 1 se detallan los mecanismos generalizados de acción que tendrían algunos grupos de plaguicidas DE. Algunos de estos productos fueron prohibidos o su uso fue restringido por medio de convenciones internacionales (*The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, The Rotterdam Convention on Prior Informed Consent, The Convention on Long-range Transboundary Air Pollution*).

Plaguicidas con actividad disruptora endócrina

Los efectos relacionados con la disrupción endócrina causada por la exposición a ciertos plaguicidas han sido documentados desde hace varias décadas. Los primeros efectos negativos observados sobre humanos y animales fueron en la década del 40 con la aplicación indiscriminada de DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano). Singer (1949) fue uno de los primeros que evidenció la reducción en el número de espermatozoides en aplicadores aéreos de DDT. Otro ejemplo de plaguicida con actividad disruptora endócrina es el endosulfán, que se observó que provoca la caída de pelo, el incremento en el tamaño de los riñones y el aumento en la toxicidad del hígado en ratas adultas expuestas en forma crónica a dosis subletales (Silva y Gammon, 2009). Ciertamente, la mayoría de los insecticidas pertenecientes al grupo de los organoclorados (DDT, endosulfán, mirex, aldrín) fueron prohibidos en un

Plaguicida	Usos	Hormonas afectadas	Mecanismo
Órgano-fosforados	La mayoría insecticidas	Hormonas tiroideas Estrógenos	Impiden la unión de la hormona tiroidea a su receptor. Aumentan la expresión de genes de respuesta a estrógenos.
Carbamatos	Fungicidas y herbicidas	Andrógenos Estrógenos Esteroides	Desconocido. Se estima que afecta los mecanismos asociados al andrógeno-receptor. Se ha demostrado que interfiere con la formación de microtúbulos en células sensibles a estrógeno.
Triazinas	Herbicidas	Andrógenos	Inhibición de los ligandos naturales que se unen a los receptores androgénicos y a las proteínas que vinculan andrógenos. Algunos provocan o inhiben la expresión/actividad de aromatasa, enzima que convierte el andrógeno en estrógeno.
Piretroides	Insecticidas	Estrógenos Progesterona	Antagonizan o potencian la acción de los estrógenos, actuando sobre el receptor de estrógeno o posiblemente por un camino de señalización alternativo. Algunos inhiben la acción de la progesterona por afectar a la hormona.

Tabla 1: Potenciales plaguicidas con actividad disruptora endócrina

Una de las características más peculiares de los DE es que no siguen un patrón de curva dosis-respuesta monotónica (a mayor dosis, mayor efecto negativo). Su forma puede ser, por ejemplo, de U o de U invertida (Figura 2), indicando que pueden provocar efectos tóxicos a dosis altas, ningún efecto a dosis intermedias y efectos adversos a dosis bajas o viceversa (U. S. EPA, 2013). Por lo tanto, los ensayos de toxicidad estandarizados en la normativa actual no detectan los efectos adversos que producen los DE a dosis bajas, debido a que cuando no se detectan efectos adversos a dosis superiores, no se continúan los estudios a bajas concentraciones. En consecuencia, el cambio de paradigma de los modelos de dosis-respuesta en los últimos años y la “hipótesis de la baja dosis” exhiben la necesidad de realizar cambios fundamentales en los ensayos toxicológicos tradicionales, para mejorar la evaluación y el control de los posibles riesgos para la salud humana.

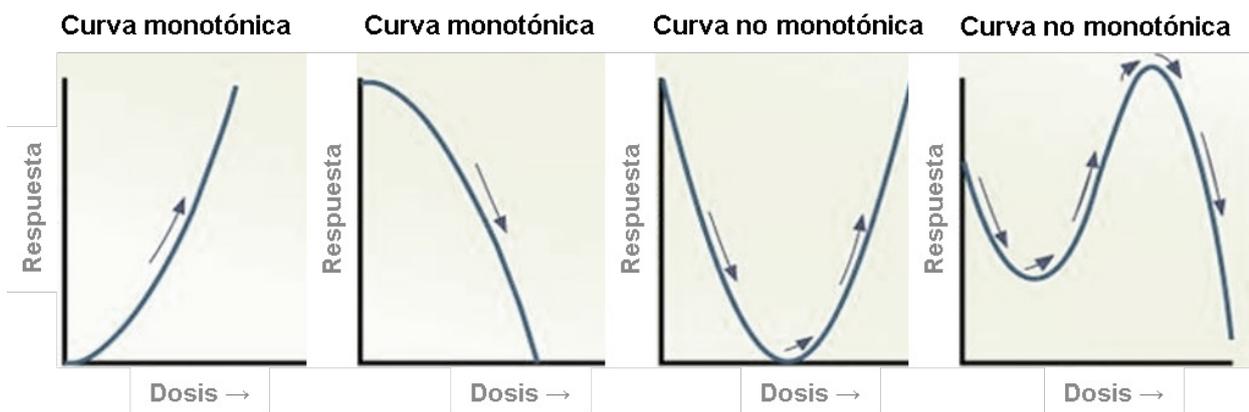


Figura 2: Ejemplos de curvas dosis-respuesta monotónicas y no monotónicas. Imagen modificada de U. S. EPA (2013).

El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico tóxico-molecular

C. elegans es un nematodo del suelo de vida libre y no parásito, común en todo el mundo (Figura 3). Es considerado un organismo modelo en biología de desarrollo, genética y ciencias médicas, haciéndolo el mejor organismo multicelular investigado. Luego de la secuenciación completa del genoma de *C. elegans* en 1998, muchos científicos se vieron atraídos a estudiar la regulación de las funciones corporales a nivel genético. Varias investigaciones han demostrado que el genoma de *C. elegans* contiene entre 60 y 80 % de los genes encontrados en humanos y comparten un variado número de mecanismos involucrados en el funcionamiento neuronal, y en la regulación y señalización de genes (Leung *et al.*, 2008; Roh y Choi, 2008).

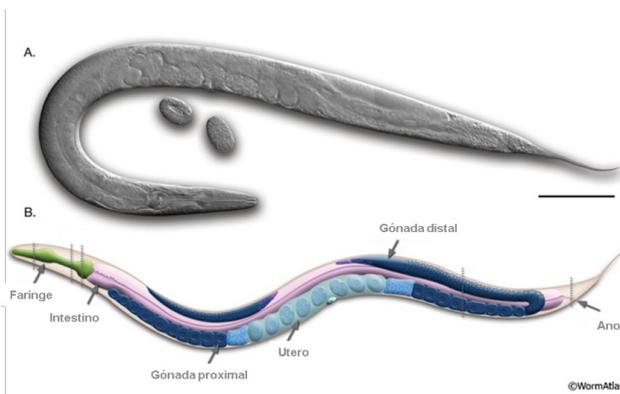


Figura 3: Anatomía de un hermafrodita adulto de *C. elegans*. Imagen modificada de Altun y Hall (2015).

Cabe subrayar que *C. elegans* se convirtió en un excelente modelo biológico debido en parte a su corto ciclo de vida (cerca de tres días), alta reproducción, una dieta simple a base de *Escherichia coli* y un manejo sencillo en el laboratorio. Además, existe una gran variedad de herramientas de biología molecular para su manipulación, que permiten hacer experimentos genéticos y transgénicos de manera más fácil en comparación a otros modelos animales, ofreciendo la posibilidad de estudiar en detalle mecanismos biológicos a nivel molecular.

Se ha demostrado en investigaciones recientes que los nematodos poseen criterios de valoración sensibles para realizar análisis toxicológicos (Dhawan *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2004; Höss *et al.*, 2013). Por ejemplo, se han utilizado para analizar los riesgos potenciales de plaguicidas (Höss *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2012; Anbalagan *et al.*, 2013), de químicos (Yamamuro *et al.*, 2011; Sochova *et al.*, 2007) y metales pesados (Chapman *et al.*, 2013; Swain *et al.*, 2004). Diversos estudios evidenciaron los efectos adversos en el comportamiento reproductivo, locomoción y la conducta alimentaria de varios plaguicidas como *aldicarb* (Nonet *et al.*, 1998), *paraquat* (Hartman *et al.*, 1995) y compuestos organofosforados (Roh y Choi, 2008; Leelaja & Rajini, 2013).

Los valores de DL50 (dosis letal 50) obtenidos en *C. elegans* para plaguicidas son similares a los de ratas y ratón, validando a este organismo modelo para estudios de toxicidad en animales en organismos no blancos (Raley-Susman, 2014). Asimismo, varias investigaciones demostraron que la sensibilidad de *C. elegans* es comparable con la de otros organismos, tales como enquitreidos, lombrices y colémbolos, pero con la ventaja de que su manejo demanda menor tiempo y espacio (Anderson *et al.*, 2004; Cole *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 2001; Kammenga y Riksen, 1996).

El amplio conocimiento del genoma de *C. elegans* permite el desarrollo de nuevos métodos para detectar disrupciones en funciones específicas de la regulación hormonal. La combinación de la evaluación de diferentes niveles organizacionales como genoma, órgano, organismo y población posibilita evaluar la disrupción endócrina sobre la base de modos de acción específicos. Por esta razón, *C. elegans* es un organismo ampliamente utilizado en el área de la toxicología molecular, tanto para la realización de estudios mecanísticos (que consisten en identificar el mecanismo celular alterado) como para la ejecución de experimentos de *screening* a gran escala (donde se buscan los *target* moleculares de toxicidad y el efecto de nuevos químicos) (Leung *et al.*, 2008; Boyd *et al.*, 2010).

Frente a la problemática de los efectos adversos de los plaguicidas, se ha formulado un modelo conceptual basado en que un mayor número de investigaciones deberían enfocarse en la vinculación entre los mecanismos moleculares y los efectos que se suceden entre los niveles de organización biológica (Figura 4) (Anderson *et al.*, 1994). El modelo comienza a nivel molecular y finaliza con las potenciales consecuencias a niveles de mayor orden (poblacional). Los cambios en el comportamiento son a menudo la primera señal de los efectos nocivos de los plaguicidas. Estas alteraciones moleculares suelen ocurrir a bajas dosis y a largo plazo, principalmente cuando las exposiciones ocurren durante los períodos de desarrollo en los que los individuos son más sensibles.

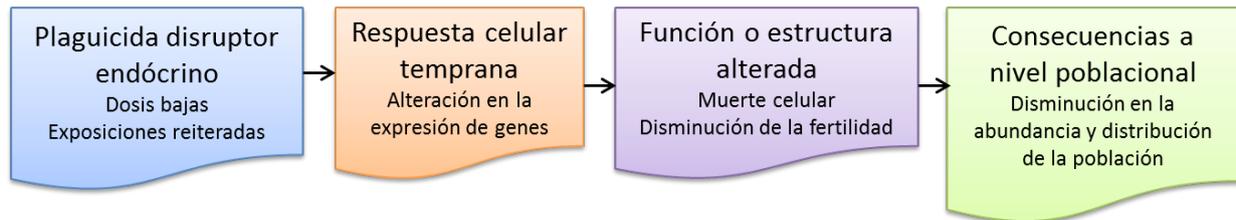


Figura 4: Modelo conceptual de los posibles efectos de los plaguicidas con actividad disruptora endócrina.

Objetivo general

El objetivo de este proyecto es implementar al nematodo *C. elegans* como modelo biológico para estudiar el efecto de plaguicidas con potencial actividad disruptora endócrina.

Objetivos específicos y actividades principales del proyecto

Análisis del efecto de plaguicidas con potencial actividad disruptora endócrina sobre el ciclo de vida y el comportamiento del nematodo C. elegans

En este objetivo se evaluarán los efectos de los plaguicidas con potencial actividad disruptora endócrina sobre la descendencia y comportamiento de *C. elegans*. Existe un gran número de estudios en los que se evidencian los efectos sobre el comportamiento reproductivo, la movilidad y la conducta alimentaria a exposiciones subletales a varios plaguicidas.

Se evaluarán los efectos toxicológicos de la exposición crónica (a bajas concentraciones y a largo plazo) de los nematodos a diferentes plaguicidas (insecticidas y herbicidas) que fueron listados como DE o con potencial actividad disruptora endócrina. Los ensayos se realizarán durante la vida de varias generaciones de individuos.

Los nematodos (cepa salvaje N2 Bristol obtenida del CGC) se crecerán en medio NGM alimentado con un césped de *E. coli*, cepa OP50-1. Cada exposición y los controles correspondientes se realizarán por cuadruplicado a varias concentraciones del plaguicida a evaluar y se incubarán a 22 °C. Los criterios de valoración que se analizarán son viabilidad, crecimiento, fertilidad, reproducción, desarrollo y comportamiento. Los ensayos se realizarán utilizando nematodos en diferentes estadios de desarrollo según el proceso que se desee estudiar (Figura 5).

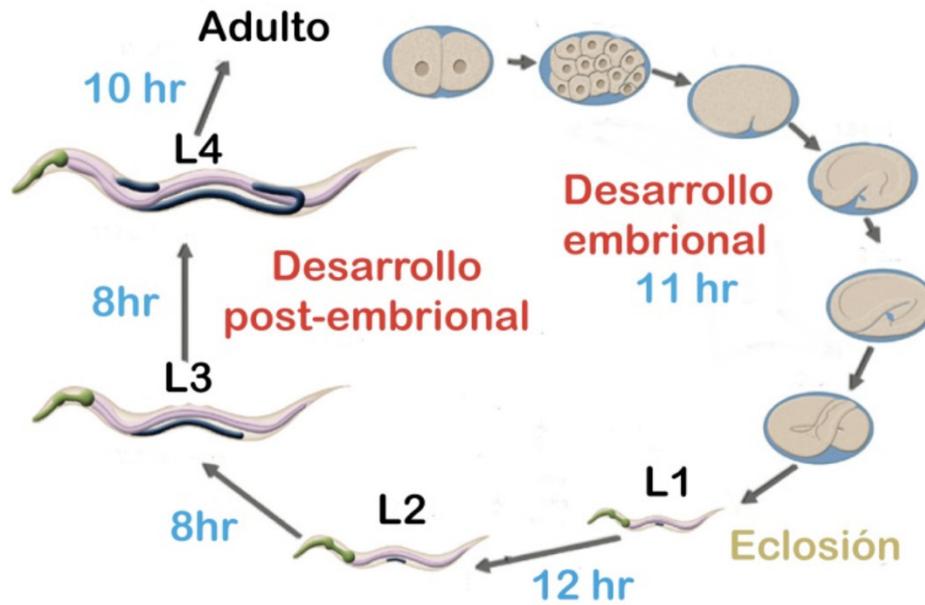


Figura 5: Ciclo de vida de *C. elegans*. Imagen modificada de Altun y Hall (2015).

A continuación se definen los parámetros para analizar luego de la exposición de los nematodos a los plaguicidas:

- Para el análisis de las curvas de crecimiento y viabilidad se usarán nematodos tanto en L1 como en L4. Se determinará el tamaño del cuerpo según Wang y Yang (2007), el porcentaje de animales grávidos (solo para el ensayo con L1) y el porcentaje de nematodos muertos por inspección visual según Roh y Choi (2008).
- El análisis del impacto sobre la fertilidad y la embriogénesis se realizará sobre animales sexualmente maduros (estadio larval L4). Luego de 24 horas de exposición se contará el número de huevos depositados por los animales (fertilidad) y a las 48 horas se cuantificará la eclosión de los huevos (viabilidad de la generación sucesiva).
- Se utilizarán nematodos adultos para el estudio de los efectos en la locomoción, en la alimentación y en los patrones de comportamiento según Anderson *et al.* (2004); Dhawan *et al.* (1999) y Wang & Xing (2008).

Identificación de los procesos moleculares afectados por la exposición a plaguicidas potenciales DE en C. elegans

En este objetivo específico se identificarán los mecanismos moleculares mediante los cuales los diferentes plaguicidas DE provocan efectos en el organismo utilizando la técnica de RNA de interferencia. La individualización de los genes involucrados en estos mecanismos permitirá el futuro desarrollo de marcadores moleculares para la disfunción endócrina.

La técnica de RNA de interferencia (RNAi) en *C. elegans* consiste en alimentar a los nematodos con cepas de *E. coli* recombinantes que expresan las secuencias de RNA doble cadena específico para cada gen del genoma del nematodo. Como consecuencia, en el nematodo que consume esta bacteria se produce la inactivación de solo un gen específico (por cada cepa de bacteria). Las cepas de *E. coli* se obtendrán de la colección de RNAi de *C. elegans* de Source BioScience. Esta colección posibilitará inactivar todos los genes del genoma del nematodo individualmente y uno por vez.

De esta manera, por ejemplo, si el plaguicida X produce un efecto en el crecimiento del nematodo con una reducción en el tamaño corporal, para identificar los genes blanco o genes involucrados en el mecanismo de acción de X se realizará el siguiente experimento. Se pondrán los nematodos en contacto con X y se los alimentará en forma independiente con todas las cepas de la colección de RNAi. Se obtendrán tres posibles resultados con respecto al crecimiento del nematodo:

- a) No afecta: no existe diferencia entre los nematodos tratados con X alimentados con una cepa de bacteria control y una cepa de bacteria RNAi.
- b) Recupera el crecimiento: el nematodo tratado con X y alimentado con bacterias RNAi crece como si no hubiera estado en contacto con X.
- c) Crece menos aún: el nematodo tratado con X y alimentado con las bacterias RNAi es más pequeño, o muere, comparado con el tratado con X y alimentado con las bacterias control.

Como conclusión se obtiene que los genes que pertenecen a las categorías b y c son posibles blancos moleculares del plaguicida X o intervienen en los mecanismos de acción de este en el nivel molecular (Figura 6). Posteriormente, los genes identificados en este *screening* servirán para el desarrollo de posibles marcadores moleculares de disrupción endócrina.

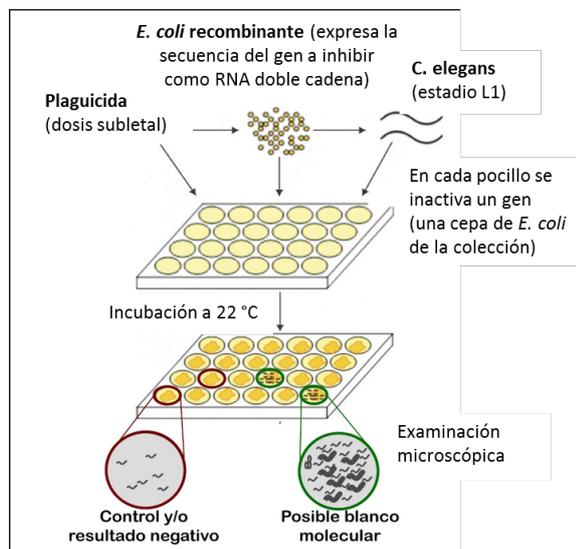


Figura 6: Esquematización del método de identificación de los blancos moleculares de los plaguicidas DE por la técnica de RNA de interferencia por alimentación.

Sostenibilidad

El proyecto aquí presentado servirá como experimento piloto para establecer protocolos experimentales para la evaluación de sustancias disruptoras endócrinas utilizando el nematodo *C. elegans* como modelo

biológico. Una vez establecido, dicho protocolo será aplicable a todos los compuestos que el Senasa considere necesario evaluar.

Es importante destacar que este proyecto permitirá afianzar el convenio de colaboración científica y tecnológica entre Senasa y CONICET firmado el 22 de noviembre de 2012 por el presidente de CONICET, Dr. Roberto Salvarezza, y el expresidente del Senasa, Dr. Marcelo Miguez, para promover la realización de actividades de cooperación institucional (Resolución D. N.º 4049 de CONICET).

Bibliografía

Ali, S. y P. Rajini (2012), "Elicitation of dopaminergic features of Parkinson's disease in *C. elegans* by monocrotophos, an organophosphorous insecticide", *CNS and Neurological Disorders - Drug Targets* 11, pp. 993-1000.

Altun, Z. F. y D. H. Hall (2015), "Handbook of *C. elegans* Anatomy", *WormAtlas*, New York, WormAtlas [en línea]. Disponible en: <<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>>.

Anbalagan, C., Lafayette, I., Antoniou-Kourouniotti, M., Gutierrez, C., Martin, J., Chowdhuri, y De Pomerai, D. (2013), "Use of transgenic GFP reporter strains of the nematode *Caenorhabditis elegans* to investigate the patterns of stress responses induced by pesticides and by organic extracts from agricultural soils", *Ecotoxicology* 22, pp. 72-85.

Anderson, G., Cole, R. y P. Williams (2004), "Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*", *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (12), pp. 35-40.

Anderson, S., Sadinski, W., Shugart, L., Brussard, P., Depledge, M., Ford, T., Hose, J., Stegeman, J., Suk, W., Wirgin, I. y G. Wogan (1994), "Genetic and molecular ecotoxicology: a research framework", *Environmental Health Perspectives* 102 (12), pp. 3-8.

- Boyd, W. A.; Smith, M. V.; Kissling, G. E. y J. H. Freedman (2010), "Medium- and high-throughput screening of neurotoxicants using *C. elegans*", *Neurotoxicology and Teratology* 32, pp. 68-73.
- Boyd, W. A.; Stringer, V. A. y P. L. Williams (2001), "Metal LC50s of a soil nematode compared to published earthworm data", *Environmental Toxicology and Risk Assess* 10, pp. 223- 235.
- Chapman, E., Dave, G. y J. Murimboh (2013), "A review of metal (Pb and Zn) sensitive and pH tolerant bioassay organisms for risk screening of metal-contaminated acidic soils", *Environmental Pollution* 179, pp. 326-42.
- Colborn, T., Vom Saal, F. S. y A. M. Soto (1993), "Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans", *Environmental health perspectives*, 101 (5), pp. 378-384.
- Cole, R. D.; Anderson, G. L. y P. L. Williams (2004), "The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity", *Toxicology and Applied Pharmacology* 194, pp. 248-256.
- Dhawan, R.; Dusenbery, D. y P. Williams (1999), "Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*", *Journal Toxicology Environmental Health* 58, pp. 451-462.
- Erbach, G. (2012), "Health threats from endocrine disruptors: A scientific and regulatory challenge. Health threats from endocrine disruptors: A scientific and regulatory challenge", en *Library Briefing*, Bruselas, Library of the European Parliament [en línea]. Disponible en: <[http://www.europarl.europa.eu/RegData/bibliotheque/briefing/2012/120303/LDM_BRI\(2012\)120303_REV1_EN.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/bibliotheque/briefing/2012/120303/LDM_BRI(2012)120303_REV1_EN.pdf)>.
- European Commission (1997), "European Workshop on Impact of endocrine disruptors on human health and wildlife", en *Proceeding of the European Workshop*, Weybridge (UK), European Commission [en línea]. Disponible en: <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/documents/reports_en.htm>.
- Hartman, P.; Childress, E. y T. Beyer (1995), "Nematode development is inhibited by methyl viologen and high oxygen concentrations at a rate inversely proportional to life span", *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 50(6), pp. B322-B326.
- Höss, S., Menzel, R., Gessler, F., Nguyen, H., Jehle, H. y W. Traunspurger (2013), "Effects of insecticidal crystal proteins (Cry proteins) produced by genetically modified maize (Bt maize) on the nematode *Caenorhabditis elegans*", *Environmental Pollution* 178, pp. 147-151.
- Kammenga, J. E. y J. A. Riksen (1996), "Comparing differences in species sensitivity to toxicants: phenotypic plasticity versus concentration-response relationships", *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, pp. 1649-1653.
- Leelaja, B. C. y P. S. Rajini (2013), "Biochemical and physiological responses in *Caenorhabditis elegans* exposed to sublethal concentrations of the organophosphorus insecticide, monocrotophos", *Ecotoxicology and environmental safety* 94, pp. 8-13.
- Leung, M., Williams, P., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K., Aschner, M. y J. Meyer (2008), "*Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology", *Toxicological Sciences* 106, pp. 5-28.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L. y A. Wenzel (2003), "Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report)", *Pure and Applied Chemistry* 75 (5), pp. 631-681.

- McKinlay, R.; Plant, J. A.; Bell, J. N. B. y N. Voulvoulis (2008), "Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment", *Environment International* 34 (2), pp. 168-183.
- Mnif, W., Hassine, A. I. H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O. y B. Roig (2011), "Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review", *International Journal of Environmental Research and public health* 8 (6), pp. 2265-2303.
- Nonet, M. L., Saifee, O., Zhao, H., Rand, J. B., y L. Wei (1998), "Synaptic Transmission Deficits in *Caenorhabditis elegans* Synaptobrevin Mutants", *The Journal of neuroscience* 18 (1), pp. 70-80.
- Olea, N.; Fernández, M. F.; Araque, P. y F. Olea-Serrano (2002), "Perspectivas en disrupción endócrina", *Gaceta sanitaria* 16 (3), pp. 250-256.
- PAN UK (Pesticide Action Network UK) (2009), "A catalogue of lists of pesticides identifying those associated with particularly harmful or environmental impacts", en *The list of lists*, London, Pesticide Action Network U [en línea]. Disponible en:
< http://www.pan-europe.info/Campaigns/pesticides/documents/cut_off/list%20of%20lists.pdf>.
- Raley-Susman, K. M. (2014), "Like a Canary in the Coal Mine: Behavioral Change as an Early Warning Sign of Neurotoxicological Damage", en Larramentdy, M. L. y S. Soloneski (eds.), *Pesticides - Toxic Aspects*, Rijeka, InTech, pp. 135-162.
- Roh, J. Y. y J. Choi (2008), "Ecotoxicological evaluation of chlorpyrifos exposure on the nematode *Caenorhabditis elegans*", *Ecotoxicology and environmental safety* 71 (2), pp. 483-489.
- Silva, M. H. y D. Gammon (2009), "An assessment of developmental, reproductive and neurobehavioral toxicology of endosulfan", *Birth Defects Research (Part B)* 86, pp. 1-28.
- Singer, P.L. (1949), "Occupational oligospermia", *Journal of the American Medical Association* 140, 1249.
- Sochova, I.; Hofman, J. y I. Holoubek (2007), "Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*", *Environment International* 33, pp. 798-804.
- Swain, S.C.; Keusekotten, K.; Baumeister, R. y S. R. Sturzenbaum (2004), "*C. elegans* Metallothioneins: New Insights into the Phenotypic Effects of Cadmium Toxicosis", *Journal of Molecular Biology* 341, pp. 951-959.
- U.S. EPA (1997), "Special report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis", *Office of Research and Development*, EPA/630/R-96/012, Washington D. C. US-EPA report [en línea]. Disponible en: <<http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/ENDOCRINE.PDF>>.
- U.S. EPA (2013), "Endocrine Disruption: State of the Science Non-Monotonic Dose Response Paper", *Endocrine Disruptor Research*, Washington D. C. US-EPA report [en línea]. Disponible en: <<http://epa.gov/ncct/edr/non-monotonic.html>>.
- Wang, D. y P. Yang (2007), "Multi-biological defects caused by lead exposure exhibit transferable properties from exposed parents to their progeny in *Caenorhabditis elegans*", *Journal of Environmental Sciences* 19, pp. 1367-1372.
- Yamamuro, D., Uchida, R., Takahashi, Y., Masuma, R. y H. Tomoda (2011), "Screening for Microbial Metabolites Affecting Phenotype of *Caenorhabditis elegans*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34, pp. 1619-1623.