



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

EFFECTOS CELULARES Y ACTIVACIÓN DE MUERTE CELULAR
INDUCIDA POR 4 INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS
EN 2 LÍNEAS CELULARES HUMANAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ EDUARDO ARTEAGA GÓMEZ

ASESORES:

DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
del FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efectos celulares y activación de muerte celular inducida por 4 insecticidas organofosforados en 2 líneas celulares humanas

Que presenta el pasante: José Eduardo Arteaga Gómez

Con número de cuenta: 305242286 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 31 de Marzo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|-------------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo | |
| VOCAL | M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez | |
| SECRETARIO | Q.F.B. Luis Alberto Parra Oaxaca | |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. Maritere Domínguez Rojas | |
| 2do. SUPLENTE | Dra. Dolores Molina Jasso | |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm

Agradecimientos.

A mi madre y a mis tías Cholita, Laura y Adriana, por cuidarme, guiarme, apoyarme y amarme incondicionalmente durante toda su vida.

A mi hermano y a sus magníficos hijos, por hacerme tan feliz sabiendo que toda la vida seremos un equipo y estaremos juntos para vencer cualquier obstáculo.

A mis queridos primos Ruiz Gómez, por haberme cuidado y querido desde que era un niño, y a sus familias por darme tanto amor y cuidados.

A Toño, Darío, a mis amigos "del poste" y a todas sus familias, por tantos años de amistad, risas, fiestas y apoyo incondicional.

A Montserrat Chávez por su motivación día con día, sus consejos y su maravilloso apoyo.

A la Familia Velázquez Benítez por su confianza, apoyo, cariño y amistad sincera desde hace tantos años.

Al Dr. Francisco J. Arenas Huertero por enseñarme a ser un profesional exitoso, por su apoyo, por ser guía en mi desarrollo profesional e intelectual y sobre todo, por ofrecerme su amistad.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Patología Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez, gracias por su apoyo y entusiasmo.

A la Dra. Josefina Cortés Eslava del laboratorio de Mutagénesis Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, por su asesoría técnica, apoyo constante y generosidad durante mi estancia en Ciudad Universitaria.

A la Dirección de investigación y al Laboratorio de Investigación en Patología Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez-Instituto Nacional de Salud

Al proyecto **PAPIIT IN222112**, "Análisis de muerte celular y genotoxicidad inducida por insecticidas organofosforados en células vegetales y humanas" por el apoyo otorgado.

Dedicatoria.

A mi madre, porque este trabajo es un reflejo de su constancia y esfuerzo para sacarme adelante. Gracias por ser mi inspiración, mi fuerza, mi fe y mi vida, esto es totalmente para ti, con todo el amor, admiración y respeto del mundo. Muchas gracias mamita, siempre estaré a tus pies.

Presentación.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Patología y en el Laboratorio de Investigación en Patología Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez- Instituto Nacional de Salud, bajo la asesoría del Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero, Investigador en Ciencias Médicas "D" e Investigador Nacional SNI nivel I adscrito, a la Dirección de Investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Para la realización de esta tesis se contó con el apoyo del **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN222112, "Análisis de muerte celular y genotoxicidad inducida por insecticidas organofosforados en células vegetales y humanas"** y del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la Universidad Nacional Autónoma de México (CCA-UNAM).

Índice

| | |
|--|------|
| Índice de Cuadros | VIII |
| Índice de Tablas | VIII |
| Índice de figuras | VIII |
| Lista de abreviaturas | X |
| Resumen..... | XII |
| Abstract | XIV |
| Capítulo I. Introducción..... | 1 |
| 1. Insecticidas | 1 |
| 1.1 Antecedentes de los Insecticidas Organofosforados | 2 |
| 1.2 Características Físicoquímicas de los Insecticidas Organofosforados | 3 |
| 1.3 Mecanismo de acción..... | 6 |
| 1.4 Daños a la salud | 9 |
| 2. Muerte celular..... | 10 |
| 2.1 Apoptosis..... | 11 |
| 2.2 Necrosis | 17 |
| 2.3 Autofagia | 18 |
| 3. Ensayo cometa..... | 20 |
| 3.1 Definición | 21 |
| 3.2 Fundamento..... | 21 |
| 3.3 Usos e importancia..... | 21 |
| 4. Antecedentes y justificación del trabajo..... | 22 |
| 5. Hipótesis | 24 |
| 6. Objetivos..... | 24 |
| 7. Esquema de trabajo..... | 25 |
| Capítulo II. Metodología Experimental..... | 26 |
| 1. Protocolos del cultivo celular..... | 26 |
| 1.1 Descongelado de células | 26 |
| 1.2 Mantenimiento del cultivo..... | 26 |
| 1.3 Despegado las células..... | 26 |
| 1.4 Conteo celular..... | 26 |
| 1.5 Microensayo en placa de 96 pozos | 27 |

| | | |
|---|---|----|
| 2. | Diseño de iniciadores (cebadores, primers)..... | 28 |
| 3. | Ensayo de viabilidad celular..... | 29 |
| 4. | Microscopia electrónica de transmisión (MET)..... | 30 |
| 5. | Ensayo cometa..... | 30 |
| 6. | Extracción de ARN..... | 31 |
| 7. | Cuantificación de ARN..... | 31 |
| 8. | Síntesis de cDNA..... | 32 |
| 9. | PCR Tiempo Real..... | 33 |
| Capítulo III. Resultados y discusión..... | | 35 |
| 1. | Resultados..... | 35 |
| 1.1 | Efectos de los insecticidas organofosforados en la viabilidad celular..... | 35 |
| 1.2 | Análisis ultraestructural por MET de los efectos de los insecticidas..... | 39 |
| 1.3 | Efectos genotóxicos de los insecticidas: inducción de cometas..... | 44 |
| 1.4 | Análisis de la expresión de diferentes genes que participan en muerte celular..... | 49 |
| 2. | Discusión de resultados..... | 54 |
| 2.1 | Viabilidad celular..... | 54 |
| 2.2 | Análisis ultraestructural..... | 55 |
| 2.3 | Genotoxicidad..... | 56 |
| 2.4 | Expresión de genes..... | 57 |
| Capítulo IV. Conclusiones, recomendaciones y referencias..... | | 59 |
| 1. | Conclusiones..... | 59 |
| 1.1 | Potencial de toxicidad de cada insecticida organofosforado..... | 59 |
| 1.2 | Inducción de cambios ultraestructurales por tipo de insecticida..... | 59 |
| 1.3 | Genotoxicidad por los insecticidas organofosforados evaluados..... | 59 |
| 1.4 | Inducción de los genes por tipo de muerte celular diferencialmente por tipo de insecticida..... | 60 |
| 2. | Recomendaciones: Control sobre el uso de insecticidas organofosforados..... | 60 |
| 3. | Referencias..... | 62 |
| 4. | Material complementario..... | 67 |
| 4.1 | Preparación de soluciones y reactivos..... | 67 |

Índice de Cuadros.

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Genes que participan en diferentes tipos de muerte celular. | 28 |
|--|----|

Índice de Tablas.

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Características de los iniciadores para evaluar la expresión de los genes por análisis de RT-PCR en tiempo real. | 29 |
| Tabla 2. Fórmula para la reacción de síntesis de cDNA. | 32 |
| Tabla 3. Fórmula para reacción de PCR tiempo real. | 33 |
| Tabla 4. Medio de cultivo para células HaCaT (200 mL). | 67 |
| Tabla 5. Medio de cultivo para células NL20 (200 mL). | 67 |
| Tabla 6. Solución para despegado de células (5 mL) | 67 |
| Tabla 7. Agarosa de punto de fusión normal (NPMA) | 68 |
| Tabla 8. Agarosa de punto de fusión bajo (LPMA). | 68 |
| Tabla 9. NaOH 10 N | 68 |
| Tabla 10. EDTA 100 y 200 mM (pH=10) | 69 |
| Tabla 11. Amortiguador de electroforesis. | 69 |
| Tabla 12. Tris 0.4 M (pH=7.5). | 69 |
| Tabla 13. Solución de lisis. | 70 |
| Tabla 14. Solución de tinción. (10X). | 70 |

Índice de figuras.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Insecticida Organofosforado. | 3 |
| Figura 2. Fórmula Química Grupo I. | 3 |
| Figura 3. Fórmula Química grupo II. | 4 |
| Figura 4. Fórmula Química grupo III. | 4 |
| Figura 5. Fórmula Química grupo IV. | 4 |
| Figura 6. Interacción Enzima- Acetilcolina. | 7 |
| Figura 7. Hidrólisis de la Acetilcolina. | 8 |
| Figura 8. Interacción Organofosforado- Enzima. | 8 |
| Figura 9. Reacción de activación. | 9 |
| Figura 10. Vías de la apoptosis. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. | 16 |
| Figura 11. Claves de las vías de señalización. | 16 |
| Figura 12. Esquema Lesión Reversible e Irreversible (Necrosis). | 18 |
| Figura 13. Vía de la autofagia | 20 |
| Figura 14. Citotoxicidad en células HaCaT en presencia de insecticidas organofosforados. | 23 |
| Figura 15. Citotoxicidad en células NL20 en presencia de insecticidas organofosforados. | 23 |
| Figura 16. Esquema para ensayo cometa. | 27 |
| Figura 17. Esquema para ensayos de viabilidad celular y análisis de expresión de genes | 27 |
| Figura 18. Ensayo cometa. | 31 |
| Figura 19. Diseño de la reacción de PCR tiempo real en placa de 96 pozos. | 33 |
| Figura 20. Condiciones de reacción a programar en el termociclador de tiempo real. | 34 |

| | |
|--|----|
| Figura 21. HaCaT en presencia de Metil Azinfos..... | 35 |
| Figura 22. NL20 en presencia de Metil Azinfos..... | 35 |
| Figura 23. HaCaT en presencia de Metil Paration..... | 36 |
| Figura 24. NL20 en presencia de Metil Paration..... | 36 |
| Figura 25. HaCaT en presencia de Ometoato..... | 37 |
| Figura 26. NL20 en presencia de Ometoato..... | 37 |
| Figura 27. HaCaT en presencia de Metamidofos..... | 38 |
| Figura 28. NL20 en presencia de Metamidofos..... | 38 |
| Figura 29. Ultraestructura de células HaCaT..... | 41 |
| Figura 30. Ultraestructura de células NL20..... | 43 |
| Figura 31. Genotoxicidad en células HaCaT en presencia de Metil Azinfos..... | 45 |
| Figura 32. Genotoxicidad en células NL20 en presencia de Metil Azinfos..... | 45 |
| Figura 33. Genotoxicidad en células HaCaT en presencia de Metil Paration..... | 46 |
| Figura 34. Genotoxicidad en células NL20 en presencia de Metil Paration..... | 46 |
| Figura 35. Genotoxicidad en células HaCaT en presencia de Ometoato..... | 47 |
| Figura 36. Genotoxicidad en células NL20 en presencia de Ometoato..... | 47 |
| Figura 37. Genotoxicidad en células HaCaT en presencia de Metamidofos..... | 48 |
| Figura 38. Genotoxicidad en células HaCaT y NL20 en presencia de Metamidofos..... | 48 |
| Figura 39. Efecto del insecticida Metil Azinfos sobre la expresión de genes de muerte en células HaCaT..... | 50 |
| Figura 40. Efecto del insecticida Metil Azinfos sobre la expresión de genes de muerte en células NL20..... | 50 |
| Figura 41. Efecto del insecticida Metil Paration sobre la expresión de genes de muerte en células HaCaT..... | 51 |
| Figura 42. Efecto del insecticida Metil Paration sobre la expresión de genes de muerte en células NL20..... | 51 |
| Figura 43. Efecto del insecticida Ometoato sobre la expresión de genes de muerte en células HaCaT..... | 52 |
| Figura 44. Efecto del insecticida Ometoato sobre la expresión de genes de muerte en células NL20..... | 52 |
| Figura 45. Efecto del insecticida Metamidofos sobre la expresión de genes de muerte en células HaCaT..... | 53 |
| Figura 46. Efecto del insecticida Metamidofos sobre la expresión de genes de muerte en células NL20..... | 53 |

Lista de abreviaturas.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

APAF-1: Factor de Activación de la Apoptosis 1

ARN: Ácido Ribonucleico.

Atg: Gen relacionado con la Autofagia

ATP: Adenosin Trifosfato

Azinf: Metil Azinfos

BCN1: Beclin 1

C8: Caspasa 8

C9: Caspasa 9

cDNA: ADN complementario

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMSO: Dimetil sulfóxido

e.e.: Error estándar

EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

FADD: Dominio de Muerte Asociado al ligando Fas.

FasL: Ligando Fas

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

INECC: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático

IPCS: Programa Internacional en Seguridad Química

MET: Microscopia electrónica de transmisión

Metam: Metamidofos

mRNA: ARN mensajero

NADPH: Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato

Omet: Ometoato

OMS: Organización Mundial de la Salud

Parath: Metil Paration

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE: Fosfatidiletanolamida

qPCR: PCR cuantitativa

RE: Retículo Endoplásmico

RIPK1: Receptor de interacción serina/treonina-proteína quinasa 1

RT: Transcripción Reversa

T: Testigo

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TNFR: Receptor de Factor de Necrosis Tumoral

ULK: Gen Unc-51-like cinasa

Resumen

Los insecticidas organofosforados son ampliamente utilizados tanto en el medio laboral (agrícola e industrial) como en el doméstico e incluso, como armamento químico. El manejo incorrecto e irresponsable de este tipo de insecticidas provoca un gran número de intoxicaciones, comprometiendo la salud de los individuos que están en contacto con ellos.

Se sabe que desde mediados de los años 70, México es uno de los principales consumidores de insecticidas organofosforados en el continente Americano, y muchos de ellos hoy en día siguen siendo aplicados a lo largo de la República Mexicana.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de cuatro insecticidas organofosforados: Metil Azinfos, Metil Paratión, Ometoato y Metamidofos, de manera *in vitro* en células que representan los sistemas de exposición más frecuentes en el humano: piel y bronquio, por lo que se utilizaron las líneas celulares HaCaT que son queratinocitos, y células bronquiales como las NL-20.

Para lograr dicho objetivo se cultivaron células HaCaT y NL20, y se expusieron a concentraciones de 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cada uno de los insecticidas organofosforados. Se realizaron ensayos de citotoxicidad mediante la tinción con cristal violeta y se observó que existe una disminución en la viabilidad celular principalmente a concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en ambas líneas celulares con el insecticida Metil Azinfos y el insecticida Metil Paratión. Para el insecticida Ometoato, la viabilidad disminuyó drásticamente con respecto al testigo en células NL20; con la línea celular HaCaT la disminución en la viabilidad no fue tan drástica, pero en ambas líneas celulares esta disminución no depende de la concentración de insecticida. Con el insecticida Metamidofos, la línea celular HaCaT mostró disminución de su viabilidad solo a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mientras que la línea celular NL20 disminuyó su viabilidad en todas concentraciones de trabajo. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

También se evaluó la genotoxicidad, estos ensayos demostraron la existencia de fragmentación de DNA. Con el insecticida Metil Azinfos a partir de la concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ existió daño genotóxico en ambas líneas celulares; el Metil Paration a partir de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ causó daño genotóxico en células HaCaT, mientras que en células NL20, el daño se observó en todas las concentraciones. Con el insecticida Ometoato, la línea celular HaCaT mostro daño genotóxico a partir de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y para la línea celular NL20 hubo daño en todas las concentraciones. Finalmente, el insecticida Metamidofos en células HaCaT causó daño en todas las concentraciones de trabajo y en las células NL20 solo hubo daño a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

El análisis ultraestructural de ambas líneas celulares expuestas a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cada uno de los insecticidas, reveló en la mayoría de los casos, la presencia de vacuolas de una sola membrana de diversos tamaños, sugiriendo un mecanismo de muerte celular denominada Metuosis.

En el estudio de la expresión de genes que participan en la muerte celular por apoptosis, autofagia y necrosis, mediante RT-qPCR, se demostró que únicamente los insecticidas Metil Azinfos y Metamidofos a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en la línea celular HaCaT, aumentaron la expresión del gen Beclin 1, el cual está relacionado principalmente con los procesos de autofagia y de muerte celular por metuosis. Ningún otro gen mostró aumento en su expresión.

En conclusión: los insecticidas Metil Azinfos y Metil Paration, son los que más afectaron la viabilidad celular, en las tres concentraciones estudiadas. Los ensayos de genotoxicidad demostraron que los insecticidas organofosforados causan daño principalmente a concentraciones por arriba de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, en ambas líneas celulares. Finalmente, el análisis ultraestructural y el estudio de la expresión de genes de muerte celular indican la presencia de un mecanismo denominado metuosis.

Abstract.

Organophosphate insecticides are widely used both in the work environment (agricultural and industrial) and domestic and even as chemical weapons. Improper handling of this type of insecticides is responsible of many poisonings, compromising the health of individuals who are in contact with them.

It is known that since the mid-70s, Mexico is one of the main consumers of organophosphorus insecticides on the American continent, and many of them today are being applied throughout Mexico.

The aim of this study was to evaluate *in vitro* the effect of four organophosphate insecticides Azinphos-methyl, Parathion-methyl, Methamidophos and Omethoate applied to cells that represent the most common systems of human exposure: skin and bronchus, keratinocyte cells HaCaT and bronchial cells NL20.

To achieve this objective HaCaT and NL20 cells were cultured and exposed to 0.1, 1 and 10 µg/µL concentrations of each organophosphorus insecticide. Cytotoxicity assays were performed by staining with crystal violet and observed that there is a decrease in cell viability mainly at 1 and 10 µg/µL in both cell lines with azinphos-methyl and parathion-methyl. For insecticide Omethoate, viability decreased drastically compared with the control in NL20 cells, with HaCaT cells, decrease in viability wasn't so drastic, but in both cell lines this decrease is not dependent of insecticide concentration. With Methamidophos insecticide, HaCaT cell line showed a decrease in viability at 10 µg/µL, whereas NL20 cell line decreased viability at all concentrations. All these differences were statistically significant ($p < 0.05$).

Genotoxicity was also evaluated; these studies demonstrated the existence of DNA fragmentation. With azinphos - methyl insecticide from the concentration of 1 µg/µL existed genotoxic damage in both cell lines, parathion - methyl from 1 µg/µL caused genotoxic damage in HaCaT cells, whereas in NL20 cells, damage was observed at all concentrations. Omethoate insecticide in the HaCaT cell line showed genotoxic damage from 1 µg/µL, and the NL20 cell line was damaged at all concentrations. Finally, methamidophos in HaCaT cells caused damage at all concentrations and NL20 cells were damaged only at 10 µg/µL concentration. These differences were statistically significant ($p < 0.05$).

Ultrastructural analysis of both cell lines exposed to a 1 µg/µL concentration of each insecticide, revealed the presence of vacuoles of a single membrane and different sizes in most cases, suggesting a mechanism of cell death called Metuosis.

The expression of genes involved in cell death by apoptosis, autophagy and necrosis, by RT-qPCR, showed that only azinphos-methyl and Metamidofos insecticides at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in the HaCaT cell line, increased expression the Beclin 1 gene, which is mainly related to the processes of autophagy and cell death Metuosis. No other gene revealed an increase in its expression.

In conclusion: azinphos-methyl and parathion-methyl insecticides are the ones that most affected the cell viability in all the concentrations tested. Genotoxicity assays did demonstrate that organophosphate insecticides caused damage mainly at concentrations above 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, in both cell lines. Ultrastructural analysis and study of the expression of cell death genes indicate the presence of a mechanism called methuosis.

Capítulo I. Introducción.

1. Insecticidas.

En los últimos 50 años los descubrimientos químicos han generado como resultado síntesis de un gran número de sustancias útiles con aplicaciones para proteger cultivos y cosechas del ataque de plagas, preservar (y atender) la salud del hombre y para incrementar el bienestar ambiental. Las sustancias químicas conocidas como plaguicidas incluyen una amplia gama de compuestos. Se pueden clasificar de acuerdo al tipo de plaga que combaten (Córdoba, 2006). Así la clasificación es:

- a) Insecticidas: son plaguicidas que controlan y destruyen artrópodos, dípteros, larvas y helmintos.
- b) Fungicidas: Plaguicidas que matan hongos.
- c) Herbicidas: Plaguicidas que destruyen las hierbas de manera general o selectiva.
- d) Rodenticidas: plaguicidas que matan ratas y otros roedores.

Cada uno de estos grupos está compuesto por sustancias de naturaleza diferente, por lo que también es útil clasificarlos teniendo en cuenta su origen:

- a) Plaguicidas inorgánicos. Fabricados a base de minerales tales como arsénico, cobre, boro, plomo, etc. Más de 18 elementos de la tabla periódica integran este grupo. Se relacionan en este grupo los compuestos organometálicos y organometaloides porque en la mayoría de los casos los efectos tóxicos son debidos al metal o metaloide que forma parte de la molécula del plaguicida.
- b) Plaguicidas vegetales. Insecticidas extraídos de diversas partes de vegetales, ejemplo: piretrinas, rotenona, nicotina (Córdoba, 2006).
- c) Microorganismos vivos. Son los virus, bacterias y hongos utilizados en el control biológico de plagas.
- d) Plaguicidas organosintéticos. Son sintetizados en el laboratorio, contienen carbono, hidrógeno y uno o más elementos como cloro, fósforo, nitrógeno, azufre, etc. Actualmente son los más utilizados y es de suma importancia para el toxicólogo conocer su clasificación, la cual se basa en la naturaleza química del grupo funcional que caracteriza al compuesto y le imparte todas las propiedades físico-químicas y toxicológicas al plaguicida. Dentro de este grupo de insecticidas se tiene a los:

- Organoclorados.
- Organofosforados.
- Carbamatos.
- Piretroides.

A nivel mundial este grupo de insecticidas organosintéticos ha sido el más estudiado por varias razones:

-Alto consumo: Más del 50% de plaguicidas utilizados en nuestro medio son insecticidas.

-Daños a la salud: los anticolinesterásicos (organofosforados y carbamatos) son los de mayor toxicidad aguda para el hombre y los animales.

-Persistencia y residualidad. Los organoclorados son agresores al ecosistema y bastante tóxicos, ya que tienen la capacidad de resistir la influencia de los factores ambientales (temperatura, humedad, rayos solares, etc.) permaneciendo inalterados por años en diferentes ecosistemas, o si se metabolizan, el metabolito formado será más estable que el plaguicida original.

Teniendo en cuenta esta propiedad, los plaguicidas pueden clasificarse en dos grupos: persistentes o no biodegradables y no persistentes o biodegradables (Córdoba, 2006).

1.1 Antecedentes de los Insecticidas Organofosforados.

Arbusow sintetizó el primer fosfato y fosfonato en 1906. Balareff preparó el primer éster del ácido fosfórico en 1914. Gerhar Schrader y colaboradores realizaron estudios sobre este tema en Alemania, encontrando en sus investigaciones el aspecto quizás más importante en la aplicación de estos productos: la acción "sistémica", ejercida también en animales y en vegetales. Logró este grupo de investigadores al mando de Schrader la síntesis de otros compuestos fosforados orgánicos y aclaró que la acción sistémica está determinada en sus variantes por las propiedades de cada compuesto en particular.

Poco después de la Segunda Guerra Mundial, se publicaron estos descubrimientos en el Informe 714 del Subcomité de Inteligencia Británica.

El primer compuesto producido en forma industrial fue el Bladán o TEPP (tetraetilpifosfato) que fue usado por primera vez como insecticida en Alemania. Actualmente el uso de estos productos es estimado en miles de toneladas (Córdoba, 2006).

1.2 Características Físicoquímicas de los Insecticidas Organofosforados.

Químicamente son ésteres del ácido fosfórico, cuya fórmula es H_3PO_4 y la fórmula química general de los insecticidas organofosforados (figura 1) se puede considerar como:

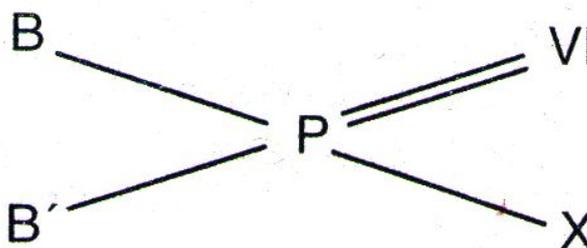


Figura 1. Insecticida Organofosforado. Tomado de Córdoba (2006).

Donde B y B' corresponden a radicales alquilo o alcoxi (O-alquil), radicales aril o ariloxi (O-arilo) y se denominan grupos básicos; X constituye el grupo ácido que generalmente es un residuo de ácido orgánico o inorgánico, como diferentes grupos alquilo, alcoxi, arilo, tioles, etc.; VI es un átomo del sexto período de la tabla periódica, usualmente oxígeno o azufre que se une al fósforo por un enlace doble.

El grupo constituyente X es el más importante, ya que de éste dependen las propiedades físicoquímicas y farmacológicas del compuesto.

Características del grupo I de los insecticidas organofosforados (Figura 2): X = contiene nitrógeno cuaternario sustituido (Córdoba, 2006).

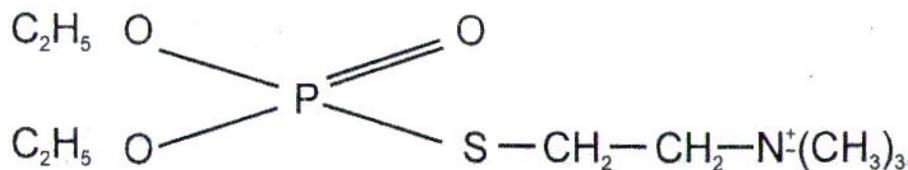


Figura 2. Fórmula Química Grupo I. Tomado de Córdoba (2006)

Características del grupo II de los insecticidas (Figura 3): X= Flúor.

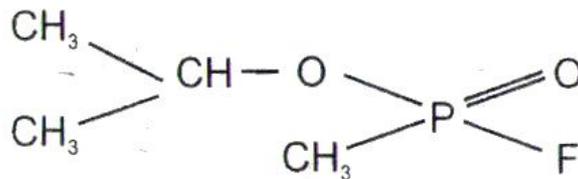


Figura 3. Fórmula Química grupo II. Tomado de Córdoba (2006)

Características del grupo III (Figura 4): X= CN, OCN, SCN o halógenos distintos del Flúor.

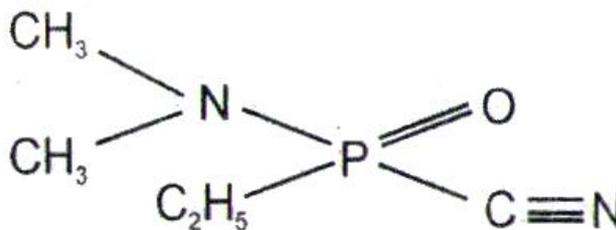


Figura 4. Fórmula Química grupo III. Tomado de Córdoba (2006)

Característica del grupo IV (Figura 5): X= alquilo, alcoxi, etc.

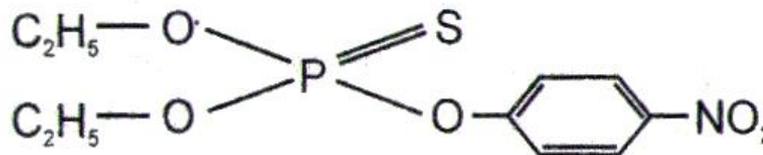


Figura 5. Fórmula Química grupo IV. Tomado de Córdoba (2006)

Los del grupo IV son de amplia gama y dentro de este grupo se encuentran otros productos que no son utilizados como plaguicidas sino como desnaturalizantes, tales como el triortocresilfosfato (TOCP) y como aditivos de gasolinas y lubricantes.

Nelson y Crawford (1972) clasificaron a los del grupo IV como "extremadamente sensibles a los cambios de pH". Su máxima hidrólisis se efectúa en un pH entre 7 y 8 y esta es incrementada en unas 10 veces por cada unidad de pH hacia la alcalinidad. Poseen un olor descrito como aliáceo, comparable al de la cebolla o el ajo (Córdoba, 2006).

Son pocos solubles en agua y para su preparación se emplean solventes orgánicos, los cuales pueden complicar la situación en caso de intoxicación. En el agua se emulsionan cambiando su color ámbar característico, por un aspecto blanquecino lechoso. Son sustancias que resisten bien el medio seco, pero se hidrolizan fácilmente en medios húmedos. Son biodegradables, es decir, carecen del efecto de contaminar a largo plazo, lo que es una gran cualidad frente a los insecticidas organoclorados que, son persistentes y causan intensa contaminación en todo el globo terrestre.

Vías de exposición.

Los fosforados orgánicos se absorben por todas las vías: oral, dérmica, conjuntival, parenteral, rectal e inhalatoria. Entre otros, el adulto recurre con mayor frecuencia a la vía oral en los casos de suicidio, y en pocos casos recurre a la vía parenteral. En la población infantil, el accidente ocurre con más frecuencia por la vía oral y en algunos casos por la vía dérmica.

La vía aérea tiene la característica de poseer una gran rapidez de acción, ya que el tóxico es llevado con suficiente presión y dispersión hasta el alveolo pulmonar, ocasionando frecuentemente accidentes fatales en pocos minutos.

La vía dérmica y conjuntival son la puerta de entrada en los casos de fumigadores tanto profesionales como el fumigador hogareño, es importante llamar la atención sobre el hecho de que cualquier erosión, laceración o solución de continuidad que exista en la piel, hace que la absorción se aumente (Córdoba, 2006).

Dosis tóxicas y letales.

Tanto las dosis tóxicas como las letales están sujetas a variantes tales como el grado de toxicidad propio de la sustancia, la especie (los insectos son más sensibles que los mamíferos), estados biológicos y patológicos; entre los primeros podemos citar como ejemplo, los estados biológicos de la mujer como el periodo menstrual y el embarazo, en los cuales los niveles de acetilcolinesterasas descienden y por lo tanto el peligro en la exposición es mayor, la edad, el sexo, niveles previos de actividad de colinesterasas al momento de la intoxicación, modificados, como ya dijimos, por fenómenos biológicos o patológicos como enfermedades, infecciones bacterianas o virales, entre las cuales destacamos la infección por bacilo tetánico, pues en ella bajan tanto o más los niveles de colinesterasas como en la intoxicación por inhibidores de las mismas. Este hecho ofrece dificultad para realizar un diagnóstico diferencial, dada la relativa frecuencia que el agricultor tiene de estar en contacto con el bacilo, y con los tóxicos y la similitud que puede existir entre los dos cuadros clínicos.

Se ha calculado que la absorción de 0.1 a 0.3 mg/Kg de un fosforado orgánico catalogado como tóxico grado I o extremadamente tóxico, es capaz de producir la muerte (Córdoba, 2006).

1.3 Mecanismo de acción.

Los insecticidas organofosforados tienen un particular modo de acción; poseen la capacidad de inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, esto los hace muy efectivos ante muchas plagas, pero al mismo tiempo, crea una gran toxicidad para el ser humano y otros animales (Baker y Wilkinson, 1990).

La característica básica del efecto tóxico de los compuestos organofosforados es la acumulación anormal del neurotransmisor acetilcolina en los tejidos (Hayes y Laws, 1991).

La acetilcolina es el mediador químico responsable de la transmisión fisiológica de los impulsos nerviosos a través de:

- a) Las neuronas preganglionares y postganglionares, tanto del sistema nervioso parasimpático y simpático,
- b) Las fibras posganglionares parasimpáticas a los órganos efectores y de las fibras simpáticas posganglionares a las glándulas sudoríparas,
- c) Los nervios motores a los músculos esqueléticos, y de algunas terminaciones nerviosas del sistema nervioso central (Hayes y Laws, 1991).

La mayor actividad de la acetilcolina es la transmisión de impulsos nerviosos a través del sistema nervioso autónomo, la actividad es menor dentro del sistema nervioso central aunque se sabe desde hace mucho tiempo que, algunas actividades del sistema nervioso central dependen de la acetilcolina, como por ejemplo la mayoría de las actividades cognitivas. Además la intensa anoxia que suele presentarse en los casos de intoxicación grave por inhibidores de colinesterasas, puede, como es natural, ocasionar daños irreversibles en el sistema nervioso central (Hayes y Laws, 1991; Córdoba, 2006).

De acuerdo con los conceptos actuales, la acetilcolina se libera de las terminaciones de las fibras colinérgicas en respuesta a la conducción de un potencial de acción a lo largo de la fibra. La acetilcolina se produce bajo la influencia de la enzima colina-acetiltransferasa dentro de vesículas que se producen por toda la neurona, pero que son más numerosas en las terminaciones axonales. La liberación de acetilcolina se

lleva a cabo en la unión entre las fibras pre y postganglionares (sinapsis), entre una fibra nerviosa y una célula efectora (unión neuroefectora) y en el contacto con los receptores colinérgicos en la superficie de la célula blanco para lograr la transmisión del impulso. En circunstancias normales, la acetilcolina liberada en cualquier unión se hidroliza por la acetil-colinesterasa casi al instante y no hay acumulación del éster. La rápida destrucción explica la brevedad y la unión de cada impulso propagado normalmente. Por lo tanto, la función normal de la acetilcolina depende de su rápida destrucción por la acetilcolinesterasa.

Si algo interfiere con esta destrucción, la acetilcolina tiende a acumularse en los lugares donde es producida. Un pequeño exceso de este neurotransmisor produce grandes estímulos anormales, pero un exceso adicional puede tener el efecto opuesto. Por ejemplo, un pequeño aumento de la acetilcolina en la unión neuromuscular de los músculos esqueléticos produce fasciculaciones, pero un aumento adicional produce debilidad profunda y, finalmente, la parálisis flácida. Las terminaciones nerviosas colinérgicas en el músculo liso y las glándulas son menos susceptibles que las de músculo esquelético para el bloqueo por un exceso de la acetilcolina (Hayes y Laws, 1991).

La hidrólisis de acetilcolina es facilitada por su unión a sitios reactivos especiales en la superficie de la proteína que constituye la enzima acetilcolinesterasa.

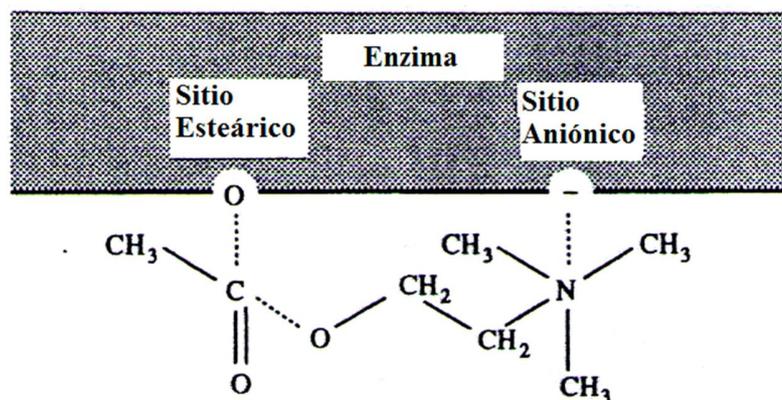


Figura 6. Interacción Enzima- Acetilcolina. Tomado de Hayes y Laws (1991)

La fuerte carga positiva en el nitrógeno cuaternario de la fracción de colina forma una unión electrostática con el sitio aniónico de la enzima. Este enlace iónico se refuerza por las fuerzas de unión auxiliares entre dos de los grupos metilo en el nitrógeno y la superficie de la proteína. Se cree que la unión del resto de colina es un requisito previo necesario para la formación de un enlace covalente entre el átomo carbonilo del resto acetato y el sitio esteárico de la enzima.

La acetilación de la enzima es seguida rápidamente por el rompimiento del enlace éster y la eliminación de colina. La enzima acetilada posteriormente reacciona con agua para regenerar la enzima y liberar ácido acético (Hayes y Laws, 1991).

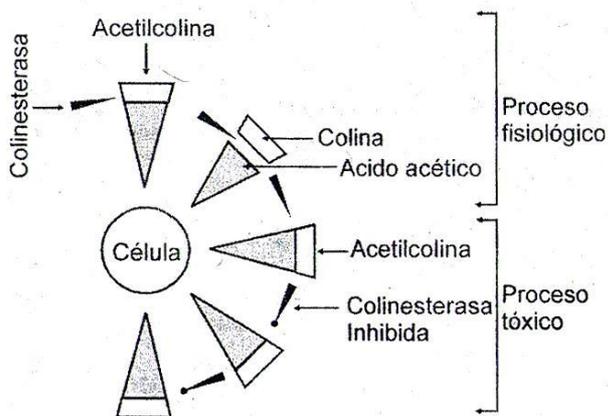


Figura 7. Hidrólisis de la Acetilcolina. Tomado de Córdoba (2006)

La mayoría de los compuestos organofosforados carecen de una carga positiva en su grupo ácido; estos compuestos reaccionan con el sitio esteárico de la molécula de acetilcolinesterasa pero no con el sitio aniónico.

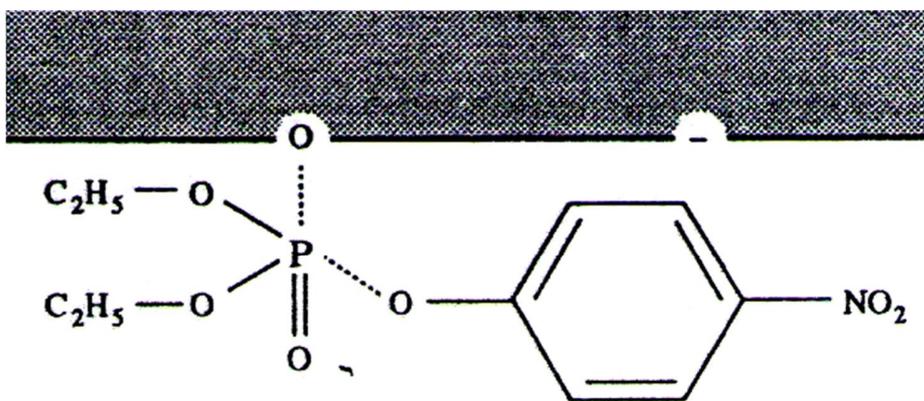


Figura 8. Interacción Organofosforado- Enzima. Tomado de Hayes y Laws (1991)

Si el sitio aniónico está o no implicado, la disociación del grupo ácido del compuesto organofosforado es completamente análoga a la disociación de colina a partir de la acetilcolina. Sin embargo, el enlace entre el átomo de fósforo y el sitio esteárico de la

enzima es más estable que el enlace entre el acetato de la acetilcolina y el mismo sitio de la enzima (Hayes y Laws, 1991).

Una vez absorbidos los insecticidas organofosforados al ponerse en contacto con la piel intacta y las mucosas (conjuntival, oral, nasal), se distribuyen en el organismo y van a sufrir procesos normales de biotransformación, los cuales pueden agruparse en la siguiente forma:

Reacciones generales de activación. Consisten principalmente en reacciones de oxidación catalizadas por oxidasas microsómicas, dependientes del NADPH, en las cuales el compuesto original se transforma en otro más tóxico. El ejemplo clásico es la conversión de paratión en paraoxón. Lo mismo ocurre con el di-metoato, malatión, nitrotrion, y muchos otros.

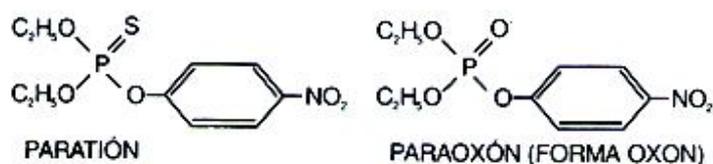


Figura 9. Reacción de activación. Tomado de Córdoba (2006)

Reacciones de desintoxicación. Son reacciones hidrolíticas mediante las cuales hay rompimiento de un enlace en el éter del fosforo, produciéndose sustancias de menor toxicidad y mayor solubilidad, lo cual facilita la excreción.

Reacciones de conjugación. Se forman igualmente compuestos de fácil excreción al reaccionar estos insecticidas, ya sea que hayan sufrido anterior metabolismo (oxidación, hidrólisis), o que no lo hayan sufrido, con sustancias naturales presentes en el organismo como el ácido glucurónico, ácido sulfúrico, etc. (Córdoba, 2006).

1.4 Daños a la salud.

La mayor parte de las intoxicaciones por plaguicidas son de origen laboral, industrial y agrícola, pero también ocurren por mecanismo accidental, criminal y suicida. El síndrome agudo es, sin lugar a dudas, el mejor conocido y el que se presenta con mayor frecuencia en la práctica clínica. En la mayor parte de los casos, la sintomatología inicia 6 a 8 hrs después de ocurrida la intoxicación, si bien en algunas intoxicaciones suicidas en que se ingieren concentrados de estos productos el tiempo de latencia suele ser mucho menor (30 min a 1h). En pocas ocasiones, algunos organofosforados muy liposolubles pueden iniciar las manifestaciones en forma tardía, de 24 h o más. De acuerdo con el tipo de células efectoras involucradas, se van

a presentar los síntomas característicos de la intoxicación aguda consecutivamente: efectos muscarínicos (músculo liso, glándulas): sudoración abundante, salivación, lagrimación, bronco-constricción e hipersecreción bronquial, espasmos abdominales, náuseas, vómitos, diarrea, disuria, bradicardia y miosis; efectos nicotínicos (músculo estriado, incluyendo el miocardio): taquicardia, opresión torácica, fasciculaciones, calambres y sacudidas en músculos periféricos y, en casos graves, del diafragma o músculos respiratorios, disritmias cardíacas; efectos neurológicos (neuronas): cefaleas, mareo, ansiedad, confusión, fatiga, convulsiones, depresión del centro respiratorio y coma. La muerte puede ocurrir como consecuencia de la depresión respiratoria o por la insuficiencia cardio-respiratoria. La intensidad de la sintomatología se relaciona con el grado de inhibición de la acetilcolinesterasa.

Se han informado de otras manifestaciones causadas por estos plaguicidas, como alucinaciones, hipertensión transitoria, rabdomiólisis, insuficiencia renal, infartos cerebrales y gangrena de las extremidades en pacientes con enfermedad vascular preexistente.

Síndrome intermedio. Se presenta 1 a 4 días después del cuadro colinérgico agudo como el descrito y después de una aparente mejoría, el paciente manifiesta debilidad de los músculos flexores de la nuca y proximales de las extremidades, parálisis de pares craneales, disminución o ausencia de reflejos de rodilla y tobillo y depresión respiratoria súbita.

Síndrome tardío. Ocurre 2 a 3 semanas después de una intoxicación aguda aparentemente en recuperación y se caracteriza por el desarrollo de una polineuropatía periférica acompañada de trastornos de la conducta, de la memoria y del estado de ánimo. El paciente manifiesta debilidad progresiva y calambres dolorosos en las extremidades pélvicas y a veces en los brazos; puede afectarse o no el sensorio, los reflejos tendinosos están deprimidos o ausentes y finalmente puede evolucionar a parálisis flácida y atrofia de músculos distales. La recuperación es lenta y puede tardar años (Rivero, et. al. 2001).

2. Muerte celular.

Una lesión celular es el resultado de un estrés celular tan intenso que las células ya no son capaces de adaptarse, o de una exposición celular a agentes inherentemente lesivos. La lesión puede progresar a través de un estadio reversible o culminar con la muerte celular.

2.1 Apoptosis.

Algunos estímulos nocivos, especialmente los que dañan al ADN, inducen otro tipo de muerte, llamada "apoptosis", que se caracteriza por la fragmentación de la cromatina sin pérdida completa de la integridad de la membrana. La apoptosis es una vía de muerte celular inducida por un programa intracelular estrechamente regulado en el cual las células destinadas a morir activan enzimas que degradan el propio ADN de las células y las proteínas nucleares y citoplasmáticas. La membrana plasmática de las células permanece intacta, pero su estructura está alterada, de tal manera que la célula apoptótica se transforma en un blanco para la fagocitosis. La célula muerta se elimina rápidamente, antes de que su contenido sea vertido al espacio extracelular, y por lo tanto la muerte celular por esta vía no activa una reacción inflamatoria en el hospedero. Así pues, la apoptosis es fundamentalmente diferente de la necrosis. La apoptosis y la necrosis coexisten a veces, y pueden compartir algunas características y mecanismos (Kumar, et al. 2006).

Las causas de la apoptosis son diversas, es responsable de numerosos acontecimientos fisiológicos, adaptativos y patológicos, entre ellos:

Situaciones Fisiológicas.

- Destrucción programada de las células durante la embriogénesis.
- Involución hormonodependiente en el adulto.
- Eliminación celular en las poblaciones celulares proliferativas.
- Muerte de células del hospedero que han cumplido su propósito.
- Eliminación de linfocitos autorreactivos potencialmente reactivos.
- Muerte celular inducida por linfocitos T citotóxicos.

Situaciones patológicas.

- Muerte celular por estímulos lesivos.
- Lesión celular en ciertas enfermedades virales.
- Atrofia patológica en los órganos parenquimatosos tras obstrucción ductal.
- Muerte celular en tumores.

Características bioquímicas de la apoptosis.

Las células apoptóticas habitualmente muestran una serie de modificaciones bioquímicas que subyacen a los cambios estructurales descritos anteriormente.

Algunas de estas características también pueden verse en las células necróticas, pero otras alteraciones son más específicas.

Escisión de proteína. Una característica específica de la apoptosis es la hidrólisis proteica que conlleva a la activación de varios miembros de una familia de cisteín-proteasas, denominadas caspasas. Muchas caspasas están presentes en las células normales como proenzimas inactivas, y necesitan activarse para inducir apoptosis. Las caspasas activas escinden muchas proteínas celulares vitales, tales como láminas, y así rompen la estructura nuclear y el citoesqueleto; además, las caspasas activan a las DNAsas, que inducen el rompimiento nucleosomal de la cromatina. Estos cambios subyacen en las alteraciones estructurales nucleares y citoplasmáticas que ocurren en las células apoptóticas.

Fragmentación del ADN. Las células apoptóticas exhiben una fragmentación característica del ADN, conocida como cadena o "ladder" (en inglés) y que corresponden a los rompimientos nucleosomales que van progresivamente aumentando en múltiplos de 180 a 200 pares de bases, por las endonucleasas dependientes de Ca^{+2} y Mg^{+2} . Los fragmentos pueden visualizarse mediante electroforesis en gel de agarosa como escaleras de ADN. La actividad de la endonucleasa también es la base de la detección de la muerte celular mediante técnicas citoquímicas que identifican rompimientos de la doble cadena de ADN, ligando un nucleótido fluorescente. Sin embargo, la escisión internucleosomal del ADN no es específica de la apoptosis (Kumar, et al. 2006).

Reconocimiento fagocítico. Las células apoptóticas expresan fosfatidilserina en las capas externas de sus membranas plasmáticas, en las que los fosfolípidos se han "dado vuelta" hacia fuera desde las capas internas. A causa de estos cambios, las células apoptóticas pueden identificarse por la fijación de colorantes específicos tales como Annexina V. En algunos tipos de apoptosis, la trombospodina, una glucoproteína de adhesión, también se expresa en las superficies de los cuerpos apoptóticos, y otras proteínas segregadas por los fagocitos pueden unirse a las células apoptóticas y opsonizarlas para su fagocitosis. Estas alteraciones permiten el reconocimiento precoz de la muerte celular por los macrófagos, dando lugar a fagocitosis sin liberación de componentes celulares pro-inflamatorios. De esta manera, la respuesta apoptótica dispone de las células con afectación mínima del tejido circundante (Kumar, et al. 2006).

Mecanismos de la apoptosis.

El proceso de apoptosis puede dividirse en una fase de iniciación, durante la cual las caspasas se hacen catalíticamente activas, y la fase de ejecución, durante la cual esas

enzimas actúan produciendo muerte celular. La iniciación de la apoptosis ocurre principalmente por señales procedentes de dos vías distintas pero convergentes: la vía extrínseca o iniciada en el receptor de muerte celular, y la intrínseca o mitocondrial. Ambas vías convergen en la activación de caspasas (Kumar, et al. 2006).

Vía extrínseca (muerte iniciada en el receptor).

Esta vía se inicia por la activación del receptor de muerte de la superficie celular en una diversidad de células. Los receptores de muerte son miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral que contiene un dominio citoplasmático implicado en las interacciones proteína-proteína que se denomina *dominio de muerte*, dado su papel esencial en el suministro de señales apoptóticas. Los receptores de muerte mejor conocidos son el receptor de TNF de tipo 1 (TNFR1) y una proteína relacionada denominada Fas (CD95), pero se han descrito otras proteínas como DR3, DR4 y DR5.

Cuando Fas se une a su ligando, el ligando de Fas unido a la membrana (FasL), tres o más moléculas de Fas se juntarán y sus dominios de muerte citoplasmáticos forman un sitio de unión para una proteína adaptadora que contiene también un dominio de muerte denominado FADD (*fas-associated death domain*). El FADD que se une a una forma inactiva de la caspasa-8 (y, en humanos, caspasa-10), otra vez a través de un dominio de muerte (Figura 10). De esta manera, múltiples moléculas pro-caspasa-8 se aproximan, y se escinden unas a otras para generar en cadena caspasa-8 activa. Entonces, la enzima desencadena una cascada de activación de caspasas escindiendo, y así activando a otras pro-caspasas; las enzimas activas realizan la fase de ejecución de la apoptosis. Esta vía puede inhibirse mediante la interacción de TNF y su receptor (TNFR1) siguiendo la vía de señalización IKK, induciendo así la activación de NF- κ B induciendo la expresión de genes de supervivencia como BCL2 y FLIP; esta última se une a la pro-caspasa-8, impidiéndole su correcto funcionamiento. También se sabe que TNF y FasL pueden llevar a cabo una señalización para la formación de un complejo denominado IIb e inducir la muerte por necrosis (Kumar, et al. 2006; Cell Signaling, 2014).

Vía intrínseca (mitocondrial).

Esta vía de apoptosis es el resultado de una permeabilidad mitocondrial aumentada y liberación de moléculas pro-apoptóticas al citoplasma sin intervención de los receptores de muerte. Los factores de crecimiento y otras señales de supervivencia estimulan la producción de miembros antiapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2. Esta familia se denomina a partir del Bcl-2, que se identificó como un oncogen en linfomas de células B. Existen más de 20 proteínas en esta familia, todas las cuales

funcionan regulando la apoptosis; las dos anti-apoptóticas principales son Bcl-2 y Bcl-x. Estas proteínas antiapoptóticas residen normalmente en las membranas mitocondriales y en el citoplasma. Cuando las células no reciben señales de supervivencia o están sujetas a estrés, la membrana mitocondrial pierde Bcl-2 y/o Bcl-x que se sustituyen por miembros pro-apoptóticos de la familia, tales como Bak, Bax y Bim. Cuando disminuyen los niveles de Bcl-2/Bcl-x, la permeabilidad de la membrana mitocondrial aumenta, y se escapan varias proteínas que pueden activar la cascada de las caspasas. Una de esas proteínas es el citocromo C, bien conocido por su papel en la respiración mitocondrial. En el citosol, el citocromo C se une a una proteína denominada Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*), y el complejo activa a la caspasa-9. Otras proteínas mitocondriales, tales como el factor inductor de apoptosis (AIF), penetran en el citoplasma donde se unen, y neutralizan, a diversos inhibidores de la apoptosis, cuya función normal es bloquear la activación de caspasas (Figura 11). Además otras proteínas como la Endonucleasa G, también comienzan a dañar el ADN provocando que la proteína p53 induzca la transcripción de miembros proapoptóticos como Puma, Bax y Bak. El resultado neto es la iniciación de una cascada de caspasas. De este modo, la esencia de esta vía intrínseca es un equilibrio entre moléculas proapoptóticas y protectoras que regulan la permeabilidad mitocondrial y la liberación de inductores de muerte que están normalmente secuestrados dentro de la mitocondria (Kumar, et al. 2006).

Fase de ejecución. La fase final de la apoptosis está mediada por una cascada proteolítica, hacia la cual convergen los diversos mecanismos de iniciación. Las proteasas que median la fase de ejecución se conservan en gran medida en las distintas especies y pertenecen a la familia de las caspasas. Son homólogas en mamíferos del gen *ced-3* de *C. elegans*. El término caspasa se basa en dos propiedades de esta familia de enzimas: la "c" se refiere a una proteasa cisteínica (es decir, una enzima con cisteína en su sitio activo) y "aspasa" se refiere a la capacidad singular de estas enzimas para escindir a continuación los residuos de ácido aspártico. La familia de las caspasas, que incluye actualmente más de diez miembros, puede dividirse funcionalmente en dos grupos: iniciador y ejecutor dependiendo del orden en que se activan durante la apoptosis. Las caspasas iniciadoras, como hemos visto, son la caspasa-8 y la caspasa-9. Varias caspasas, entre ellas caspasa-3 y caspasa-6, funcionan como ejecutoras.

Como muchas proteasas, las caspasas existen como proenzimas inactivas o zimógenos, deben sufrir una escisión activadora para que se inicie la apoptosis. Las caspasas tienen sus propios sitios de escisión que pueden hidrolizarse no solamente por otras caspasas sino también auto-catalíticamente. Después de que una caspasa iniciadora es escindida para producir su forma activa, el programa de muerte enzimática se pone en movimiento por la activación rápida y secuencial de otras caspasas. Las caspasas

ejecutoras actúan sobre muchos componentes celulares, cortan proteínas componentes del citoesqueleto y las proteínas de la matriz nuclear y, de esta manera, rompen el primero y dan lugar a la fragmentación del núcleo. En el núcleo, los blancos de las caspasas activas incluyen proteínas implicadas en la transcripción, replicación y reparación del ADN. En particular, la activación de la caspasa-3 convierte a una DNasa citoplasmática en una forma activa, escindiendo a un inhibidor de esta enzima; esta DNasa induce el característico rompimiento internucleosomal del ADN. En general, los cuerpos apoptóticos formados tienen la característica de contener restos de cromatina y restos mitocondriales principalmente. Ambas vías de la apoptosis pueden ser autorreguladas mediante proteínas, además factores como el estrés causado en el retículo endoplásmico genera la liberación de Calcio, el cual activa a la enzima Calpain, encargada de activar a la Caspasa 12, iniciando la cascada de muerte celular (Kumar, et al. 2006).

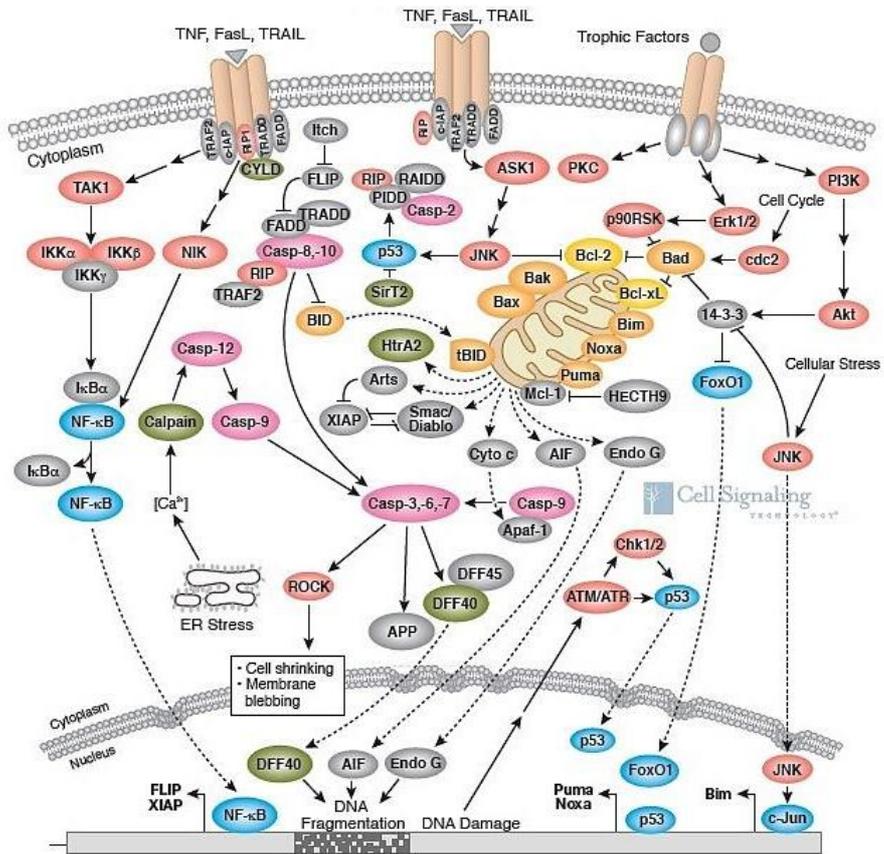


Figura 10. Vías de la apoptosis. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Tomado de <https://www.cellsignal.com> (2014)

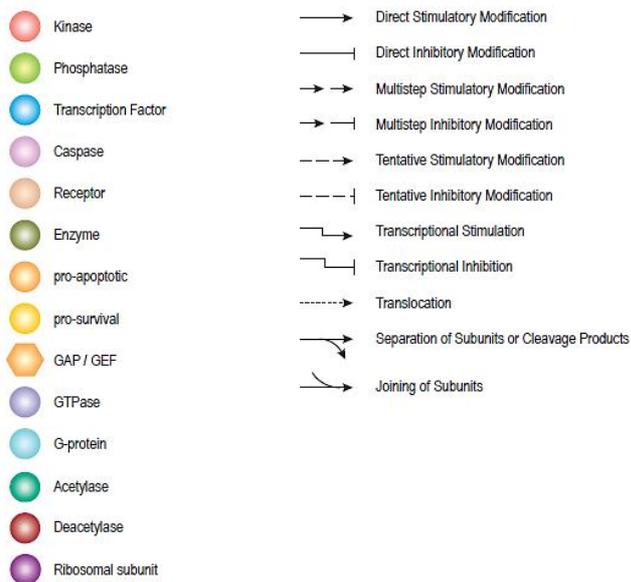


Figura 11. Claves de las vías de señalización. Tomado de <https://www.cellsignal.com> (2014)

2.2 Necrosis.

La necrosis se refiere a un espectro de cambios morfológicos que sigue a la muerte celular en el tejido vivo como resultado, en gran medida, de la acción degradante progresiva de las enzimas en la célula letalmente lesionada. Como se usa habitualmente, la necrosis es la correlación macroscópica e histológica de la muerte celular que ocurre en una situación de lesión exógena irreversible. Las células necróticas son incapaces de mantener la integridad de la membrana y, a menudo, sus contenidos se escapan. Esto puede ocasionar inflamación en el tejido circundante.

El aspecto morfológico de la necrosis es el resultado de la desnaturalización y degradación de las proteínas intracelulares, como resultado de la digestión enzimática de la célula. Las enzimas provienen de los lisosomas lisados de las mismas células muertas, en cuyo caso la digestión enzimática se denomina autólisis, o de los lisosomas de los leucocitos que han migrado durante las reacciones inflamatorias. La célula necrótica puede tener una apariencia homogénea más cristalina que la de las células normales, principalmente como resultado de la pérdida de las moléculas de glucógeno. Cuando las enzimas han digerido los organelos citoplasmáticos, el citoplasma se va llenando de vacuolas. Finalmente, puede ocurrir una reacción de calcificación de las células muertas. Al final, los restos de las células muertas pueden aparecer como masas de fosfolípidos alrededor de las demás células a manera de vainas de mielina. Estos precipitados fosfolípidicos son entonces fagocitados por otras células o degradados a ácidos grasos. Las células necróticas también se caracterizan por discontinuidades manifiestas en la membrana plasmática y en los organelos, dilatación importante de las mitocondrias con la apariencia de grandes densidades amorfas, figuras intracitoplasmáticas a manera de mielina, residuos osmiofílicos amorfos y agregados de material "algodonoso" representando, probablemente, proteína desnaturalizada (Kumar, et al. 2006).

Los cambios nucleares revelan fragmentación inespecífica del ADN. La basofilia de la cromatina puede desvanecerse (cariólisis), un cambio que posiblemente refleja la actividad de las DNAsas. Un segundo patrón (que se ve también en muerte celular apoptótica) es la picnosis, caracterizada por encogimiento nuclear y aumento de la basofilia. Aquí el ADN aparentemente se condensa en una masa sólida, contrída y basofílica. En el tercer patrón, conocido como cariorrexis, los núcleos picnóticos o parcialmente picnóticos sufren fragmentación. Con el paso del tiempo (1 ó 2 días), el núcleo de la célula necrótica desaparece totalmente (Kumar, et al. 2006).

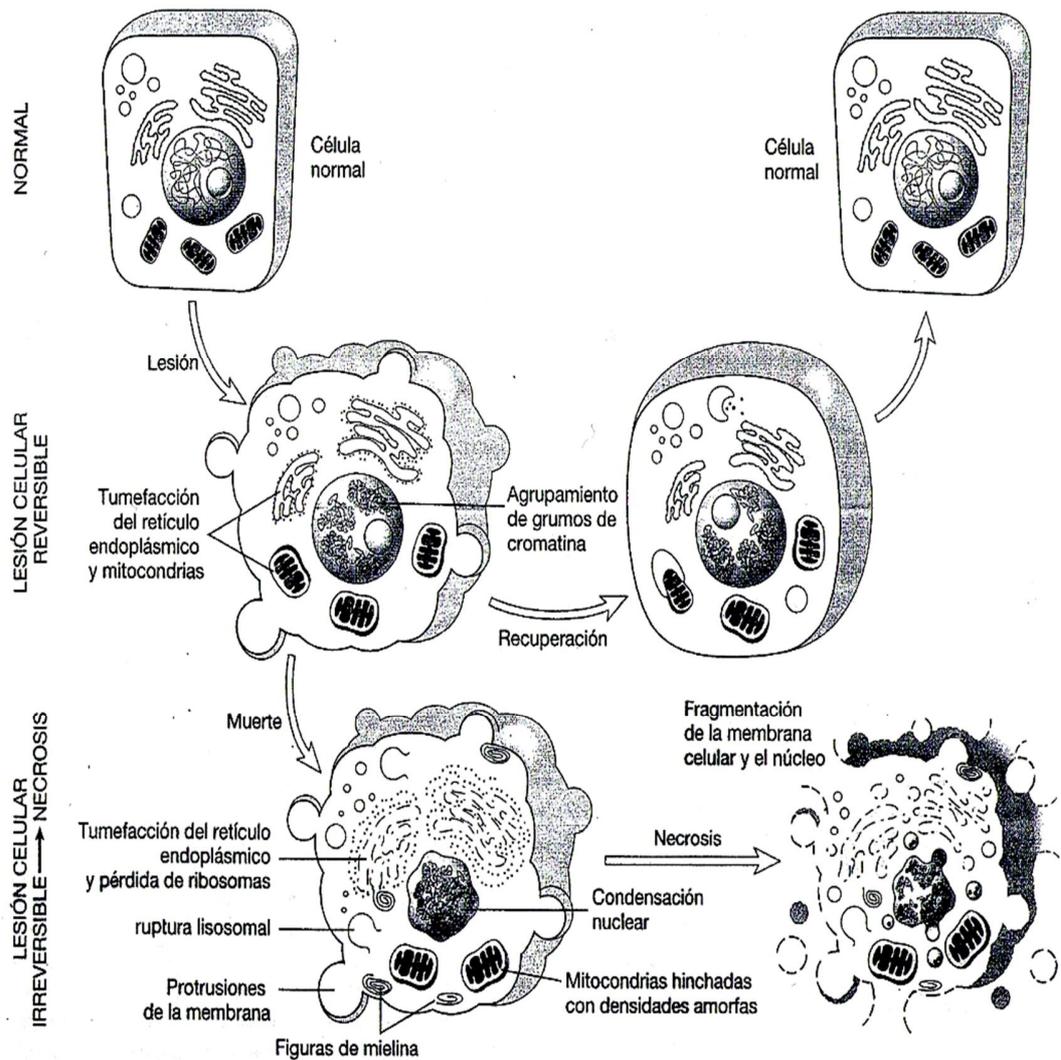


Figura 12. Esquema Lesión Reversible e Irreversible (Necrosis). Tomado de Kumar (2006)

2.3 Autofagia

Ante los diferentes estímulos que se producen por el estrés celular como ayuno prolongado o inanición, hipoxia, respuesta a patógenos intracelulares, etc., la autofagia es un mecanismo de supervivencia, con la finalidad de mantener la homeostasis celular por medio de la degradación de proteínas y organelos para proveer sustratos necesarios al metabolismo energético, reciclar amino ácidos, ácidos grasos y nucleótidos para la biosíntesis celular (Glick et al., 2010; Singletary and Milner, 2008; Yu et al., 2008).

En la autofagia se han descrito una serie de pasos como: iniciación, elongación, maduración y cierre.

- **INICIACIÓN:** Ante la disminución de nutrientes, *mTOR* se disocia de Ulk 1 y 2 (unc-51-like cinasa/Atg1) y es desfosforilado para fosforilar y activar a Atg13 y FIP200 (familia de proteínas de adhesión focal cinasa que interactúan con proteínas de 200 KDa / Atg17) formando un complejo que marca el inicio para la elongación de la membrana (fagóforo), Ulk 1 y 2 fosforilan a AMBRA1 (molécula activadora del regulador de autofagia Beclin 1) el cual ayuda a la separación de Beclin 1 (*Atg6/vps30*) de Bcl2, así Beclin 1 junto con p150, Vps34, BIF1 (factor de interacción con BAX) y UVRAG (gen asociado a resistencia a la radiación ultravioleta) inician el proceso. Posteriormente se unen al complejo Atg14 y Vps15 para fusionarse con la membrana de retículo endoplásmico (Heath and Xavier, 2009; Levy and Thorburn, 2011; Glick et al., 2010; Singletary and Milner, 2008; Yu et al., 2008; Eisenberg-Lerner et al., 2009).
- **ELONGACION:** En este paso se unen Atg5 y Atg12 con Atg16 para mediar el proceso de conversión por lipidación de LC3I (proteína de cadena ligera /Atg8). LC3I sufre un corte en su extremo C terminal para ser conjugado con la fosfatidiletanolamida (PE) y es transformado en LC3II para localizarse en el lumen de la membrana, donde se agregaran al complejo Atg3, Atg7 y Ulk1, iniciando la elongación del autofagosoma, donde además, PI3k III, Vps34, P50, UVRAG, y Beclin 1 forman el complejo promotor de maduración del autofagosoma (Singletary and Milner, 2008; Heath and Xavier, 2009; Levy and Thorburn, 2011; Glick et al., 2010; Eisenberg-Lerner et al., 2009).
- **CIERRE Y MADURACIÓN:** El autofagosoma es removido de la región perinuclear para fusionarse con el lisosoma donde Atg16 se disocia para que LC3II pueda unirse a la dineína iniciando la fusión de las membranas a través de las Lamp 1 y 2 (proteínas asociadas a membrana lisosomal), y UVRAG que interactúan con las proteínas Vps de clase C y estimulan a la GTPasa Rab7, formando el autofagolisosoma donde se liberan las hidrolasas para degradar el material intravesicular, para posterior liberación al citoplasma (Heath and Xavier, 2009; Levy and Thorburn, 2011; Glick et al., 2010; Singletary and Milner, 2008; Yu et al., 2008; Eisenberg-Lerner et al., 2009).

La autofagia es regulada negativamente por *mTOR* mediante fosforilación de *Ulk 1/2* y *Atg13* suprimiendo la autofagia por secuestro del complejo *Ulk 1/2/Atg13* y *FIP200* (Heath and Xavier, 2009, Levy and Thorburn, 2011, Singletary and Milner, 2008, Eisenberg-Lerner et al., 2009), y también por *Bcl-2* o *Bcl-XL* interaccionando directamente con el dominio BH3 de *Beclin 1* (Kang and Reynolds, 2009; Yu et al., 2008; Eisenberg-Lerner et al., 2009).

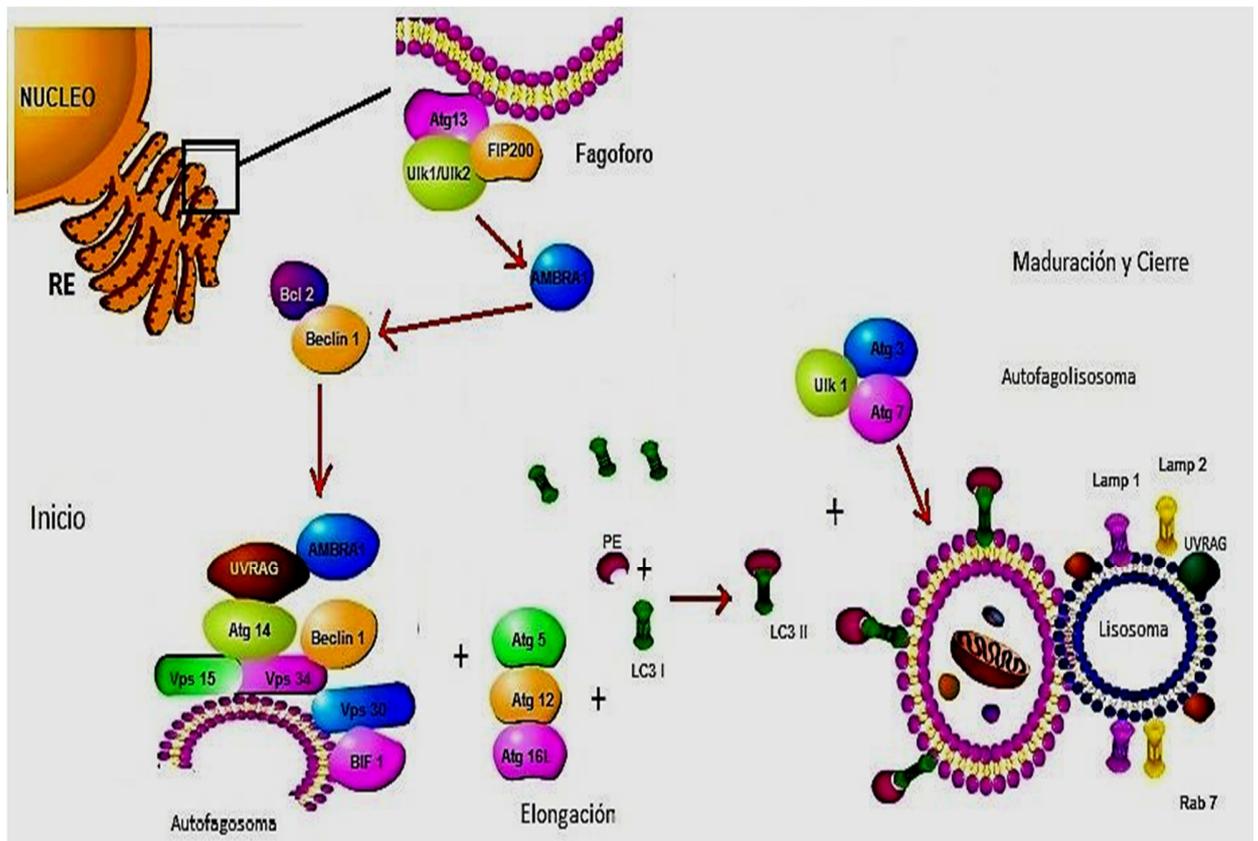


Figura 13. Vía de autofagia: RE Retículo endoplásmico, PE fosfatidiletanolamida. Tomado de Romero Hernández, et. al. (2013).

3. Ensayo cometa.

Nuevos productos se agregan cada año a la actual carga de sustancias tóxicas en el medio ambiente. Esto ha provocado un incremento en la contaminación de los ecosistemas, así como un deterioro del aire, el agua y la calidad del suelo. Las excesivas actividades industriales y agrícolas afectan gravemente la biodiversidad, amenazando la supervivencia de muchas especies y causando riesgo de enfermedades a los humanos. Algunos de los productos químicos utilizados, por ejemplo, insecticidas y metales pesados, pueden ser genotóxicos para algunas especies en particular o para todas, causando efectos perjudiciales en células somáticas o germinales. Existen sistemas de prueba que ayudan en

la predicción de peligros y evaluación de riesgos y son importantes para evaluar el potencial genotóxico de productos químicos antes de que sean usados, y así, evitar el daño en flora y fauna de diversos hábitats (Anderson y Dhawan, 2009).

3.1 Definición.

El ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina, es una técnica que se encarga de evaluar y cuantificar el daño producido al ADN en células eucariontes y procariontes por cualquier agente físico, químico o biológico. Ha sido aceptado ampliamente como una herramienta simple, sensible y rápida, incrementando así su aplicación en diversos campos que van desde la genética toxicológica hasta la epidemiología humana (Anderson y Dhawan, 2009).

3.2 Fundamento.

El fundamento de este ensayo radica en que las rupturas que se han producido en el material genético, producto de la interacción con el contaminante, generan fragmentos los cuales al ser sometidos a un pH superior a trece y posteriormente a una electroforesis, aparentan ser la cola de un cometa, donde la "cabeza" representa el núcleo y la cola es el ADN fragmentado. La longitud y la intensidad de la cola dependen del número de rupturas que se han producido. Debido a esta apariencia que forman las células resultantes, a este ensayo se le conoce comúnmente como "Ensayo Cometa".

3.3 Usos e importancia.

El ensayo cometa es un valioso método para la detección de compuestos genotóxicos en actividades ocupacionales y ambientales en humanos, y puede ser utilizado como una herramienta en la evaluación de riesgos. El daño en el ADN, evaluado por medio del ensayo cometa, nos indica la exposición a un genotóxico y si esta exposición está en una etapa inicial, puede someterse a una reparación y proporciona la oportunidad de intervenir en el momento exacto y salvaguardar la integridad de un individuo. El ensayo puede llevarse a cabo después de la eliminación del genotóxico de la dieta o del medio ambiente, con el fin de monitorear la reducción del daño en el ADN del individuo, además es relativamente rápido, barato y ofrece la comparación de los datos obtenidos con otros ensayos citogenéticos e incluso con las determinaciones moleculares.

Para los ensayos se emplean comúnmente linfocitos, células del epitelio bucal, nasal, espermatozoides y células placentarias. El empleo de este ensayo también contribuye a la

predicción del desarrollo de algunas enfermedades (carcinomas, cáncer de esófago y pulmón, etc.) debido a la susceptibilidad de los individuos al daño en su ADN. También es una herramienta alternativa y de apoyo a los ensayos citogenéticos, factores como la edad, la alimentación, el estilo de vida y las enfermedades pueden ser parámetros que influyen directamente sobre el estudio y monitoreo de las poblaciones con el ensayo cometa (Anderson y Dhawan, 2009).

4. Antecedentes y justificación del trabajo.

La OMS establece un sistema de clasificación para distinguir entre las formas más peligrosas de plaguicidas basándose en los riesgos para la salud humana, evaluando las exposiciones individuales o múltiples en un corto período de tiempo.

Los insecticidas organofosforados utilizados en este trabajo están clasificados por la Organización Mundial de Salud como:

- Extremadamente peligrosos (Ia): Metil Paratión
- Altamente Peligrosos (Ib): Metil Azinfos, Ometoato y Metamidofos.

Además se sabe que desde mediados de los años 70 y principios de los años 90, México fue de los mayores consumidores de insecticidas organofosforados en Centro y Norteamérica, y hasta la fecha, estos insecticidas no están prohibidos en nuestro país y siguen siendo permitidos, conforme al Diario Oficial de la Federación desde el 3 de enero de 1991 (OMS, 2009; IPCS, 1986; INECC, 2014).

La Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) no restringe el uso de estos insecticidas cuatro insecticidas organofosforados (USA Environmental Protection Agency, 2013) y hasta ahora ninguno de ellos ha demostrado ser carcinógeno según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2014), sin embargo estudios han demostrado la mutagenicidad del Metil Paratión en células de mamíferos y en levaduras (IARC, 1983).

Estudios previos cuyos resultados aparecen en las figuras 14 y 15, muestran los efectos tóxicos de los cuatro insecticidas organofosforados: Metil Paratión, Metil Azinfos, Ometoato y Metamidofos en líneas celulares humanas de piel y de bronquio, por lo cual se ha despertado el interés de conocer el potencial toxicológico de estos insecticidas, los cuales aún son utilizados en nuestro país y se consideran peligrosos (Figuras 14 y 15) (Cortés Eslava, et al, 2013).

predicción del desarrollo de algunas enfermedades (carcinomas, cáncer de esófago y pulmón, etc.) debido a la susceptibilidad de los individuos al daño en su ADN. También es una herramienta alternativa y de apoyo a los ensayos citogenéticos, factores como la edad, la alimentación, el estilo de vida y las enfermedades pueden ser parámetros que influyen directamente sobre el estudio y monitoreo de las poblaciones con el ensayo cometa (Anderson y Dhawan, 2009).

4. Antecedentes y justificación del trabajo.

La OMS establece un sistema de clasificación para distinguir entre las formas más peligrosas de plaguicidas basándose en los riesgos para la salud humana, evaluando las exposiciones individuales o múltiples en un corto período de tiempo.

Los insecticidas organofosforados utilizados en este trabajo están clasificados por la Organización Mundial de Salud como:

- Extremadamente peligrosos (Ia): Metil Paratión
- Altamente Peligrosos (Ib): Metil Azinfos, Ometoato y Metamidofos.

Además se sabe que desde mediados de los años 70 y principios de los años 90, México fue de los mayores consumidores de insecticidas organofosforados en Centro y Norteamérica, y hasta la fecha, estos insecticidas no están prohibidos en nuestro país y siguen siendo permitidos, conforme al Diario Oficial de la Federación desde el 3 de enero de 1991 (OMS, 2009; IPCS, 1986; INECC, 2014).

La Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) no restringe el uso de estos insecticidas cuatro insecticidas organofosforados (USA Environmental Protection Agency, 2013) y hasta ahora ninguno de ellos ha demostrado ser carcinógeno según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2014), sin embargo estudios han demostrado la mutagenicidad del Metil Paratión en células de mamíferos y en levaduras (IARC, 1983).

Estudios previos cuyos resultados aparecen en las figuras 14 y 15, muestran los efectos tóxicos de los cuatro insecticidas organofosforados: Metil Paratión, Metil Azinfos, Ometoato y Metamidofos en líneas celulares humanas de piel y de bronquio, por lo cual se ha despertado el interés de conocer el potencial toxicológico de estos insecticidas, los cuales aún son utilizados en nuestro país y se consideran peligrosos (Figuras 14 y 15) (Cortés Eslava, et al, 2013).

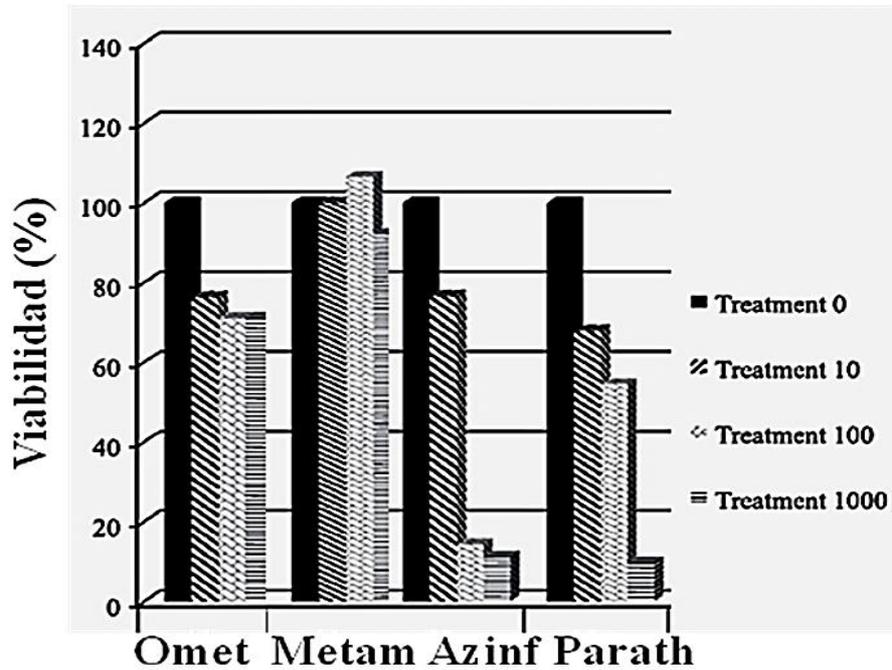


Figura 14. Citotoxicidad en células HaCaT en presencia de insecticidas organofosforados. Las concentraciones usadas fueron de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ de medio de cultivo. Tomado de Cortés Eslava, et al. (2013)

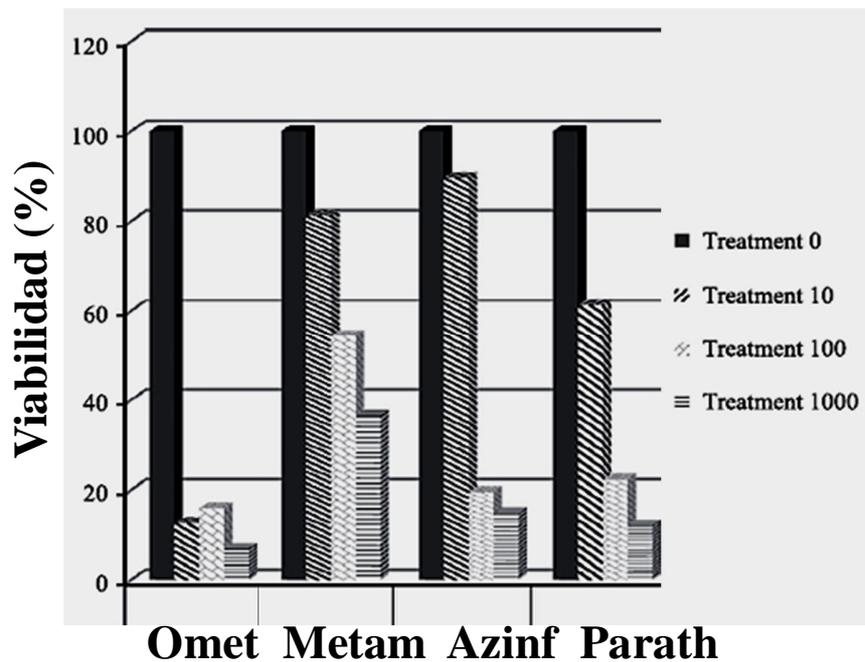


Figura 15. Citotoxicidad en células NL20 en presencia de insecticidas organofosforados. Las concentraciones usadas fueron de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ de medio de cultivo. Tomado de Cortés Eslava, et al. (2013)

Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares relacionados a la muerte celular que producen estos compuestos y que puedan explicar los efectos citotóxicos y la muerte celular descrita.

En este estudio se propone iniciar la descripción de dichos efectos en el estudio *in vitro* de cada insecticida en cultivo de células que representan sistemas de exposición en el humano: piel y bronquio, utilizando líneas celulares de piel como HaCaT que son queratinocitos y células bronquiales como las NL-20. Son realmente pocos los reportes que describan algunos de los procesos que participan en la inducción de muerte celular, como un efecto tóxico debido a la exposición a los insecticidas. Por lo que representa una razón importante en realizar la evaluación de los efectos de estos compuestos en estos modelos de líneas celulares humanas.

5. Hipótesis.

"Los insecticidas organofosforados serán capaces de activar la expresión de genes que puedan explicar las alteraciones celulares inducidas y la muerte celular debido a su exposición *in vitro*, en queratinocitos y células bronquiales humanas"

6. Objetivos.

Objetivo general:

- Evaluar los efectos tóxicos de cuatro insecticidas organofosforados en queratinocitos y células bronquiales humanas con la finalidad de determinar los mecanismos de daño.

Objetivos específicos.

- Evaluar la citotoxicidad inducida y los tipos de muerte celular.
- Observar y evaluar los cambios inducidos en la ultraestructura celular.
- Evaluar la genotoxicidad inducida por medio del ensayo cometa.
- Cuantificar la expresión de genes que participan en cada tipo de muerte celular.

Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares relacionados a la muerte celular que producen estos compuestos y que puedan explicar los efectos citotóxicos y la muerte celular descrita.

En este estudio se propone iniciar la descripción de dichos efectos en el estudio *in vitro* de cada insecticida en cultivo de células que representan sistemas de exposición en el humano: piel y bronquio, utilizando líneas celulares de piel como HaCaT que son queratinocitos y células bronquiales como las NL-20. Son realmente pocos los reportes que describan algunos de los procesos que participan en la inducción de muerte celular, como un efecto tóxico debido a la exposición a los insecticidas. Por lo que representa una razón importante en realizar la evaluación de los efectos de estos compuestos en estos modelos de líneas celulares humanas.

5. Hipótesis.

"Los insecticidas organofosforados serán capaces de activar la expresión de genes que puedan explicar las alteraciones celulares inducidas y la muerte celular debido a su exposición *in vitro*, en queratinocitos y células bronquiales humanas"

6. Objetivos.

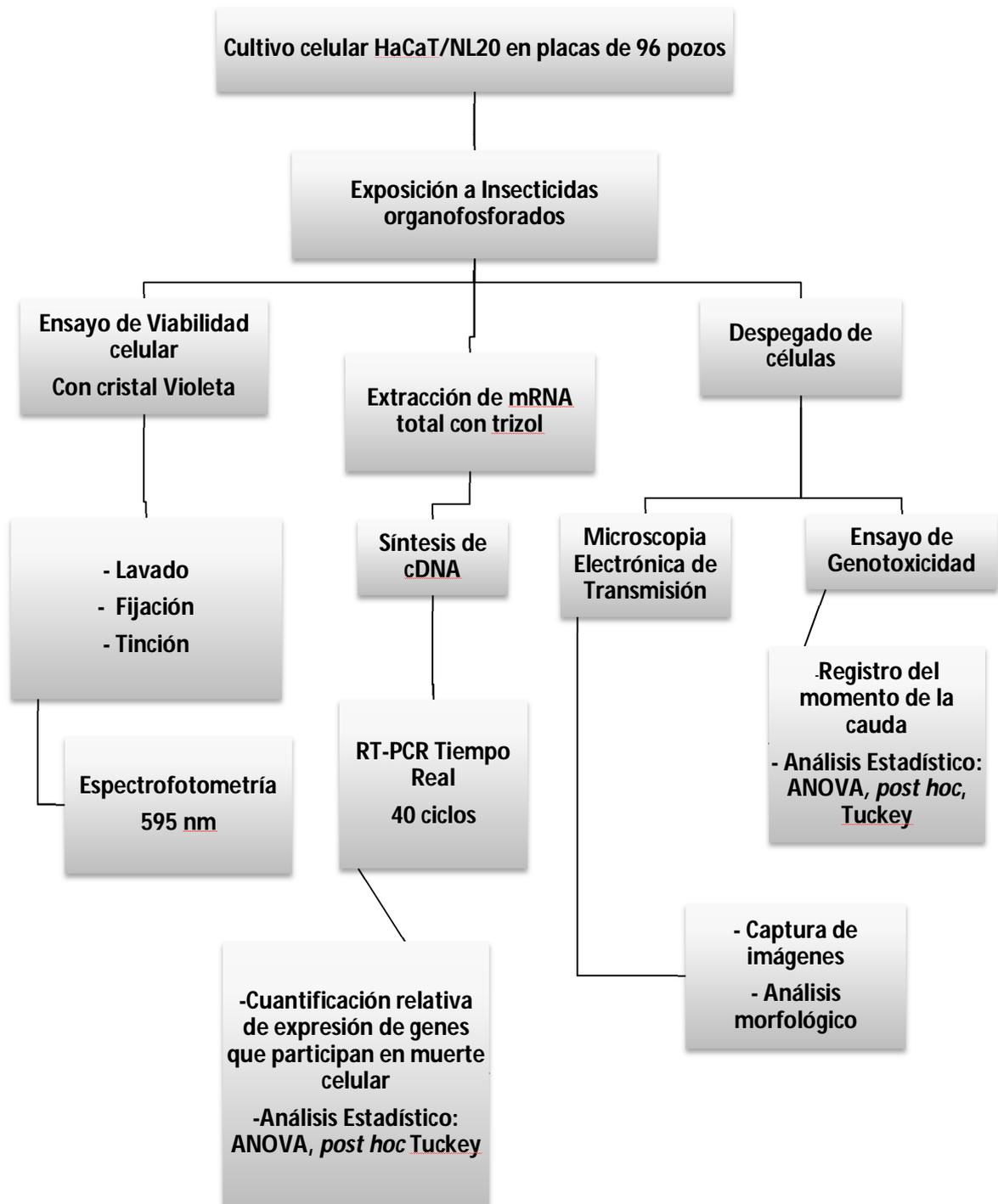
Objetivo general:

- Evaluar los efectos tóxicos de cuatro insecticidas organofosforados en queratinocitos y células bronquiales humanas con la finalidad de determinar los mecanismos de daño.

Objetivos específicos.

- Evaluar la citotoxicidad inducida y los tipos de muerte celular.
- Observar y evaluar los cambios inducidos en la ultraestructura celular.
- Evaluar la genotoxicidad inducida por medio del ensayo cometa.
- Cuantificar la expresión de genes que participan en cada tipo de muerte celular.

7. Esquema de trabajo.



Capítulo II. Metodología Experimental.

1. Protocolos del cultivo celular.

1.1 Descongelado de células.

Se agregaron 5 mL de medio de cultivo en botella de 25 cm² para cultivo celular y se rotuló con el nombre de la línea celular (HaCaT o NL20), el número de pase y el nombre de usuario. Se descongeló un vial de células a temperatura ambiente dentro de la campana de flujo laminar. El contenido del vial se agregó a la botella y se homogenizó suavemente, finalmente la botella fue colocada dentro de la incubadora y se dejaron adherir las células.

1.2 Mantenimiento del cultivo.

Al paso de 2 días se evaluó el pH del medio (cambio de color). En caso positivo el medio de cultivo se cambió dentro de la campana de flujo laminar.

1.3 Despegado las células.

Se abrió la botella dentro de la campana de flujo laminar y se decantó el medio de cultivo. Se agregaron 4 mL de solución salina fisiológica estéril al 0.9% más 0.5 mL de tripsina. Se homogenizó suavemente y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Después se pasó el contenido a un tubo cónico de 15 mL estéril dentro de la campana de flujo laminar. Se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante dentro de la campana de flujo laminar y se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo.

1.4 Conteo celular.

Se tomaron 10 µL de la resuspensión celular más 40 µL de medio y fueron colocados dentro de un tubo de microcentrífuga de 0.6 mL. Se llenó la cámara de Newbauer y se hizo el conteo celular con la siguiente fórmula:

$$\# \text{ Total de células en 1 mL} = \frac{\# \text{ células contadas en los 4 cuadrantes}}{4} \times 1 \times 5 \times 10\,000$$

En donde:

4= número de cuadrantes contados

5= superficie contada (mm²)

1= profundidad de la cámara

10000= dilución

1.5 Microensayo en placa de 96 pozos.

Una vez que se contó el número celular deseado (de 500 000 a 1 000 000 células) por ensayo, se procedió a la siembra en placas de 96 pozos. Por pozo se sembraron 16 000 células en un volumen final de 100 μL , realizando triplicados para cada concentración de insecticida, testigo y control, como se muestra en la siguiente figura:

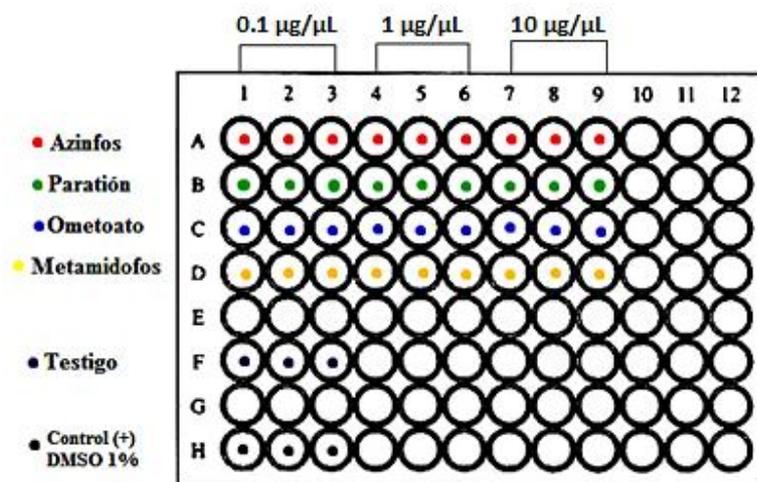


Figura 16. Esquema para ensayo cometa.

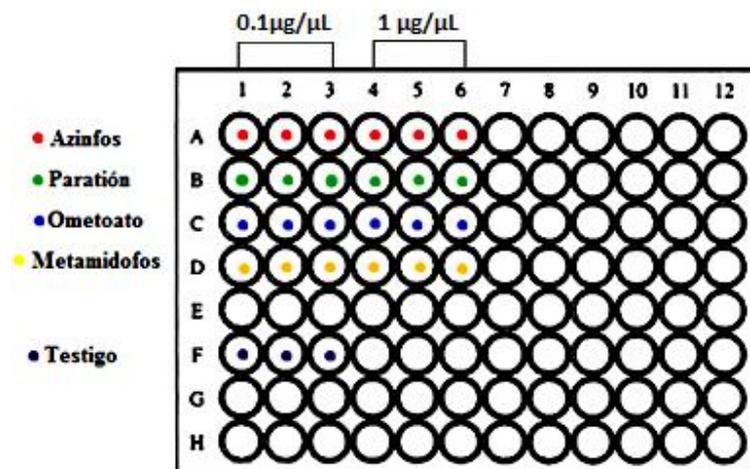


Figura 17. Esquema para ensayos de viabilidad celular y análisis de expresión de genes por RT-qPCR.

Sembradas las células en la placa de 96 pozos, se incubaron a 37°C y 0.5% de CO₂ durante 24 horas para su adhesión y expansión en los pozos de la placa. Transcurridas las 24 horas, se les retiró el medio, y se les agregó 100 µL de medio fresco a las células testigo y 100 µL de medio con insecticida a diferentes concentraciones o DMSO a las células tratadas. Nuevamente se dejaron incubando a 37°C y 0.5% de CO₂ durante 24 horas en presencia del insecticida para evaluar los efectos. Al día siguiente se retiró el medio y se fijaron o despegaron las células, según fuera el caso.

2. Diseño de iniciadores (cebadores, primers).

Los genes seleccionados para analizar la respuesta celular fueron Caspasa 9 y Caspasa 8, los cuales participan en la muerte celular apoptótica; RIPK1, que controlan la muerte celular por necrosis; y finalmente Beclin 1, que inicia la autofagia. El gen GAPDH se utilizó como gen endógeno constitutivo.

Las características y función de cada uno de estos genes se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Genes que participan en diferentes tipos de muerte celular.

| Gen | Proteína | Actividad | Familia |
|-----------|---|-------------------------------|-------------------------------------|
| Caspasa 9 | Proteasa ácida cisteína-aspártica 9 | Proapoptótica | Proteasas ácidas cisteína-aspártica |
| Caspasa 8 | Proteasa ácida cisteína-aspártica 8 | Proapoptótica | Proteasas ácidas cisteína-aspártica |
| RIPK1 | Receptor de interacción serina-treoninquinasa 1 | Inducción de necrosis | RIP |
| Beclin 1 | Beclin 1 | Regulación autofágica | |
| GAPDH | Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa | Control endógeno constitutivo | |

Después de la elección de estos genes, se buscaron las secuencias de sus mRNA en el Gene Bank Sequence Database del National Center of Biotechnology (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para diseñar los iniciadores y realizar el RT-qPCR se utilizó la siguiente fórmula:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

Las secuencias iniciadoras así como la T_m de diseño y de trabajo se muestran en el siguiente cuadro:

Tabla 1. Características de los iniciadores para evaluar la expresión de los genes por análisis de RT-PCR en tiempo real.

| Gen | Iniciadores 5´- 3´ | T_m de diseño ($^{\circ}\text{C}$) | T_m de trabajo ($^{\circ}\text{C}$) | Tamaño del producto (pb) |
|-----------|---|--|---|--------------------------|
| Caspasa 9 | F= AGCTGCAGGTGGACCAGC R= CGCTGGATGCCTCGATCA | 60 | 58 | 79 |
| Caspasa 8 | F= ACAACTGGACAGTGAAGATCT R= AGCAGCTCCTTCAGGAAGG | 60 | 58 | 162 |
| RIPK1 | F= GACATGCCTTGAATGTCATTA R= GGCCTCGTTGTGCTCAATG | 60 | 58 | 168 |
| Beclin 1 | F= GCACCATGCAGGTGAGCTT R= GTGACACGGTCCAGGATCTT | 60 | 58 | 85 |
| GAPDH | F= CGGAGTCAACGGATTTGGTC R= ATGAAGGGGTCATTGATGGCA | 60 | 58 | 96 |

3. Ensayo de viabilidad celular.

16×10^3 células se sembraron por triplicado en placas de 96 pozos durante 24 horas, luego se expusieron otras 24 horas a 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cada insecticida organofosforado, además de llevar una muestra control. Al finalizar el tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X durante 5 min, se fijaron agregando 100 μL de formaldehído al 10% por pozo toda la noche y se lavaron nuevamente dos veces con PBS 1X. Después se dejaron secar a temperatura ambiente y se tiñeron agregando 100 μL de cristal violeta al 0.05% por pozo, durante 5 min. Se lavaron dos veces con agua de la llave para retirar el exceso de colorante y se dejaron secar. El colorante retenido en las células se retiró usando 0.2mL de ácido acético al 33% por pozo, y la cantidad de color se cuantificó en un espectrofotómetro a 595nm. Se obtuvieron promedios de los triplicados y se realizó una gráfica de viabilidad. La mortalidad inducida por cada compuesto se calculó como un %, tomando como referencia el 100% de viabilidad en las células de control.

4. Microscopia electrónica de transmisión (MET).

Una vez que las células fueron expuestas al insecticida, se retiró el medio de cultivo y se agregaron por pozo 100µL de solución de despegado (tripsina 10%-NaCl 90%) durante 10 minutos dejándose dentro de la incubadora a 37°C. Posteriormente se juntaron los triplicados en un solo vial de 1.5 mL y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró y se agregó 1mL de solución fijadora fría, se centrifugo a 2000 rpm durante 10 minutos. Se lavaron las células y se agregó una solución post-fijadora durante una hora. Se volvieron a lavar y se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol. El óxido de propileno se añadió dos veces durante 20 min, y luego se retiró para añadir resina y óxido de propileno 1:2 durante 1 h, 1:1 durante 2.5 h, y 2:1 por una noche. En la mañana, las células se retiraron y se colocaron en resina a 60 °C durante 24 h. Se obtuvieron cortes ultrafinos y finalmente fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión, a la vez que se capturaron las imágenes para su posterior análisis.

5. Ensayo cometa.

Una vez que las células fueron expuestas al insecticida, se retiró el medio de cultivo y se agregaron por pozo 100µL de solución de despegado (tripsina 10%-NaCl 90%) durante 10 minutos dejándose dentro de la incubadora a 37°C. Se unieron los triplicados en un solo vial de 1.5mL y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue retirado y posteriormente se agregaron 300 µL de medio de cultivo en cada tubo. Los ensayos cometa se realizaron de la siguiente manera: se hicieron las preparaciones en portaobjetos precubiertos con agarosa de punto de fusión normal, se mezcló la suspensión celular con agarosa con bajo punto de fusión, después se introdujeron en solución de lisis (NaCl [2.5 M], EDTA [100 mM], Tris [10 mM], pH= 10, Triton X-100 1%, DMSO 10%, los últimos dos componentes son añadidos antes de usarse) fría al menos por una hora. Posteriormente se dejaron en una cámara de electroforesis horizontal con amortiguador de pH>13 por 20 minutos para que se lleve a cabo la desnaturalización del ADN y otros 20 minutos, para que durante la electroforesis (a 25 Volts y 300 mA) el ADN fragmentado migre hacia el ánodo. Después se le quitó a las laminillas el exceso de álcali con un amortiguador neutro (Tris 0.4M) y se fijaron con etanol al 100%. Se tiñeron con bromuro de etidio (2 µg/mL) y se observaron al microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm. Empleando el programa "Cometassay IV" se analizaron 30 núcleos de 3 preparaciones por grupo, determinando el momento de la cola de cada uno de los núcleos que capturo. Este dato proporciona tanto la longitud como la intensidad de la cola del cometa. En el presente estudio únicamente se muestran los resultados numéricos obtenidos del programa.

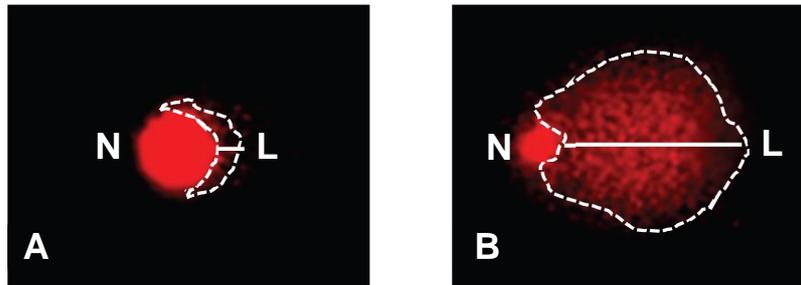


Figura 18. Ensayo cometa. Se muestra en A un núcleo de células sin exponer a genotóxicos. En B se muestra un núcleo de una célula que fue expuesta a agentes genotóxicos. Tinción con bromuro de etidio. N, núcleo. L, longitud de la cauda del cometa. La zona punteada muestra la "cola" del cometa.

** Nota: las células fueron enviadas al Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM (CCA-UNAM) en donde se realizó la preparación y lectura de las laminillas. Se determinó el momento de la cola y las imágenes se digitalizaron.

6. Extracción de ARN.

Después del tratamiento con insecticidas organofosforados, se retiró de la placa de 96 pozos el medio con insecticida, y se agregaron 100 μL de trizol a cada pozo, se resuspendió perfectamente y se unieron los triplicados de cada tratamiento. A los viales obtenidos, se le agregaron 60 μL de cloroformo y se homogenizó en vórtex. Se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y fue recolectada la fase acuosa, sin interferir con la fase intermedia y se colocó en otro microtubo nuevo. Para lograr la precipitación del ARN, a la fase acuosa se agregaron 150 μL de isopropanol. Se dejó reposar 30 minutos y se agregó glucógeno para asegurar la precipitación. Se agitó suavemente y centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos. Se decantó y agregaron 300 μL de etanol al 70%. Se homogenizó en vórtex y centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y se dejó secar boca abajo sobre una papel limpio a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en 20 μL de agua DEPC y se almacenó a -20°C hasta su uso.

7. Cuantificación de ARN.

Obtenido el ARN, se cuantificó mediante un espectrofotómetro capacitado para registrar micro volúmenes de muestra. Se encendió el instrumento y se eligió la opción de cuantificación de ARN. Se limpió el porta muestras con agua inyectable o agua DEPC y la ayuda de un paño suave. Se calibró a cero, agregando en el porta muestras 2 μL agua inyectable o agua DEPC. Una vez calibrado, se retiraron con un paño suave los 2 μL de agua del porta muestras. Cada muestra fue homogenizada perfectamente y se tomaron 2

µL de muestra colocándolas en el aparato para su cuantificación. Una vez cuantificada la muestra se retira y se procede a cuantificar del mismo modo las demás, limpiando el porta muestras con agua inyectable o DEPC entre cada lectura.

8. Síntesis de cDNA.

Una vez cuantificado el ARN mediante espectrofotometría, se hizo una dilución de cada muestra con el fin de obtener una solución con la concentración de 20 ng/µL, como se muestra en el siguiente ejemplo:

$$\begin{aligned} C1 &= \text{Concentración deseada} = [20 \text{ ng}/\mu\text{L}] \\ V1 &= \text{Volumen deseado} = 50 \mu\text{L} \\ C2 &= \text{Concentración reportada (stock)} = [200 \text{ ng}/\mu\text{L}] \end{aligned}$$

$$C1V1 = C2V2$$

Despejando:

$$C1V1/C2 = V2 = 5 \mu\text{L}$$

Por lo tanto, se tomaron 5 µL (1000 ng de ARN) del stock y se llevó a un aforo de 50 µL con agua DEPC o agua inyectable. Posteriormente, para poder analizar la expresión del mRNA de los genes seleccionados, se realizó una reacción de síntesis de cDNA en microtubos de 0.2 mL con las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 2. Fórmula para la reacción de síntesis de cDNA.

| Reactivo Volumen final por tubo= 20 µL | Volumen |
|---|---------|
| Buffer 5X | 4 µL |
| dNTPs | 2 µL |
| OligodT | 1 µL |
| RT enzima | 0.5 µL |
| Inhibidor de RNAsas | 0.2 µL |
| ARN | 5 µL |
| H ₂ O | 7.3 µL |

La condiciones de la síntesis dentro del termociclador fueron: 37°C durante 60 minutos, 70°C durante 10 minutos y finalmente 22°C durante 1 minuto.

9. PCR Tiempo Real.

Partiendo del cDNA, se realizó la siguiente mezcla de reacción, trabajando por triplicado las muestras:

Tabla 3. Fórmula para reacción de PCR tiempo real.

| Reactivo | Volumen |
|-------------------------------|---------|
| Volumen final por pozo= 20 µL | |
| "Syber Green®" | 10 µL |
| Oligo "Forward" [10 µM] | 0.6 µL |
| Oligo "Reverse" [10 µM] | 0.6 µL |
| ROX [1:10] | 0.04 µL |
| cDNA | 2 µL |
| H ₂ O | 6.76 µL |

Además se incluyó una muestra "NTC" (*no template control*), que en PCR tiempo real sirve como control para corroborar que no exista contaminación y/o dímeros o estructuras secundarias de los iniciadores. La muestra "NTC" contiene todos los componentes de reacción, con excepción del cDNA (templado o molde).

| All | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | NTC | T(-) | T(-) | T(-) | A1 | A1 | A1 | A2 | A2 | A2 | P1 | P1 |
| A | REF SYBR |
| | P1 | P2 | P2 | P2 | O1 | O1 | O1 | O2 | O2 | O2 | M1 | M1 |
| B | REF SYBR |
| | M1 | M2 | M2 | M2 | | | | | | | | |
| C | REF SYBR | REF SYBR | REF SYBR | REF SYBR | | | | | | | | |

Figura 19. Diseño de la reacción de PCR tiempo real en placa de 96 pozos

La placa se introdujo dentro del termociclador para PCR tiempo real, con las siguientes condiciones de reacción:

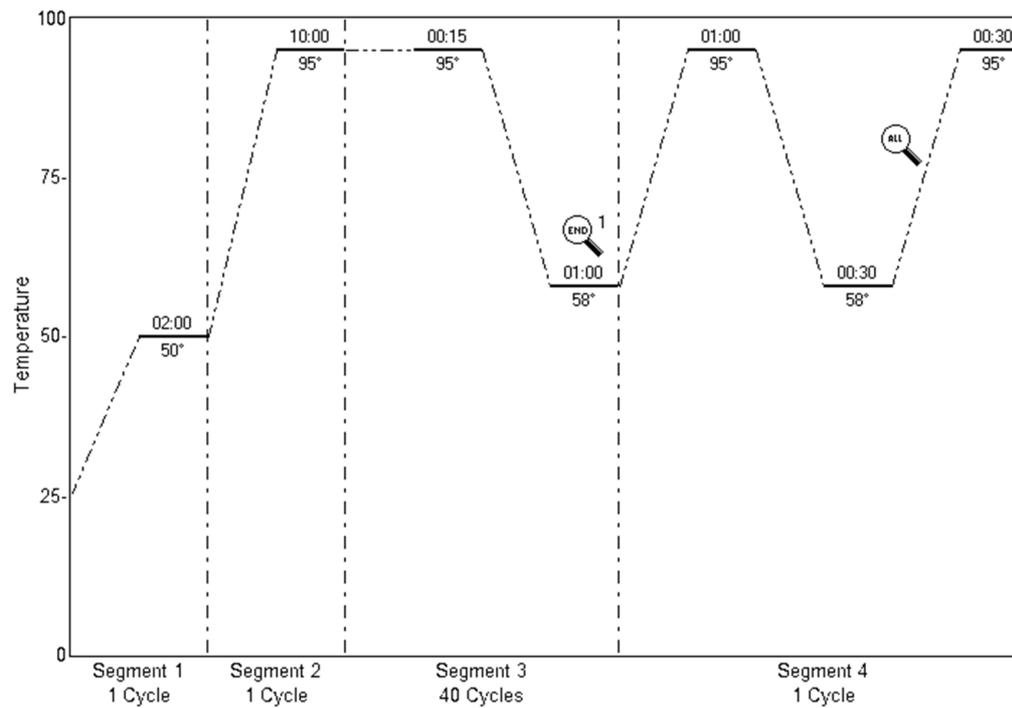


Figura 20. Condiciones de reacción a programar en el termociclador de tiempo real.

Al término de la reacción, se cuantificaron los productos de amplificado mediante el método de cuantificación relativa.

Capítulo III. Resultados y discusión.

1. Resultados.

1.1 Efectos de los insecticidas organofosforados en la viabilidad celular.

El ensayo de viabilidad celular se realizó por el método de cristal violeta y reveló una respuesta en la reducción que depende de la concentración. Se observó que en la mayoría de los casos, la viabilidad celular se ve afectada al incrementar la concentración de insecticida. La absorbancia del testigo se consideró como un el 100% de viabilidad. Las células NL-20 mostraron ser más sensibles al efecto de los insecticidas (Figuras 21-28).

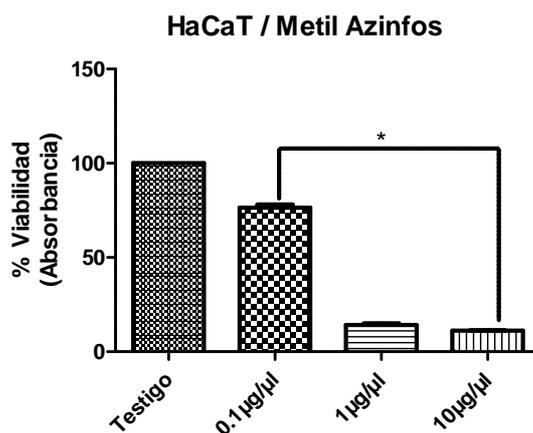


Figura 21. HaCaT en presencia de Metil Azinfos. Cada barra representa el promedio de las absorbancias \pm e.e. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

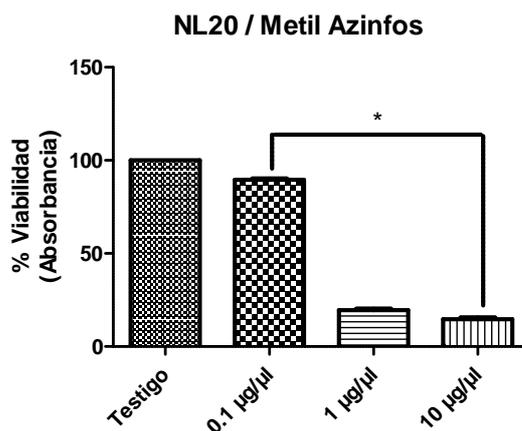


Figura 22. NL20 en presencia de Metil Azinfos. Cada barra representa el promedio de las absorbancias \pm e.e. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

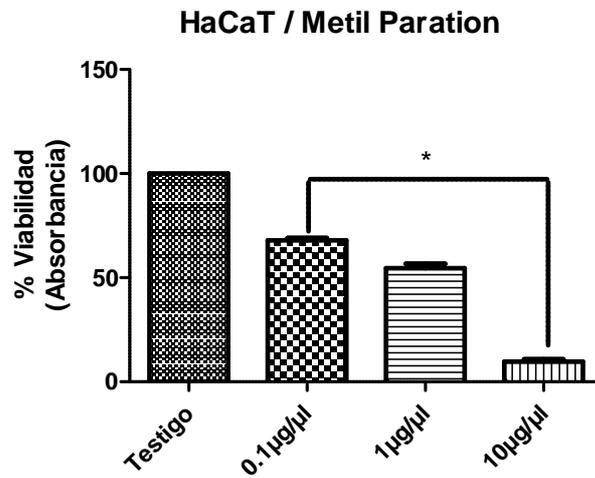


Figura 23. HaCaT en presencia de Metil Paration. Cada barra representa el promedio de las absorbancias \pm e.e. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

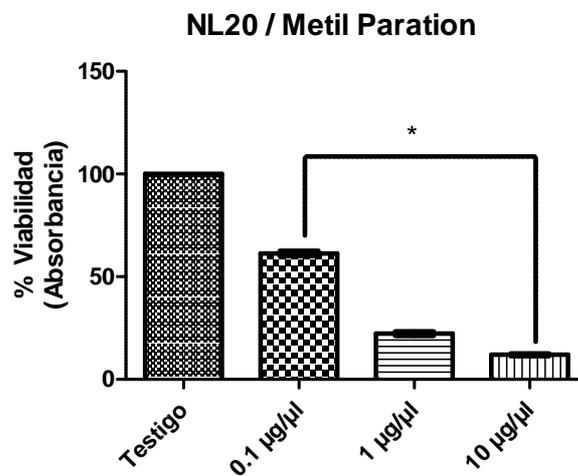


Figura 24. NL20 en presencia de Metil Paration. Cada barra representa el promedio de las absorbancias \pm e.e. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

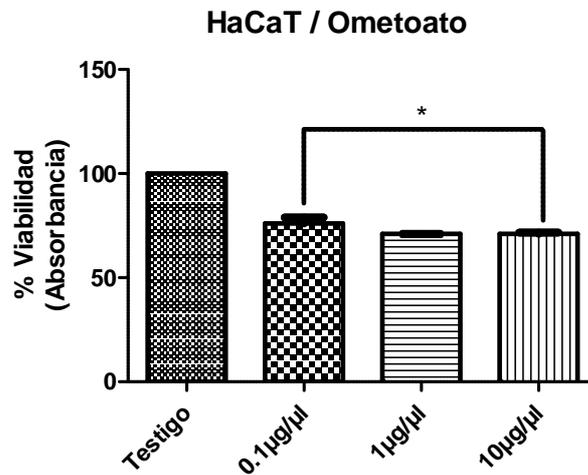


Figura 25. HaCaT en presencia de Ometoato. Cada barra representa el promedio de las absorbancias \pm e.e. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

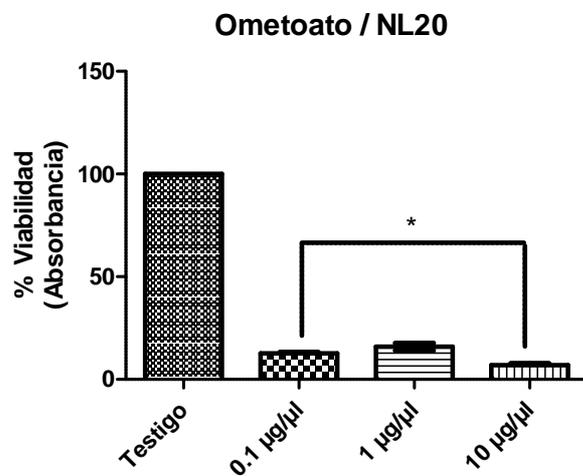


Figura 26. NL20 en presencia de Ometoato. Cada barra representa el promedio de las absorbancias \pm e.e. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

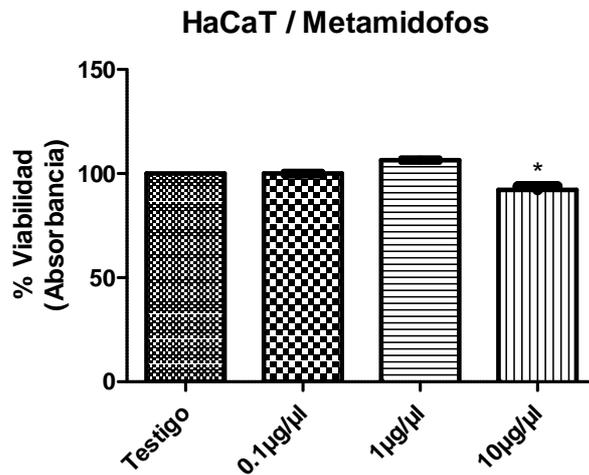


Figura 27. HaCaT en presencia de Metamidofos. Cada barra representa el promedio de las absorbancias \pm e.e. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

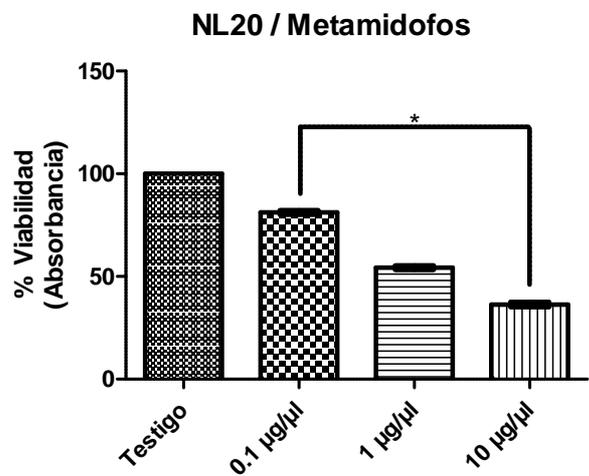


Figura 28. NL20 en presencia de Metamidofos. Cada barra representa el promedio de las absorbancias \pm e.e. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo, ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

1.2 Análisis ultraestructural por MET de los efectos de los insecticidas.

El análisis de los efectos se realizó durante la exposición a 1µg/µL, debido a que es la concentración donde se observaron mejor los efectos morfológicos. Ambas líneas celulares presentaron vacuolas en la mayoría de los casos. La descripción de cada uno de los tratamientos en células HaCaT y NL20 se hace a continuación:

Células HaCaT. Testigo. (Figura 29A).

Membrana con contornos sin lisis y con la presencia de vellosidades. En el interior del citoplasma se encuentra un gran número de mitocondrias (M) funcionales con crestas no dilatadas, con cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RR), algunas vacuolas con material ligeramente electrodensó (V) que puede corresponder a lípido u otra proteína. El núcleo contiene heterocromatina preferente y no presentan ni nucléolos ni algún tipo de alteraciones.

Células HaCaT. Metil Azinfos. (Figura 29B).

La membrana tiene contornos sin lisis celular y con algunas prolongaciones de las membranas. El citoplasma contiene un gran número de mitocondrias de pequeño tamaño (M) con crestas dilatadas (MD) y un gran número de vacuolas de tamaños diferentes de pequeñas (VP) a grandes (VG), algunas con contenido citoplásmico (VC). El núcleo no se encuentra fragmentado, con membrana nuclear íntegra y más eucromatina y cúmulos de heterocromatina perinuclear (NH). No presenta nucléolo.

Células HaCaT. Metil Paration. (Figura 29C).

La membrana tiene contornos irregulares con algunas zonas de lisis celular (LC). El citoplasma está reemplazado totalmente por vacuolas de tamaño mediano (VM) algunas con material ligeramente electrodensó y otras con material muy electrodensó que sugiere placas de queratina (Q). Existe una reminiscencia de núcleo (N) muy pequeño y en degeneración.

Células HaCaT. Ometoato. (Figura 29D).

La membrana celular tiene signos de lisis celular (flechas). El citoplasma contiene una gran cantidad de vacuolas de diferentes tamaños que contienen restos de organelos celulares (V) algunas con calcificación (C); sin embargo contiene algunas mitocondrias que parecen funcionales de pequeño tamaño (M). El núcleo es pequeño sin nucléolo pero sin signos de degeneración pero con más heterocromatina (H).

Células HaCaT. Metamidofos. (Figura 29E).

La membrana celular tiene algunos signos de lisis celular (flechas). El citoplasma contiene un gran número de vacuolas de mediano tamaño con bordes internos irregulares con una gran lisis del citoplasma (L). El núcleo está conservado pero tiene cúmulos de heterocromatina principalmente perinuclear sin signos de degeneración (N).

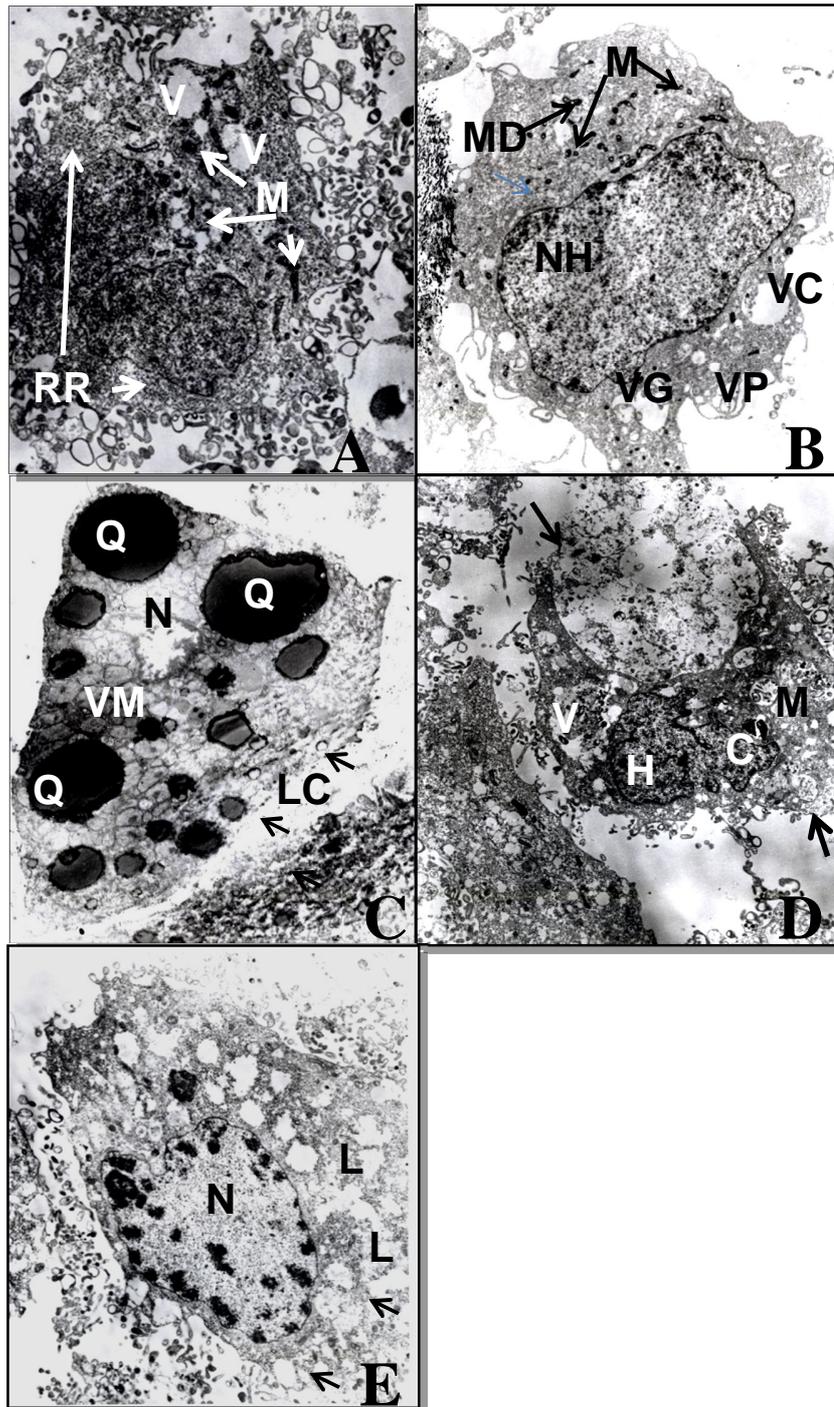


Figura 29. Ultraestructura de células HaCaT. A) HaCaT Testigo (-), B) HaCaT + Metil Azinfos C) HaCaT + Metil Paratión, D) HaCaT + Ometoato y E) HaCaT+ Metamidofos.

Células NL20. Testigo. (Figura 30A).

Los contornos de la membrana son regulares y sin cambios. En el citoplasma se observan algunas mitocondrias (M) con crestas y otras mitocondrias con cambios compatibles de degeneración con matriz mitocondrial dilatada (MD). Hay abundante retículo endoplásmico liso (RL) y rugoso (RR). Se observan vacuolas de secreción en el interior de vacuolas (VS), características de células bronquiales. El núcleo no tiene alteraciones, con heterocromatina perinuclear (HP) y un nucleolo descondensado (N) y zonas más eucromáticas (E).

Células NL20. Metil Azinfos. (Figura 30B).

Contornos de la membrana regulares con la presencia de muchos cilios (Ci). En el citoplasma se observan mitocondrias de pequeño tamaño, con abundantes cisternas de retículo endoplásmico rugoso dilatadas con contenido (RR). Escasas vacuolas. El núcleo contiene hetero y eucromatina, no tiene nucleolo organizado.

Células NL20. Metil Paration. (Figura 30C).

Contornos de la membrana regulares con la presencia de muchos cilios (Ci). En el citoplasma se observan mitocondrias calcificadas (MC), no se observa retículo endoplásmico, con la presencia de escasas vacuolas de secreción (VS). El núcleo no tiene alteraciones con cúmulos de heterocromatina perinuclear (HN) y nucleolo (N) evidente.

Células NL20. Ometoato. (Figura 30D).

Los contornos son irregulares con la formación importante de cilios (Ci). En el citoplasma se observan mitocondrias (M) con un gran número de crestas mitocondriales y el citoplasma tiene una respuesta de vacuolización (V) importante, aparentemente sin contenido en su interior. El núcleo tiene una gran vacuola en su interior con gran heterocromatinización (H) y un nucleolo aparente (N).

Células NL20. Metamidofos. (Figura 30E).

Los contornos de las membranas son regulares sin cambios. En el citoplasma se observan vacuolas de diferentes tamaños (V) y mitocondrias muy calcificadas (MC) y un aspecto granuloso del citoplasma. El núcleo se observa con heterocromatina pericentromérica y zonas de eucromatina sin cambios.

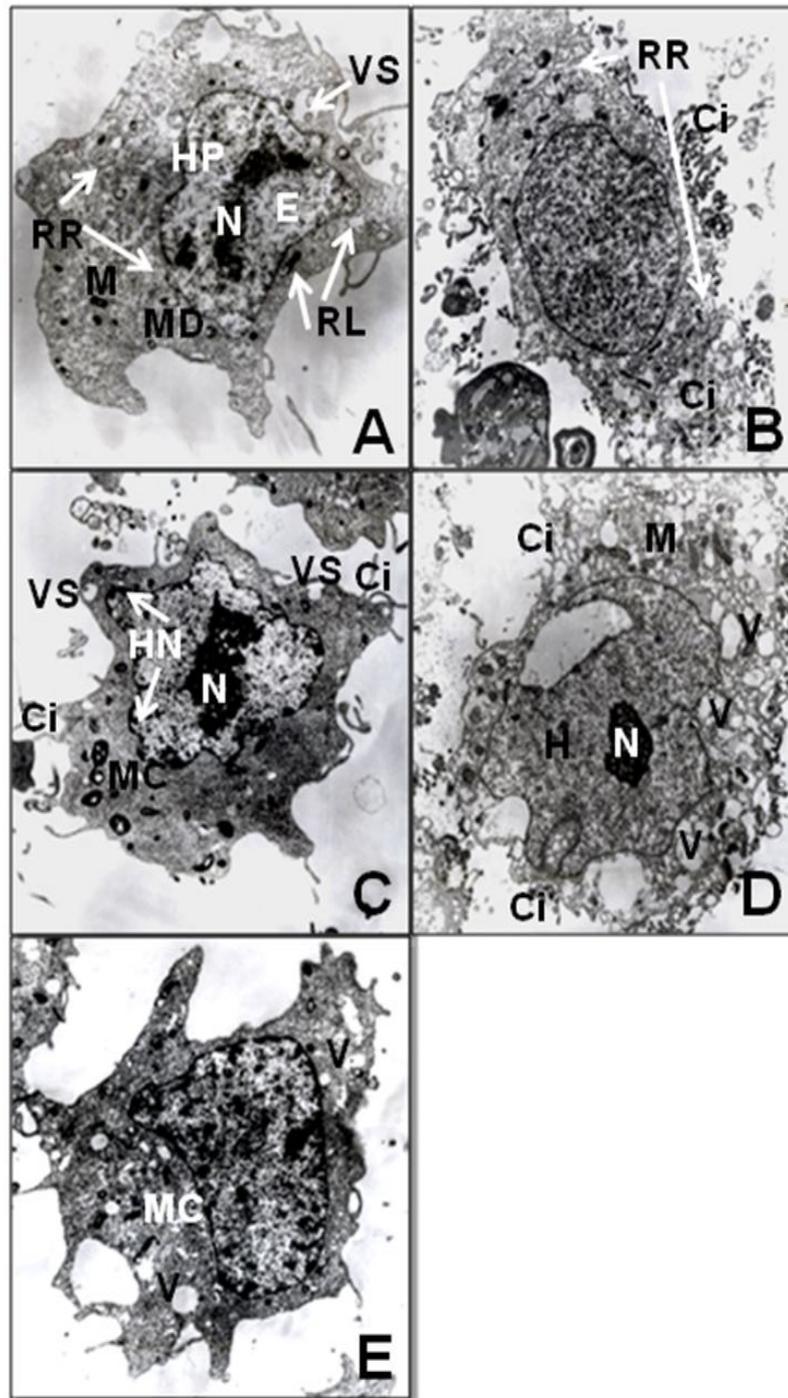


Figura 30. Ultraestructura de células NL20. A) NL20 Testigo (-), B) NL20 + Metil Azinfos, C) NL20 + Metil Paration, D) NL20 + Ometoato y E) NL20 + Metamidofos.

1.3 Efectos genotóxicos de los insecticidas: inducción de cometas.

Las líneas celulares HaCaT y NL20 se analizaron en presencia de los 4 insecticidas organofosforados a 3 diferentes concentraciones, además frente a un testigo positivo que fue DMSO (dimetilsulfóxido) al 1%. Se observó que la exposición *in vitro* a insecticidas organofosforados provocó daño genotóxico principalmente en las concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, aun por arriba del daño genotóxico provocado por el DMSO.

En el caso del insecticida Metil Azinfos, el comportamiento es muy similar en ambas líneas celulares con daño considerable a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y la ausencia de núcleos a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ debido a la toxicidad. (Figuras 31 y 32)

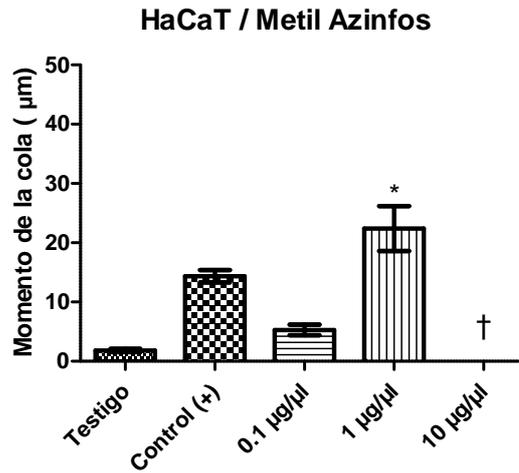


Figura 31. Genotoxicidad en células HaCaT en presencia de Metil Azinfos. Cada barra representa el promedio del momento de la cola \pm e.e. $n= 30$ núcleos. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo. † No se observaron núcleos. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

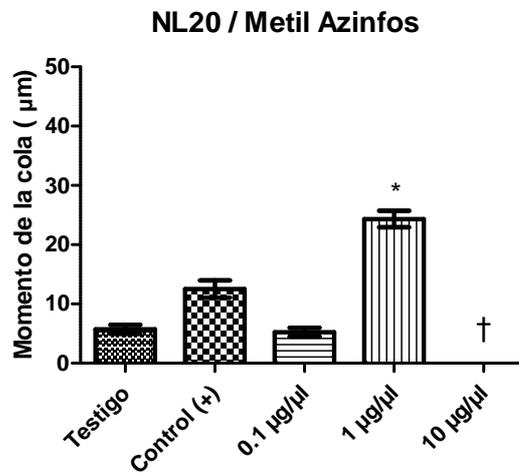


Figura 32. Genotoxicidad en células NL20 en presencia de Metil Azinfos. Cada barra representa el promedio del momento de la cola \pm e.e. $n= 30$ núcleos. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo. † No se observaron núcleos. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

Con el insecticida Metil Paration, se observó que la línea celular NL20 fue más sensible al presentar diferencias significativas con respecto al testigo en todas las concentraciones de trabajo, lo cual no sucedió con la línea celular HaCaT. La ausencia de núcleos a concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fue evidente en ambas líneas celulares (Figuras 33 y 34).

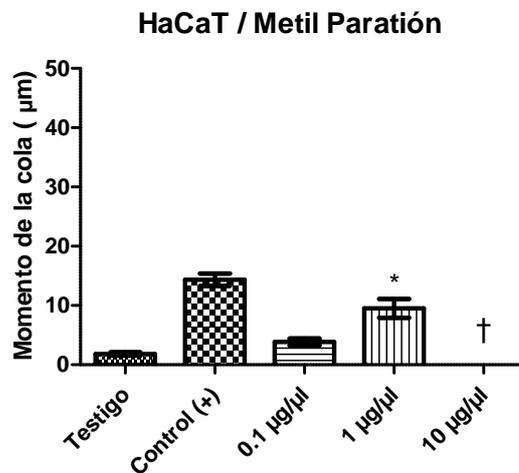


Figura 33. Genotoxicidad en células HaCaT en presencia de Metil Paration. Cada barra representa el promedio del momento de la cola \pm e.e. $n=30$ núcleos. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo. † No se observaron núcleos. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

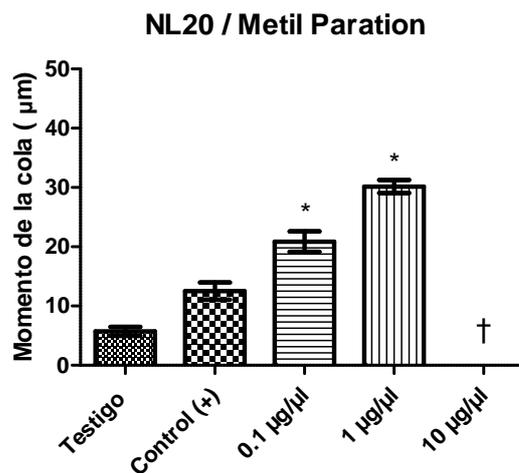


Figura 34. Genotoxicidad en células NL20 en presencia de Metil Paration. Cada barra representa el promedio del momento de la cola \pm e.e. $n=30$ núcleos. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo. † No se observaron núcleos. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

El Ometoato provocó mayor daño genotóxico en la línea celular NL20. Cabe señalar que a las concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en la línea celular NL20 ya no se observaron núcleos, probablemente a la toxicidad incrementada en esta línea celular (Figuras 35 y 36).

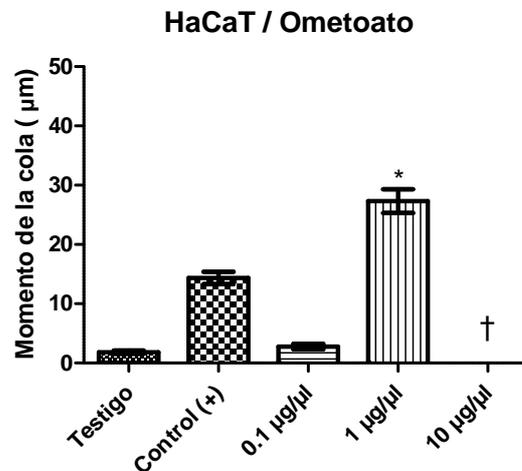


Figura 35. Genotoxicidad en células HaCaT en presencia de Ometoato. Cada barra representa el promedio del momento de la cola \pm e.e, $n= 60$ núcleos. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo. † No se observaron núcleos. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

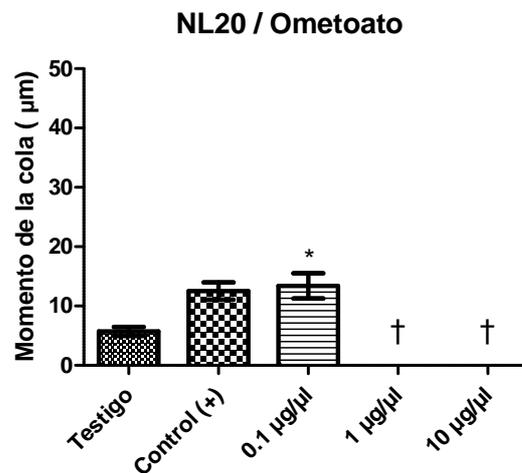


Figura 36. Genotoxicidad en células NL20 en presencia de Ometoato. Cada barra representa el promedio del momento de la cola \pm e.e, $n= 60$ núcleos. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo. † No se observaron núcleos. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

Finalmente el efecto genotóxico del insecticida Metamidofos fue elevada en la línea celular HaCaT, a cualquier concentración. Es importante señalar que este es el único insecticida organofosforado que a concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, aun mostró la presencia de núcleos evaluables en ambas líneas celulares (Figuras 37 y 38).

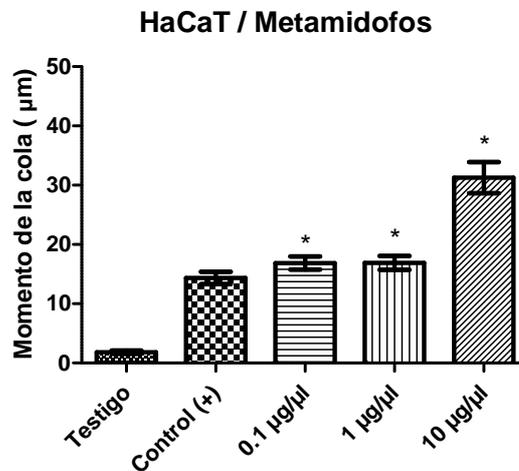


Figura 37. Genotoxicidad en células HaCaT en presencia de Metamidofos. Cada barra representa el promedio del momento de la cola \pm e.e. $n= 60$ núcleos. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo. † No se observaron núcleos. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

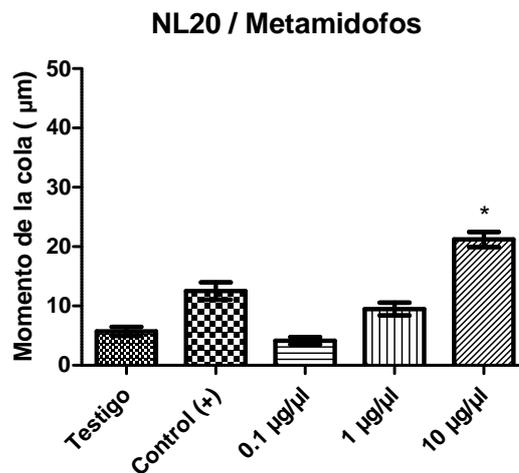


Figura 38. Genotoxicidad en células HaCaT y NL20 en presencia de Metamidofos. Cada barra representa el promedio del momento de la cola \pm e.e. $n= 60$ núcleos. Los * muestran diferencias significativas con respecto al testigo. † No se observaron núcleos. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

1.4 Análisis de la expresión de diferentes genes que participan en muerte celular

La cuantificación de la expresión de genes de muerte celular se realizó para demostrar si pudiera existir una relación entre la exposición a insecticidas organofosforados y los efectos que cada uno tiene, sobre la expresión de genes que participan en los distintos mecanismos de muerte celular. Solo se utilizaron dos concentraciones, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, debido a que el ensayo de genotoxicidad reveló que existe un gran daño a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y reveló poco rendimiento de mRNA extraído.

Esta cuantificación se denomina relativa debido a que se compara la relación de mRNA de un gen específico respecto a la cantidad de mRNA de un gen constitutivo endógeno usado como control, en este caso GAPDH. Este ensayo se realizó utilizando el fluoróforo SYBER Green, el cual se une a ADN de doble cadena. Los resultados se analizaron utilizando la fórmula de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$.

Para el caso del insecticida Metil Azinfos, la única diferencia significativa con respecto al testigo se observó en la línea celular HaCaT, teniendo un aumento en la expresión del gen Beclin 1 (BCN1) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figuras 39 y 40).

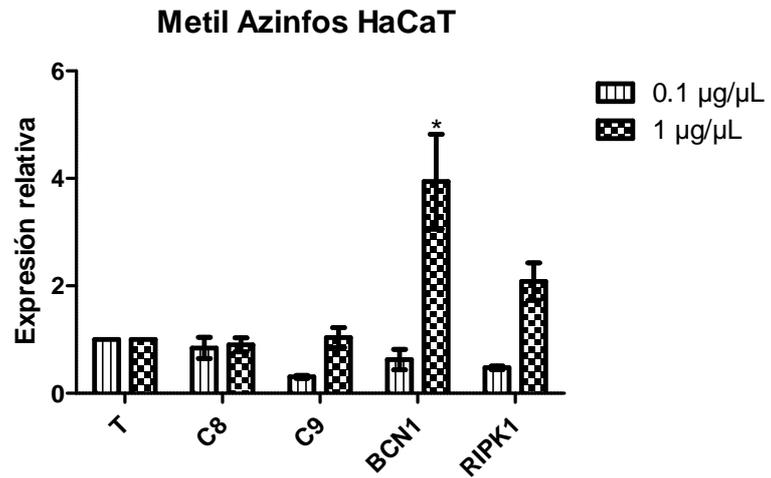


Figura 39. Efecto del insecticida Metil Azinfos sobre la expresión de genes de muerte en células HaCaT. Cada barra representa la media \pm e.e. de los triplicados. Los * indican diferencias significativas con respecto al testigo. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

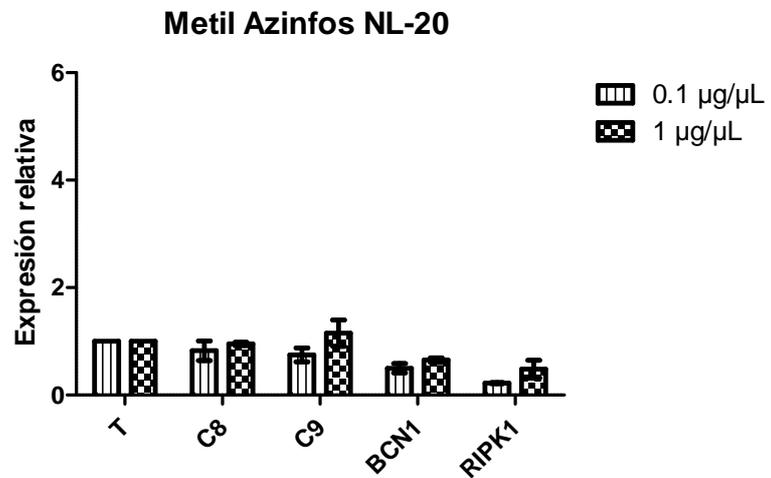


Figura 40. Efecto del insecticida Metil Azinfos sobre la expresión de genes de muerte en células NL20. Cada barra representa la media \pm e.e. de los triplicados. Los * indican diferencias significativas con respecto al testigo. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

Con el insecticida Metil Paration, la única diferencia significativa se manifestó en una disminución en la expresión del gen RIPK1 en la línea celular NL20 a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figuras 41 y 42).

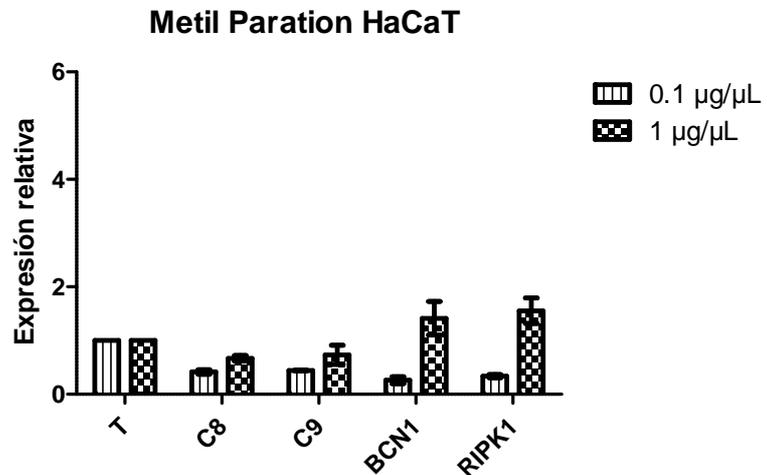


Figura 41. Efecto del insecticida Metil Paration sobre la expresión de genes de muerte en células HaCaT. Cada barra representa la media \pm e.e. de los triplicados. Los * indican diferencias significativas con respecto al testigo. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

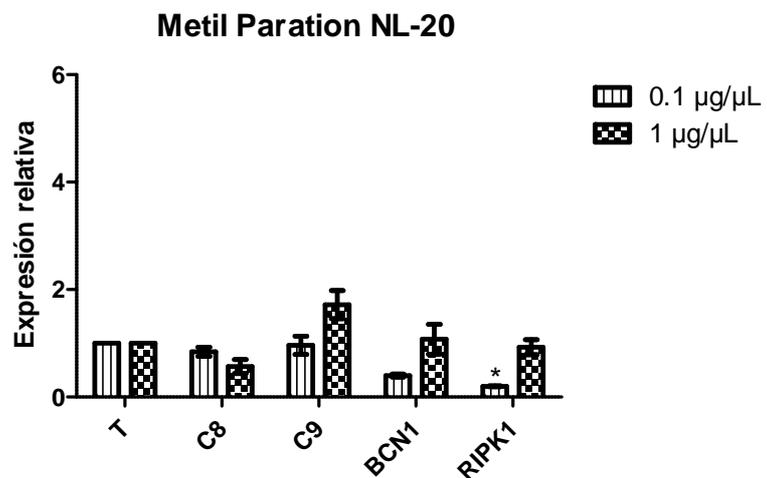


Figura 42. Efecto del insecticida Metil Paration sobre la expresión de genes de muerte en células NL20. Cada barra representa la media \pm e.e. de los triplicados. Los * indican diferencias significativas con respecto al testigo. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

El insecticida Ometoato en la línea celular HaCaT disminuyó la expresión de todos los genes, a excepción del gen caspasa 8 a una concentración de concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para la línea celular NL20, la expresión del gen RIPK1 disminuyó en ambas concentraciones y para el gen Beclin 1 la disminución en su expresión fue a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figuras 43 y 44).

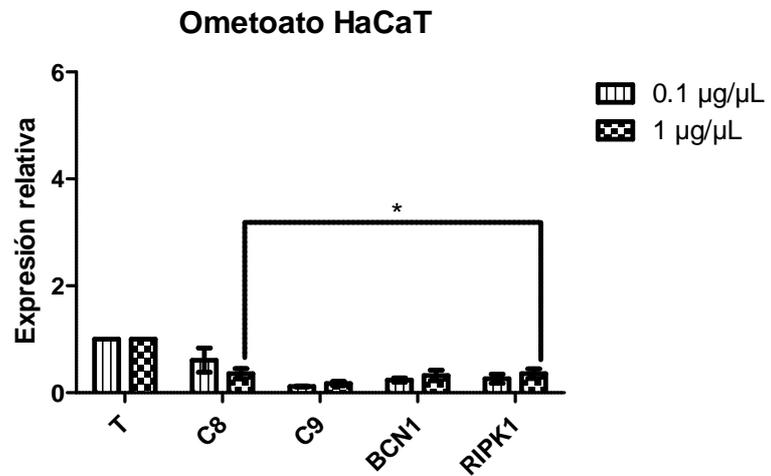


Figura 43. Efecto del insecticida Ometoato sobre la expresión de genes de muerte en células HaCaT. Cada barra representa la media \pm e.e. de los triplicados. Los * indican diferencias significativas con respecto al testigo. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

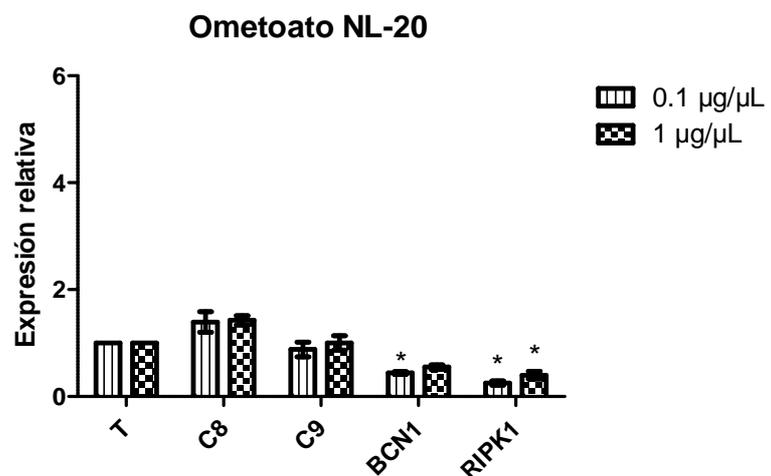


Figura 44. Efecto del insecticida Ometoato sobre la expresión de genes de muerte en células NL20. Cada barra representa la media \pm e.e. de los triplicados. Los * indican diferencias significativas con respecto al testigo. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

En la línea celular HaCaT, el organofosforado Metamidofos indujo la expresión del gen Beclin 1 a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Mientras que la expresión del gen RIPK1 se disminuyó en ambas concentraciones de trabajo, para la línea NL20 (Figuras 45 y 46).

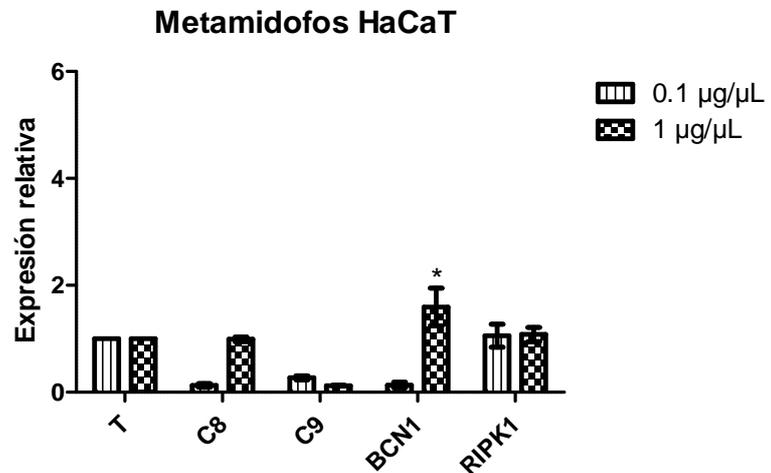


Figura 45. Efecto del insecticida Metamidofos sobre la expresión de genes de muerte en células HaCaT. Cada barra representa la media \pm e.e. de los triplicados. Los * indican diferencias significativas con respecto al testigo. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

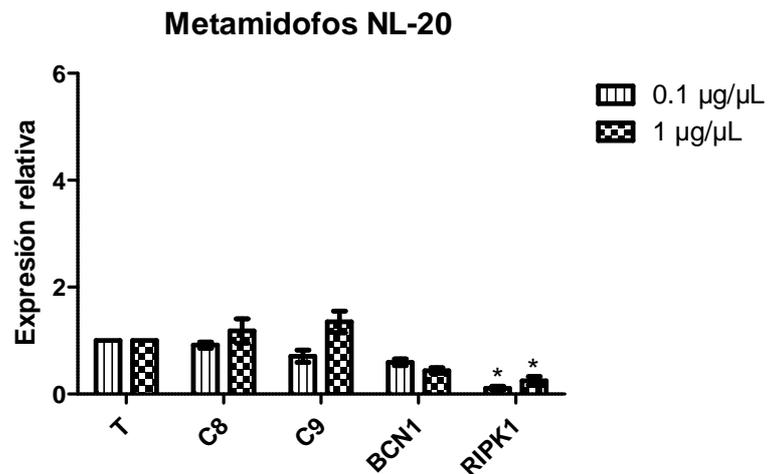


Figura 46. Efecto del insecticida Metamidofos sobre la expresión de genes de muerte en células NL20. Cada barra representa la media \pm e.e. de los triplicados. Los * indican diferencias significativas con respecto al testigo. ANOVA una vía, *post hoc* Tukey ($p \leq 0.05$).

2. Discusión de resultados.

2.1 Viabilidad celular.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de 4 insecticidas organofosforados, realizar un análisis ultraestructural de los cambios inducidos; así como evaluar la expresión de algunos genes relacionados a diferentes tipos de muerte celular. Los resultados mostraron que, con base a los ensayos de viabilidad se corroboró la toxicidad de los 4 insecticidas organofosforados; en la mayoría de los casos los cambios en la viabilidad celular fueron inversamente proporcionales a la concentración del insecticida. En la línea celular HaCaT pudimos observar que el insecticida Metamidofos a las concentraciones de 0.1 y 1µg/µL no tiene diferencias significativas con respecto al testigo. Un mecanismo que pueda explicar la inducción de muerte es que los insecticidas organofosforados al tener poca solubilidad en agua, pueden provocar su acumulación en la membrana de la célula *in vitro*, creando cambios y desarreglos de los lípidos de las membranas, desestabilizándolas, provocando su muerte (Kumar, et al., 2006). Existen algunos estudios que demuestran que el endosulfan que es un insecticida organoclorado puede inducir la generación de especies reactivas de oxígeno, que a su vez activan la cascada de fosforilación de ERK1/2 y disminuyen el ritmo de crecimiento de células HaCaT (Antherieu, et. al., 2007). Para metamidofos se reportó que incrementa los niveles de especies oxígeno reactivas y la presencia de malondialdehído entre otros efectos, en células PC12. Así, es posible que el daño oxidativo al parecer sea un evento que contribuye a la citotoxicidad (Lu XT, et al., 2012). Esto se tendrá que explorar.

Otro mecanismo posible de respuesta es la inducción de queratinización de la línea celular HaCaT, principalmente por efecto del Metil Paratión (Figura 29). Por otro lado, se reportó que el Metil Paratión induce un incremento de la glutatión sulfhidrilo transferasa, la cual puede activar el compuesto, un hecho que es importante en la inducción de toxicidad y genotoxicidad en células HepG2 (Edwards, et al., 2013). Existe un número muy limitado de estudios que hayan evaluado el efecto tóxico de insecticidas organofosforados en células bronquiales humanas. Cortés-Eslava (2013) demostró que de estos 4 insecticidas, con excepción del metamidofos, los otros tres son fuertemente citotóxicos en las 2 líneas celulares (Cortés Eslava, et al, 2013). Parte de la posible explicación a este hecho, de que sean las células NL-20 más sensibles al efecto tóxico de estos insecticidas, puede deberse a que expresan genes de inducción de la fase I de desintoxicación de sustancias xenobióticas. Arenas-Huertero y cols (2011) demostraron que estas células expresan de manera importante algunos genes como aldocetoreductas AKR1B1 y AKR1C1, después de la exposición a fracciones orgánicas extraídas de hollín de humo de leña que contienen una concentración alta de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Arenas-Huertero, et al., 2011). Estudios

previos *in vitro* han demostrado que el insecticida Metamidofos a concentraciones bajas (0.05-1.0 μM) en células estriadas y del hipocampo, no inhiben la enzima acetilcolinesterasa y tampoco muestran ningún cambio en la viabilidad celular. (Gubert, et. al, 2010). En un contexto más general, se documentó que Dimetoato y Metil Azinfos entre otros compuestos organofosforados pueden además reducir la síntesis de proteínas tanto en astrocitos (Marinovich, et al., 1996), como en células HL-60 (Marinovich, et al., 1994). Este efecto también puede contribuir a la propiedad citotóxica de estos compuestos. En consecuencia se explica porque este abatimiento de la síntesis de proteínas por algunos de estos compuestos puede afectar a procesos celulares más generales como la proliferación celular. Guizzetti y cols (2005) reportaron que el Paration y otros compuestos organofosforados disminuyen la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de astrocitos fetales de rata y en la línea celular 1321N1 de astrocitos humanos, que además se correlaciona con las concentraciones que inducen la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) (Guizzetti, et al., 2005).

Todos los mecanismos descritos anteriormente pueden ser posibles formas de inducción de daño a la membrana y/o de pérdida de la homeostasis celular, que pudieran participar en la inducción de la citotoxicidad por los insecticidas, y de manera diferencial entre las células bronquiales y los queratinocitos. Sin embargo, esto se deberá evaluar.

2.2 Análisis ultraestructural.

No existen estudios en la literatura que evalúen los cambios ultraestructurales debido al efecto de insecticidas en cultivo de células humanas. A nivel ultraestructural se sabe que mucho de estos compuestos organofosforados causan daño mitocondrial que incluye hinchamiento, desacoplamiento de las crestas mitocondriales y pérdida de la matriz mitocondrial. Estos cambios se evidenciaron en el epitelio ciliado de células de la placa del paladar de ranas, expuestas *in vitro* a insecticidas como el Dursban y Lorsban (Swann, et. al., 1996). De manera general se sabe que en el caso de los queratinocitos HaCaT y con excepción del Paration, los 3 restantes insecticidas produjeron cambios compatibles a una muerte celular que no es apoptosis, ni necrosis ni autofagia.

La presencia de vacuolas de diferente tamaño siempre caracterizó a las alteraciones ultraestructurales en las células expuestas. Con excepción del Metil Paration que fue capaz de inducir la queratinización de las células HaCaT (figura 29), las demás células no presentaron fragmentación nuclear ni aparición de vesículas autofágicas, es decir, vesículas con doble membrana. De hecho, estas vacuolas de mediano tamaño son de membrana sencilla y algunas contienen material ligeramente electrodensito en su interior. Los cambios son compatibles con la muerte conocida como metuosis descrita

por Romero-Hernández y cols (2013). La Metuosis implica un proceso de Macropinocitosis descontrolada, en el que las vacuolas o macropinosomas se producen a partir de las proyecciones de la membrana y forman ondas plasmáticas que atrapan los líquidos extracelulares y los rodean para el transporte al citoplasma, donde se acumulan. Así, parece que este proceso interfiere con el reciclaje, por defectos acoplados a la fusión de los lisosomas, lo cual desencadena la acumulación de éstas vacuolas que en última instancia interrumpen la integridad celular causando la muerte. Este tipo de muerte la demostraron como respuesta a 100 μM de curcumina en células de astrocitoma durante 24 h (Romero-Hernández, et. al., 2013). Un estudio que puede respaldar lo anterior, es el de Cortés-Eslava y cols (2013) que demostraron que el Metil Paratión a 100 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ induce cambios importantes en células HaCaT con la presencia de un gran número de vacuolas en el citoplasma, mediante el análisis por microscopía de campo claro (Cortés-Eslava, et. al., 2013). Cabe mencionar, Antherieu y cols (2007) reportaron la ausencia de apoptosis inducida por endosulfan en estos mismos queratinocitos (Antherieu, et al., 2007). Esto demuestra que muchos de estos compuestos pueden ser citotóxicos por vías diferentes a las ya estudiadas, y deja patente el desconocimiento de los efectos de éstos, ampliamente utilizados principalmente en nuestro país. Sin embargo, este hecho deberá evaluarse en un futuro.

2.3 Genotoxicidad.

Existen varios parámetros para medir la genotoxicidad y muy variados entre ellos, por lo que puede en ocasiones ser difícil hacer comparaciones directas entre los efectos de algunos compuestos xenobióticos de un estudio y otro. Sin embargo, todos ellos evalúan finalmente daño al ADN. Los resultados mostraron que todos los insecticidas indujeron la formación de cometas y aumento en el parámetro del momento de la "cola" en todos los compuestos, de manera importante en las células bronquiales NL-20. La inducción de daño al ADN evaluada mediante el ensayo cometa también se reportó para células HepG2 por efecto del fenthion y terbufos que son también insecticidas organofosforados, y resulta dependiente de la concentración de los compuestos (Wu, et al., 2011) También se documentó que el dicrotophos es genotóxico en células HepG2; además de que produce aberraciones cromosómicas en células CHO-K1 (Wu, et al., 2012). Siguiendo los resultados de otros compuestos organofosforados, Aiub y cols, (2002) reportaron que el temephos, a 1.34 μM también induce un incremento importante de los cometas inducidos en cultivo celular (Aiub, et al., 2002). Existe la propuesta de que la generación de especies oxígeno reactivas no metabolizadas pueden reaccionar con un conjunto de macromoléculas para inducir el daño al ADN observado en células expuestas a estos compuestos. (Higashi, 1988; Sanderman, 1988). Sin embargo, cuando se analizan los efectos genotóxicos de estos compuestos se puede ver que no inducen un intercambio de cromátidas hermanas en

cultivo de linfocitos humanos (Gómez-Arroyo, et al, 1987). Otros estudios han comprobado que el metamidofos incrementa la inducción de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas (Amer y Sayed, 1987). De manera *in vitro*, exponiendo ADN de timo de ternera a Metil Azinfos y otros compuestos organofosforados, se induce la formación de aductos de ADN por la técnica de marcaje con ³²P (Shah RG, et al., 1997). También el estrés oxidante puede ser un factor importante en la inducción de genotoxicidad por metamidofos, de acuerdo a los estudios de Lu y cols (2012) mediante el daño al ADN, induciendo rompimientos del genoma que no se pueden corregir (Lu, et. al., 2012). Finalmente podemos señalar que los resultados de inducción de cometas obtenidos de este estudio, son comparables con los reportados en estudios previos.

2.4 Expresión de genes.

Estudios previos *in vitro* han demostrado que en células neuronales PC12, el insecticida paratión induce apoptosis, también se ha demostrado que en líneas celulares humanas de neuroblastoma (SH-SY5Y) varios insecticidas organofosforados, entre ellos, el Paratión, afectan la integridad mitocondrial en estos cultivos, provocando principalmente una disminución en la síntesis de ATP y por lo tanto la activación de mecanismos de muerte celular. (Massicotte, et. al., 2005; Sadri, et. al., 2010). Células NK (natural killer) de humano cultivadas *in vitro*, a concentraciones de 0-100 ppm utilizando otro tipo de insecticidas organofosforados (Diclorvos y Clorpirifos) inducen apoptosis, del mismo modo la línea celular proveniente de linfocitos humanos EL4, en presencia de paratión induce apoptosis por la vía mitocondrial. (Saleh, et. al. 2003; Li, et. al. 2007)

Al afectar la integridad mitocondrial, se puede suponer la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, la permeabilidad mitocondrial aumenta la liberación de moléculas proapoptóticas al citoplasma sin intervención de los receptores de muerte. Cuando las células se encuentran en condiciones de estrés provocadas por el insecticida, la membrana pierde miembros antiapoptóticos (BCL2). Cuando disminuyen los niveles de proteínas antiapoptóticas, la permeabilidad de la mitocondria aumenta de manera importante y se escapan proteínas como el citocromo C, el cual es conocido por su papel en la respiración mitocondrial y en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. (Kumar, et al. 2006).

De las diferencias significativas que se presentaron en la expresión de genes por RT-qPCR, solamente 2 de ellas demostraron un aumento en la expresión de Beclin 1. Ambas fueron en la línea celular HaCaT, la primera de ellas fue con el insecticida Metil Azinfos a una concentración de 1 µg/µL y la segunda con el insecticida Metamidofos a concentración de 1 µg/µL.

Como se mencionó anteriormente, algunas evidencias que apoyan nuestra hipótesis demuestran que la curcumina en líneas celulares de astrocitoma provoca un fenómeno de respuesta muy parecido al observado por los insecticidas organofosforados en estas células epiteliales. En ensayos con organofosforados y Curcumina, existe una sobreexpresión del gen Beclin 1, y a su vez este gen, induce la formación de vacuolas grandes que son compatibles con la muerte por metuosis. Además, los ensayos de exposición a curcumina no demostraron la presencia de muerte celular por apoptosis ni por necrosis. (Romero-Hernández, et. al., 2013)

Capítulo IV. Conclusiones, recomendaciones y referencias.

1. Conclusiones.

1.1 Potencial de toxicidad de cada insecticida organofosforado.

Metil Azinfos: disminuye la viabilidad celular de manera semejante en HaCaT y NL20.

Metil Paratión: Disminuye principalmente la viabilidad en la línea celular NL20.

Ometoato: Induce mayor citotoxicidad en células NL20. El daño producido no depende de la concentración.

Metamidofos: Es el insecticida que daña menos a ambas líneas celulares, la viabilidad en células NL20 se ve afectada a todas las concentraciones, mientras que en células HaCaT, solo a la mayor concentración (10 µg/µL)

1.2 Inducción de cambios ultraestructurales por tipo de insecticida.

A excepción del insecticida Ometoato en la línea celular HaCaT, las características ultraestructurales demuestran la ausencia de alguno de los tipos de muerte celular planteados. La presencia de vacuolas es una característica constante en todos los tratamientos, que sugiere muerte por metuosis.

1.3 Genotoxicidad por los insecticidas organofosforados evaluados.

Metil Azinfos: Las concentraciones de 1 y 10 µg/µL son las únicas que provocaron daño genotóxico en ambas líneas celulares.

Metil Paratión: Las 3 concentraciones causaron daño sobre el material genético en células NL20, mientras que en células HaCaT fue a partir de la concentración de 1 µg/µL que es causado el daño.

Ometoato: Todas la concentraciones causaron daño genotóxico en la línea celular NL20, en células HaCaT solo las concentraciones de 1 y 10 µg/µL causaron daño al DNA.

Metamidofos: Sólo a concentración de 10 µg/µL provocó daño genotóxico en células NL20, mientras que en células HaCaT, las 3 concentraciones de trabajo causaron daño.

1.4 Inducción de los genes por tipo de muerte celular diferencialmente por tipo de insecticida.

Metil Azinfos: Aumenta la expresión del gen Beclin 1 en células HaCaT a la concentración de 1 µg/µL.

Metil Paratión: Disminuye la expresión del gen RIPK1 (necrosis) en células NL20.

Ometoato: Disminuye la expresión de todos los genes en la línea celular HaCaT, mientras que en NL20 disminuye la expresión de Beclin 1 y RIPK1.

Metamidofos: Aumenta la expresión del gen Beclin 1 en células HaCaT, y disminuye la expresión de RIPK1 en células NL20.

2. Recomendaciones: Control sobre el uso de insecticidas organofosforados en nuestro país.

Proteger la salud de las personas que trabajan frecuentemente con insecticidas organofosforados en nuestro país es un tema de seguridad pública, las siguientes recomendaciones ayudarán a un uso seguro de cualquier insecticida.

1. Antes de usar cualquier insecticida, asegúrese de que realmente lo necesita. Verifique si el organismo que busca controlar esté realmente causando un daño importante y duradero.
2. Investigue los métodos alternativos para el manejo de plagas que no requieren el uso de productos químicos (control físico, control mecánico, control biológico).
3. Tenga en cuenta que la mayoría de las plagas no pueden ser eliminadas totalmente, ni siquiera con el uso de insecticidas. Factores como el riego incorrecto, drenaje insuficiente, o daño físico, pueden provocar que persista la existencia de una plaga.
4. Si se ve en la necesidad de utilizar un insecticida identifique correctamente la plaga que está causando el problema para aplicar un insecticida que sea eficaz y contundente contra ella. Si no tiene la experiencia suficiente para saber qué insecticida utilizar, recurra a la ayuda de un experto en plagas, para conocer qué productos químicos se encuentran disponibles.

5. Revise en páginas oficiales de gobierno, si el o los insecticidas seleccionados para controlar su plaga, están permitidos en su país, si existen casos de intoxicación por su uso, si son carcinógenos, si son para uso en interiores o exteriores, su modo de acción, el equipo de protección personal que se debe usar al momento de su aplicación y todas las características especificadas en su etiqueta.
6. Cuando elija insecticidas, recuerde que la mayoría (aún los más potentes) controlan ciertas etapas del crecimiento de una plaga. Evite el uso prolongado de insecticidas concentrados, si es posible, mejore su rendimiento diluyéndolos, evite hacer aplicaciones generalizadas por todo el jardín o la casa.
7. Asegúrese de que los insecticidas se apliquen correctamente a la planta o al lugar afectado y que no se desplacen a otras plantas o lugares fuera del sitio de aplicación. El viento puede desplazar fácilmente los insecticidas del lugar de aplicación. No aplique cuando haga viento, porque los pesticidas pueden ser transportados a lugares donde no se les necesita o requiere.
8. Evite que la aplicación se escurra o penetre en alcantarillas, arroyos u otras masas de agua para prevenir de este modo la contaminación de las fuentes de agua. Evite aplicar productos químicos inmediatamente antes del riego o de una lluvia, a menos que las etiquetas requieran que se irrigue justo después de la aplicación.

3. Referencias.

- Aiub, C., Coelho, E., Sodré, E., Pinto, L. and Felzenszwalb, I. (2002). Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet Mol Res.* 1(2):159-166.
- Amer, S. and Sayed, M. (1987). Cytogenetic effects of the insecticide methamidophos in mouse bone marrow and cultured mouse spleen cells. *Z Naturforsch C.* 42(1-2): 21-30.
- Anderson, D. and Dhawan, A. (2009). *The comet assay in Toxicology.* Cambridge. RSC Publishing. P ags 3-6, 27, 28, 120-127.
- Antherieu, S., Ledirac, N., Luzy, A., Lenormand, P., Caron, J. and Rahmani, R. (2007). Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK 1/2 mechanism. *J Cell Physiol.* 213: 177–186.
- Arenas-Huertero, F., Ap tiga-Vega, E., Miguel-Pérez, G., Villeda-Cuevas, D. and Trillo-Tinoco, J. (2011). Molecular Markers Associated with the Biological Response to Aromatic Hydrocarbons from Urban Air in Humans, Air Pollution - New Developments, Prof. Anca Moldoveanu (Ed.), ISBN: 978-953-307-527-3, InTech, DOI: 10.5772/17999. Available from: <http://www.intechopen.com/books/air-pollution-new-developments/molecular-markers-associated-with-the-biological-response-to-aromatic-hydrocarbons-from-urban-air-in>
- Baker, S. and Wilkinson, C. (1990). *The effects of pesticides on human health.* Virginia. Princeton. P ags 144-151.
- Cell Signaling Technology. (2014). *Recursos de la apoptosis.* Recuperado el 16 de enero del 2014 de <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=science-pathways-apoptosis>
- Córdoba, D. (2006). *Toxicolog a.* Bogotá. Manual Moderno. P ags 121-122, 124, 130,131, 139-154.
- Cortés-Eslava, J., Gómez-Arroyo, S., Arenas-Huertero, F., Flores-Maya, S., Díaz-Hernández, M., Calder n-Segura, M., Valencia-Quintana, R.,

Espinosa-Aguirre, J. and Villalobos-Pietrini, R. (2013). The role of plant metabolism in the mutagenic and cytotoxic effects of four organophosphorus insecticides in *Salmonella typhimurium* and in human cell lines. *Chemosphere*. 92(9): 1117-1125.

- Edwards, F., Yedjou, C. and Tchounwou, P. (2013). Involvement of oxidative stress in methyl parathion and parathion-induced toxicity and genotoxicity to human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environmental Toxicology*. 28(6): 342–348
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H. and Kimchi A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell death and differentiation*. 16: 966-975.
- Glick, D., Barth, S. and Macleod, K. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *Journal Pathology*. 221: 3-12.
- Gómez-Arroyo, S., Noriega-Aldana, N., Juárez-Rodríguez, D. and Villalobos-Pietrini, R. (1987). Sister chromatid exchanges induced by the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, phoxim and methyl azinfos in cultured human lymphocytes. *Contam. Ambiental*. 3: 63–70.
- Gubert, P., Avila, D., Bridi, J., Saurin, S., Lugokenski, T., Villarinho, J., Fachinetto, R., Pereira, M., Ferreira, J., da Rocha, J. and Soares, F. (2011). Low concentrations of methamidophos do not alter AChE activity but modulate neurotransmitters uptake in hippocampus and striatum in vitro. *Life Sciences*. 88(1-2):89-95
- Guizzetti, M., Pathak, S., Giordano, G. and Costa L. (2005). Effect of organophosphorus insecticides and their metabolites on astroglial cell proliferation. *Toxicology*. 215(3):182-190.
- Hayes, W. and Laws, E. (1991). *Handbook of Pesticide Toxicology*. San Diego. Academic Press Inc. Págs 917-939.
- Heath, R. and Xavier, R. (2009). Autophagy, immunity and human disease. *Current opinion in gastroenterology*. 25: 512.

- Higashi K. (1988). Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* 197 (2): 273–288
- IARC. Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. (1983). *Monografías sobre la evaluación de los riesgos carcinogénicos para los humanos: Metil Paratión*. Recuperado el 10 de febrero del 2014 de <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/index.php>
- IARC. Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. (2014). *Clasificación de agentes carcinógenos*. Recuperado el 10 de febrero del 2014 de <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
- INECC. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2014). *Lista de plaguicidas prohibidos en México*. Recuperado el 10 de febrero del 2014 de <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/lprohibi.html>
- IPCS. Programa Internacional en Seguridad Química. (1986). *Insecticidas organofosforados: una introducción general*. Recuperado el 10 de febrero del 2014 de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm>
- Kang, M. and Reynolds, C. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical Cancer Research.* 15: 1126.
- Kumar, V. et. al. (2006). *Patología Estructural y Funcional*. Robbins y Cotran editores. (7ª ed.) Madrid. Elsevier. Págs 10-33.
- Levy, J. and Thorburn, A. (2011). Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes. *Pharmacology & Therapeutics.* 131: 130-141
- Li, Q., Kobayashi, M. and Kawada, T. (2007). Organophosphorus pesticides induce apoptosis in human NK cells. *Toxicology.* 239(1-2): 89-95.
- Loomis, T. (1988). *Fundamentos de Toxicología*. (3ª ed.) Zaragoza. Acribia. Págs 78,79, 87-93.
- Lu, X., Ma, Y., Wang, C., Zhang, X., Jin da Q. and Huang, C. (2012). Cytotoxicity and DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12 cells and protection by vitamin E. *J Environ Sci Health B.* 47(5): 445-454.

- Marinovich, M., Ghilardi, F. and Galli, C. (1996). Effect of pesticide mixtures on in vitro nervous cells: comparison with single pesticides. *Toxicology*. 108 (3):201-206.
- Marinovich, M., Guizzetti, M. and Galli, C. (1994). Mixtures of benomyl, pirimiphos-methyl, dimethoate, diazinon and azinphos-methyl affect protein synthesis in HL-60 cells differently. *Toxicology*. 94(1-3):173-185.
- Massicotte, C., Knight, K., Van der Schyf, C., Jortner, B. and Ehrich, M. (2005). Effects of organophosphorus compounds on ATP production and mitochondrial integrity in cultured cells. *Neurotox Res*. 7(3): 203-217.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (2009). *Clasificación de plaguicidas por su peligrosidad según la OMS*. Recuperado el 10 de febrero del 2014 de http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/en/
- Rivero, O. et al. (2001). *Daños a la salud por plaguicidas*. México, D.F. Manual Moderno. Págs 61-64, 129-143.
- Romero-Hernández, M., Eguía-Aguilar, P., Pérezpeña-DíazConti, M., Rodríguez-Leviz, A., Sadowinski-Pine, S., Velasco-Rodríguez, L., Cortés, J. and Arenas-Huertero, F. (2013). Toxic effects induced by curcumin in human astrocytoma cell lines. *Toxicol Mech Methods*. 23 (9): 650-659.
- Sadri, S., Bahrami, F., Khazaei, M., Hashemi, M. and Asgari, A. (2010). Cannabinoid receptor agonist WIN-55,212-2 protects differentiated PC12 cells from organophosphorus induced apoptosis. *International Journal Toxicol*. 29(2): 201-208.
- Saleh, A., Vijayasathy, C., Masoud, L., Kumar, L., Shahin, A. and Kambal, A. (2003). Paraoxon induces apoptosis in EL4 cells via activation of mitochondrial pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*. 190(1): 47-57.
- Sanderman, H. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res*. 197 (2): 183–194.
- Shah, R., Lagueux, J., Kapur, S., Levallois, P., Ayotte, P., Tremblay, M., Zee, J. and Poirier, G. (1997). Determination of genotoxicity of the metabolites

of the pesticides Guthion, Sencor, Lorox, Reglone, Daconil and Admire by ³²P-postlabeling. *Mol Cell Biochem.* 169(1-2): 177-184.

- Singletary, K. and Milner, J. (2008). Diet, Autophagy, and Cancer: A Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17: 1596-1610.
- Swann, J., Schultz, T. and Kennedy, J. (1996). The effects of the organophosphorous insecticides Dursban and Lorsban on the ciliated epithelium of the frog palate in vitro. *Arch Environ Contam Toxicol.* 30(2): 188-194.
- USA Environmental Protection Agency (EPA). (2013). *Pesticides: regulating pesticides.* Recuperado el 10 de febrero del 2014 de <http://www.epa.gov/opprd001/rup/>
-
- Wu, J., Chye, S., Shih, M., Chen, C., Yang, H. and Chen, S. (2012). Genotoxicity of dicrotophos, an organophosphorous pesticide, assessed with different assays in vitro. *Environ Toxicol.* 27(5):307-315.
- Wu, J., Hseu, Y., Tsai, J., Chen, L., Chye, S., Chen C. and Ching Chen, S. (2011). Fenthion and terbufos induce DNA damage, the expression of tumor-related genes, and apoptosis in HEPG2 cells. *Environ Mol Mutagen.* 52(7):529-537.
- Yu, I., Strandberg, I. and Lenardo, M. (2008). The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy.* 4: 567.

4. Material complementario

4.1 Preparación de soluciones y reactivos.

Tabla 4. Medio de cultivo para células HaCaT (200 mL).

| Reactivo | Cantidad |
|--------------------|---------------|
| Suero Fetal Bovino | 20 mL |
| Antibiótico (100X) | 2 mL |
| Medio RPMI-1640 | c.b.p. 200 mL |

Tabla 5. Medio de cultivo para células NL20 (200 mL).

| Reactivo | Cantidad |
|--|---------------|
| Glutamina (100X) | 2 mL |
| Aminoácidos no esenciales (100X) | 2 mL |
| ITS (insulina, transferrina, selenio) | 200 μ L |
| EGF (Factor de crecimiento epidérmico) | 10 μ L |
| Hidrocortisona (6.6 mg/mL) | 15 μ L |
| Suero Fetal Bovino | 8 mL |
| Antibiótico (100X) | 2 mL |
| Medio de cultivo F12 | c.b.p. 200 mL |

Tabla 6. Solución para despegado de células (5 mL)

| Reactivo | Cantidad |
|-----------------------------|----------|
| Solución salina fisiológica | 4.5 mL |
| Tripsina-Verseno | 0.5 mL |

Tabla 7. Agarosa de punto de fusión normal (NPMA)

| Reactivo | Cantidad | |
|-----------------------------------|----------|--------|
| Agarosa de punto de fusión normal | 0.1 g | 0.05 g |
| Agua desionizada | 10 mL | 10 mL |
| Concentración final | 1% | 0.5 % |

Tabla 8. Agarosa de punto de fusión bajo (LPMA)

| Reactivo | Cantidad | |
|---------------------------------|----------|--------|
| Agarosa de punto de fusión bajo | 0.1 g | 0.05 g |
| Agua desionizada | 10 mL | 10 mL |
| Concentración final | 1% | 0.5 % |

Tabla 9. NaOH 10 N

| Reactivo | Cantidad |
|------------------|----------|
| NaOH | 20 g |
| Agua desionizada | 50 mL |
| Volúmen | 50 mL |

Tabla 10. EDTA 100 y 200 mM (pH=10)

| Reactivo | Cantidad | Cantidad |
|------------------|----------|----------|
| EDTA | 0.74 g | 1.48 g |
| Agua desionizada | 20 mL | 20 mL |
| Volumen | 20 mL | 20 mL |
| Concentración | 100 mM | 200 mM |

Tabla 11. Amortiguador de electroforesis.

| Reactivo | Cantidad |
|---------------------|------------------|
| NaOH 10 N | 30 mL |
| EDTA 200 mM (pH=10) | 5 mL |
| Agua desionizada | Aforar a 1000 mL |
| Volumen | 1000 mL |

Tabla 12. Tris 0.4 M (pH=7.5)

| Reactivo | Cantidad |
|--------------------------|----------|
| Laminillas a neutralizar | 30 |
| Tris | 33.95 g |
| Agua desionizada | 700 mL |

Tabla 13. Solución de lisis.

| Reactivo | Cantidad |
|--------------------|---------------|
| Laminillas a lisar | 30 |
| NaCl | 14.6 g |
| EDTA | 3.72 g |
| Tris | 0.12 g |
| NaOH | 0.8 g |
| DMSO | 10 mL |
| Tritón X-100 | 1 mL |
| Agua desionizada | c.b.p. 100 mL |
| Volumen | 100 mL |

Tabla 14. Solución de tinción. (10X)

| Reactivo | Cantidad |
|--------------------|----------|
| Bromuro de Etidio* | 10 mg |
| Agua destilada | 50 mL |
| Volumen | 50 mL |

*Para teñir se usa una solución 1X (diluir la solución 10X)