



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE PLAGUICIDAS PARA INDUCIR ROMPIMIENTOS DE
DOBLE HÉLICE Y REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS HUMANAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. Karen Suárez Larios

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Regina Dorinda Montero Montoya
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM
Dra. Ana María Salazar Martínez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM



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
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE PLAGUICIDAS PARA INDUCIR ROMPIMIENTOS DE
DOBLE HÉLICE Y REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS HUMANAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. Karen Suárez Larios

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Regina Dorinda Montero Montoya
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM
Dra. Ana María Salazar Martínez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, CD. MX. DICIEMBRE, 2019.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB/1238/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 2 de septiembre del 2019 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR(A) EN CIENCIAS** de la estudiante **SUÁREZ LARIOS KAREN** con número de cuenta 30100823-5 con la tesis titulada **“ESTUDIO SOBRE LA CAPACIDAD DE PLAGUICIDAS PARA INDUCIR ROMPIMIENTOS DE DOBLE HÉLICE Y REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN EN CÉLULAS HUMANAS”**, realizada bajo la dirección del **DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES
Vocal: DR. VICTOR MANUEL DÁVILA BORJA
Secretario: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
Suplente: DRA. LETICIA GUADALUPE YÁNEZ ESTRADA
Suplente: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de noviembre del 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

AGRADECIMIENTOS

INSTITUCIONES

- ✂ Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM
- ✂ Al programa PAPIIT por el apoyo No. IN203011-3
- ✂ Al CONACyT por el apoyo otorgado a través de la beca de doctorado (No. 260448)
- ✂ Al programa de Apoyos a los Estudios de Posgrado (PAEP)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

- ✂ A la Dra. Regina D. Montero Montoya por tener la fuerza para continuar siendo mi guía después de tanto tiempo, por su profunda paciencia, su deseo de que siempre busquemos ser mejores profesionales, mejores personas. Gracias por sus palabras de aliento, suaves, duras y firmes. Por usted adquirí el gusto por enseñar a otros, por querer ser también un guía.
- ✂ A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo que fue un gran soporte durante un momento crítico; que no vio lo negativo, sino la oportunidad para encarrilar a quien viajaba sin rumbo.
- ✂ Dra. Ana María Salazar Martínez que, sin importar sus propias actividades, siempre tuvo tiempo, un consejo, una sonrisa. Quien mostró, al igual que la Dra. Montero y la Dra. Gómez, una fuerza imbatible para superar los obstáculos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- ✂ Madre, padre, hermanas, en serio, gracias por dejarme hacer lo que más me gusta. Ya perdí la cuenta de cuántas palabras me han brindado para no detenerme, pero créanme que las guardo a todas y cada una de ellas. Sin sus ánimos no hubiera podido disipar mi ira, mi tristeza, mi frustración. Con ustedes disfruto mis aciertos, mis alegrías, mi satisfacción.

- ✂ A todos los integrantes del laboratorio, a los que llegaron y a los que se fueron durante todo el tiempo en el que desarrollé este proyecto. Con todos y cada uno de ustedes aprendí cosas nuevas, pequeñas y grandes, todas valiosas. No pongo nombres, porque temo olvidar a alguien durante este momento en el que escribo estas líneas.

- ✂ A los chicos que prestaron su brazo, que donaron su sangre. Gracias por la confianza que me brindaron cuando me obsequiaron una parte valiosa de ustedes. Sin ella, este trabajo no hubiera podido realizarse.

- ✂ Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, a su personal, sus estudiantes, sus investigadores. Verlos cada día era recordar mi compromiso, mi gusto, mis sueños.

- ✂ A los Miembros de mi Jurado:
 - Dra. Patricia Ramos Morales
 - Dr. Víctor Manuel Dávila Borja
 - Dra. Ana María Salazar Martínez
 - Dra. Leticia Guadalupe Yáñez Estrada
 - Dra. Sandra Díaz Barriga ArceoGracias por su tiempo, su conocimiento, su curiosidad, su interés.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. Plaguicidas	3
1.1 Definición, clasificación y usos	3
1.2 Efectos tóxicos	6
1.3 Plaguicidas como agentes leucemogénicos	8
2. Daño genotóxico	10
2.1 γ -H2AX como biomarcador de daño	13
2.2 Rompimientos de doble cadena (DSB) del DNA	13
2.3 Agentes exógenos inductores de DSB	15
2.4 Mecanismos principales de reparación de DSB	18
PLANTEAMIENTO	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
DISEÑO EXPERIMENTAL	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Donadores	24
2. Reactivos	24
3. Anticuerpos	24
4. Detección de rompimientos de doble cadena por microscopía de fluorescencia	25
4.1 Tratamientos	25
4.2 Detección de γ -H2AX	25
4.3 Evaluación de los focos de γ -H2AX	26

5. Citotoxicidad	27
6. Identificación de proteínas de reparación por Western Blot	27
6.1 Aislamiento de células mononucleares	27
6.2 Tratamientos	28
a) Identificación de proteínas de reparación p-Ku80 y Rad51	28
b) Identificación de proteínas de reparación p-Ku80 y p-CtIP	28
6.3 Procesamiento y almacenamiento del botón celular	28
6.4 Extracción y cuantificación de proteínas	28
6.5 Western Blot	29
a) Identificación de proteínas de reparación p-Ku80 y Rad51	29
b) Identificación de proteínas de reparación p-Ku80 y CtIP	29
6.6 Normalización del análisis óptico	30
7. Evaluación del papel de topoII en la inducción de DSB a través del ensayo de MN con bloqueo de citocinesis (CBMN)	31
7.1 Tratamientos	32
a) Sin inhibición del sitio catalítico de topoII	32
b) Con inhibición del sitio catalítico de topoII	32
7.2 Fijación de los linfocitos	32
7.3 Preparación, tinción y evaluación de laminillas	33
7.4 Análisis estadístico	34
RESULTADOS	35
1. Identificación de DSB a través de la detección de focos de γ -H2AX	35
2. Evaluación de la citotoxicidad a través del ensayo con MTS	39
3. Identificación de la participación de las maquinarias de reparación HR y NHEJ a través de la cuantificación de las proteínas Rad51 y p-Ku80	40
4. Identificación de la participación de las maquinarias de reparación NHEJ y alt-EJ a través de la cuantificación de las proteínas p-Ku80 y p-CtIP	45
5. Evaluación de daño genotóxico por inhibición de topoII	46
a) Sin inhibición del sitio catalítico de topoII	47
b) Con inhibición del sitio catalítico de topoII	47
DISCUSIÓN	49
1. Inducción de DSB	49
2. Participación de los mecanismos de reparación HR, NHEJ y alt-EJ	53
3. Glifosato y paraoxón como venenos de topoII	55

4. Compuestos negativos en la inducción de DSB o mecanismos de reparación	61
5. Aportaciones	62
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS	79
Anexo 1. Artículo para la obtención de Grado: Screening of Pesticides with the Potential to Inducing DSB and Successive Recombinational Repair”.	80
Anexo 2. Estudios de leucemia infantil concordante en gemelos monocigóticos con marcadores clonotípicos únicos.	90
Anexo 3. Estudios retrospectivos utilizando Tarjetas Guthrie.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aplicaciones para la detección de γ -H2AX.	14
Figura 2. Regulación del ciclo celular y la elección de la vía de reparación de los DSB.	19
Figura 3. Principales mecanismos de reparación de DSB en eucariontes superiores.	20
Figura 4. Esquema general del diseño experimental que se siguió para cada uno de los plaguicidas y metabolitos estudiados en este trabajo de investigación.	23
Figura 5. Representación esquemática de las membranas utilizadas para la identificación de las proteínas de interés.	30
Figura 6. Clasificación del daño detectado en las células mononucleares evaluadas con base en el número de DSB presentes en el núcleo.	37
Figura 7. Evaluación del efecto del endosulfán lactona y la permetrina sobre la fosforilación de Ku80 (p-Ku80) y/o la inducción de Rad51 en células mononucleares aisladas de sangre periférica y que fueron tratadas en G0.	42
Figura 8. Evaluación del efecto del pentaclorofenol y del glifosato sobre la fosforilación de Ku80 (p-Ku80) y/o la inducción de Rad51 en células mononucleares aisladas de sangre periférica y que fueron tratadas en G0.	43
Figura 9. Evaluación del efecto del paraoxón sobre la fosforilación de Ku80 (p-Ku80) y/o la inducción de Rad51 en células mononucleares aisladas de sangre periférica y que fueron tratadas en G0.	44
Figura 10. Evaluación del efecto del paraoxón y del glifosato sobre la fosforilación de Ku80 (p-Ku80) en células mononucleares aisladas de sangre periférica, que fueron tratadas en G0 y cosechadas en dos tiempos de recuperación.	45
Figura 11. Identificación de daño genotóxico (flechas) en células a través del ensayo de MN con bloqueo de citocinesis.	46
Figura 12. Porcentaje de células con más de 10 focos de γ -H2AX inducidos por los tratamientos con paraoxón, glifosato o etopósido.	51

- Figura 13. Propuesta de este trabajo: mecanismo de acción a través del cual etopósido podría estar induciendo el daño remanente observado en el ensayo de MN con el tratamiento previo con el inhibidor ICRF-187. 57
- Figura 14. Propuesta de este trabajo: mecanismo de acción a través del cual paraoxón o glifosato podrían estar induciendo DSB con las dosis probadas, así como la reparación e inducción del daño observado en el ensayo de MN. 59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de los plaguicidas evaluados en el presente trabajo con base en diferentes clasificaciones y su estado actual en México.	5
Tabla 2. Estudios epidemiológicos de caso-control: Asociación entre la exposición a plaguicidas en la etapa prenatal con el riesgo a desarrollar leucemia infantil.	9
Tabla 3. Estudios <i>in vitro</i> de genotoxicidad de los compuestos evaluados en este trabajo.	11
Tabla 4. Estudios que utilizaron a γ -H2AX como biomarcador de daño genotóxico.	17
Tabla 5. Concentraciones de trabajo utilizadas para la evaluación de DSB, proteínas de reparación y el ensayo de MN.	26
Tabla 6. Porcentaje de células con DSB (focos de γ -H2AX) por exposición a plaguicidas o metabolitos de plaguicidas.	36
Tabla 7. Porcentaje de células con DSB (focos de γ -H2AX) con base en las categorías de daño establecidas.	38
Tabla 8. Efecto citotóxico de los plaguicidas y metabolitos que indujeron DSB.	39
Tabla 9. Detección de las proteínas p-Ku80 y Rad51 en células mononucleares tratadas con los plaguicidas y metabolitos que indujeron DSB.	41
Tabla 10. Daño citogenético observado a través del ensayo del sistema de MN en células tratadas con los compuestos de interés.	48

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AC	Aberraciones cromosómicas
alt-EJ	Mecanismo de reparación por unión de extremos alterna
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
DC	Daño combinado
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico*
DSB	Rompimientos de doble cadena*
EPA	Agencia para la Protección Ambiental*
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación*
GN	Gemaciones nucleares
H2AX	Histona H2A variante X
γ -H2AX	H2AX fosforilada
HR	Reparación por recombinación homóloga*
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
Mbp	mega pares de bases*
Mn	Manganeso
MN	Micronúcleo
MTS	Compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
NHEJ	Reparación por unión de extremos no homólogos*
c-NHEJ	Vía de reparación NHEJ clásica
OMS	Organización Mundial de la Salud
p-CtIP	Proteína CtIP fosforilada
p-Ku80	Proteína Ku80 fosforilada
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos*
PNP	Puentes nucleoplasmáticos
SSB	Rompimientos de cadena sencilla*
topoII	Topoisomerasa II

* Por sus siglas en inglés

RESUMEN

Los plaguicidas son compuestos químicos diseñados para el control de plagas, por lo que son ampliamente utilizados en todo el mundo. Hoy en día, existen miles de compuestos en el mercado y cada día se desarrollan más. La producción y uso continuo de estas sustancias ha conducido a que no se estudien adecuadamente los efectos adversos que puedan tener sobre organismos que no son el blanco. Son innumerables los reportes que señalan que la exposición a los plaguicidas tiene efectos nocivos sobre la salud de diversas especies, incluida la humana. La exposición crónica a estos compuestos ha sido asociada al desarrollo de diversas enfermedades incluido el cáncer, y en el caso particular de los niños, un grupo de edad especialmente susceptible, han sido relacionados con el riesgo de desarrollar leucemia. Se ha propuesto que algunos plaguicidas pueden ser inductores de translocaciones asociadas a este tipo de cáncer mediante la inhibición de la topoisomerasa II (topoII). Para explorar esta posibilidad, es necesario investigar si estos compuestos pueden generar rompimientos de doble cadena (DSB) que induzcan una reparación, eventos necesarios para la formación de translocaciones. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de diversos plaguicidas para inducir estos cortes y su subsecuente reparación a través de los mecanismos por Recombinación Homóloga (HR), por Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ) y/o por la vía Alternativa de Unión de Extremos (alt-EJ); sólo los compuestos que promovieron dichos eventos fueron posteriormente estudiados para determinar si los DSB son producto de la inhibición de topoII. Muestras de sangre de donadores sanos fueron expuestas a endosulfán, glifosato, pentaclorofenol, permetrina o propoxur o bien, a los metabolitos AMPA, endosulfán lactona o paraoxón. La evaluación de los DSB se realizó a través de la identificación de focos de γ -H2AX por microscopia de fluorescencia. El ensayo con MTS fue utilizado para descartar que el daño hallado fuera citotóxico. La activación de los mecanismos de reparación HR, NHEJ y alt-EJ se evaluó por Western Blot a través de la detección de las proteínas Rad51, p-Ku80 y p-CtIP, respectivamente. El papel de los plaguicidas como inhibidores de topoisomerasa II se estudió mediante el ensayo de MN en combinación con el inhibidor catalítico de topoII, ICRF-187. El glifosato, pentaclorofenol, permetrina, endosulfán lactona y paraoxón indujeron un aumento significativo de células con DSB en al menos una de las concentraciones probadas. De ellos, sólo el glifosato y el paraoxón indujeron significativamente la presencia de p-Ku80. Ninguno de los compuestos influyó en la presencia Rad51. Glifosato y paraoxón fueron evaluados para determinar la participación de alt-EJ, así como el papel de estos compuestos como inhibidores de topoII. En ambos casos, no se detectó la presencia de p-CtIP, mientras que el daño observado en el ensayo de MN fue indistinto en los tratamientos con y sin el inhibidor ICRF-187. Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que sólo el glifosato y el paraoxón son inductores de DSB, daño que condujo a la activación significativa del mecanismo de reparación NHEJ, lesiones que se originaron de forma independiente a la inhibición de topoisomerasa II.

ABSTRACT

Pesticides are chemical compounds designed for the pest control, so they are widely used worldwide. There are currently thousands of these compounds on the market and every day more are developed. The continuous use and production of these substances has led to not properly study the adverse effects that they may have on organism that aren't the target. There are innumerable reports that point out that exposure to the pesticides has harmful effects on the health of various species, including the human. Chronic exposure to these one has been associated with the development of several diseases including cancer, and in the particular case of children, an especially susceptible age group, has been linked to the risk of developing leukemia. It has been proposed that some pesticides may be inducers of translocations associated with this type of cancer through topoisomerase II (topoII) inhibition. To explore this possibility, it's necessary to investigate whether these compounds can generate double strand breaks (DSB) that induce repair, necessary events for the formation of translocations. Therefore, the objective of this work was to evaluate the capacity of various pesticides to induce these cuts and their later repair through the mechanisms by Homologous Recombination (HR), by Non-Homologous End Join (NHEJ) and/or by the alternative way of End Join (alt-EJ); only the compounds that promoted these events were subsequently studied to determine if DSB's are the product of topoII inhibition. Blood samples for healthy donors were exposed to endosulfan, glyphosate, pentachlorophenol, permethrin or propoxur or, to the metabolites AMPA, endosulfan lactone or paraoxon. The evaluation of the DSB was carried out through the identification of γ -H2AX foci by fluorescence microscopy. The MTS assay was used to rule out that the damage found was cytotoxic. The activation of the HR, NHEJ and alt-EJ repair mechanisms was evaluated by Western Blot through the detection of Rad51, p-Ku80 and p-CtIP proteins, respectively. The role of pesticide as topoII inhibitors was studied by the MN assay in combination with the topoII catalytic inhibitor, ICRF-187. Glyphosate, pentachlorophenol, permethrin, endosulfan lactone and paraoxon induced a significant increase in cells with DSB in at least one of the concentrations tested. Of these, only glyphosate and paraoxon significantly induced the presence of p-Ku80. None of the compounds influenced the presence of Rad51. Glyphosate and paraoxon were evaluated to determine the participation of alt-EJ, as well as the role of these compounds as topoII inhibitors. In both cases, the presence of p-CtIP was not detected, while the damage observed in the MN assay was indistinct in treatments with and without the ICRF-187 inhibitor. Therefore, the results obtained in this work suggest that only glyphosate and paraoxon are inducers of DSB's, damage that led to the significant activation of the NHEJ repair mechanisms, lesions that originated independently of topoisomerase II inhibition.

INTRODUCCIÓN

1. Plaguicidas

1.1 Definición, clasificación y usos.

Los plaguicidas están en estrecha relación con los seres humanos, teniendo un papel importante en la producción de alimentos y en la prevención de enfermedades a través del control de plagas y/u organismos vectores.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido a los plaguicidas como compuestos químicos utilizados para matar plagas, dentro de las cuales se incluyen insectos, roedores, hongos y malezas (WHO, 2016). A nivel mundial, se encuentran registrados cerca de 6,400 ingredientes que, una vez combinados con coadyuvantes, derivan en más de 100,000 productos comerciales (Gatica, 2018). A principios del 2016, la Agencia para la Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, tenía registrados cerca de 1,140 ingredientes activos (EPA, 2016). Por su parte, México cuenta con 426 compuestos enlistados en el Catálogo de Plaguicidas que, con base en las distintas modalidades específicas (tipo, formulación, empresa, nombre comercial y usos), derivan en unos 5,524 registros sanitarios vigentes; de estos, la Red Internacional de Plaguicidas (PAN) tiene clasificados a 183 de estos ingredientes (3140 registros en 2016) como plaguicidas altamente peligrosos (Bejarano, 2017).

El término plaguicida engloba a una gran variedad de compuestos químicos que son empleados para el control de plagas. Por consiguiente, éstos pueden ser clasificados con base en distintos criterios como: organismo blanco, modo de acción, mecanismo de acción, estructura química, persistencia, grado de toxicidad y usos (Tabla 1).

Organismo blanco: grupo hacia el cual está dirigido el plaguicida: insecticida, acaricida, fungicida, bactericida, herbicida, rodenticida, molusquicida, desinfectantes, etc. (Ortiz y cols, 2014).

Modo de acción: forma en la que debe de entrar en contacto el plaguicida con el organismo blanco para llevar a cabo su función. Algunos modos de acción son por contacto, por ingestión, sistémico, repelente y foliar (Ortiz y cols, 2014).

Mecanismo de acción: se refiere a cómo actúa el plaguicida directamente sobre los procesos fisiológicos de la plaga, ejemplo de ello son los inhibidores de acetilcolinesterasa, de la biosíntesis de tubulina en hongos, de la síntesis de aminoácidos en plantas y el bloqueo de la fotosíntesis (Casida, 2009).

Estructura química: se dividen en orgánicos, inorgánicos y de origen botánico. La mayoría de los plaguicidas son orgánicos e incluyen a todos los compuestos sintéticos a base de carbono; éstos pueden clasificarse en organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides (piretrinas sintéticas) y

derivados de triazinas, entre otros. (Ortiz y cols. 2014). Dentro de los plaguicidas inorgánicos se encuentran el mercurio, selenio, fosfito de magnesio y los arsenicales como el trióxido de arsénico.

Algunos compuestos de origen botánico son la rotenona, la piretrina, la nicotina y el aceite de canola (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Persistencia: hace referencia a la vida media del compuesto en el medio ambiente. Se clasifican en ligeramente persistentes (menos de 4 semanas), poco persistentes (de 4 a 26 semanas), moderadamente persistentes (27 a 52 semanas), altamente persistentes (más de 1 año y menos de 20) y permanentes (más de 20 años) (CICLOPLAFEST, 2004).

Grado de toxicidad: establecido por la OMS, se define como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud, a través de una o múltiples exposiciones en un periodo relativamente corto de tiempo. Utilizando este criterio, se estableció un sistema de clasificación con base en los valores de la DL₅₀¹ oral y dérmica reportada en rata. Hay 5 clases: Ia – extremadamente peligrosos, Ib – altamente peligrosos, II – moderadamente peligrosos, III – ligeramente peligrosos y U – poco probable que presenten un peligro agudo (WHO, 2009).

Usos: dependiendo del destino del plaguicida se clasifican en: agrícolas (más del 85% de la producción mundial de plaguicidas se destina a esta actividad), salud pública (10% de la producción total), forestales, urbanos, jardinería, pecuarios, domésticos e industriales (Ortiz y cols, 2014; Ramírez y Lacasaña, 2001).

El registro del uso de compuestos químicos como agentes controladores de plagas data de centurias. Hace tres mil años, en China se empleó el azufre como fumigante y en el siglo XVI se introdujo el arsénico para el control de insectos. En el mismo siglo, en los arrozales de Japón se utilizaba como larvicida el aceite de ballena de baja calidad mezclado con vinagre. Los romanos hacían uso de la sal común para el control de gusanos y el sulfuro contra los insectos. En los 1800's se desarrolló el insecticida Verde de París, una mezcla de cobre y sales de arsénico, sustituido más adelante por arseniatos de cobre y plomo. Durante el siglo XIX comenzó a utilizarse el trióxido de arsénico como herbicida y, el sulfato de cobre, como fungicida para combatir el mildiú (enfermedad en plantas ocasionada por protistas) en los viñedos europeos, plaga que llegó de los Estados Unidos. Los extractos de plantas también han sido empleados como plaguicidas. A finales del siglo XVII ya se aplicaban extractos acuosos de tabaco a los cultivos. En el siglo XIX se encontró que la piretrina, compuesto presente en flores como el crisantemo, tenía propiedades insecticidas; la rotenona, ingrediente activo de la raíz de la planta leguminosa Derris, fue aislado en 1895 y empleado como insecticida, la raíz ya era utilizada por China y nativos de Sudamérica como veneno para peces (Moreno, 2003; 3G E-Learning, 2017).

¹ DL₅₀ – Dosis (mg/kg de peso) que causa la muerte en el 50% de los animales expuestos.

Tabla 1. Identificación de los plaguicidas evaluados en el presente trabajo con base en diferentes clasificaciones y su estado actual en México.

Compuesto	Clasificación	Organismo blanco ¹	Modo de acción ^{1,2}	Mecanismo de acción ³	Estructura química ¹	Persistencia ¹	Nivel de riesgo de toxicidad aguda ⁴	Usos ^{1,5}	Estado en COFEPRIS ⁵
Endosulfán (metabolito endosulfán lactona)	Insecticida / acaricida	De contacto	Neurotóxico: bloqueo del flujo clorinado GABA-dependiente en el complejo acarreador de iones del receptor clorinado de GABA	Organoclorado	Fase de vapor: 2 días Suelo: 32 días en suelos aeróbicos 150 días en suelos anaeróbicos Agua: 2 días	Grupo II	Cultivos, preservación de maderas y jardinería.	Prohibido	
Glifosato (metabolito AMPA)	Herbicida	Foliar	Bloqueo de la síntesis de aminoácidos	Organofosforado (aminofosfonato)	Suelo: biodegradación en 1.85-7 días en suelos aeróbicos Agua: ND	Grupo III	Cultivos, urbano	Permitido	
Paratión (metabolito paraoxón*)	Insecticida / acaricida y nematocida	De contacto	Neurotóxico: Inhibición de AChE	Organofosforado	Fase vapor: 4.2 horas Fotodegradación: 31-70 horas Agua: 3-43 semanas	Grupo Ia	Cultivos	Prohibida su importación	
Pentaclorofenol	Insecticida / Fungicida	De contacto	Neurotóxico: bloqueo del flujo clorinado GABA-dependiente en el complejo acarreador de iones del receptor clorinado de GABA	Organoclorado	Fase de vapor: 29 días Suelo: fotodegradación en 14 días Agua: fotodegradación en 0.86 horas (luz de sol directa)	Grupo Ib	Tratamiento de maderas y textiles	Uso restringido	
Permetrina	Insecticida	De contacto	Neurotóxico: moduladores de los canales de Na	Piretroide	Fase vapor: 17 horas (a radicales libres) y 49 días (a ozono) Suelo: 6-106 días; 30 días en condiciones aeróbicas; 108 días bajo condiciones anaeróbicas. Agua: 23-37 días por fotólisis	Grupo II	Protección de bosques, urbano y control de vectores	Permitido	
Propoxur	insecticida	De contacto	Neurotóxico: Inhibidor reversible de AChE	Carbamato	Fase vapor: 12 horas Suelo: biodegradación 80 a 120 días según el tipo de suelo. Agua: 93 días por hidrólisis, pH 7.	Grupo II	Urbano y control de vectores	Permitido	

AMPA - Ácido aminometilfosfónico; AChE - acetilcolinesterasa; GABA - ácido γ-aminobutírico; Na - Sodio. * En el presente trabajo sólo se evaluó el paraoxón.
Fuentes: 1 - TOXNET. 2019. 2 - IRAC España, 2015. 3 - FAO, 2012. 4 - WHO, 2009. 5 - COFEPRIS, 2019

Sin embargo, no es sino hasta el siglo XX que surgen los compuestos sintéticos con las propiedades plaguicidas que actualmente conocemos. Algunas de estas sustancias comenzaron a ser sintetizadas entre los años de 1930-1940 siendo los ditiocarbamatos los primeros en utilizarse; compuestos químicos como el DDT, el dinitrocresol y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético se encontraban en fase experimental. Así, al finalizar la Segunda Guerra Mundial hubo un despliegue masivo en número y variedad de plaguicidas que se sintetizaron y se usaron por primera vez. Actualmente son ampliamente utilizados en el campo, en los hogares, en el sector salud y en la industria (Moreno, 2003; Ramírez y Lacasaña, 2001).

En México, el uso de estos compuestos inició en 1948 con la introducción del DDT y otros organoclorados, seguidos por compuestos organofosforados, carbamatos, piretroides, así como diversos herbicidas y fungicidas (Albert, 2005). Para 2014, la FAO reportó que el consumo de los principales grupos de plaguicidas en productos formulados (insecticidas, herbicidas, fungicidas y bactericidas) fue de 98,914 toneladas, siendo México el tercer mercado más importante de América Latina, después de Brasil y Argentina (Bejarano, 2017). En la actualidad, los estados que más utilizan plaguicidas son Campeche, Chiapas, Estado de México, Morelos, Nayarit, Puebla, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán, uso que se refleja en la acumulación de sus residuos en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Gatica, 2018).

1.2 Efectos tóxicos

Una vez que se sintetizaron los primeros plaguicidas (específicamente del grupo de los organoclorados) y se descubrió su potencial como agentes controladores de plagas, principalmente de insectos, inició una etapa en la historia, después de la segunda guerra mundial, en donde estas sustancias comenzaron a producirse y a utilizarse ampliamente en todo el mundo sin ningún tipo de control. En 1948, el hombre detrás de la síntesis del DDT, principal organoclorado utilizado en esa época, el Dr. Paul Müller, fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina bajo la siguiente línea: “por su descubrimiento de la alta eficiencia del DDT como un veneno de contacto contra varios artrópodos” (The Nobel Prize, 2019).

El rápido desarrollo y aplicación de estos novedosos y benéficos compuestos no dio pauta a que se investigara algún posible efecto negativo en especies no blanco. Sin embargo, no pasó mucho tiempo antes de que comenzaran a reportarse los daños que los plaguicidas tienen sobre otros organismos. La denuncia más emblemática e importante del peligro latente de los plaguicidas se registra en el libro “Primavera Silenciosa”, escrito por la investigadora estadounidense Rachel Carson y publicado el 27 de septiembre de 1962. En él, no sólo se hace una descripción de los grupos de plaguicidas más utilizados en esa época, los organoclorados y los organofosforados, sino que también se recopilaron los casos existentes de todos los efectos tóxicos que estos compuestos habían generado en diferentes especies,

incluida la humana, lo que señaló claramente que estos compuestos no eran específicos y, por ende, presentaban un riesgo para todos los seres vivos expuestos a ellos. El libro marcó el inicio de un movimiento ecologista que al final conllevó a que los plaguicidas fueran supervisados por parte del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y posteriormente por la EPA, así como por varias organizaciones gubernamentales y no gubernamentales en todo el mundo.

El uso de plaguicidas de forma extensa, principalmente en la agricultura, conduce a que no solo las personas que los aplican estén en contacto directo con ellos, sino también la población en general que, de forma indirecta puede estar expuesta a estos compuestos o a sus residuos. Esta exposición no ocupacional puede darse principalmente a través del consumo de alimentos o agua contaminados.

La vía respiratoria también tiene gran importancia debido a que muchos plaguicidas se aplican en forma de aerosol, nebulizaciones, bombas de humo y por aspersores aéreos en la agricultura (Ramírez y Lacasaña, 2001; WHO, 2018). Estos últimos tienen relevancia debido a que, al esparcir los plaguicidas desde avionetas, grandes extensiones de tierra son cubiertas por estos compuestos, incluyendo no solo los campos de cultivo a los cuales están dirigidos, sino también zonas aledañas a ellos debido a la dispersión por el viento, como las casas de los mismos agricultores, centros educativos, pueblos cercanos a los campos de cultivo o áreas de vegetación natural como bosques y selvas (Ramírez-Jiménez y cols. 2014).

Lo anterior resulta en un grave problema ecológico y de salud debido a que, como se mencionó anteriormente, la mayoría de los plaguicidas son inespecíficos, por lo que además de las especies blanco, aquellas que no lo son también se ven afectadas presentando diversos niveles de daño (Carson, 2010). El grado de toxicidad de un plaguicida va a depender de varios factores (Ramírez y Lacasaña, 2001) que pueden dividirse en tres grupos: los relacionados con los patrones de exposición, aquellos asociados con los compuestos y los inherentes al organismo.

Factores relacionados con los patrones de exposición: tipo de aplicación, vía de exposición, tiempo, dosis, duración de la exposición.

Factores asociados con los compuestos: tipo de plaguicida, vida media, solubilidad, biodisponibilidad (que se ve influenciado por la toxicocinética y la toxicodinámica del compuesto), etc.

Factores inherentes al organismo: edad, sexo, metabolismo, susceptibilidad genética, estado de salud y nutricional, estilo de vida, entre otros.

La combinación de estos factores determina los efectos tóxicos que producen los plaguicidas en los organismos y que pueden ser agudos o crónicos. La toxicidad aguda se registra en las primeras 24 a 48 horas después de la exposición al agente químico y se caracterizan por signos y síntomas según la dosis y el grupo químico al que pertenecen; entre los síntomas más comunes se encuentra irritación en la piel o mucosas, náuseas, mareos, convulsiones o incluso la muerte. La toxicidad crónica puede presentarse después de una exposición repetida y prolongada a dosis bajas del compuesto; la gravedad

de la toxicidad puede variar en el transcurso del tiempo (MSP, 2018) y puede inducir efectos adversos tan variados como defectos congénitos, alteraciones en el sistema endocrino, así como daños neurológicos (problemas cognitivos y Parkinson), reproductivos, respiratorios (asma), metabólicos (diabetes), alteraciones del desarrollo y cáncer (Bolognesi y cols. 2011; Kim y cols. 2017; Rodríguez, 2015; Yañez-Estrada y cols. 2018), particularmente leucemia infantil (Belson, 2007; Infante-Rivard y cols. 1999; Ma y cols. 2002).

1.3 Plaguicidas como agentes leucemogénicos

Los plaguicidas han sido propuestos como agentes leucemogénicos en infantes y niños al actuar como promotores de translocaciones recíprocas asociadas a subtipos particulares de leucemia (Alexander y cols. 2001; Greaves y Wiemels, 2003; Kim y cols. 2006). Este enunciado fue resultado de la información que integra los resultados obtenidos en dos campos de investigación distintos y de forma independiente: en el epidemiológico y en el molecular. En el campo epidemiológico, diversos estudios han hallado una asociación entre el riesgo a desarrollar leucemia infantil y la exposición a plaguicidas de la madre y del niño durante la gestación (Tabla 2). En el campo molecular (casi paralelamente a los reportes del primer campo de investigación), los estudios retrospectivos en niños con leucemia encontraron que algunas translocaciones, específicas de ciertos subtipos de este cáncer, se pueden originar durante el desarrollo embrionario; esta información condujo a plantear la posibilidad de que este daño conduce al desarrollo de la enfermedad años después del nacimiento del niño e incluso, en los casos más graves, dentro del primer año vida (translocaciones que involucran al gen MLL) (Wiemels y cols. 2009a; Anexos 2 y 3). Debido a la rapidez con la que se desencadena la leucemia en este grupo de edad y la conclusión de que algunas translocaciones se están originando *in utero*, se presentó la propuesta de que algunos agentes exógenos pueden estar favoreciendo la formación de estos eventos. Dentro de los compuestos enlistados se incluyen a los plaguicidas con base en los reportes epidemiológicos antes mencionados. Sin embargo, más allá de esta propuesta, sólo un par de estudios ha explorado esta posibilidad al investigar la asociación entre la exposición del niño durante el desarrollo embrionario y la presencia de translocaciones asociadas a leucemia infantil (LaFiura y cols. 2007; Suárez-Larios, 2012).

Tabla 2. Estudios epidemiológicos de caso-control: Asociación entre la exposición a plaguicidas en la etapa prenatal con el riesgo de desarrollar leucemia infantil (modificado de *Infante-Rivard y Weichenthal, 2007*).

Tipo de Leucemia	No. de casos total	Exposición	Tipo o uso del plaguicida	No. de casos expuestos	Riesgo estimado	Fuente
ALL y ANLL	18	Ocupacional materna	NE	12 7 3	General: 2.6 (0.8-9.1) ALL 3.5 (1.1-11.2) ANLL 2.4 (0.5-11.0)	Shu y cols. 1988
ANLL	90 27 8	En el hogar	NE	50 12 8	< 1 semana 1.4 (0.8-2.2)** 1-2 semanas 0.9 (0.4-2.1) Más días ---	Buckley y cols. 1989
		Ocupacional paterna	NE	NE	1.9	
		Ocupacional materna	NE	NE	6.0	
NE	59 155 71	En el hogar	Exterminio	32	1.0 (0.6, 1.8)	Leiss y cols. 1995
			Uso en el patio	76	0.8 (0.5, 1.1)	
			Plaquitas	45	1.5 (1.0, 2.8)	
ALL	491	En el hogar	Herbicidas	118	1.84 (1.32, 2.57)	Infante-Rivard y cols. 1999
			Insecticidas para plantas	78	1.97 (1.32, 2.94)	
			Plaguicidas para árboles	63	1.70 (1.12, 2.59)	
			Repelentes/sprays	49	0.70 (0.45, 1.09)	
			Productos contra babosas y caracoles	6	1.57 (0.43, 5.62)	
NE	19,674*	Ocupacional paterna	Fungicidas clorofenato***	11	1.0 (0.5, 1.8)	Heacock, y cols. 2000
NE	1184	Ocupacional materna	NE	15 24 ¹	3.6 (1.5, 8.8) 2.5 (1.3, 4.7)	Meinert y cols. 2000
		Ocupacional paterna	NE	57 68 ¹	1.6 (1.1, 2.2) 1.6 (1.1, 2.3)	
ALL	135	En el hogar	Control profesional de plagas	20	2.3 (0.9, 5.4)	Ma y cols. 2002
			Insecticidas	68	2.3 (1.3, 4.0)	
			Productos para el control de pulgas	22	0.7 (0.4, 1.6)	
			Herbicidas	30	1.8 (0.9, 3.5)	
ALL, AML	136	Materna	NE	15	ALL 2.53 (0.71, 8.97) AML 5.08 (1.84, 14.0)	Alexander y cols. 2001
			Baygon/mosquitocida	7	ALL 4.3 (0.66, 28.0) AML 7.82 (1.73, 35.3)	
NE	568	En el hogar	Insecticidas	92	1.8 (1.2-2.8)	Menegaux y cols. 2006
			Plaguicidas para el jardín	14	2.5 (0.8-7.2)	

* Estudio de Cohorte y de caso-control anidado. ** Tiempo de exposición antes del nacimiento. *** Empleo de plaquitas en no menos de un año antes del nacimiento del bebé. ¹ Exposición antes, durante y después del embarazo. ANLL – leucemia no linfoblástica aguda; NE – no especificado.

2. Daño genotóxico

Debido al potencial tóxico que presentan los plaguicidas y su papel en el desarrollo de distintas enfermedades como el cáncer, se ha estudiado el posible papel genotóxico de muchas de estas sustancias, es decir, su capacidad de inducir lesiones de forma directa o indirecta en el DNA. En algunas ocasiones también se incluye la evaluación de los metabolitos. El daño puede ser identificado a través de pruebas que pueden ser clasificadas con base en el nivel en que son medidos: mutación en genes, daño en el DNA o daño cromosómico (Jacobson-Kram y Keller, 2001). Dentro de las pruebas que evalúan las lesiones a nivel del DNA o de los cromosomas, se encuentran los ensayos de aberraciones cromosómicas (AC), de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), de micronúcleos (MN) y cometa, ensayos de genotoxicidad que han sido utilizados en estudios epidemiológicos (Alvarado-Hernandez y cols. 2013; Bolognesi, 2003; Bolognesi y cols. 2009, 2011; Bull y cols. 2006; Gómez-Arroyo y cols. 2000; Martínez-Valenzuela y cols. 2009) y ecotoxicológicos (González y cols. 2010), así como en modelos *in vivo* (Dzwonkowska y Hübner, 1986; Farah y cols. 2006; Mañas y cols. 2008, 2009; Martínez-Paz y cols. 2013; Prasad y cols. 2009) e *in vitro* (Álvarez-Moya y cols. 2014; Bajpayee y cols. 2006; Lin y cols. 2007; Gómez-Arroyo y cols. 1995; Gonzalez-Cid y cols. 1990; Koller y cols. 2012; Mañas y cols. 2008, 2009; Rojas y cols. 2009; Tisch y cols. 2002, 2005; Türkez y Togar 2011; Ündeger y Basaran 2005, Wang y cols. 1998). Este último grupo de estudios se encuentra ejemplificado en el Tabla 3.

Es importante resaltar que, debido a que las poblaciones humanas evaluadas en los estudios epidemiológicos no están expuestas a un sólo plaguicida, sino a una mezcla de ellos, es difícil determinar qué compuesto es el que ocasiona el daño genotóxico y, más aún, dilucidar a través de qué mecanismos de acción lo está induciendo, por lo que es importante estudiar estas sustancias por separado. Si se considera el posible papel de algunos plaguicidas como inductores de translocaciones recíprocas, el mecanismo propuesto para la generación de este daño sería a través de la promoción de rompimientos de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés), paso fundamental para la formación de este tipo de alteraciones estructurales. Con las pruebas de genotoxicidad tradicionales es difícil determinar si estas sustancias pueden causar lesiones tan particulares como lo son los DSB, por lo que en consecuencia, se ha implementado el uso de nuevos biomarcadores de genotoxicidad más específicos para este tipo de lesiones, siendo la detección de la histona H2AX fosforilada (γ -H2AX) uno de los candidatos más prometedores en el campo de la toxicología.

Tabla 3. Estudios *in vitro* de genotoxicidad de los compuestos evaluados en este trabajo.

Grupo	Compuesto	Sistema	Etapa del C. C.	Ensayo	Concentración	Tiempo de exposición	Rango de genotoxicidad	Referencia
Organoclorados	Pentaclorofenol	Células de mucosa nasal	P	Ensayo Cometa	0.3-1.2 mM	1 h	1.2 mM	Tisch y cols. 2005
	Endosulfan	Línea celular CHO Linfocitos	P G0	Ensayo Cometa	0.01-10 µM	3 h	Dosis-dependiente 0.25-10 µM	Bajpayee y cols. 2006
Organofosforados	Paratión + S9	Línea celular LAZ-007	P	ICH	0.07-68.7 µM	48 h 1 h	0.07-68.7 µM	Sobti y cols. 1982
	Paratión Paraoxón	Línea celular CHO	P	ICH	0.03-1 mM	8	0.3-1 mM 0.1-1 mM	Nishio y Uyeiki, 1981
		Linfocitos	P	MN	1-25 µM	48 h	1-25 µM	Rojas y cols. 2009
	Glifosato isopropilmanina	Eritrocitos (tilapia) y linfocitos (humano)	G0	Ensayo cometa	0.7-700 µM	20 h	0.7-7 µM	Alvarez-Moya y cols. 2014
		Núcleos de estambres (plantas <i>Tradescantia</i>)				3 h		
	Glifosato + S9	Linfocitos (toro)	P	AC e ICH	28-1120 µM	24 h	AC: 560-1120 µM ICH: 56-1120 µM	Siviková y cols. 2006
				ICH		48 h 2 h	280-560 µM 140 µM	
	Glifosato y glifosato + S9	Linfocitos	G0	MN	0.003-3.43 mM	4 h	0.02, 0.55 y 3.43 mM 3.43 mM (S9)	Mladinic y cols. 2009
				Ensayo cometa			0.02 mM 3.43 mM (S9)	
	Glifosato	Línea celular HT1080 Línea celular GM38	P	Ensayo cometa	4.5-6.6 mM 4-6.5 mM	4 h	5.25-6.5 mM 4.5-6.5 mM	Monroy y cols. 2005
		Linfocitos	P	AC	0.2-6 mM	48 h	No genotóxico	Mañías y cols. 2009
		Línea celular Hep2	P	Ensayo cometa	3-15 mM	4 h	3-7.5 mM	
		Línea celular TR146	P	MN	0.06-0.118 mM	20 min	0.06-0.118 mM	Koller y cols. 2012
				Ensayo cometa	0.06-11.8 mM		0.118-1.18 mM	

Tabla 3. Estudios *in vitro* de genotoxicidad de los compuestos evaluados en este trabajo (*continuación*).

Grupo	Compuesto	Sistema	Etapas del C. C.	Ensayo	Concentración	Tiempo de exposición	Rango de genotoxicidad	Referencia												
Glifosato		Líneas celulares BEAS-2B y SHSY-5Y	P	Ensayo cometa	100 µM	NE	100 µM	Alleva y cols. 2016												
									Líneas celulares HEC1A y MDA-MB-231	Ensayo cometa	2.95 y 5.9 mM	4 h	2.95 y 5.9 mM	De Almeida y cols. 2018						
															Línea celular MCF7	AC	0.07-2.95 µM	28 h	0.15-2.95 µM	Santovito y cols. 2018
AMPA		Linfocitos	P	AC	0.9 y 1.8 mM	48 h	1.8 mM	Mañas y cols. 2008												
									Línea celular Hep-2	Ensayo cometa	2.5-10 mM	4h	2.5-7.5 mM							
Carbamatos	Propoxur	Linfocitos	P	IHC	4-40 mM directo	48 h	No genotóxico	Gómez-Arroyo y cols. 1995												
									<i>Vicia faba</i>	20-160 mM en extracto de <i>Vicia faba</i> c/propoxur	4-120 mM	4 h	4-120 mM							
	Propoxur	Linfocitos	P	ICH y MN	0.24-0.95 mM	48 h	0.24-0.95 mM	González y cols. 1990												
									NO-Propoxur		0.21-0.84 mM		0.42 y 0.84 mM							
	Propoxur y NO-Propoxur	Línea celular V79	P	AC	0.24-1.92 mM	2 h	No genotóxico	Wang y cols. 1998												
											0.004-0.42 mM	0.01-0.42 mM								
			0.03-0.84 mM	No genotóxico																
							0.04-0.67 mM	0.04-0.84 mM												
	NO-propoxur	Línea celular CHO	P	AC					0.2-4.2 µM	1 h + 24/48 h recuperación	0.2-2.1 µM	Lin y cols. 2007								
							1 o 2 *	ICH					0.17-1.34 µM	2 h	0.17-1.34 µM					
Piretroides	Permetrina	Mucosa oral	P	Ensayo cometa					0.5-1 mM	1 h	0.5-1 mM	Tisch y cols. 2002								
							Linfocitos	P					AC e ICH	0.51 mM	72 h	0.51 mM	Türkez y Togar, 2011			

BEAS-2B – células humanas epiteliales bronquiales; CHO – células de ovario de hámster chino; GM38: fibroblastos humanos primarios; HEC1A – línea celular de cáncer endometrial; Hep-2 – células de epiteloma humano; HT1080 – fibrosarcoma humano; LAZ-007 – células linfoides humanas originarias de células B; MCF7 – células de cáncer de mama con respuesta a hormonas; MDA-MB-231 células de cáncer de mama independientes de hormonas; SHSY-5Y – células neuronales; TR146 – línea celular de epitelio bucal; V79 – fibroblastos de pulmón de hámster.

C. C. – Ciclo celular; P – células en proliferación; GO – células sin proliferar; NE – no especificado. * 1 o 2 – tratamiento durante el primer o segundo ciclo celular. AC – ensayo de aberraciones cromosómicas; ICH – ensayo de intercambio de cromátidas hermanas; MN – ensayo de micronúcleos.

2.1 γ -H2AX como biomarcador de daño

H2AX es una histona que pertenece a la familia H2A (una de las cinco proteínas principales constitutivas que están involucradas en la formación de los nucleosomas) y que fue descubierta a principios de los años 1980's. En mamíferos, esta variante se encuentra presente en niveles entre el 2 y 25% del total de las histonas H2A dependiendo de la línea o tejido celular (Fernandez-Capetillo y cols. 2004). H2AX tiene la peculiaridad de presentar una cola terminal COOH más larga (13 residuos) junto con un motivo SQ (serina-glutamina) altamente conservado. En respuesta ante la radiación ionizante y otros agentes que inducen rompimientos de doble cadena, la serina 139 del motivo SQ, ubicada a cuatro residuos del C terminal, es rápidamente fosforilada (1-3 minutos) pasando a su forma gamma, γ -H2AX (Rogakou y cols, 1998; Redon y cols. 2002). La fosforilación de esta histona es realizada por los miembros de la familia PI3 cinasa que incluye a las proteínas ATM (ataxia telangiectasia mutada), ATR (relacionada con Rad3 y ataxia telangiectasia) y DNA-PK (proteína cinasa dependiente de DNA) (Dickey y cols. 2009). Bajo la inducción de rompimientos en la doble cadena del DNA o DSB, una de estas proteínas cinasas fosforila muchas moléculas de H2AX en la región de cromatina dañada que puede abarcar desde unos pocos Mbp hasta muchas decenas de Mbp flanqueando la lesión; esta respuesta amplificada es detectada con anticuerpos específicos para γ -H2AX e identificada como un foco nuclear discreto que puede ser utilizado para contabilizar el número DSB en una célula y/o examinar la co-localización de otras proteínas de reparación del DNA en los sitios donde ocurrió el rompimiento de la doble cadena (Dickey y cols. 2009). Esta cualidad ha conducido a que γ -H2AX comenzara a utilizarse en diversas áreas de la investigación básica, del desarrollo de fármacos y tratamientos, así como de la Toxicología (Dickey y cols. 2009; Redon y cols. 2012) (Figura 1), siendo en este último punto de gran valor al fungir como un biomarcador de efecto temprano al detectar un daño inicial como lo son los rompimientos de doble cadena del DNA.

2.2 Rompimientos de doble cadena del DNA

Los rompimientos de doble cadena o DSB pueden inducirse bajo las siguientes condiciones:

- a. Durante la recombinación homóloga entre los cromosomas durante la meiosis.
- b. Como intermediarios durante rearrreglos regulados por el desarrollo como la recombinación V(D)J y la recombinación del cambio de clase de la inmunoglobulina.
- c. En los extremos de los cromosomas debido a un metabolismo defectuoso de los telómeros.
- d. Cuando la horquilla de replicación del DNA encuentra rupturas de una sola cadena u otro tipo de lesión.

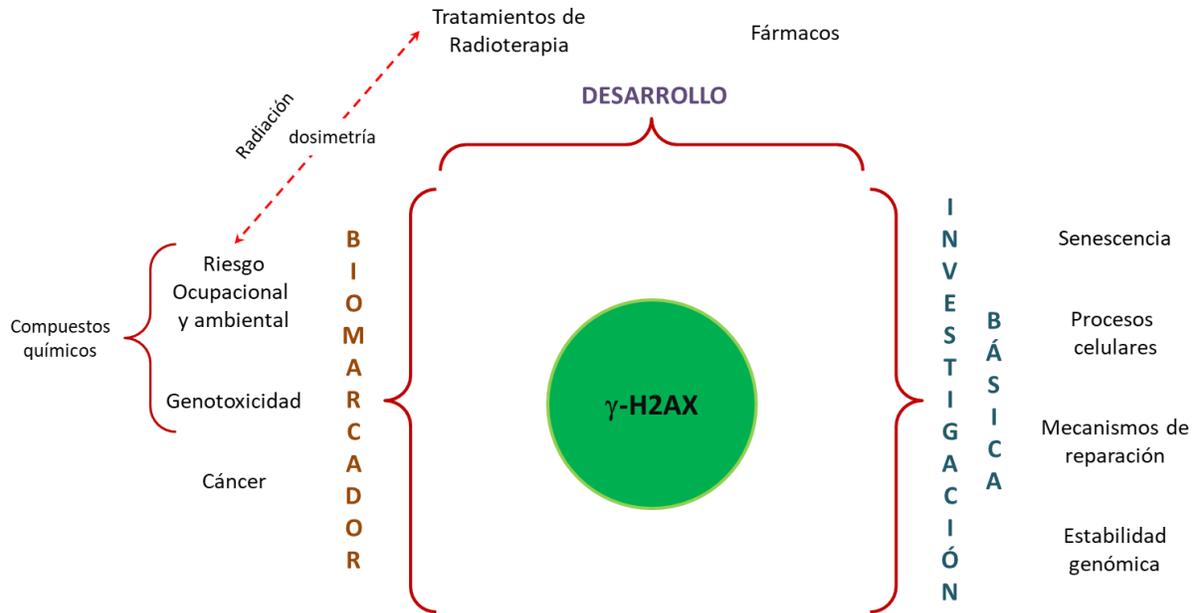


Figura 1. Aplicaciones de la detección de γ -H2AX. Gracias a su sensibilidad, el ensayo de γ -H2AX ha comenzado a utilizarse en diversas áreas de investigación, incluyendo el nivel básico: estudio de la estabilidad del genoma, mecanismos de reparación del DNA, procesos celulares como la apoptosis, etc. En la última década, γ -H2AX ha sido identificada como un biomarcador de cáncer (y lesiones premalignas) y de genotoxicidad ocasionada por compuestos químicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y plaguicidas, entre otros. Además, ha sido desarrollada para entender la biología de la radiación y establecer una biodosimetría con el fin de mejorar el desarrollo de drogas y tratamientos con radiación. También se ha buscado implementar su uso para evaluar riesgo por radiación en accidentes ocupacionales y ambientales, así como en estudios en poblaciones en riesgo por exposición a contaminantes ambientales.

- e. Por agentes endógenos como especies reactivas de oxígeno y por el estrés mecánico de los cromosomas.
- f. Por agentes exógenos físicos y químicos (xenobióticos) como la radiación ionizante y algunos medicamentos antineoplásicos respectivamente; estos últimos al actuar como radiomiméticos o a través de la inhibición de topoisomerasa II (topoII) (Khanna y Jackson, 2001).

Los DSB, principalmente aquellos que se producen de forma espontánea por agentes endógenos o exógenos, son considerados el tipo de lesión más peligrosa para la célula, debido a que pueden conducir a la muerte. A nivel biológico, son de gran importancia ya que su reparación es más compleja que en los otros tipos de daño al DNA. Además, si la reparación de los extremos rotos es errónea, puede conducir a la pérdida o amplificación de material cromosómico o, bajo ciertas circunstancias, a eventos de translocación en donde los fragmentos de dos cromosomas pueden ser intercambiados, algunas veces de forma recíproca (Khanna y Jackson, 2001). A su vez, ante la persistencia o la incorrecta reparación de los DSB, existe la posibilidad de una inestabilidad genómica que conduzca a la carcinogénesis a través de la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumores o pérdida de la heterocigosidad, que si llega a presentarse en células germinales, o incluso en

las células de un embrión en desarrollo, ello puede conducir a defectos en el producto (Kanaar y cols. 1998).

En el caso particular de las translocaciones cromosómicas, algunas veces conducen a la fusión de genes cuyo transcrito puede desregular o alterar las funciones de un proto-oncogen (Khanna y Jackson, 2001). En leucemias, las translocaciones son la alteración citogenética que se presenta con mayor frecuencia (Burmeister y Thiel, 2001; Zhang y Rowley, 2006; Greaves, 2002). Los estudios moleculares en leucemias en infantes y niños han identificado translocaciones asociadas a subtipos particulares de leucemia, siendo un ejemplo las translocaciones t(8;21), t(12;21) y aquellas que involucran al gen MLL como la t(4;11) (Kersey, 1997; Pui y cols. 2004, 2011). Casi al mismo tiempo, se ha reportado que algunas translocaciones tienen su origen durante el desarrollo embrionario, lo que ha permitido determinar su valor como marcadores tempranos o iniciadores del proceso leucemogénico (Greaves y Wiemels, 2003; Greaves, 2005).

2.3 Agentes exógenos inductores de DSB

Dada la importancia de los DSB en la formación de eventos de translocación y otras lesiones, estudios recientes han incorporado el uso de la histona γ -H2AX para la identificación puntual de este daño en distintos campos de investigación.

En medicina, el uso de este marcador ha sido indispensable para el desarrollo de terapias con radiación y de nuevos fármacos antitumorales. Diversos tipos de cáncer son tratados con agentes quimioterapéuticos que tienen como blanco a la topoisomerasa II (topoII). Dentro de este tipo de compuestos se distinguen dos grupos principales: los venenos y los inhibidores catalíticos de topoII. Los primeros de ellos se unen en sitios distintos al catalítico, por lo que topoII conserva la capacidad de unirse al DNA y corta la doble cadena. Sin embargo, estos compuestos envenenan el complejo de unión entre topoII y el DNA al inhibir un segundo paso de la reacción de la enzima (ej. religación del DNA) (Montecucco y cols. 2015), lo que conlleva a la formación de complejos covalentes estables entre la proteína y el DNA que conducirán a la formación directa de DSB y, en consecuencia, a una mayor formación de aberraciones cromosómicas (incluye al etopósido, la doxorubicina y la mitoxantrona). En contraste a éstos, los compuestos del segundo grupo interactúan con el sitio catalítico de topoII, al bloquearlo se impide la unión de la enzima con el DNA y con ello la presencia de los complejos covalentes de topoII; por tanto, se ha observado que este tipo de sustancias no conducen a la formación de DSB (ejemplo de ellos son la merbarona y el ICRF-187) (Mosesso y cols. 2015; Nitiss, 2009).

En el campo de la Toxicología, los grupos de trabajo se han centrado en evaluar a γ -H2AX como biomarcador de la inducción de DSB como consecuencia de una exposición a radiación ionizante

ambiental, laboral o por accidentes nucleares, aunque también se ha evaluado el efecto genotóxico de compuestos químicos como metales, hidrocarburos aromáticos y plaguicidas (Tabla 4).

Radiación ionizante: agente físico que permitió el descubrimiento de la forma gamma de H2AX. A su vez, fue el primer agente que se estudió utilizando a γ -H2AX como un biomarcador para detectar los DSB (Rogakou y cols. 1998). Se ha corroborado la detección de este daño en individuos expuestos a radiación ambiental, laboral o en accidentes radiológicos (Garty y cols. 2010; Moquet y cols. 2014), así como también ha permitido desarrollar las técnicas empleadas para la evaluación de γ -H2AX (Rothkamm y Horn, 2009).

Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, por sus siglas en inglés): diversos estudios han evaluado el papel de los PAH en la formación de DSB, ya sea de forma individual (Audebert y cols. 2010; Kawanishi y cols. 2009; Toyooka e Ibuki, 2005, 2006) o en mezcla (Mattsson y cols. 2009) como el humo de tabaco (Albino y cols. 2004; Toyooka e Ibuki, 2009) y la quema de combustible de biomasa (madera, estiércol de vaca, desechos de la agricultura como bambú, entre otros) (Mondal y cols. 2010). Un mecanismo propuesto por el cual estos compuestos inducen las rupturas de forma directa es a través de un fenómeno conocido como *fitotoxicidad*, en donde al existir una co-exposición a PAH y a la luz UV, los primeros absorben la luz volviéndose más reactivos y por ende, adquirieron la facultad de inducir rupturas en la doble cadena del DNA (Toyooka e Ibuki, 2006, 2009; Toyooka y cols. 2011).

Plaguicidas: junto a los PAH, los plaguicidas han sido estudiados para determinar su papel en la inducción de DSB, aunque a diferencia de los primeros, la información es limitada. Estudios en líneas celulares han determinado que algunos fungicidas (Graillet y cols. 2012a; Crépet y cols. 2013); plaguicidas con estructura de metil-pirazol (Graillet y cols. 2012b), la acetamiprida, un neonicotinoide (Cavas y cols. 2012) y algunos tio-ftalimida clorados (Hershman y cols. 2017) favorecen la formación de DSB. Sin embargo, existe información limitada sobre los mecanismos por los cuales estos compuestos pueden inducir los DSB, aunque éstos parecen depender del grupo químico al que pertenecen. Graillet y cols. (2012b) identificaron la posible participación del estrés oxidante en la formación de los DSB en células tratadas con plaguicidas metil-pirazoles, aunque aparentemente hay otros mecanismos involucrados cuando se trata de mezclas complejas que incluyen a organoclorados y organofosforados, entre otros (Graillet y cols. 2012a). Actualmente, el mecanismo principal que se ha propuesto es a través de su acción como venenos de topoII, esto como consecuencia de los estudios realizados en pacientes con leucemias secundarias. Se ha concluido que, este tipo de cáncer, es consecuencia del tratamiento de un cáncer primario con agentes quimioterapéuticos del grupo de los venenos de topoII siendo, una de sus características principales, la presencia de translocaciones específicas que involucran al gen MLL, eventos que no son comunes en leucemias *de novo* en adultos (Alexander y cols. 2001). Sin embargo, los rearrreglos que implican a este gen también se encuentran en un alto porcentaje de las leucemias infantiles (~8% en la leucemia linfoblástica aguda y ~18% en la leucemia mieloide aguda) (Pui y cols. 2011), por lo que se ha propuesto que los niños pudieran estar

expuestos (durante el desarrollo embrionario o en los primeros años de su vida) a compuestos que actúen como venenos de topoiI, entre ellos los plaguicidas (Alexander y cols. 2001; Greaves y Wiemels, 2003; Pui y cols. 2004).

Tabla 4. Estudios que utilizaron a γ -H2AX como biomarcador de daño genotóxico al detectar DSB.

Compuesto	Modelo de Estudio	Concentraciones	Tiempo de Exposición	Resultados	Referencia
Cromo (VI)	A549, HCT116 (MLH1 ^{-/-}), HCT116 + ch3 (MLH1 ⁺), DLD1 (MSH6 ^{-/-}), DLD1 + ch2 (MSH6 ⁺), MEFs	10 y 20 μ M	3, 6 y 12 horas	La reparación del daño Cr-DNA por el mecanismo mismatch promueve la formación de DSB como lesiones secundarias. Respuesta tiempo y dosis-dependiente.	Peterson-Roth y cols. 2005
Campos Electromagnéticos	Ratones ICR hembra	Campo electromagnético sinusoidal de 50-Hz	24 y 48 horas	Asociación entre el incremento de daño genotóxico y la disminución en la tasa de pre-implantación embrionaria.	Luo y cols. 2006
Humo de cigarro	A549, NHBE	10, 25 y 50 μ M	4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas	Daño genotóxico tiempo y dosis-dependiente.	Albino y cols. 2004
Humo de cigarro	A549	25, 50, 75 y 100%	4 horas	Daño genotóxico dosis-dependiente.	Toyooka e Ibuki, 2009
Mezclas complejas de PAHs y oxi-PAHs (extracto de suelo)	HepG2	0.01, 0.1 y 1 mg de suelo/ml	3, 6, 24 y 48 horas	Daño genotóxico tiempo y dosis-dependiente sostenible por 48 horas.	Mattsson y cols. 2009
Quema de biomasa en el hogar como combustible	Linfocitos de sangre periférica y células epiteliales aéreas	---	Exposición crónica (al menos 2.5 a 5.5 horas diarias)	Incremento de daño genotóxico comparado con el grupo control (uso de gas como combustible).	Mondal y cols. 2010
Benzo[a]pireno	CHO-K1	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁷ M + 0.06 J/cm ² de UV	1 hora con Benzo[a]pireno seguido de la radiación	Detección de daño genotóxico (agente fototóxico).	Toyooka e Ibuki, 2005
Benzo[a]pireno, naftaleno, fenantreno y pireno	HaCaT	10 ⁻¹¹ – 10 ⁻⁷ M + 1- 5 J/cm ² de UV	1 hora seguido de la radiación	Efecto fototóxico (excepto el naftaleno)..	Toyooka e Ibuki, 2006
3,6-Dinitrobenzo[e]pireno	HepG2	3 μ M	1 hora	Efecto genotóxico.	Kawanishi y cols. 2009
Benzo[a]pireno, fluoranteno, 3-metilclorantreno	HepG2, ACHN, CaCo-2	0.1, 1 y 10 μ M	24 horas	Efecto genotóxico del benzo[a]pireno y del 3-metilclorantreno en HepG2 y CaCo-2 -> influencia del metabolismo celular.	Audebert y cols. 2010
Bisfenol A y bisfenol F	LS174T, HepG2, ACHN	1, 5, 10, 50 y 10 μ M	24 horas	Efecto genotóxico del bisfenol F en HepG2.	Audebert y cols. 2011

Tabla 4. Estudios que utilizaron a γ -H2AX como biomarcador de daño genotóxico al detectar DSB (*continuación*).

Compuesto	Modelo de Estudio	Concentraciones	Tiempo de Exposición	Resultados	Referencia
Compuestos fototóxicos	HaCaT	0.001-0.1 μ M	1 h + radiación UV	Detección de daño genotóxico.	Toyooka y cols. 2011
Acetamiprida	CaCo-2	25, 75, 150 y 300 μ M	24 horas	Efecto genotóxico dosis-dependiente.	Cavas y cols. 2012
Mezclas de plaguicidas	ACHN, SH-SY5Y, LS-174T, HepG2	7 mezclas con concentraciones equimolares: 1, 3, 10, 30 y 100 μ M	24 horas	Efecto genotóxico combinado a bajas concentraciones de las mezclas comparado con el efecto individual en HepG2.	Graillot y cols. 2012b
Plaguicidas metilpirazol	ACHN, SH-SY5Y, LS-174T, HepG2, Jurkat	0.1, 1 y 10 μ M	24 horas	Plaguicidas tebufenpirad, bixafen, fenpiroximat y tolfenpirad genotóxicos en SH-SY5Y y Jurkat.	Graillot y cols. 2012b
Mezclas de plaguicidas	ACHN, SH-SY5Y, LS-174T, HepG2	1 – 100 μ M	24 horas	Efecto genotóxico en una mezcla en HepG2.	Crépet y cols. 2013
Catálogo de plaguicidas <i>Toxcast</i> Fase 1 de la EPA	NTHY-ori-3-1	Diversas concentraciones μ M	24 horas	19 de 309 plaguicidas: Inducción de daño genotóxico asociado con la dosis.	Hershman y cols. 2017

A549 – Adenocarcinoma pulmonar humano; NHBE – células epiteliales bronquiales humanas; MEFs – fibroblastos embrionarios de ratón; CHO-K1 – células de ovario de hamster chino; HaCaT – queratinocitos humanos; HepG2 – carcinoma hepatocelular humano; LS174T – adenocarcinoma colorectal epitelial humano; ACHN – adenocarcinoma de células renales humanas; CaCo-2 – línea celular de carcinoma de colon humano; SH-SY5Y – células de neuroblastoma humano; Jurkat – leucemia de linfocitos T. NTHY-ori-3-1 – línea celular tiroidea humana. DSB: Rompimientos de doble cadena en el DNA.

2.4 Mecanismos principales de reparación de DSB

En células eucarióticas, los DSB pueden ser resueltos a través de dos vías principales: la reparación por Recombinación Homóloga (HR) o bien, por la Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ) mejor conocida como Recombinación no Homóloga. Los DSB producto de nucleasas y de la radiación ionizante pueden ser reparadas por cualquier vía. Los DSB provocados por el colapso de la horquilla de replicación son reparados principalmente por HR (Shrivastav y cols, 2008). Si bien se sabe que en mamíferos, la vía de reparación NHEJ predomina, la activación del mecanismo de reparación de DSB dependerá también de la fase del ciclo celular. Se ha observado que la reparación por NHEJ puede ocurrir a lo largo del ciclo celular, aunque es dominante en las fases G0/G1 y G2 de la célula. En contraste, el mecanismo HR está activo durante las fases S y G2, donde la replicación del ADN está en su punto más alto y cuando las cromátidas hermanas están disponibles (Ceccaldi y cols. 2016; Christmann y cols. 2003) (Figura 2).

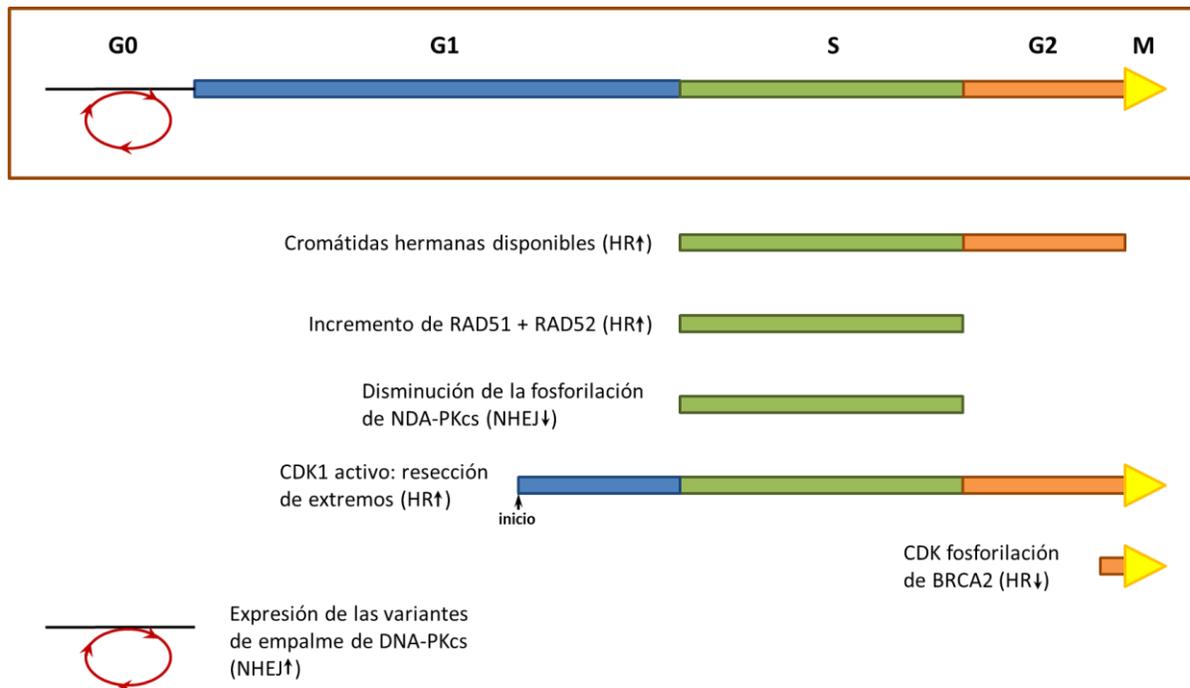


Figura 2. Regulación del ciclo celular y la elección de la vía de reparación de los DSB. En el recuadro se muestra una representación del ciclo celular. Cada esquema subsecuente indica un mecanismo específico que regula a NHEJ o HR en la fase del ciclo celular correspondiente. G0 indica células que no están en proliferación (Modificado de *Shrivastav y cols. 2008*).

La reparación HR, antes conocida como “libre de errores”, requiere de regiones extensas de DNA homólogas para poder llevarse a cabo. Utiliza información de la cromátida hermana no dañada, del cromosoma homólogo (Kanaar y cols. 1998) o de regiones repetidas en el mismo o en un distinto cromosoma (Shrivastav, 2008). Por tanto, está limitada sólo a una parte del ciclo celular que abarca desde la replicación del DNA hasta antes de la mitosis: durante la fase S y la G2 (Iliakis y cols. 2015). En general, durante la reparación por esta vía el DNA es resectado en el sitio del DSB para formar una región extendida de una sola hebra de DNA 3' (ssDNA); este proceso está regulado por el ciclo celular y requiere de varios factores como el complejo MRN, CtIP, Exo1, Dna2 y la helicasa BLM. Rápidamente, la proteína RPA se une a los extremos de las hebras para estabilizar la estructura y facilitar la entrada de Rad51. Con la ayuda de los parálogos de Rad51, Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrcc2 y Xrcc3, así como BRCA2, se forma un filamento nucleoprotéico de Rad51 que invade la secuencia homóloga con el apoyo de Rad54. Finalmente, el daño es resuelto a través de resolvasas (Figura 3A) (Iliakis y cols. 2015).

Por otra parte, la reparación NHEJ no necesita de una secuencia homóloga, o esta región es muy limitada, para poder unir los extremos rotos, por lo que no está libre de error (Kanaar y cols. 1998). NHEJ está involucrada en el alineamiento de una o pocas bases complementarias, conocido como microhomología para realizar una reparación directa, lo que conduce a pequeñas deleciones y, en ocasiones, a pequeñas inserciones (Shrivastav y cols. 2008). Durante el proceso de reparación, los extremos de DNA rotos son capturados instantáneamente por el heterodímero Ku70/Ku80 que recluta a las proteínas DNA-PKcs hacia el sitio de ruptura. Las DNA-PKcs cambian su conformación y forman dímeros para generar un andamio que subsecuentemente procesa los extremos del DNA con ayuda de la proteína Artemis. Finalmente los extremos son ligados por el complejo Ligasa IV/XRCC4, reacción que es estimulada por XLF (Figura 3B) (Iliakis y cols. 2015).

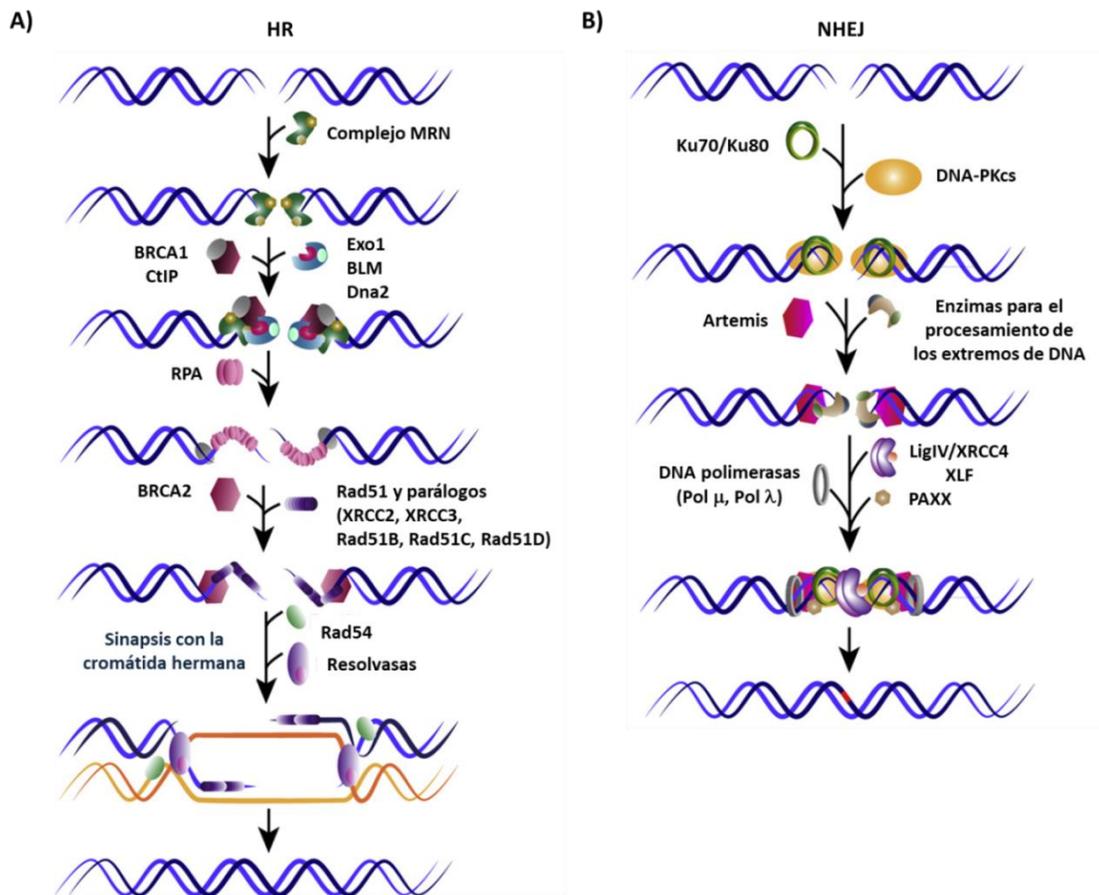


Figura 3. Principales mecanismos de reparación de DSB en eucariotes superiores. (A) Recombinación Homóloga (HR). (B) Unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Modificado de Iliakis y cols. 2015).

PLANTEAMIENTO

Si bien se ha propuesto a los plaguicidas como agentes promotores de leucemia infantil a través de la inducción de translocaciones específicas, no se ha profundizado en este tema existiendo un gran vacío en este campo. Esto probablemente se debe a que las translocaciones son eventos raros en las células y, si a ello se suma que sólo unas pocas translocaciones han sido asociadas a la leucemia infantil, entonces la probabilidad de encontrarlas específicamente en un estudio *in vivo* se reduce drásticamente.

Una forma de determinar si los plaguicidas pueden promover la formación de translocaciones es buscar los eventos tempranos que pueden conllevar a la formación de un tipo de daño tan particular. Estos eventos son los DSB y su subsecuente reparación. La extensión del daño (número de DSB) y la fase del ciclo celular podrían ser determinantes en la inducción de translocaciones, por el tipo de reparación por recombinación que entraría en acción. La identificación de este daño inicial puede volverse fundamental para identificar si los plaguicidas pueden afectar al DNA.

Una pregunta adicional se desprende del planteamiento de que los plaguicidas inducen translocaciones, la cual tiene que ver en cómo se están produciendo los DSB. La inhibición de tipo veneno de topoII es uno de los principales mecanismos propuestos para la formación de este daño. Sin embargo, esto no ha sido investigado a fondo, por lo que la pregunta permanece.

Por tal motivo, el interés de este trabajo es investigar:

- a) Si plaguicidas que actualmente se usan en México y que son representativos de los principales grupos de estos compuestos (considerando su estructura química) pueden inducir DSB y su subsecuente reparación.
- b) Si la generación de estos DSB, es consecuencia de la inhibición tipo veneno de topoII.

HIPÓTESIS

Existen plaguicidas que inducen rompimientos en la doble hélice del DNA a través de la inhibición de topoisomerasa II, produciendo sustratos para la activación de mecanismos de reparación por recombinación.

OBJETIVO GENERAL

Identificar entre un grupo de plaguicidas o sus metabolitos aquellos que tengan el potencial de inhibir topoisomerasa II promoviendo así la formación de rompimientos de doble cadena que active los mecanismos de reparación.

OBJETIVOS PARTICULARES

-  Identificar, entre un grupo de plaguicidas y metabolitos representativos de los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides, aquellos compuestos con la capacidad de producir DSB en linfocitos de sangre periférica.

-  Evaluar la activación de los mecanismos de reparación por Recombinación Homóloga (HR), por Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ) y/o por la vía Alternativa de Unión de Extremos (alt-EJ) en células mononucleares tratadas con los plaguicidas y metabolitos inductores de DSB.

-  Determinar si los compuestos que indujeron los DSB y la reparación de este daño, lo hicieron al actuar como venenos de topoisomerasa II en linfocitos de sangre periférica.

DISEÑO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA CADA COMPUESTO EVALUADO

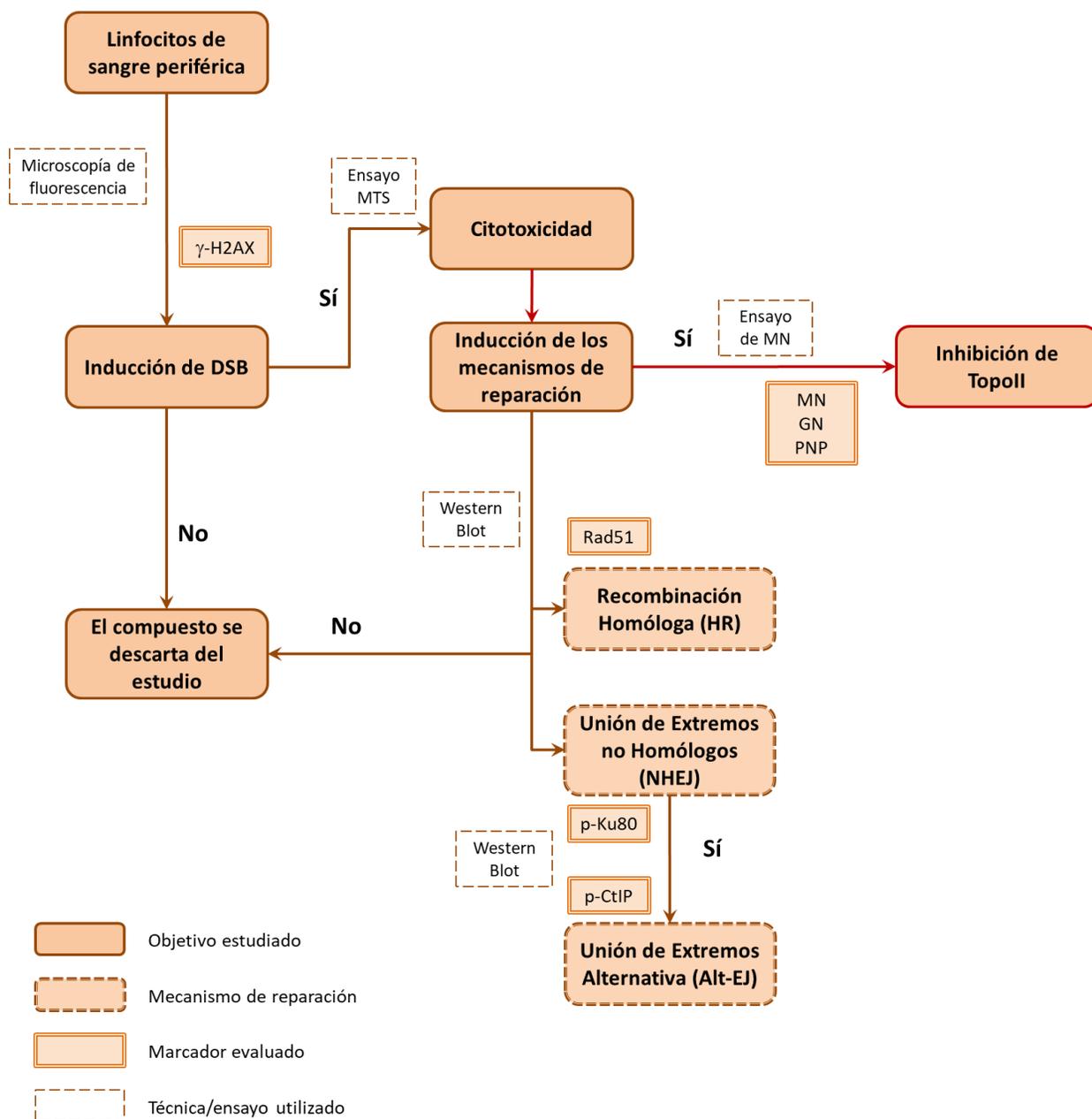


Figura 4. Esquema general del diseño experimental que se siguió para cada uno de los plaguicidas y metabolitos estudiados en este trabajo de investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Donadores

Para los diferentes experimentos se utilizaron en total las muestras de sangre periférica de diecisiete donadores varones sanos entre los 21 y 35 años de edad, un donador por ensayo. Se les pidió su participación en el estudio explicando el objetivo del mismo y se les aplicó una encuesta. Se tomó una muestra de sangre por punción venosa de 3 mL para la identificación de los DSB y la citotoxicidad o bien, de 20 mL para la detección de proteínas de reparación y evaluación de MN. La toma fue realizada por personal capacitado utilizando siempre material nuevo y estéril. Todos los donadores fuman o beben ocasionalmente y son residentes de la Ciudad de México y su área metropolitana. Se corroboró que ninguno de los donadores haya fumado y/o bebido dentro de las 48 horas previas a la toma de muestra, así como también que no se hubieran expuesto a radiación (para propósitos médicos) o ingerido medicamentos dentro del mes previo a la toma de muestra. La sangre se colectó en tubos Sarstedt Monovette® con heparina.

2. Reactivos

Los plaguicidas endosulfán, glifosato, pentaclorofenol, permetrina y propoxur, los metabolitos AMPA (ácido aminometilfosfónico, del glifosato), endosulfán lactona (del endosulfán) y paraoxón (del paratión), y los inhibidores de topoisomerasa II, el etopósido e ICRF-187, fueron obtenidos a través de Sigma-Aldrich. El DMSO fue adquirido en ATCC. El reactivo Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation de PROMEGA fue utilizado para determinar la citotoxicidad. El “kit” de reactivos para la detección de inmunotransferencia Amersham™ ECL™ y las placas de revelado Amersham™ HiperFilm™ ECL de GE Healthcare se emplearon para el análisis de las proteínas de interés.

3. Anticuerpos

Anticuerpos primarios: ratón anti-fosfo-histona H2A.X (Ser139) y conejo anti-Rad51 policlonal (de Millipore), conejo anti-Ku80 (fosfo T714) policlonal (de Abcam), conejo anti-fosfo-CtIP (Ser327) policlonal y conejo anti-beta actina policlonal (ThermoFisher Scientific), cabra anti-actina (1-19) policlonal (de SantaCruz). Anticuerpos secundarios: Alexa Fluor® 555 en cabra anti-ratón (de Invitrogen), cabra anti-conejo IgG-HRP, cabra anti-ratón IgG-HRP y burro anti-cabra IgG-HRP (de SantaCruz) y cabra anti-conejo IgG poli-HRP (de ThermoFisher Scientific).

4. Detección de rompimientos de doble cadena por microscopía de fluorescencia

4.1. Tratamientos

De cada plaguicida y metabolito, así como del control positivo, etopósido (por su capacidad de inducir DSB), se probaron cuatro concentraciones en diluciones seriadas (Tabla 5). Se llevó a cabo un ensayo por plaguicida con su respectiva réplica. Los tratamientos con el plaguicida o metabolito de interés se acompañaron de un testigo negativo (medio de cultivo) y uno positivo (etopósido 50 μ M). Para cada uno de ellos, 250 μ L de sangre entera se mezclaron suavemente en 2.25 mL de medio RPMI-1640 y se adicionó el compuesto y concentración correspondientes. Los cultivos se incubaron durante 1.5 horas a 37 °C. Finalizado este tiempo, se adicionaron 3 mL de KCl 0.075 M y se dejó en incubación a 37 °C por 30 minutos. Los linfocitos se fijaron siguiendo el protocolo descrito por Andrievski y Wilkins (2009) con modificaciones menores, el cual se describe brevemente a continuación: las células se centrifugaron a 250g x 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se agregó formaldehído en una concentración final de 4%. 10 minutos después, se adicionó 1 mL de PBS con Tritón X-100 al 0.12%. Las muestras se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, resuspendiendo manualmente de forma periódica. Posteriormente, las células se lavaron con 1 mL de amortiguador PBS frío suplementado con 4% de suero fetal bovino (SFB) y se centrifugaron a 300g x 8 min a 0 °C. El sobrenadante fue removido y se agregó 1 mL de metanol frío al 50% en PBS. Las muestras se dejaron a -20 °C durante toda la noche. Las células fueron centrifugadas a 300g x 8 min a 0 °C y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se adicionaron 3 mL de metanol frío al botón celular. Las muestras se mantuvieron almacenadas a -20 °C hasta su análisis.

4.2. Detección de γ -H2AX

La identificación de los rompimientos de doble cadena se llevó a cabo a través de la detección de focos por inmunofluorescencia de la histona H2AX fosforilada (γ -H2AX) por microscopía (Nikon Eclipse 80i). La tinción del núcleo de los linfocitos se realizó con base en el protocolo de Watters y cols. (2009) con ligeras modificaciones, éste se describe brevemente a continuación: Las laminillas de cada tratamiento se prepararon por goteo. Éstas se lavaron tres veces con PBS (30 min cada lavado) y se bloquearon con el amortiguador KCMT (KCl 120mM, NaCl 20mM, Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM, Tritón X-100 0.2%) con 12% de SFB durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario contra γ -H2AX (dilución 1:200 en solución de bloqueo) se agregó en las laminillas y se dejó incubando durante toda la noche a 4 °C. Tres lavados con KCMT se llevaron a cabo; cada lavado fue de 15 min. Las laminillas se dejaron en incubación con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555 (1:500 en solución de bloqueo) durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad; posteriormente, se realizaron lavados como con el anticuerpo primario. Finalmente, se enjuagó con agua desionizada antes de adicionar el medio de montaje con DAPI (VECTASHIELD®).

Tabla 5. Concentraciones de trabajo utilizadas para la evaluación de los DSB, las proteínas de reparación y el ensayo de MN.

Compuesto	Concentraciones (μM)			CAS #	
	DSB	Reparación (1)	Reparación (2) y ensayo de MN		
Plaguicida	Endosulfán	0.02, 0.2, 1	---	115-29-7	
	Glifosato ^{a,b}	0.4, 2, 10, 50	1.25, 2.5, 5	5	1071-83-6
	Pentaclorofenol ^a	0.03, 0.15, 0.75, 3.75	0.02, 0.1, 0.5	---	87-86-5
	Permetrina ^a	8, 40, 200, 1000	8, 40, 200	---	52645-53-1
	Propoxur*	0.24, 0.48, 0.96, 1.44	---	---	114-26-1
Metabolito	AMPA	40, 200, 1000, 5000	---	---	1066-51-9
	Endosulfán lactona ^a	0.08, 0.4, 2, 10	0.02, 0.05, 0.15	---	3868-61-9
	Paraoxón ^{a,b}	0.02, 1, 5, 25	1, 5, 25	25	311-45-5
Control	Etopósido ^{a,b}	0, 0.4, 2, 10, 50 ⁽³⁾	10	30	33419-42-0
	ICRF-187 ^c	---	---	50	24584-09-6

* Concentración mM.

^a. Compuestos utilizados para la evaluación de proteínas de reparación (1),

^b. Compuestos utilizados para la evaluación de proteínas de reparación (2) y de MN,

^c. Compuesto utilizado sólo para la evaluación de MN,

(1) Evaluación de los mecanismos de reparación NHEJ y HR,

(2) Evaluación de los mecanismos de reparación NHEJ y alt-NHEJ,

(3) La dosis de 50 μM fue utilizada como control positivo para cada plaguicida.

4.3. Evaluación de los focos de $\gamma\text{-H2AX}$

La identificación de los focos de $\gamma\text{-H2AX}$ se realizó con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i equipado con un filtro de tres bandas (Nikon, Japón). Se utilizó un objetivo 100X (amplificación final 1000X). La presencia de los focos se detectó como puntos o motas fluorescentes de color rosa/rojo (Alexa Fluor® 555) en el núcleo contrateñido de coloración azul (DAPI). La evaluación se realizó en las dos réplicas de cada concentración, una laminilla por réplica. Se valoraron 50 células mononucleares en tres regiones diferentes por laminilla registrando el número de focos en cada una de ellas. En total, 300 células fueron evaluadas por tratamiento. Un núcleo positivo fue aquél que presentó uno o más focos de $\gamma\text{-H2AX}$, de acuerdo con el criterio de Scarpato y cols. (2011). La extensión del daño del DNA fue clasificada en tres categorías: porcentaje de células sin daño (Categoría 1: ausencia de focos $\gamma\text{-H2AX}$), con daño moderado (Categoría 2: <10 focos de $\gamma\text{-H2AX}$) y con daño severo (Categoría 3: >10 focos de $\gamma\text{-H2AX}$ dispersos o agrupados que no pudieron ser contabilizados). Adicionalmente, el daño total fue expresado como porcentaje de núcleos positivos para $\gamma\text{-H2AX}$, independientemente del número de focos presentes en el núcleo (Categorías 2 y 3).

5. Citotoxicidad

Se determinó el efecto citotóxico de los compuestos que indujeron significativamente la formación de DSB. La citotoxicidad fue evaluada a través de un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo The CellTiter 96® AQueous One Solution. El principio de esta solución radica en que el compuesto tetrazolio MTS (presente en el reactivo) es biorreducido por las células vivas en el producto formazán; este proceso es presumiblemente realizado por NADPH o NADH y enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas. Se siguió el protocolo general sugerido por el fabricante. Para ello, células mononucleares fueron aisladas de sangre periférica utilizando el reactivo Histopaque®-1077 (Sigma). Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de SFB y llevadas a una concentración de 5×10^5 células/mL. Por tratamiento, 200 μ L de la suspensión celular fueron colocados en una placa de 96 pozos. Las células fueron tratadas con el compuesto correspondiente durante 1.5 h a 37 °C. Las concentraciones aplicadas fueron las mismas que se utilizaron para la detección de rompimientos de doble cadena. Finalizado el tiempo de exposición, 20 μ L de la solución colorimétrica se adicionó y se dejó en incubación por 3 h a 37 °C. La lectura de la absorbancia se realizó en una longitud de onda de 490 nm utilizando un lector de placas (Synergy H4 Hybrid, BioTek). El porcentaje de supervivencia de cada tratamiento fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$(\text{Abs } 490 \text{ nm del tratamiento} / \text{Abs } 490 \text{ nm del control negativo}) \times 100.$$

La prueba se llevó a cabo en dos ensayos independientes con tres réplicas cada uno.

6. Identificación de proteínas de reparación por Western Blot

6.1. Aislamiento de células mononucleares

Dos series de experimentos independientes se llevaron a cabo con el fin de identificar el mecanismo de reparación que participa en la reparación de los DSB: a) Para NHEJ y HR, se identificaron las proteínas p-Ku80 y Rad51 y, b) para NHEJ y alt-EJ, se buscaron las proteínas p-Ku80 y p-CtIP. Cada ensayo fue acompañado de una réplica. Para ello, las células mononucleares fueron aisladas con Histopaque® - 1077 y lavadas con medio de cultivo RPMI-1640. Se corroboró que la viabilidad de las células fuera superior al 90% utilizando el colorante azul de tripán (Sigma®) y se contabilizaron en una cámara de Neubauer. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB y llevadas a una concentración final de 5×10^5 células/mL.

6.2. Tratamientos

a) Identificación de las proteínas de reparación p-Ku80 y Rad51.

Los plaguicidas y metabolitos, que indujeron significativamente la fosforilación de H2AX, fueron seleccionados para la determinación de la presencia de las proteínas de reparación p-Ku80 y Rad51. Tres concentraciones fueron probadas (Tabla 5). Por tratamiento, 1 mL de la suspensión celular fue tratada con el compuesto correspondiente durante 1.5 h a 37 °C. Dos experimentos independientes se llevaron a cabo para cada compuesto. Cada experimento incluyó una réplica. Como testigos negativo y positivo se utilizó medio de cultivo y etopósido (10 µM), respectivamente.

b) Identificación de las proteínas de reparación p-Ku80 y p-CtIP.

El plaguicida glifosato y el metabolito paraoxón fueron evaluados con las concentraciones de 5 y 25 µM respectivamente (Tabla 5). Se prepararon dos grupos de tratamientos: el primero de ellos se procesó una vez finalizado el tiempo de exposición; el segundo, al concluir un periodo de recuperación post-tratamiento de 15 minutos. Cada grupo fue expuesto al compuesto de interés durante 2 h a 37 °C. Para el tiempo de recuperación, los tratamientos del segundo grupo fueron centrifugados a 250 *g* por 10 minutos para retirar el sobrenadante y lavar las células con medio RPMI fresco. Se repitió el paso anterior sólo que en esta ocasión se resuspendiendo suavemente en 1 mL de RPMI suplementado con 10% de SFB. Las células se mantuvieron a 37 °C durante 15 minutos antes de ser procesadas. Dos experimentos independientes se llevaron a cabo para cada compuesto, cada uno se realizó con su réplica correspondiente. Como testigos negativo y positivo se utilizaron medio de cultivo y etopósido (30 µM), respectivamente.

6.3. Procesamiento y almacenamiento del botón celular

Concluido el tiempo de exposición o de recuperación, las muestras se centrifugaron a 3000*g* x 5 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Se adicionaron 600 µL de azida de sodio (0.5 M) al 10% en PBS y se resuspendió con vórtex. Los botones celulares se obtuvieron al centrifugar a 3000*g* x 5 min a 4 °C y sustraer el sobrenadante. Éstos se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.

6.4. Extracción y cuantificación de proteínas

La extracción de proteínas se llevó a cabo en frío y bajo las siguientes condiciones: 50 µL de una solución de lisis RIPA con inhibidores de fosfatasa y proteasas fueron adicionados a cada botón celular, se incubaron durante 15 minutos y centrifugaron a 13,800*g* por 15 minutos. Las muestras para la identificación de p-Ku80 y Rad51 se sonicaron con un pulso antes de la incubación. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 0.5 mL y se almacenó a -70 °C hasta su evaluación. Para la cuantificación de

proteínas, un volumen de 5 μ L de cada muestra se colocó en una placa de 96 pozos y se utilizó el “kit *DC Protein Assay*” (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. La placa se dejó en agitación y en oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente. La concentración proteínica se determinó con un lector de placas (VersaMax Tunable) a una longitud de onda de 750 nm.

6.5 Western Blot

Para la identificación de las proteínas de interés, 35 μ g de proteínas totales por muestra se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%.

a) Identificación de proteínas de reparación p-Ku80 y Rad51

Las proteínas se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa 0.45 μ m (GE-Healthcare). Las membranas se incubaron con solución de bloqueo (TBS-1% *blotting-grade blocker*) a 4 °C toda la noche. Se hicieron dos lavados de 10 min c/u con TBS-Tween 1% y uno de 5 min con TBS. Las membranas fueron cortadas con base en el peso molecular de las proteínas de interés (Figura 5a) y se incubaron toda la noche en agitación a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente: conejo anti-Rad51 (1:500 en solución de bloqueo) o conejo anti-Ku80 (phospho T714) (1:1000 en solución de bloqueo). El anticuerpo primario contra β -actina, cabra anti-Actina (1-19) (1:1000 en solución de bloqueo), se incubó a 28 °C durante 1h. Las membranas se lavaron con TBS-Tween 1% dos veces, 10 min cada uno y un lavado con TBS por 5 min a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, cabra anti-conejo IgG-HRP (1:3000 en solución de bloqueo) para p-Ku80 y Rad51 y burro anti-cabra IgG-HRP (1:3000 en solución de bloqueo) para actina. La incubación se realizó por una hora a 28 °C. Se repitieron los lavados realizados después del anticuerpo primario. Las membranas se expusieron con un “kit” de luminiscencia (GE-Healthcare) y se revelaron en placas fotográficas (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE-Healthcare). La placas fueron digitalizadas y el análisis óptico se hizo a través del “software Quantity One” 4.1.1 (Bio.Rad).

b) Identificación de proteínas de reparación p-Ku80 y p-CtIP

Las proteínas se transfirieron sobre la membrana de nitrocelulosa y se incubó con solución de bloqueo (TBS-2% *blotting-grade blocker*) a 4 °C toda la noche. Se hicieron tres lavados de 10 min c/u con TBS-Tween 1% y uno de 10 min con TBS. Las membranas fueron cortadas con base en el peso molecular de las proteínas de interés (Figura 5b) y se incubaron toda la noche en agitación a 4 °C con el anticuerpo primario conejo anti-phospho-CtIP (Ser327) (1:1000 en solución de bloqueo). El anticuerpo primario conejo anti-beta Actina (1:1000 en solución de bloqueo) se incubó a temperatura ambiente durante 1h. Las membranas se lavaron con TBS-Tween 1% tres veces, 10 min cada vez, y un lavado con TBS por 10 min a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo IgG poli-HRP (1:3000 en solución de bloqueo). La incubación se realizó por una hora a temperatura ambiente.

Se repitieron los lavados realizados después de la incubación con el anticuerpo primario. Las membranas se expusieron con un “kit” de luminiscencia (GE-Healthcare) y se revelaron en un fotodocumentador de geles (Gel Logic 1500 Imaging System) y adquiridas con el programa Kodak MI Ver 4.5.0. El análisis óptico se realizó a través del “software Image Studio Lite” versión 5.2.

Después de identificar p-CtIP, las membranas fueron lavadas dos veces con amortiguador de *stripping*, dos veces con PBS, dos con TBS-Tween 1% y una vez con TBS. Cada lavado fue de 10 min. Posteriormente, las membranas se dejaron incubando con solución de bloqueo a 4 °C toda la noche. Se lavaron tres veces con TBS-Tween 1% y una vez con TBS x 10 min cada lavado. Seguido a ello, se dejó incubando toda la noche con el anticuerpo primario conejo anti-Phospho-Ku80 (Thr714) (1:1000 en solución de bloqueo) y se repitió todo el procedimiento realizado anteriormente para la identificación de p-CtIP.

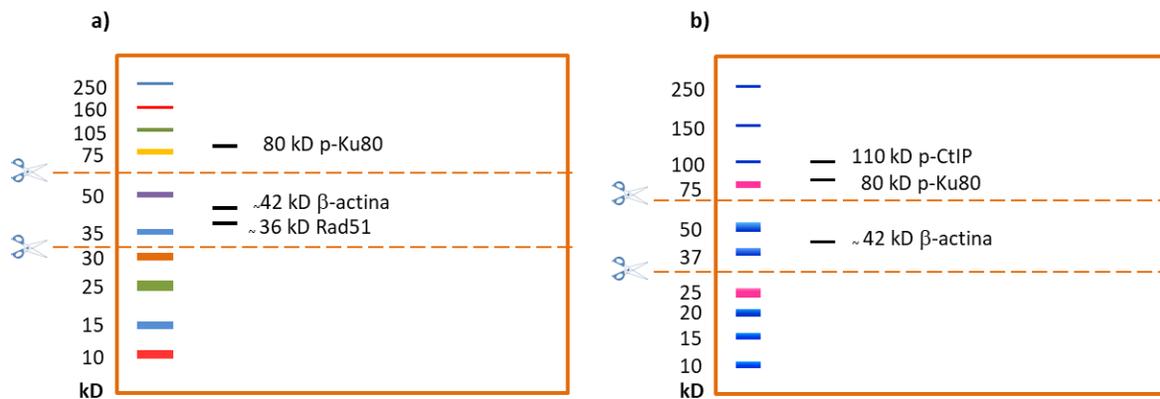


Figura 5. Representación esquemática de las membranas utilizadas para la identificación de las proteínas de interés. a) Identificación de las proteínas de reparación p-Ku80 y Rad51: la membrana se cortó en tres partes: en el segmento superior se identificó la proteína p-Ku80 y, en el intermedio, las proteínas Rad51 y β-actina. B) Identificación de las proteínas de reparación p-Ku80 y p-CtIP: la membrana se dividió en tres: en el segmento superior se identificaron las proteínas p-CtIP y p-Ku80 y, en el intermedio, β-actina.

6.6 Normalización del análisis óptico

Para cada compuesto, el análisis óptico se realizó a través de la densidad óptica (D.O.) de la proteína de interés (Ku-80 fosforilada, Rad51 y CtIP fosforilada), así como del control de carga. Una vez que se obtuvo la D.O. de cada una de las concentraciones evaluadas, se llevó a cabo una doble normalización para cada una de ellas y que a continuación se describe:

1era normalización. Los valores de D.O. de cada concentración se normalizaron con respecto a su control de carga β -actina (D.O. β -actina) utilizando la siguiente fórmula:

$$1\text{era normalización (Norm. 1 } x) = \text{D.O. Proteína } x / \text{D.O. } \beta\text{-actina } x$$

donde x es la concentración correspondiente.

2da normalización: Los valores obtenidos en el paso anterior, se normalizaron nuevamente con base en el promedio de la primera normalización de los testigos negativos (Prom. Norm. 1 C.N.) y de acuerdo con la fórmula:

$$2\text{da normalización (Norm. 2 } x) = (\text{Norm. 1 } x / \text{Prom. Norm. 1 C.N.}) \times 100$$

donde x es la concentración correspondiente.

Los resultados fueron adquiridos en Excel para el análisis estadístico. Los datos se reportan en porcentaje del incremento de la proteína de interés con respecto al tratamiento correspondiente (% vs tratamiento).

7. Evaluación del papel de topoII en la inducción de DSB a través del ensayo de MN con bloqueo de citocinesis (CBMN)

Para determinar si el glifosato y el paraoxón inducen los DSB, a través de su interacción con topoII, se siguió el razonamiento que a continuación se presenta: la reparación errónea de los rompimientos de doble cadena conlleva a un daño secundario al afectar la estructura de los cromosomas (fragmentos, cromosomas dicéntricos, entre otros). Este daño puede ser detectado con pruebas citogenéticas como el ensayo de aberraciones cromosómicas o de MN. Los venenos de topoII, al ser inductores de DSB, tienen la capacidad de promover la formación de dicho daño secundario. Cuando se administra un inhibidor catalítico de topoII, previo al tratamiento con el veneno, se impide la generación de DSB y por ende, la aparición del daño secundario (Mosesso y cols. 2015). Con base en lo anterior, si el glifosato o el paraoxón tuvieran esta cualidad, se observaría este efecto. Para identificar el daño secundario producto de los DSB, se utilizó la prueba de MN.

El plaguicida glifosato y el metabolito paraoxón fueron evaluados con esta prueba. Se seleccionó la concentración más alta que haya inducido significativamente la fosforilación de p-Ku80. En el caso del glifosato se empleó la concentración de 5 μM , mientras que para el paraoxón fue la de 25 μM . Como

testigo positivo se utilizó el veneno conocido de topoII, etopósido, en una concentración de 30 μM ; como testigo negativo, medio de cultivo. En tubos de 15 mL, se resuspendieron 250 μL de sangre entera en medio de cultivo RPMI llevando a un volumen final de 5 mL. Todos los tratamientos se llevaron a cabo en G0 (antes de la estimulación de los linfocitos) y en dos experimentos independientes, cada uno con una réplica.

7.1. Tratamientos

Los diferentes tratamientos se llevaron a cabo con base en lo descrito por Mosesso y cols (2015). Se usaron las concentraciones descritas en el Tabla 5 y bajo las siguientes condiciones:

a. Sin inhibición del sitio catalítico de topoII

Los cultivos de sangre entera fueron tratados con el glifosato, el paraoxón o el etopósido (control positivo) durante 2 h a 37 °C. Los cultivos se lavaron dos veces con PBS estéril y se incubaron a 37 °C por 72 horas en medio de cultivo RPMI suplementado (aminoácidos no esenciales 1X, L-glutamina 1X, 20% de SFB). Para estimular la proliferación de los linfocitos se adicionaron 0.2 mL de fitohematoglutina. La citocalasina-B (30 μg) se agregó 44 h después de iniciados los cultivos de sangre entera.

b. Con inhibición del sitio catalítico de topoII

Los cultivos fueron tratados con el inhibidor catalítico de topoII, ICRF-187, en concentración final de 50 μM , e incubados a 37 °C. Una hora después, se añadió el compuesto de interés (glifosato, paraoxón o etopósido), dejando 2 h más de incubación. Finalizado el tiempo de exposición, los cultivos se lavaron y prepararon bajo las mismas condiciones que en el inciso *a*. Para descartar la influencia del inhibidor sobre la frecuencia del daño genotóxico evaluado, se incluyó un cultivo incubado sólo con el ICRF-187 durante 3 h a 37 °C.

7.2. Fijación de los linfocitos

Después de 72 h de iniciados los cultivos, los tubos fueron centrifugados a 250g por 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante dejando 1 mL y se resuspendió el botón celular con mucho cuidado. En vórtex, se adicionaron 10 mL de solución de Carnoy (3:1 metanol - ácido acético), homogeneizando muy bien para evitar la formación de agregados celulares. El botón celular se lavó bajo las siguientes condiciones: se centrifugó a 250g por 10 min, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 200 μL (por arriba del botón) y se resuspendió en vórtex adicionando 10 mL de solución de Carnoy. Estos pasos se repitieron hasta obtener un botón celular blanco. Las muestras se almacenaron en el fijador a 4 °C hasta su evaluación.

7.3. Preparación, tinción y evaluación de laminillas

Las muestras se retiraron del refrigerador y se dejaron templar. Se preparó una laminilla por cultivo celular. Las células se hidrataron en una serie de alcohol etílico al 100%, 80%, 70% y 50% (v/v en agua desionizada), seguido de agua desionizada, 2 min en cada uno. Las laminillas se tiñeron en una solución de Giemsa (Sigma-Aldrich) al 4% por 1-2 h a temperatura ambiente con el fin de obtener una buena tinción del citoplasma. Finalizado el tiempo de tinción, se enjuagaron con agua corriente y secaron con aire. Una vez transcurridas 24 horas, se añadieron tres gotas de medio de montaje Entellan (Merck) y se colocó suavemente sobre ellas un cubreobjetos corroborando que no se hubiesen formado burbujas de aire. Se dejó secar por dos días antes de la evaluación al microscopio. Para cada tratamiento se obtuvo el índice de nucleación (IN), el cual se obtuvo de la siguiente manera: 500 células (N) fueron contadas y clasificadas en mono- (N_1), bi- (N_2), tri- (N_3) y polinucleadas (≥ 4 núcleos, N_4). El IN se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$IN = (N_1 + 2N_2 + 3N_3 + 4N_4) / N$$

Paralelo a ello, se contabilizaron los eventos de apoptosis y necrosis. Para la evaluación del daño genotóxico, 2000 células binucleadas fueron evaluadas. Los eventos identificados fueron micronúcleos (MN), gemaciones (GN), puentes nucleoplasmáticos (PNP), daño combinado (dos o más de los eventos antes mencionados, DC), así como la presencia de fragmentos nucleares o microdeleciones en el citoplasma de la célula. La frecuencia para cada tipo de daño (X) se obtuvo a través de la fórmula que a continuación se presenta:

$$\text{Frecuencia de } X = (\text{No. de } X \text{ encontrados} / 2000) \times 1000$$

La evaluación se hizo en todos los tratamientos, tanto con el inhibidor catalítico ICRF-187 como sin él.

En la identificación de microfragmentos de DNA se utilizó también la tinción de Feulgen. Mediante un tratamiento previo con HCl, se produce una hidrólisis ácida que separa los grupos púricos del DNA, esto abre a su vez los anillos de desoxirribosa permitiendo la formación de aldehídos en el núcleo de la célula, grupos químicos que son teñidos de color rosa. Para ello, se prepararon laminillas por goteo y se dejaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Las laminillas se sumergieron en metanol absoluto por 10 minutos, dejando secar nuevamente a temperatura ambiente. Éstas se almacenaron a 4 °C toda la noche antes de su tinción. Posteriormente, las laminillas se trataron con HCl 5M por 30 min y se enjuagaron con agua antes de sumergirlas en el reactivo de Schiff (Sigma-Aldrich) durante 30 min. El

citoplasma fue contrateñido con el reactivo Light Green (Sigma-Aldrich) durante 30 segundos dando al final una coloración verde. Las laminillas se enjuagaron y se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche; posteriormente se montaron con medio de montaje Entellan colocando con cuidado un cubreobjetos.

8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con los programas GraphPad Prism 6 y GraphPad QuickCalcs. Para los DSB's y las proteínas de reparación del experimento 1, p-Ku80 y Rad51, se determinó el efecto de los tratamientos en comparación con el testigo negativo a través de la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunn. El efecto citotóxico de los tratamientos con los plaguicidas y metabolitos fue analizado con regresiones lineares. La prueba de U de Mann-Whitney se aplicó para la comparación entre los testigos negativos y los positivos (etopósido o cloro al 3.5%), así como para la identificación de las proteínas de reparación p-Ku80 y p-CtIP. El análisis de las frecuencias de los distintos tipos de daño identificadas a través del ensayo de MN se llevó a cabo mediante la prueba exacta de Fisher. En todas las pruebas estadísticas se estableció una significancia con valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Identificación de DSB a través de la detección de focos de γ -H2AX

De los plaguicidas probados, el glifosato (2 y 10 μ M), el pentaclorofenol (0.15 μ M) y la permetrina (8 y 200 μ M), promovieron un incremento significativo en el porcentaje de células con rompimientos de doble cadena del DNA ($p < 0.05$), mientras que el endosulfán y el propoxur no mostraron un efecto sobre este parámetro. En el caso de los metabolitos evaluados, el endosulfán lactona (0.4 y 2 μ M) y el paraoxón (1 y 25 μ M), indujeron un aumento significativo en el número de células con DSB; el AMPA no generó este tipo de daño en ninguna de las concentraciones probadas. El pentaclorofenol mostró un efecto de hormesis en los tratamientos con este compuesto se observó un mayor número de células con focos de γ -H2AX en las concentraciones más bajas (0.03 y 0.15 μ M), mientras que en las más altas (0.75 y 3.75 μ M), este evento disminuyó. Opuesto a lo anterior, se observó que los cultivos tratados con propoxur tuvieron una disminución en el porcentaje de células con focos de γ -H2AX en las concentraciones más bajas (240 y 480 μ M) en comparación con el testigo negativo, seguido de un incremento en las concentraciones más altas (960 y 1440 μ M), pero sin que el porcentaje fuese mayor al del testigo negativo (Tabla 6).

Con base en la clasificación del número de focos de γ -H2AX presentes en cada núcleo evaluado (Figura 6), se encontró que la mayoría de las células con daño se hallaban dentro de la categoría 2 ($p < 0.05$); es decir, que los compuestos que promovieron un aumento significativo en el número de células con DSB, causaban de 1 a 10 rupturas en la doble hélice del DNA en cada célula afectada (Tabla 7). El glifosato (2 y 10 μ M) y el paraoxón (25 μ M), además mostraron también un incremento significativo de células que tenían más de 10 focos ($p < 0.05$) (Tabla 7); daño que estuvo relacionado con la dosis con excepción de la concentración más alta de glifosato (50 μ M), en donde se encontró que ésta era citotóxica.

Tabla 6. Porcentaje de células con DSB (focos de γ -H2AX) por exposición a plaguicidas o a metabolitos de plaguicidas.

Plaguicida	[μ M]	Mediana de % de células con daño total (mín-máx)	p* (K-W)	Metabolito	[μ M]	Mediana de % de células con daño total (mín-máx)	p* (K-W)
Glifosato	0	51.50 (47.00-56.00)	0.0054 (14.68)	AMPA	0	67.00 (52.00-82.00)	0.1653 (6.492)
	0.4	69.00 (64.00-74.00)			40	65.00 (58.00-78.00)	
	2	74.50 ^a (66.00-80.00)			200	60.00 (32.00-80.00)	
	10	75.00 ^a (48.00-81.00)			1000	68.00 (58.00-74.00)	
	50	67.50 (58.0-70.0)			5000	87.00 (66.00-94.00)	
Etopósido**	50	96.50 (94.00-98.00)		Etopósido**	50	98.00 (96.00-100.00)	
PCP	0	21.00 (12.00-40.00)	0.0259 (11.06)	Endosulfán lactona	0	47.00 (36.00-50.00)	0.0001 (23.30)
	0.03	52.00 (34.00-68.00)			0.08	66.00 (62.00-78.00)	
	0.15	60.00 ^a (42.00-84.00)			0.4	74.00 ^a (66.00-80.00)	
	0.75	30.00 (16.00-70.00)			2	77.00 ^a (72.00-80.00)	
	3.75	31.00 (8.00-54.00)			10	53.00 (42.00-66.00)	
Etopósido**	50	91.00 (88.00-100.0)		Etopósido**	50	100.00 (98.0-100.0)	
Permetrina	0	47.00 (36.00-50.00)	0.0092 (13.46)	Paraoxón	0	21.00 (12.00-40.00)	0.0054 (14.68)
	8	73.00 ^a (50.00-86.00)			0.2	41.00 (26.00-64.00)	
	40	64.00 (56.00-72.00)			1	56.00 ^a (44.00-72.00)	
	200	76.00 ^a (64.00-90.00)			5	48.00 (40.00-56.00)	
	1000	64.00 (40.00-86.00)			25	60.00 ^a (32.00-74.00)	
Etopósido**	50	100.0 (98.00-100.0)		Etopósido**	50	91.00 (88.00-100.0)	
Propoxur	0	55.00 (46.00-62.00)	0.0008 ^b (18.89)				
	240	36.00 (28.00-58.00)					
	480	20.00 ^c (6.00-40.00)					
	960	34.00 (24.00-42.00)					
	1440	53.00 (48.00-66.00)					
Etopósido**	50	87.00 (84.00-90.00)					
Endosulfán	0	50.82 (42.40-55.35)	0.443 (2.95)				
	0.02	58.41 (58.24-59.12)					
	0.2	45.49 (38.6-69.66)					
	1	55.33 (46.03-58.80)					
Etopósido**	50	75.80 (69.75-90.78)					

En *cursiva*: valores estadísticamente significativos de acuerdo con el estadístico aplicado.

* Prueba de Kruskal-Wallis (K-W) considerando el daño total en las células, g.l. 4 en todas las pruebas. Entre paréntesis se encuentra el valor dado por la prueba. En **negritas** se presentan los valores significativos para esta prueba, $p < 0.05$.

a – Concentración significativa comparando con el testigo negativo, prueba post-hoc estadístico de Dunn, $p < 0.05$.

** El efecto del etopósido se analizó a través de la prueba de Mann-Whitney, $p < 0.05$.

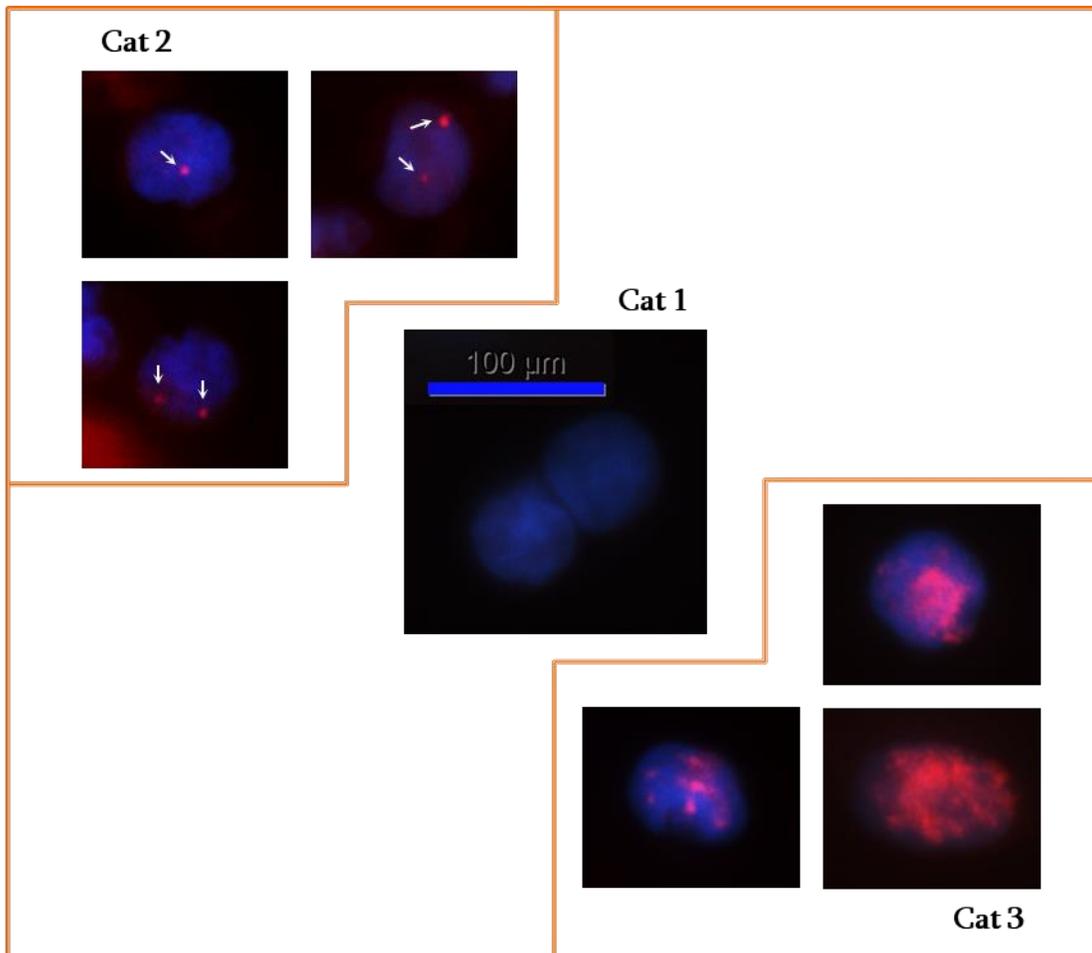


Figura 6. Clasificación del daño detectado en las células mononucleares evaluadas con base en el número de DSB presentes en el núcleo. Cat: Categoría. Cat 1 – sin daño (ausencia de focos de γ -H2AX); Cat 2 – daño moderado (con menos de 10 focos de γ -H2AX, focos señalados con una flecha); Cat 3 – con daño severo (más de 10 focos de γ -H2AX y/o focos agrupados que no pueden ser contabilizados). Núcleo: tinción con DAPI (azul). Focos de γ -H2AX: tinción con el fluorocromo Alexa Fluor® anti-ratón (rojo).

Tabla 7. Porcentaje de células con DSB (focos de γ -H2AX) con base en las categorías de daño establecidas.

Plaguicida	[μ M]	Mediana de % de células (mín-máx)					Mediana de % de células (mín-máx)								
		Sin focos	p* (K-W)	1 a 10 focos	p* (K-W)	Más de 10 focos	p* (K-W)	Metabolito	[μ M]	Sin focos	p* (K-W)	1 a 10 focos	p* (K-W)	Más de 10 focos	p* (K-W)
Glifosato	0	48.5 (44-53)	0.0054	51.5 (46-56)	0.0105	0.0 (0-1)	0.0006	Endosulfán-lactona	0	53.0 (50-64)	0.0002	45.0 (34-48)	0.0001	2.0 (2-2)	0.2165
	0.4	31.0 (26-36)	(14.68)	67.5 ^b (62-71)	(13.16)	2.0 (0-3)	(19.57)		0.08	34.0 ^a (22-38)	(22.01)	61.0 (54-76)	(23.1)	4.0 (2-14)	(5.776)
	2	26.0 ^c (20-34)		64.0 ^b (59-70)		5.5 ^b (3-21)			0.4	26.0 ^a (20-34)		70.00 ^b (64-76)		3.0 (0-6)	
Etopósido**	10	25.0 ^c (19-52)		66.0 (44-69)		9.5 ^b (4-13)		2	23.0 ^a (20-28)		73.00 ^b (70-80)		4.0 (0-6)		
	50	32.5 (30-42)		64.5 (57-69)		1.0 (1-10)		10	47.0 (34-58)		52.00 (40-62)		1.0 (0-4)		
	50	3.5 ^c (2-6)		5.5 ^c (3-15)		91.5 ^d (81-95)		Etopósido**	50	0.0 ^c (0-2)		8.00 ^c (2-10)		92.0 ^d (90-98)	
PCP	0	79.0 (60-88)	0.0259	20.0 (12-36)	0.0386	0.0 (0-4)	0.2480	Paraoxón	0	79.0 (60-88)	0.0054	20.0 (12-36)	0.0228	0.0 (0-4)	0.0365
	0.03	48 (32-66)	(11.06)	50.0 (34-64)	(10.11)	3.0 (0-4)	(5.41)		0.2	59.0 (36-74)	(14.68)	39.0 (24-60)	(11.36)	2.0 (0-4)	(10.24)
	0.15	40.0 ^a (16-58)		55.0 ^b (34-82)		4.0 (0-8)			1	44.0 ^a (28-56)		50.0 ^b (40-70)		4.0 (0-10)	
	0.75	70.0 (30-84)		29.0 (12-62)		3.0 (0-8)			5	52.0 (44-60)		41.0 (40-54)		4.0 (0-10)	
Etopósido**	3.75	69.0 (46-92)		29.0 (6-52)		2.0 (0-6)		25	40.0 ^a (26-68)		39.0 (20-72)		11.0 ^b (2-34)		
	50	9.0 ^c (0-12)		4.0 ^c (2-8)		88.0 ^d (84-98)		Etopósido**	50	9.0 ^c (0-12)		4.0 ^c (2-8)		88.0 ^d (84-98)	
	Permetrina	0	53.0 (50-64)	0.0092	45.0 (34-48)	0.0089	2.0 (2-2)	0.8149							
Etopósido**	8	27.0 ^c (14-50)	(13.46)	64.0 ^b (48-84)	(13.55)	2.0 (2-16)	(1.57)								
	40	36.0 (28-44)		59.0 (54-70)		3.0 (0-6)									
	200	24.0 ^c (10-36)		71.0 ^b (62-80)		2 (0-14)									
Etopósido**	1000	36.0 (14-60)		61.0 (40-80)		5.0 (0-6)									
	50	0.0 ^c (0-2)		8.0 ^c (2-10)		92.0 ^d (90-98)									

En *cursiva y negritas*: valores estadísticamente significativos de acuerdo al estadístico aplicado considerando una p<0.05. * Prueba de Kruskal-Wallis (K-W), 4 g.l. en todas las pruebas. ** El efecto del etopósido se analizó con la prueba de Mann-Whitney. a – Concentraciones que presentaron menor número de células sin daño comparado con el testigo negativo, prueba post-hoc estadístico de Dunn. b – Concentraciones que presentaron mayor número de células con daño (menos de 10 focos o más de 10 focos) comparado con el testigo negativo, prueba post-hoc estadístico de Dunn. c – En los tratamientos con etopósido, el número de células sin focos de γ -H2AX o con menos de 10 focos fue significativamente menor comparación con el testigo negativo. d – En los tratamientos con etopósido, el número de células con más de 10 focos de γ -H2AX fue significativamente mayor en comparación con el testigo negativo. PCP: Pentaclorofenol. Sólo los compuestos que presentaron un aumento significativo (p<0.05) para daño total son presentados en esta tabla.

2. Evaluación de la citotoxicidad a través del ensayo con MTS

Las cuatro concentraciones, de los cinco compuestos que indujeron significativamente DSB, fueron evaluadas para determinar su efecto citotóxico a través de una regresión lineal. Se encontró que sólo el glifosato y el endosulfán lactona redujeron la viabilidad de las células de forma dosis-dependiente (Tabla 8), yendo de un 100% de viabilidad a un 70% con el glifosato, y de un 100% a un 65% con el endosulfán lactona. El pentaclorofenol, aún y cuando presentó un rango de sobrevivencia del 100 al 78%, este efecto sólo se presentó en la concentración de 0.75 μM , en las otras tres concentraciones probadas (0.03, 0.15 y 3.75 μM), fue superior al 80%. La permetrina y el paraoxón no mostraron un efecto citotóxico significativo en las concentraciones usadas.

Tabla 8. Efecto citotóxico de los plaguicidas y metabolitos que indujeron DSB.					
	Compuesto	Rango de sobrevivencia (%)	R ²	F	P*
Plaguicida	Glifosato	100 a 70	0.252	9.431	0.0047
	Pentaclorofenol	100 a 78	0.007	0.092	0.7669
	Permetrina	100 a 100	0.014	0.141	0.7150
Metabolito	Endosulfán lactona	100 a 65	0.679	25.35	0.0003
	Paraoxón	100 a 90	0.147	2.246	0.1579
Control Positivo	Etopósido	100 a 96	5.388e – 006	7.004e – 005	0.9934

* Regresión lineal, $p < 0.05$
 En **negritas**, compuestos que presentaron un efecto citotóxico significativo.

3. Identificación de la participación de las maquinarias de reparación HR y NHEJ a través de la cuantificación de las proteínas Rad51 y p-Ku80

Los compuestos que dieron positivo significativamente para la inducción de DSB, fueron seleccionados para los siguientes ensayos. El objetivo fue determinar qué mecanismo de reparación del DNA por recombinación fue inducido como resultado de los eventos de DSB. El pentaclorofenol, aún y cuando sólo indujo rompimientos de doble cadena en las dosis más bajas probadas, también fue incluido en estos análisis. Las concentraciones de cada uno de los plaguicidas y metabolitos se ajustaron tomando en consideración la dosis más alta que haya inducido el mayor porcentaje de células con DSB y el menor efecto citotóxico.

La detección de las proteínas p-Ku80 y Rad51, a través de la técnica de Western Blot, fueron utilizadas para evaluar los mecanismos de reparación NHEJ y HR, respectivamente (Tabla 9). Se encontró que los compuestos endosulfán lactona, permetrina y pentaclorofenol no indujeron un incremento significativo de p-Ku80 ni de Rad51 (Tabla 9, Figuras 7 y 8-A). Por otra parte, se encontró que el glifosato indujo la fosforilación de Ku80 de forma dosis-dependiente y, la concentración más alta (5 μM), presentó un incremento estadísticamente significativo de esta proteína fosforilada, en comparación con el testigo negativo ($p < 0.05$); en contraste, la cantidad proteica de Rad51 no fue afectada (Figura 8-B). En el caso del paraoxón, se encontró que las células tratadas con este compuesto presentaron una mayor cantidad de p-Ku80 en las tres concentraciones probadas (1, 5 y 25 μM) en comparación con el testigo negativo; esta respuesta fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), pero no dosis-dependiente; además, al igual que los otros plaguicidas, el paraoxón no influyó en la inducción de la proteína Rad51 (Figura 9). Los anteriores resultados fueron publicados en Suárez y cols. 2017 (Anexo 1).

Tabla 9. Detección de las proteínas p-Ku80 y Rad51 en células mononucleares tratadas con los plaguicidas y metabolitos que indujeron DSB¹.

Plaguicida [µM]	p-Ku80			Rad51			p-Ku80			Rad51		
	Mediana (Mín-Máx)	p* (K-W)	Mediana (Mín-Máx)	Mediana (Mín-Máx)	p* (K-W)	Mediana (Mín-Máx)	Mediana (Mín-Máx)	p* (K-W)	Mediana (Mín-Máx)	p* (K-W)	Mediana (Mín-Máx)	
Glifosato	0	104.05 (55.27-136.64)	0.0297	104.17 (39.49-152.16)	0.4955	89.23 (43.57-167.19)	77.64 (26.33-196.03)	0.5386	89.23 (43.57-167.19)	0.5386	77.64 (26.33-196.03)	
	1.25	206.20 (124.57-263.08)	(7.99)	122.89 (107.47-184.29)	(2.56)	142.86 (88.89-248.21)	156.49 (73.00-196.03)	(2.39)	142.86 (88.89-248.21)	(2.39)	156.49 (73.00-196.03)	
	2.5	190.91 (154.93-372.62)		158.29 (78.36-168.36)		148.26 (125.26-240.84)	157.58 (131.00-257.95)		148.26 (125.26-240.84)		157.58 (131.00-257.95)	
	5	205.27 ^a (159.68-445.38)		113.41 (44.73-158.32)		212.11 (146.81-224.40)	201.41 (133.41-217.24)		212.11 (146.81-224.40)		201.41 (133.41-217.24)	
Etopósido**	30	198.21 (175.31-284.94)	0.0286	84.26 (63.89-119.35)	0.6571	171.66 (158.96-225.00)	152.65 (144.87-223.25)	0.2000	171.66 (158.96-225.00)	0.2000	152.65 (144.87-223.25)	
PCP	0	95.91 (75.43-128.66)	0.2087	99.37 (73.91-126.7)	0.7852	102.55 (70.64-124.25)	96.74 (49.92-156.59)	0.0077	102.55 (70.64-124.25)	0.0077	96.74 (49.92-156.59)	
	0.02	149.80 (79.13-272.62)	(4.74)	126.3 (105.3-183.9)	(1.26)	196.43 ^a (131.21-222.50)	171.36 (99.31-272.97)	(9.55)	196.43 ^a (131.21-222.50)	(9.55)	171.36 (99.31-272.97)	
	0.1	194.25 (111.80-244.51)		137.2 (98.38-202.0)		159.13 ^a (132.78-170.26)	113.04 (111.51-126.02)		159.13 ^a (132.78-170.26)		113.04 (111.51-126.02)	
	0.5	265.54 (142.39-314.75)		120.2 (63.04-210.7)		157.79 ^a (141.65-161.09)	147.67 (106.97)		157.79 ^a (141.65-161.09)		147.67 (106.97)	
Etopósido**	30	239.23 (215.60-263.99)	0.1000	74.77 (53.21-114.4)	0.7000	167.30 (60.84-258.4)	98.03 (66.30-175.78)	0.1044	167.30 (60.84-258.4)	0.1044	98.03 (66.30-175.78)	
Permetrina	0	100.64 (49.14-150.22)	0.9586	103.94 (40.39-155.67)	0.1169	103.94 (40.39-155.67)	103.94 (40.39-155.67)		103.94 (40.39-155.67)		103.94 (40.39-155.67)	
	8	106.94 (53.95-165.37)	(0.436)	134.32 (129.64-197.42)	(5.77)	134.32 (129.64-197.42)	134.32 (129.64-197.42)		134.32 (129.64-197.42)		134.32 (129.64-197.42)	
	40	91.88 (49.47-128.77)		194.02 (163.28-200.09)		194.02 (163.28-200.09)	194.02 (163.28-200.09)		194.02 (163.28-200.09)		194.02 (163.28-200.09)	
	200	128.33 (45.91-173.62)		200.41 (142.13-204.75)		200.41 (142.13-204.75)	200.41 (142.13-204.75)		200.41 (142.13-204.75)		200.41 (142.13-204.75)	
Etopósido**	30	178.55 (137.66-193.60)	0.2000	140.75 (62.99-182.81)	0.7000	140.75 (62.99-182.81)	140.75 (62.99-182.81)		140.75 (62.99-182.81)		140.75 (62.99-182.81)	

1.- Para mejor claridad, se realizó una doble normalización vs. actina y tratamiento, los datos se reportan en porcentaje del incremento de la proteína de interés con respecto al tratamiento correspondiente.

En *cursiva*: valores estadísticamente significativos de acuerdo con el estadístico aplicado considerando una p<0.05.

* Prueba de Kruskal-Wallis (K-W), 3 g.l. en todas las pruebas. En **negritas** se señalan los compuestos que indujeron la fosforilación de Ku80 de forma significativa.

^a dosis significativa en comparación con el testigo negativo, prueba post-hoc estadístico de Dunn.

** El efecto del etopósido se analizó con la prueba de Mann-Whitney.

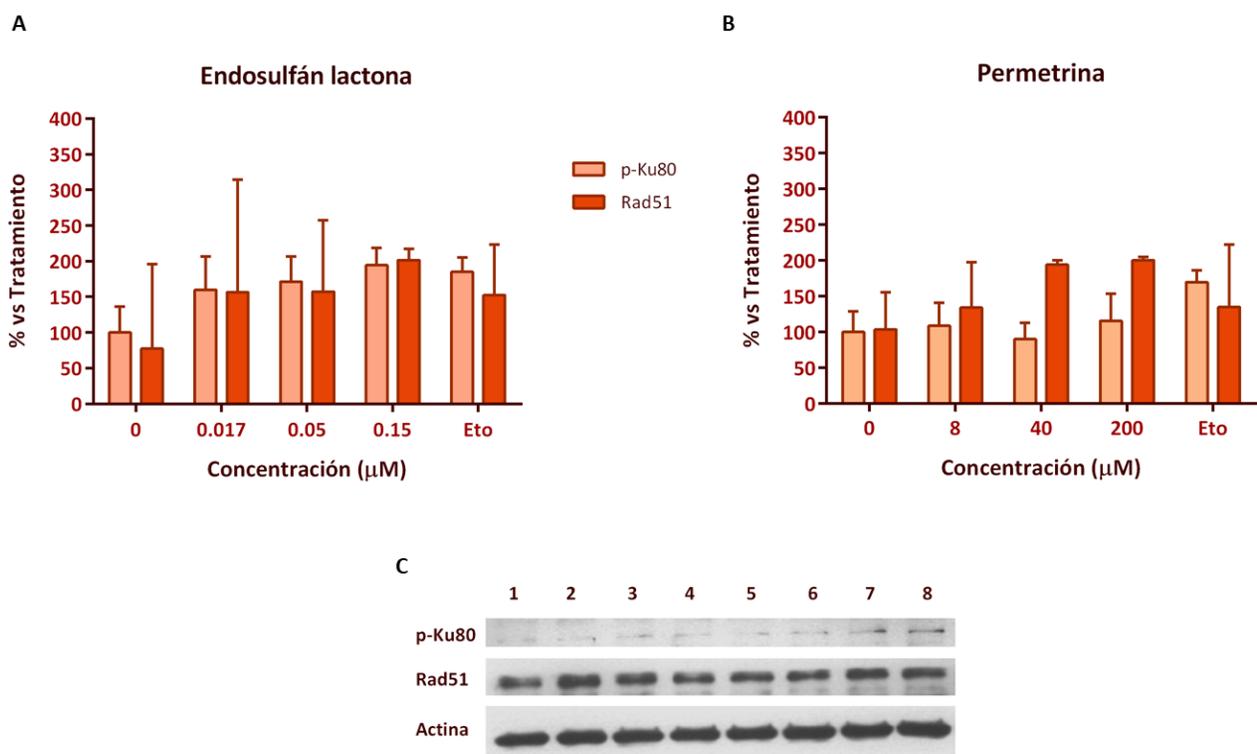


Figura 7. Evaluación del efecto del endosulfán lactona y la permetrina sobre la fosforilación de Ku80 (p-Ku80) y/o la inducción de Rad51 en células mononucleares aisladas de sangre periférica (5×10^5 células/mL) y que fueron tratadas en G0 durante 1.5 horas (dos ensayos independientes con al menos una réplica). No se encontró un efecto del endosulfán lactona (A) ni de la permetrina (B) sobre las proteínas p-Ku80 o Rad51. C. La parte inferior muestra una membrana representativa: línea 1 - testigo negativo; líneas 2-4 - endosulfán lactona (0.017, 0.05, 0.15 μM); líneas 5-7 - permetrina (8, 40 y 200 μM, ver la gráfica); línea 8 - testigo positivo, etopósido (10 μM). TN - testigo negativo, Eto - etopósido. Para cada compuesto se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis, la identificación de las concentraciones significativas ($p < 0.05$) se realizó a través de la prueba post hoc, comparación múltiple de Dunn. Para el testigo positivo se aplicó el estadístico de Mann-Whitney, con una $p < 0.05$. Para mejor claridad, se realizó una doble normalización vs. actina y tratamiento, los valores se reportan en el porcentaje del incremento de la proteína de interés con respecto al tratamiento correspondiente (% vs Tratamiento). En las gráficas se representa la mediana con su rango.

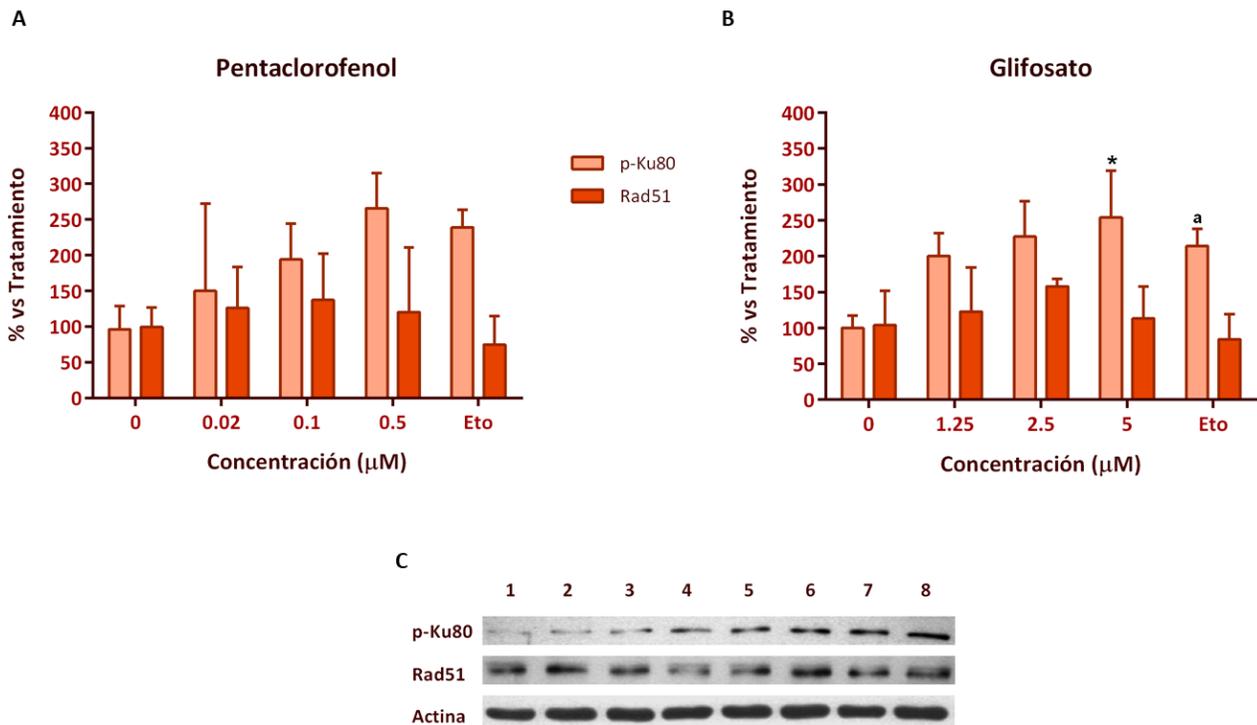


Figura 8. Evaluación del efecto del pentaclorofenol y del glifosato sobre la fosforilación de Ku80 (p-Ku80) y/o la inducción de Rad51 en células mononucleares aisladas de sangre periférica (5×10^5 células/mL) y que fueron tratadas en G0 durante 1.5 horas (dos ensayos independientes con al menos una réplica) **A.** El pentaclorofenol no generó ningún efecto sobre las proteínas p-Ku80 o Rad51. **B.** La concentración de 5 μM de glifosato (*) indujo un incremento de la proteína p-Ku80 de forma significativa en comparación con el testigo negativo. El testigo positivo también presentó un aumento significativo en p-Ku80 (a) **C.** La parte inferior muestra una membrana representativa: línea 1 - testigo negativo; líneas 2-4 - pentaclorofenol (0.2, 1 y 5 μM); líneas 5-7 - glifosato (1.25, 2.5 y 5 μM , ver la gráfica); línea 8 – testigo positivo, etopósido (10 μM). TN - testigo negativo, Eto - etopósido. Para cada compuesto se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis, la identificación de las concentraciones significativas ($p < 0.05$) se realizó a través de la prueba post hoc, comparación múltiple de Dunn. Para el control positivo se aplicó el estadístico de Mann-Whitney, con una $p < 0.05$. Para mejor claridad, se realizó una doble normalización vs. actina y tratamiento, los valores se reportan en el porcentaje del incremento de la proteína de interés con respecto al tratamiento correspondiente (% vs Tratamiento). En las gráficas se representa la mediana con su rango.

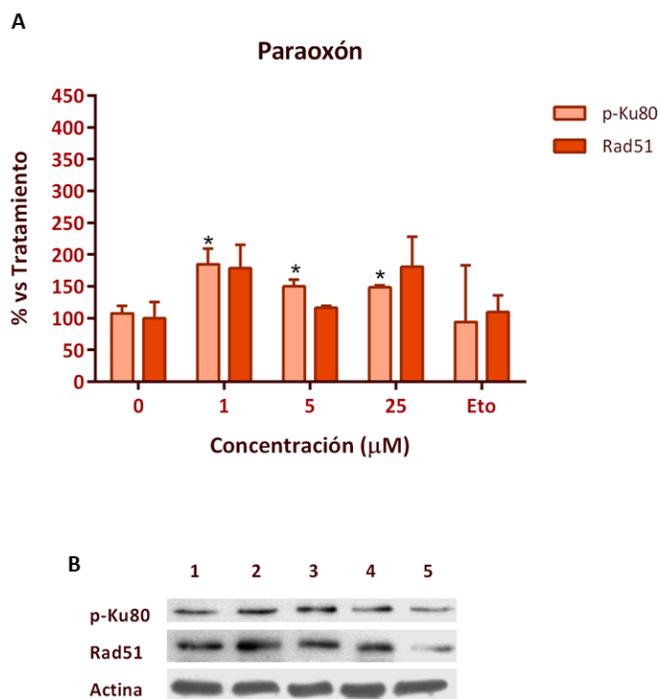


Figura 9. Evaluación del efecto del paraoxón sobre la fosforilación de Ku80 (p-Ku80) y/o la inducción de Rad51 en células mononucleares aisladas de sangre periférica (5×10^5 células/mL) y que fueron tratadas en G0 durante 1.5 horas (dos ensayos independientes con al menos una réplica). **A.** Se observó un incremento significativo (*) de la proteína p-Ku80 en las tres concentraciones probadas de paraoxón; sin embargo, Rad51 no mostró una variación significativa en los tratamientos probados, como se muestra en la gráfica. **B.** La parte inferior muestra una membrana representativa: línea 1 - testigo negativo; líneas 2-4 - paraoxón (1, 5 y 25 µM); línea 5 – testigo positivo, etopósido (10 µM). TN- testigo negativo, Eto - etopósido. Se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis, la identificación de las concentraciones significativas ($p < 0.05$) se realizó a través de la prueba post hoc, comparación múltiple de Dunn. Para el testigo positivo se aplicó el estadístico de Mann-Whitney, con una $p < 0.05$. Para mejor claridad, se realizó una doble normalización vs. actina y tratamiento, los valores se reportan en el porcentaje del incremento de la proteína de interés con respecto al tratamiento correspondiente (% vs Tratamiento). En las gráficas se representa la mediana con su rango.

4. Identificación de la participación de las maquinarias de reparación NHEJ y alt-EJ a través de la cuantificación de las proteínas p-Ku80 y p-CtIP

El paraoxón y el glifosato indujeron un aumento significativo de p-Ku80 sólo en las células que no tuvieron un periodo de recuperación en comparación con el respectivo control negativo (Figura 10-A). Al evaluar el efecto de un periodo de recuperación de 15 minutos post-tratamiento sobre la fosforilación de Ku80, se encontró un incremento de la proteína con los tratamientos, aunque ninguno fue significativo (Figura 10-B). Ninguno de los compuestos estudiados indujo la fosforilación de la proteína CtIP en los tiempos de recuperación evaluados (0 y 15 min posteriores a la exposición).

Inducción de la fosforilación de Ku80 por exposición a plaguicidas

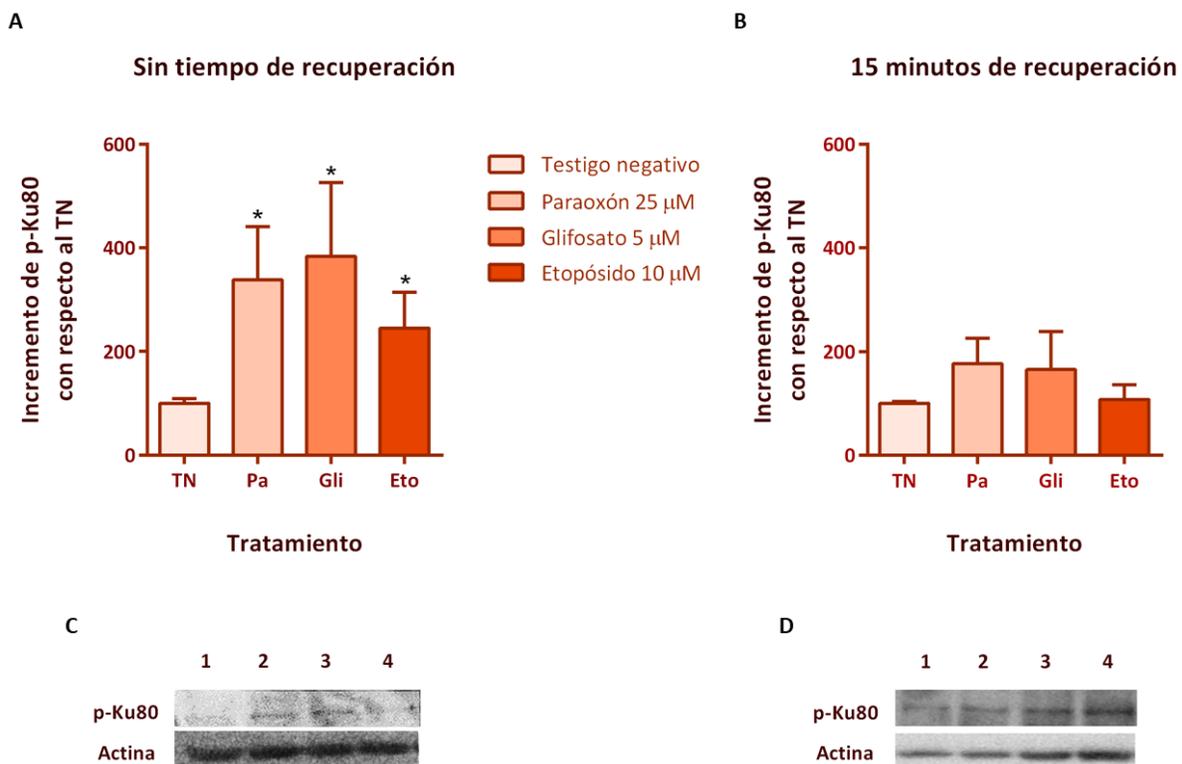


Figura 10. Evaluación del efecto del paraoxón y del glifosato sobre la fosforilación de Ku80 (p-Ku80) en células mononucleares aisladas de sangre periférica, que fueron tratadas en G0 y cosechadas en dos tiempos de recuperación. **A.** El tratamiento con los plaguicidas y el testigo positivo (etopósido) indujo un incremento significativo de la fosforilación de Ku80 (*) en células sin tiempo de recuperación. **B.** Después de 15 minutos de recuperación, los niveles de p-Ku80 no fueron significativos en ninguno de los tratamientos en comparación con el testigo negativo. Se presenta una membrana representativa de p-Ku80 en células tratadas y sin tiempo de recuperación (C), o con 15 minutos de recuperación (D). Línea 1 – testigo negativo; línea 2 – paraoxón 25 μ M; línea 3 – glifosato 5 μ M; línea 4 – testigo positivo, etopósido 10 μ M. TN – testigo negativo, Pa – paraoxón, Gli – glifosato, Eto – testigo positivo, etopósido. Para cada compuesto se aplicó la prueba estadística U de Mann Whitney en comparación con el testigo negativo respectivo y considerando una $p < 0.05$.

5. Evaluación de daño genotóxico por inhibición de topolI

Se registró todo tipo de daño genotóxico evaluable en el sistema de MN con base en los criterios establecidos por Fenech y cols. (2003). Los biomarcadores identificados fueron MN, GN y PNP, así como la presencia de daño combinado (DC, dos o más eventos antes descritos) (Figura 11). Además, se incluyó la evaluación de microdeleciones debido a que se advirtió su presencia en algunas células durante las evaluaciones al microscopio. Los resultados obtenidos en los dos ensayos independientes fueron sumados y se resumieron en la Tabla 10.

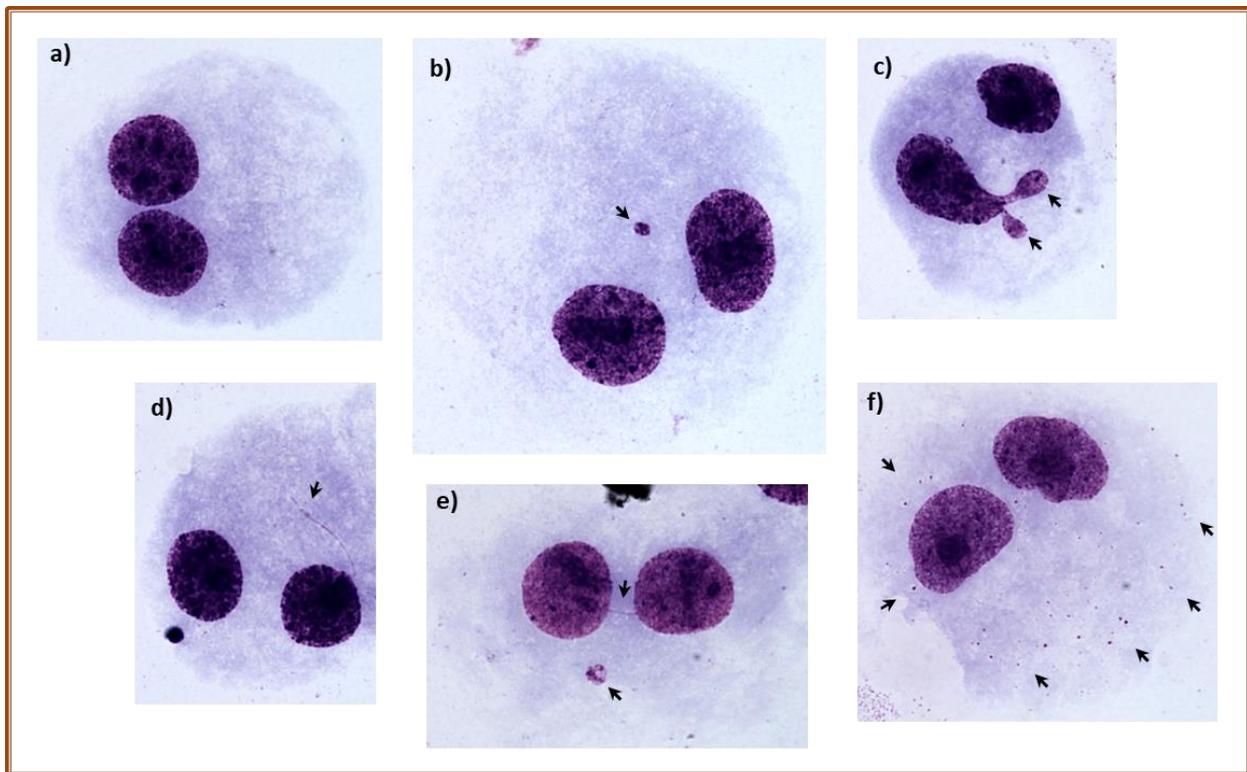


Figura 11. Identificación de daño genotóxico (flechas) en células a través del ensayo de MN con bloqueo de citocinesis. a) célula binucleada normal; b) célula con un MN; c) célula con dos GN en uno de los núcleos hijos; d) célula con PNP roto; e) célula con daño combinado, un MN y un PNP; f) célula con microdeleciones. Tinción con Giemsa al 4%. MN – micronúcleo; GN – gemación nuclear; PNP – puente nucleoplasmático.

Fotografías: Microscopio Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU), objetivo 100x (aumento final 1000x).

a) Sin inhibición del sitio catalítico de topoII

Paraoxón y glifosato indujeron un incremento significativo ($p < 0.05$), en la frecuencia de MN. El glifosato también promovió un mayor número de PNP, cercano a la significancia ($p = 0.0534$). Además, se observó la presencia de estructuras semejantes a minutas, dobles y sencillas, en el citoplasma de células tratadas con estos compuestos, siendo significativamente mayor en comparación con el testigo negativo ($p < 0.05$). El testigo positivo generó un incremento significativo en las frecuencias de MN, PNP, DC y de los microfragmentos antes mencionados, pero no así en los niveles de GN. Los parámetros de muerte celular no se vieron afectados en comparación con el testigo negativo (Tabla 10).

b) Con inhibición del sitio catalítico de topoII.

La adición del inhibidor del sitio catalítico de topoII, ICRF-187, previo al tratamiento con paraoxón no afectó los niveles de MN, PNP ni de DC, aunque produjo una disminución significativa de GN ($p < 0.05$). El inhibidor no afectó ninguno de los marcadores de daño evaluados en células tratadas con glifosato. Con respecto a los parámetros de muerte celular, la administración previa con el inhibidor de topoII provocó un incremento significativo de apoptosis en los cultivos tratados con paraoxón y con glifosato, así como de necrosis en los expuestos a glifosato. En cambio, los tratamientos con el inhibidor y el etopósido presentaron una menor frecuencia de todos los parámetros en comparación con los cultivos que sólo se trataron con el testigo positivo, con excepción de la apoptosis y necrosis, parámetros que no se vieron afectados por la presencia del inhibidor (Tabla 10).

Como ya se comentó, durante la evaluación del daño citogenético se identificó la presencia de dobles minutas (DM) y de fragmentos de material genético presentes en el citoplasma de varias células, los cuales se denominaron como microdeleciones (MD) (Figura 11, inciso f). La presencia de este material genético se corroboró a través de la tinción de Feulgen. Se registró el número de eventos por tratamiento (MD+DM) y, al igual que los otros marcadores de daño genotóxico, se aplicó la prueba exacta de Fisher para identificar diferencias entre tratamientos. Se encontró que las células expuestas a los compuestos glifosato, paraoxón y al testigo positivo, presentaron una mayor frecuencia de MD+DM en contraste con el testigo negativo ($p < 0.05$). Esta misma tendencia se presentó en los tratamientos con el inhibidor de topoII previo a la administración del paraoxón, del glifosato o del testigo positivo. Los cultivos de glifosato incubados previamente con ICRF-187 presentaron una disminución significativa de este tipo de daño en comparación con los tratados con sólo el glifosato ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas de este parámetro entre los tratamientos del paraoxón o del testigo positivo con y sin el inhibidor catalítico de topoII (Tabla 10).

El índice de nucleación, que refleja el número de veces que se dividieron las células durante el cultivo, se vio afectado sólo en los tratados con el etopósido independientemente de si se había pre-incubado con el ICRF-187 o no (Tabla 10).

Tabla 10. Daño citogenético observado a través del sistema de MN en células tratadas¹ con los compuestos de interés.

Tratamiento	MN (^o / _{oo})	GN (^o / _{oo})	PNP (^o / _{oo})	DC (^o / _{oo})	MD + DM (^o / _{oo})	Apoptosis (^o / _{oo})	Necrosis (^o / _{oo})	Índice de Nucleación
Sin el inhibidor del sitio catalítico de topoll								
Control	8	24.5	4	2	0.25	5	15	1.68
Paraoxón 25µM	19	30	6.5	2	11.5	4	13	1.68
Glifosato 5 µM	15	28	7.5	3	13.5	3	10	1.69
Etopósido 30 µM	196	36	34	37.5	9	12	10	1.23
Con el inhibidor del sitio catalítico de topoll								
Control + I	8	23.5	2	1	1	5	8	1.68
Paraoxón 25 µM + I	16	19 ^a	5	1	11	26^b	17	1.67
Glifosato 5 µM + I	19	33	8	3	8^a	16^b	24^b	1.66
Etopósido 30 µM + I	47^a	19 ^a	6^a	9^a	10	19	8	1.28

MN: Micronúcleos, GN: gemaciones nucleares, PNP: Puentes nucleoplasmáticos DC: Daño combinado. MD: microdeleciones, DM: dobles minutas.

(^o/_{oo}) - No. de eventos por cada 1000 células.

¹ - El tratamiento se realizó en G0.

+ I: Tratamiento previo con el ICRF-187, inhibidor del sitio catalítico de topoll.

En **negritas** se presentan los compuestos que indujeron mayor daño en comparación al testigo negativo correspondiente, prueba exacta de Fisher, p<0.05.

En *cursivas* se presentan los valores más bajos del índice de nucleación.

^a - Tratamientos que presentaron menor daño cuando se adicionó el ICRF-187.

^b - Tratamientos que presentaron mayor daño cuando se adicionó el ICRF-187.

DISCUSIÓN

El efecto nocivo que tienen los plaguicidas en distintas especies, incluida la humana, lleva varias décadas en discusión. Una de las razones más importantes para ello es su naturaleza química heterogénea; al hablar de plaguicidas, no sólo se hace referencia a un número limitado de compuestos con estructuras y efectos similares (como lo son las dioxinas y los PAH, por ejemplo), sino a una variedad de sustancias con estructuras diferentes que inducen efectos nocivos muy diversos. Otra razón de peso es su aplicación. Los plaguicidas generalmente se aplican en mezcla, la cual puede incluir no solo los coadyuvantes que acompañan al compuesto activo, sino también a más de un plaguicida. En consecuencia, en un organismo no blanco afectado resulta difícil discernir qué sustancia es la que está promoviendo el daño, si hay un efecto sinérgico u otro tipo de respuesta. Un ejemplo de ello es la asociación de estos compuestos con el riesgo de desarrollar una amplia variedad de enfermedades, entre ellas, la leucemia infantil. Si bien se ha sugerido el papel de estos compuestos como agentes promotores de translocaciones asociadas a algunos subtipos particulares de este cáncer (Alexander y cols. 2001; Greaves, 2003; Kim y cols. 2006), en la realidad resulta complicado determinar cuáles de ellos pueden tener ese papel.

Una forma de abordar este tema es a través de la evaluación individual de los compuestos activos de los plaguicidas comerciales. Tomando la propuesta de que estas sustancias pueden ser inductoras de translocaciones, en primera instancia se puede seleccionar un grupo representativo de los compuestos activos y determinar si tienen la capacidad de inducir rompimientos de doble cadena (ya sea de forma directa o indirecta), daño inicial cuya reparación errónea puede conducir a un evento de translocación.

1. Inducción de DSB

En este trabajo, ocho compuestos fueron evaluados individualmente para determinar su capacidad de inducción de DSB en linfocitos de sangre periférica de donadores sanos. Dado que los linfocitos en G0 son células con niveles bajos o nulos de enzimas de metabolismo de xenobióticos (Christina y cols. 2013; Hukkanen y cols. 1997; Norppa, 2001; Pelkonen y Raunio, 1997), se seleccionaron cinco compuestos originales (endosulfán, glifosato, pentaclorofenol, permetrina y propoxur) y tres metabolitos (endosulfán lactona, paraoxón y AMPA), bajo el criterio de que, al existir poca actividad metabólica, el efecto observado será consecuencia de la exposición a estos compuestos y no a los productos de éstos. Todas las sustancias evaluadas en este estudio cuentan con reportes de daño genotóxico *in vitro* en distintos sistemas y ensayos (Tabla 3), además de que a pesar de estar prohibidos o estar considerados como altamente peligrosos, aún son utilizados en nuestro país (Bejarano, 2017; COFEPRIS, 2019).

Cinco de ellos promovieron la formación de los DSB: los plaguicidas glifosato, pentaclorofenol y permetrina, así como los metabolitos endosulfán lactona y paraoxón. El daño fue identificado en el núcleo de linfocitos humanos a través de la formación de focos de la histona H2AX fosforilada. Estos compuestos indujeron un incremento significativo en al menos una concentración probada (OECD, 2010).

Un foco de γ -H2AX se origina a partir de la fosforilación de cerca de 2000 moléculas de la histona H2AX que rodean a un DSB; en consecuencia, en la actualidad se asume que el número de focos presentes en el núcleo celular refleja aproximadamente la cantidad de DSB nucleares inducidos (Scarpato y cols. 2013). Así, la detección de los DSB a través de la identificación de los focos de γ H2AX por microscopía permite evaluar dos parámetros indicadores del efecto genotóxico del compuesto probado: la proporción de células que presenta daño y el número de rompimientos que se producen en una célula.

Estudios con radiación (Rothkamm y Löbrich, 2003; Scarpato y cols. 2013) y diversos compuestos genotóxicos (Harada y cols. 2014; Hershman y cols. 2017; Scarpato y cols. 2013) han reportado un incremento en el número de células con DSB asociado con la concentración, llegando a presentar una respuesta dosis-dependiente (Harada y cols. 2014; Scarpato y cols. 2013). En este estudio, sólo el endosulfán lactona presentó esta tendencia con excepción de la concentración más alta, en donde el aumento del número de células con DSB no fue significativo, algo que puede ser asociado al efecto citotóxico del compuesto. El pentaclorofenol presentó un efecto de hormesis, es decir, el compuesto promovió un aumento de células con DSB en las concentraciones más bajas, seguido de la disminución de estos eventos en las dos más altas, respuesta que no estuvo relacionada con citotoxicidad. Los otros tres compuestos que también indujeron daño, no presentaron un patrón en particular con las concentraciones probadas. Previamente, Graillot y cols (2012b) encontraron una inducción de γ -H2AX por exposición a plaguicidas con estructura metil-pirazol en las líneas celulares SH-SY5Y y Jurkat. Por su parte, Hershman y cols. (2017), al evaluar los 309 plaguicidas registrados en el catálogo *Toxcast* Fase 1 de la EPA, hallaron que 39 de ellos fueron genotóxicos al inducir los DSB, respuesta que estuvo relacionada con la concentración y, en el caso de dos de estos compuestos, el captan y el captafol (dos compuestos tio-ftalimida clorados), el daño observado también estuvo asociado con eventos de apoptosis.

En nuestro trabajo, al evaluar el número de focos presentes en el núcleo celular, se encontró que todos los plaguicidas positivos indujeron principalmente menos de 10 focos por célula en todas las concentraciones probadas. Sólo el paraoxón (25 μ M) y el glifosato (2 y 10 μ M) promovieron un incremento significativo en el porcentaje de células con más de 10 focos de γ H2AX, aunque las células con menos de 10 focos siguieron predominando. Se ha reportado que la radiación (Rothkamm y Löbrich, 2003; Scarpato y cols. 2013; Zwicker y cols. 2011) y agentes antineoplásicos (Kim y cols. 2011; Watters y cols. 2009) promueven el incremento de los DSB de una forma dosis-dependiente,

misma respuesta que se observó en el testigo positivo; en contraste a ello, los resultados aquí obtenidos indican que no ocurre así con las concentraciones probadas de los plaguicidas estudiados.

Como testigo positivo en una concentración de 50 μM , el etopósido, un fármaco antineoplásico, indujo más de 10 focos por núcleo en más del 85% de las células evaluadas. Sin embargo, en concentraciones bajas, la cantidad de focos generados fue comparable con lo observado en los tratamientos con glifosato y paraoxón (Figura 12). Lo anterior conduce a pensar que ambos compuestos son los inductores de DSB más potentes de los probados en el estudio, por lo que pueden presentar un riesgo mayor para la estabilidad celular.

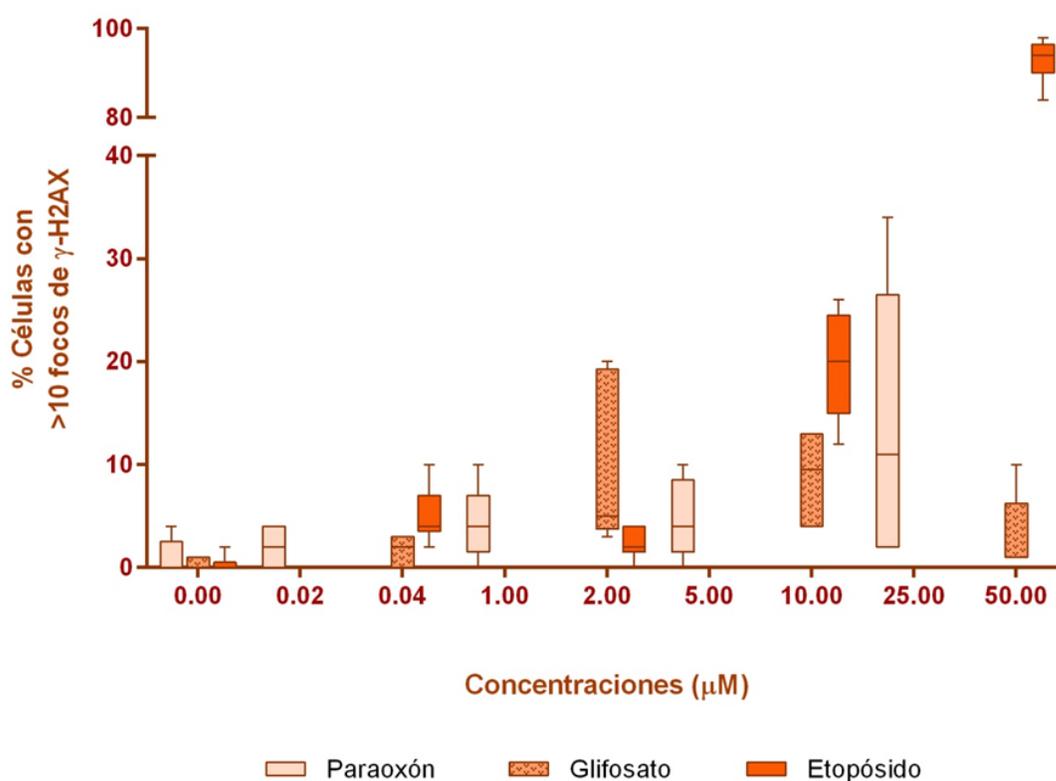


Figura 12. Representación gráfica de la distribución del porcentaje de células con más de 10 focos de $\gamma\text{-H2AX}$ inducidos por los diferentes tratamientos con paraoxón, glifosato o etopósido. Los valores se adquirieron de los resultados obtenidos en el presente estudio. Para cada compuesto se realizó un ensayo con su respectiva réplica, 500 células en total fueron evaluadas.

Con la evaluación de los DSB a través de microscopía de fluorescencia, no sólo puede determinar el número de DSB presentes en el núcleo celular, sino que también es posible identificar la intensidad de

la fluorescencia, así como la disposición y el tamaño de los focos dentro del núcleo. Se ha reportado que estas características varían de compuesto a compuesto, lo que sugiere que habrá distintos mecanismos implicados en la generación de los DSB (Watters y cols, 2009), así como diferentes consecuencias para las células afectadas: recombinación, reparación del DNA, apoptosis, entre otros (Redon, 2012). En el presente estudio, se encontró que todos los plaguicidas favorecían principalmente la formación de focos puntuales y pequeños, brillantes y en algunas ocasiones agrupados, independientemente de la concentración, teniendo una apariencia similar a los observados en linfocitos de niños con sobrepeso (Scarpato y cols. 2011), en linfocitos expuestos a bajas dosis de radiación (Zwicker y cols. 2011) y en las concentraciones de 10 μM o menores de etopósido como las empleadas en este trabajo. La pregunta que surge de ello es si las lesiones, censadas a través de focos de $\gamma\text{-H2AX}$ con estas características, pueden ser reparadas. Este tipo de foco también ha sido detectado en líneas celulares utilizadas para el estudio de la activación de los mecanismos de reparación, esto al inducir DSB de forma controlada con radiación (Kinashi y cols. 2011; Paull y cols. 2000; Toulany, 2012; Uematsu y cols. 2007). Por tanto, existe la posibilidad de que el daño evaluado aquí pueda conllevar a eventos de reparación. La identificación de ICH en células proliferantes tratadas con paraoxón y glifosato (Nishio y Uyeki, 1981; Siviková y cols. 2006; Sobti y cols. 1982) refuerza los resultados aquí obtenidos de que estos compuestos pueden inducir DSB que conducirían a la activación de los mecanismos de reparación.

Por otra parte, la concentración utilizada para el testigo positivo (50 μM de etopósido) indujo la presencia de focos grandes y robustos que parecían motas cubriendo casi en su totalidad el núcleo, o bien, núcleos marcados en su totalidad con el Alexa Fluor® 555 (teñidos de rosa/rojo), en donde fue difícil distinguir focos individuales. Este tipo de patrón ha sido asociado a un efecto citotóxico (Watters y cols. 2009), así como también como un indicador de apoptosis (Olsen y cols. 2012; Redon y cols. 2012). Sin embargo, en la prueba con MTS utilizada en este trabajo no se encontró un incremento en la muerte celular; no obstante Bandele y Osheroff (2008), hallaron un efecto citotóxico en concentraciones mayores a 10 μM del compuesto después de 6 horas de exposición (0-200 μM). A su vez, Hershman y cols. (2017) reportaron que el etopósido sólo indujo la activación de la vía de apoptosis después de 8 h de tratamiento y en concentraciones superiores a 10 μM ; por debajo de este tiempo (2 y 4 h), no observaron un efecto con las concentraciones evaluadas (0.1-100 μM), similar a lo que se encontró en este trabajo. De acuerdo con esto, la muerte celular ocurre con retraso después de la detección de los DSB, en concentraciones superiores a 10 μM . Por esta razón y dado que no se han estudiado las consecuencias de este tipo de foco en un tiempo de exposición menor a 4 horas, para continuar con la determinación de los mecanismos de reparación en la presente investigación, se disminuyó la concentración del testigo positivo a 10 μM , la cual indujo focos similares a los producidos por la exposición a los plaguicidas y metabolitos, por lo que el daño puede ser equiparable.

La fosforilación de H2AX como consecuencia de la detección de los DSB promueve el inicio de la reparación del daño por la vía que corresponde. Para estudiar los mecanismos de reparación, fueron probadas tres concentraciones de cada compuesto; la más alta correspondió a aquella que indujo un mayor número de DSB de forma significativa. En el caso del endosulfán lactona y el glifosato se consideró, además, la citotoxicidad del compuesto medida a través de la biorreducción del compuesto MTS, respuesta que indica la integridad metabólica de la célula. Dada la citotoxicidad del glifosato en la evaluación de DSB, la concentración máxima probada fue ajustada a 5 μM . Lo anterior es de interés ya que difiere de lo observado en líneas celulares; en ellas se ha determinado que este compuesto no es genotóxico en concentraciones menores a 900 μM . En un periodo de 24 horas de incubación con el compuesto, Townsend y cols. (2017) encontraron que la citotoxicidad de este plaguicida en células Raji sólo se presenta en las concentraciones más altas (superior a 10 mM), mientras que Monroy y cols. (2005) reportaron este efecto en concentraciones superiores de 0.9 y 5 mM en las líneas celulares HT1080 y GM38, respectivamente. La línea celular TR146 tratada con glifosato durante 20 min tampoco se vio afectada en concentraciones inferiores a 1.18 mM (Koller y cols. 2012). Esta diferencia indica que las células humanas normales son más sensibles a los efectos tóxicos del glifosato que las líneas celulares, diferencia que se vuelve más evidente en el estudio de De Almeida y cols. (2018), quienes observaron que en células de sangre periférica, el glifosato induce muerte celular de forma significativa en un rango de concentración de 59 μM a 2.9 mM, mientras que en las líneas celulares MCF7 y MDA no (443.5 μM – 3.5 mM). Estos datos adquieren relevancia cuando se trata de poblaciones o individuos expuestos a estos compuestos tóxicos.

2. Participación de los mecanismos de reparación HR, NHEJ y alt-EJ

Estudios con radiación han permitido identificar la participación de los principales mecanismos de reparación de DSB a través del ciclo celular, así como del papel de algunas de las proteínas que están asociadas a estos mecanismos, ej. Rad51 (HR) y Ku80 (NHEJ) (Bishay y cols. 2001; Chen y cols. 1997; Frasca y cols. 2001; Paull y cols. 2000; Rothkamm y cols. 2003; Shelke y Das, 2015; Shrivastav y cols. 2008). Mientras que HR está activa durante las fases S y G2, NHEJ lo está principalmente durante las fases G0/G1 y G2 (Ceccaldi y cols. 2016; Christmann y cols. 2003). Con estas bases, es posible indagar si los DSB, producto de la exposición a plaguicidas, activan estos mecanismos. Lo anterior puede ser posible a través de la identificación de proteínas clave como Rad51 que está asociada a la reparación HR, y Ku80 fosforilada, propia de NHEJ.

Al determinar la participación de los mecanismos de reparación, la cantidad de daño promovida por el glifosato y el paraoxón (células con >10 focos), parece ser relevante en relación con la presencia de proteínas de reparación como p-Ku80. Sólo estos dos compuestos indujeron un incremento significativo en la fosforilación de esta proteína, mientras que el resto de los compuestos que

promovieron la formación de más de 10 focos de γ H2AX por célula no lo hicieron. El glifosato provocó un incremento de la fosforilación de Ku80 en forma dosis-dependiente, mientras que con el paraoxón, esta proteína se presentó significativamente en las tres concentraciones probadas. Como era de esperarse, la proteína Rad51 no fue inducida con ninguno de los tratamientos dados en linfocitos no proliferantes. Esto es consistente con reportes previos en donde se indica que HR no participa en la reparación de DSB en células en G0/G1 (Bishay y cols. 2001; Ceccaldi y cols. 2016; Chen y cols. 1997; Shrivastav y cols. 2008).

En general, los resultados obtenidos muestran que el paraoxón y el glifosato, un insecticida y un herbicida, son inductores de DSB en linfocitos de sangre periférica ante una exposición aguda. Esto es consistente con el paraoxón, el metabolito más tóxico del paratión, un plaguicida clasificado en el grupo Ia (extremadamente peligroso), según la clasificación de toxicidad aguda de la OMS (WHO, 2009). Sin embargo, no es así con el glifosato, cuya toxicidad se encuentra actualmente en discusión, aunque hoy en día se ubica dentro del grupo III, es decir, está clasificado como ligeramente peligroso ante una exposición aguda. En el presente estudio, los tratamientos dados a células que se hallaban en un estado no proliferativo indujeron rompimientos en el DNA, así como también promovieron la activación de la fosforilación de Ku80, una proteína que participa en la vía de reparación NHEJ. Estos resultados son consistentes con los reportados en estudios con células mononucleares de sangre periférica en donde los DSB fueron inducidos con radiación. Frasca y cols. (2001) determinaron que Ku80 es fosforilada en el citoplasma de las células previo a la formación del dímero Ku70/Ku80 requerido para el inicio de la reparación, mientras que Shelke y Das (2015) detectaron la expresión de Ku80 y otras proteínas que participan en el mecanismo de reparación NHEJ.

Continuando con lo anterior, es bien conocido que la resolución de los DSB es llevada a cabo por los mecanismos de reparación HR o NHEJ. Sin embargo, en los últimos años se han descubierto otros mecanismos que pueden contribuir a la reparación del daño, como son: 'el Alineamiento de Una Hebra' o SSA (por sus siglas en inglés) y 'la Unión de Extremos Alterna' o alt-EJ (por sus siglas en inglés). La activación de uno u otro mecanismo también dependería de la etapa del ciclo celular y de la presencia de proteínas específicas (Aparicio y cols. 2014; Ceccaldi y cols. 2016). Alt-EJ tiene la facultad de reparar el daño haciendo un uso mayor de microhomologías en las hebras rotas en comparación con NHEJ, por lo que se ha propuesto que induce más daño que este mecanismo, aunque se ha reportado su participación durante las fases G1 y G2 (Frit y cols. 2014). Por tal motivo, para diferenciar a ambas vías de reparación, actualmente se conoce a NHEJ como c-NHEJ que hace alusión a la vía clásica o canónica (Ceccaldi y cols. 2016; Frit y cols. 2014; Soni y cols. 2015). Dadas las características de los mecanismos de reparación y las del presente trabajo, la detección de la fosforilación de Ku80 en células de sangre periférica en G0 condujo a pensar que fue la activación del mecanismo de reparación c-NHEJ lo que ha contribuido con el daño encontrado en el ensayo de MN, tema que será discutido más adelante. Este mecanismo por ser penoso a errores, se ha descrito que

induce microdeleciones o microinserciones que pudieran alterar la sobrevivencia de la célula, si se presentan en secuencias regulatorias (Hromas y cols. 2016), así como podrían inducir la presencia de rearrreglos cromosómicos, entre ellos, eventos de translocación (Ghezraoui y cols. 2014). Sin embargo, recientemente Barton y cols. (2014) reportaron que un daño extensivo en el DNA, producido por radiación ionizante en líneas celulares en G0/G1, es suficiente para inducir la intervención de alt-EJ a través de la fosforilación de RPA2, Plk-3 y CtIP, vía a la cual estos autores le atribuyen la presencia de la mayoría de eventos de translocación encontrados. Ellos hallaron que, una vez que la célula detecta los DSB, una de las primeras señales que inician la activación de alt-EJ es la fosforilación de CtIP (p-CtIP) en la serina 327, señal que se detectó desde que se indujo el daño hasta 180 minutos después, con un pico máximo a los 30 min. Por tal motivo, para investigar esta posibilidad, en el presente trabajo se buscó la presencia de CtIP fosforilada en linfocitos de sangre periférica expuestos al glifosato, al paraoxón o al testigo positivo. La señal se buscó una vez finalizado el tiempo de exposición o bien, después de 15 minutos de recuperación. Sin embargo, en ninguno de los tiempos se detectó la presencia de esta proteína fosforilada. Contrario a ello, nuevamente se identificó la fosforilación de Ku80 la cual, en los tratamientos sin tiempo de recuperación, fue menor en los testigos negativos en comparación con el paraoxón y el glifosato. Lo anterior corrobora que la inducción de los DSB, producto de la exposición a estos compuestos, está activando a la vía de reparación c-NHEJ y no al mecanismo alt-EJ. La ausencia de CtIP fosforilada puede deberse a tres motivos principales. El primero de ellos tiene que ver con la intensidad del daño inducido por los compuestos, ya que las concentraciones probadas, si bien indujeron un incremento significativo de DSB's en los linfocitos tratados, este tipo de daño no fue lo suficientemente intenso (predominancia de células con más de 10 focos) como para activar a alt-EJ. El segundo, implica la respuesta de c-NHEJ ante la inducción de DSB, pues como se observó en los resultados de este trabajo, este mecanismo se indujo ante la exposición a los xenobióticos. Y el tercero tiene que ver con la propia presencia de alt-EJ en la fase G0 de linfocitos; esto se debe a que sólo ha reportado la participación de este mecanismo de reparación en las fases G1 y G2 del ciclo celular. Si bien Barton y cols. (2014) identificaron la presencia mínima de las proteínas RPA2 y CtIP en fibroblastos humanos en confluencia-arrestada (G0), la detección de la forma fosforilada de RPA2 (pRPA2^{Ser4/8}) fue casi nula y no buscaron CtIP fosforilada, por lo que deja la interrogante de si realmente alt-EJ puede estar activa en G0 en líneas celulares; en linfocitos no se detectó.

3. Glifosato y paraoxón como venenos de topoII

Se ha reportado que el tratamiento de cánceres primarios con compuestos químicos, que son venenos para topoII, induce leucemias secundarias con eventos de translocación y otros rearrreglos que involucran, entre otros genes, a MLL (Felix, 1998; Seiter y cols. 2001). Este conocimiento condujo al pensamiento de que algunos eventos de translocación específicos, asociados con subtipos particulares

de leucemia infantil, pueden ser originados por la exposición del infante y/o de la madre gestante a agentes con la capacidad de inhibir a topoII, entre ellos los plaguicidas (Alexander y cols. 2001; Pui y cols. 2004). En la primera parte del estudio se determinó que el daño en forma de DSB inducido por diferentes concentraciones de paraoxón y de glifosato es comparable con el inducido por etopósido en concentraciones inferiores a 50 μM , por lo que se planteó que la inducción de rearrreglos cromosómicos será similar entre estos compuestos y a través del mismo mecanismo. Para investigar esto se aplicó el ensayo de MN.

Anteriormente Mosesso y cols. (2015) reportaron que el inhibidor catalítico de topoII, ICRF-187, aplicado previo al tratamiento con etopósido, un veneno de topoII, produjo una disminución en la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Esto se debe a que el inhibidor se une al sitio catalítico de topoII impidiendo que esta enzima se una al DNA y, por tanto, se evita la formación de DSB, aun cuando el etopósido se haya adicionado. En el presente estudio también se observó la disminución del daño genotóxico en los tratamientos con etopósido cuando los cultivos fueron tratados previamente con el inhibidor catalítico. En ellos se identificó una reducción significativa de todas las lesiones evaluadas. Sin embargo, a diferencia del estudio de Mosesso y cols. (2015), en donde se reportó que las frecuencias de las aberraciones cromosómicas inducidas por el etopósido regresaron a los niveles basales con la administración del ICRF-187, en el presente trabajo las frecuencias de las lesiones se mantuvieron por arriba de éstos de forma significativa.

Como veneno de topoII, etopósido puede promover tanto la producción de DSB como de SSB (al inhibir sólo una subunidad de topo II) (Muslimovic y cols. 2009); sin embargo, al ser bloqueado su mecanismo de acción principal, una posible explicación para lo observado en este trabajo puede darse a través del entendimiento del propio metabolismo de este compuesto. Se ha establecido que la biotransformación del etopósido se da principalmente en el hígado a través de sistema de citocromo P450 (CYP450), particularmente por la isoforma CYP3A4 (Zhuo y cols. 2004). Sin embargo, se ha reportado que también puede ser metabolizado por una vía independiente a CYP, a través de la mieloperoxidasa presente en granulocitos como los neutrófilos (Haim y cols. 1986; Kagan y cols. 1999). En este estudio, los tratamientos se llevaron a cabo en sangre entera, por lo que estas células podrían haber metabolizado al etopósido a través de esta vía y conducir a la formación de los metabolitos etopósido catecol y etopósido quinona, los cuales también tienen la capacidad de inducir DSB's a través de la inhibición de TopoII (Gantchev y Hunting, 1998; Lovett y cols. 2001a, 2001b). Con la adición del inhibidor ICRF-187, la inducción de los DSB mediante TopoII se bloqueó. Sin embargo, el metabolito etopósido quinona tiene la habilidad de formar aductos con el DNA (Gantchev y Hunting, 1998) y, aunado a ello, se ha observado que los intermediarios, el radical libre fenoxil y el radical libre semiquinona, pueden entrar en un ciclo redox y dañar a las células (Kagan y cols. 1999). Ello explicaría el daño remanente que se observó en el ensayo de MN aún y con la presencia del ICRF-187 (Figura 13).

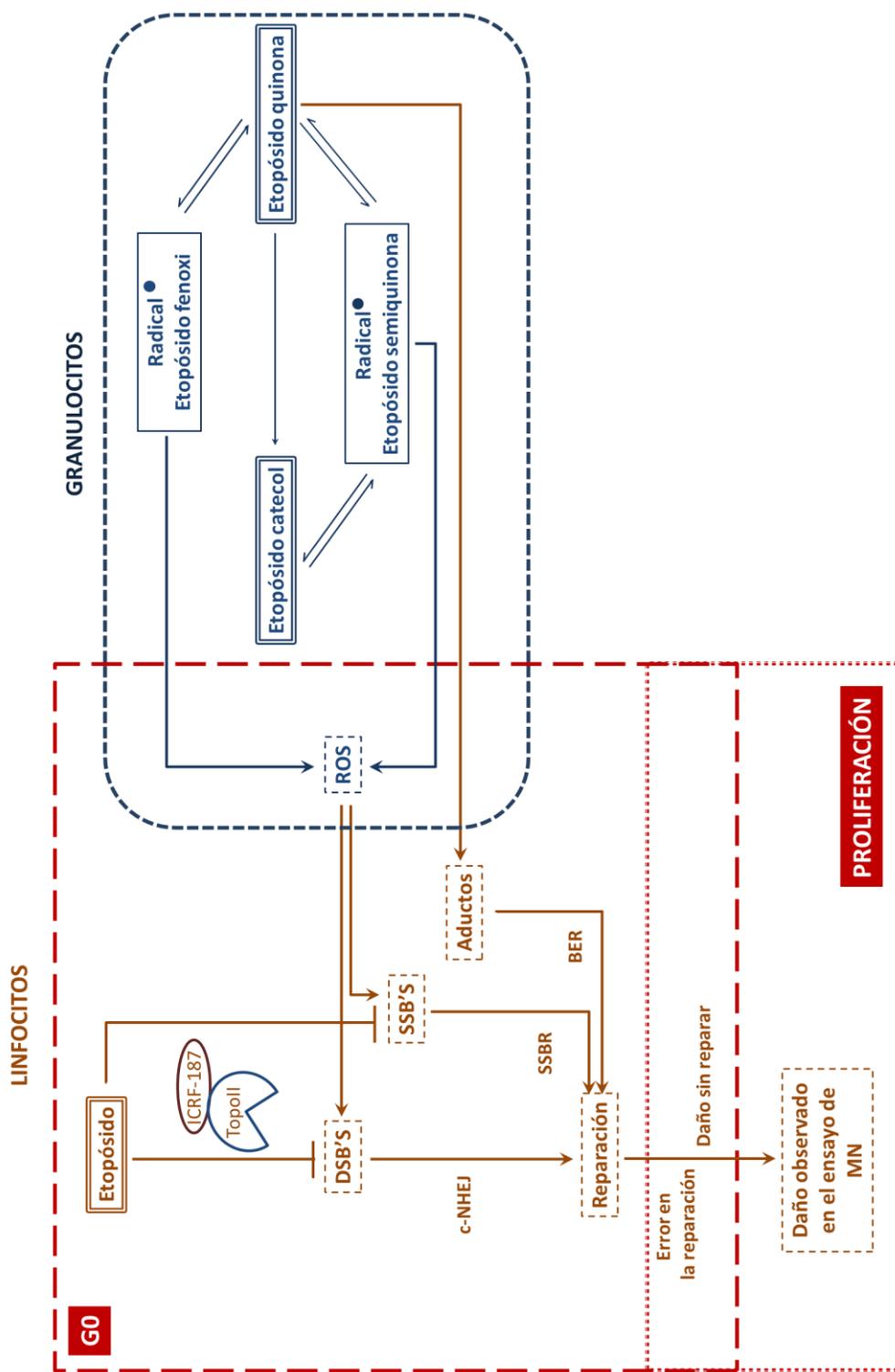


Figura 13. Propuesta de este trabajo: mecanismo de acción a través del cual el etopósido podría estar induciendo el daño remanente observado en el ensayo de MN con el tratamiento previo con el inhibidor catalítico ICRF-187. Información recopilada de Haim y cols. 1986, Kagan y cols. 1999 y Muslimovic y cols. 2009.
 ROS – radicales libres de oxígeno; DSB's – rompimientos de doble cadena; SSB's – rompimientos de cadena sencilla; SSBR – reparación de rupturas de cadena sencilla; BER – reparación por escisión de bases; c-NHEJ – vía clásica de la reparación por recombinación de extremos no homólogos; MN – micronúcleos.

En contraste, al evaluar los tratamientos con paraoxón se encontró que el inhibidor disminuyó significativamente sólo la frecuencia de GN, mientras que no influyó en el daño inducido por el glifosato. Fenech y cols. (2011) describieron los posibles eventos que podrían conducir a la formación de GN. Entre ellos se ha reportado la eliminación de genes amplificados (Shimizu y cols. 1998), como resultado de la ruptura de un puente nucleoplasmático (Fenech y cols. 2011) o bien, como resultado de la eliminación de fragmentos de cromosomas acéntricos intersticiales o terminales en linfocitos desprovistos de folatos (Lindberg y cols. 2007). Los resultados obtenidos en el presente estudio, después de la inhibición de topoII, indican que sólo las gemaciones inducidas por la exposición al paraoxón fueron sensibles a la inhibición catalítica de topoII, lo que sugiere un origen clastogénico para este tipo de lesiones en cultivos tratados con este plaguicida. En general, sin embargo, MN y puentes no sufrieron cambios con el inhibidor, por lo que paraoxón y claramente el glifosato, no actuaron como venenos de topoII.

Se ha propuesto que el estrés oxidante puede ser un mecanismo indirecto por el cual algunos plaguicidas inducirían la formación de DSB (Crépet y cols. 2013; Graillot y cols. 2012b; Wozniak y cols. 2018). Estudios han reportado que plaguicidas con estructuras con anillos aromáticos polihalogenados distintos, como los herbicidas acematida clorinato, y algunos organofosforados y organoclorados, inducen la formación de SSB así como peroxidación lipídica en plasma, hígado y cerebro de ratas (Bagchi y cols. 1995; Salehi y cols. 2012), en líneas celulares (Alleva y cols. 2016; Edwards y cols. 2013) y en población expuesta (Mecdad y cols. 2011). Clorpirifos, un plaguicida organofosforado, disminuye la actividad de las enzimas del Ciclo de Krebs y de los complejos de proteínas de la cadena de transporte electrones y la síntesis de ATP (Basha y Poojary. 2014; Middlemore-Risher y cols. 2011). Paraoxón es el metabolito *oxón* activo del paratión que se forma por el metabolismo de CYP. En el presente trabajo se agregó directamente este compuesto, por lo que desde un inicio tendría la capacidad de inducir estrés oxidante. Este daño podría incurrir indirectamente en lesiones en el DNA que se observaron en forma de DSB, pero también en la producción de SSB y la oxidación de bases nitrogenadas como se ha observado con otros organofosforados (Alleva y cols. 2016; Bagchi y cols. 1995). Estas lesiones en su conjunto conducirían a la formación del daño secundario observado en el ensayo de MN (Figura 14).

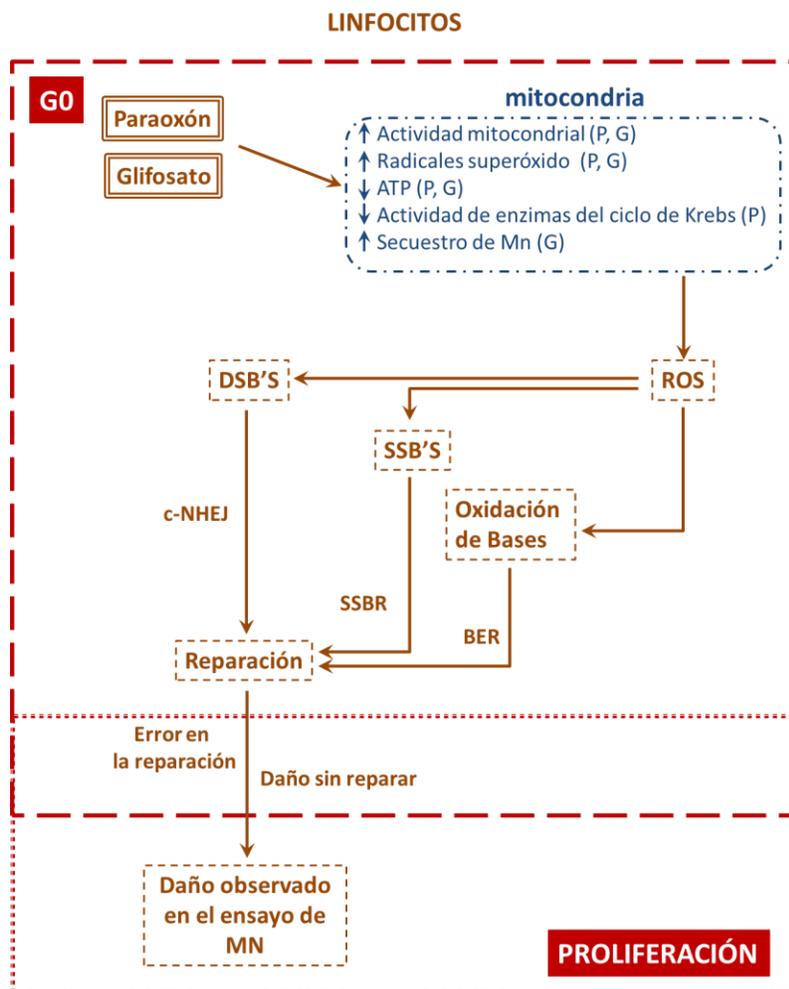


Figura 14. Propuesta de este trabajo: mecanismo de acción a través del cual el paraoxón o el glifosato podría estar induciendo DSB con las dosis probadas, así como la reparación y formación del daño observado en el ensayo de MN. Información recopilada de Alleva y cols. 2016; Bagchi y cols. 1995; Basha y cols. 2014; Middlemore-Risher y cols. 2011, y de Samsel y Seneff, 2015.

P – paraoxón; G – glifosato; Mn – manganeso; ROS – radicales libres de oxígeno; DSB's – rompimientos de doble cadena; SSB's – rompimientos de cadena sencilla; SSBR – reparación de rupturas de cadena sencilla; BER – reparación por escisión de bases; c-NHEJ – vía clásica de la reparación por recombinación de extremos no homólogos; MN – micronúcleos.

Por otra parte, se ha observado que glifosato puede disminuir severamente los niveles de manganeso (Mn) al inducir la disfunción mitocondrial (Samsel y Seneff, 2015); particularmente, al igual que clorpirifos, en concentraciones bajas (10 μ M) provoca un incremento en la actividad mitocondrial, lo que puede aumentar drásticamente la generación de superóxidos por la cadena respiratoria y afectar la producción de ATP (Alleva y cols. 2016). A diferencia del testigo positivo en este trabajo, glifosato no es metabolizado por las células de mamíferos (Anadon y cols. 2009; IPCS-INCHEM, 1994), por lo que la inducción de DSB's y el daño observado en el ensayo de MN debe de ser inducido por el mismo compuesto original. Se ha descrito que este plaguicida puede desestabilizar a la mitocondria a través de su capacidad de quelar minerales como el Mn, interfiriendo así con la actividad de la Mn-superóxido dismutasa y en consecuencia desestabilizando a la mitocondria (Alleva y cols. 2016; Samsel y Seneff, 2015). Por tanto, existe la posibilidad de que la disfunción mitocondrial generada por la exposición a glifosato, podría estar induciendo un incremento en los niveles de estrés oxidante que desencadene el daño observado en forma de focos de γ -H2AX y, al igual que con el paraoxón, se esperarían además

otras lesiones como SSB y bases oxidadas que contribuirían con la inducción del daño secundario encontrado en el ensayo de MN (Figura 14).

Al evaluar los parámetros de muerte celular, apoptosis y necrosis, se halló que, la adición previa del inhibidor de topoII, causó un incremento significativo de apoptosis en los tratamientos con el paraoxón y el glifosato, así como de necrosis en células tratadas con glifosato. Estos resultados sugieren que el inhibidor podría estar potenciando el efecto citotóxico de estos compuestos, efecto que se ha observado en varias formulaciones del glifosato, en comparación con el compuesto puro (De Almeida y cols. 2018).

Una particularidad que llamó la atención durante la evaluación de MN, fue la presencia de pequeños fragmentos en el citoplasma en una proporción significativa de células tratadas tanto con los plaguicidas como con el etopósido, algo que aunque Santovito y cols. (2018) presentan en las imágenes de linfocitos tratados con glifosato que reportan en su estudio, no lo discuten. La presencia de estos micro-fragmentos podría deberse a eventos de cromotripsis, descrita por primera vez por Stephens y cols (2011). Este fenómeno sólo se ha descrito en distintos tipos de cáncer (Biermann y cols. 2019; Kaur y cols. 2019; Newell y cols. 2019; Steininger y cols. 2018; Stephens y cols. 2011; Tuna y cols. 2019), incluido el mesotelioma pleural maligno, cáncer asociado con la exposición a asbestos (Mansfield y cols. 2018); así como a síndromes (Feursten y cols. 2018; Genesio y cols. 2015; Luijten y cols. 2018; Nazaryan y cols. 2019) y en personas clínicamente sanas en donde se presume un antecedente de cromotripsis asociado a enfermedades congénitas (de Pagter y cols. 2015; Hattori y cols. 2019; Kurtas y cols. 2018; Pettersson y cols. 2018). La cromotripsis es un evento que involucra la ruptura de un cromosoma (o unos pocos cromosomas) y su subsecuente reparación. Este daño tendría como consecuencia un cromosoma reparado aleatoriamente y la presencia de pequeños fragmentos de DNA que quedarían excluidos durante la reparación (Jones y Jallepalli, 2012). La hipótesis que se manejó en este trabajo es que los fragmentos que se observaron con apariencia de microdeleciones y dobles minutas, pueden ser una consecuencia de la producción de DSB complejos, definidos como la formación de un número mayor de DSB muy cercanos entre sí (Barton y cols. 2014) y que podrían estar presentes en las células clasificadas dentro de la categoría 3, es decir, que tuvieron más de diez DSB en su núcleo. Dada la cercanía de los DSB, existe la posibilidad de que la maquinaria de reparación sea incapaz de corregir el daño correctamente, lo que se traduciría en fragmentos que no son incorporados a ninguno de los dos núcleos hijos y, por tanto, quedan dispersos en el citoplasma, tal y como se observa en la cromotripsis. El etopósido es bien conocido por inducir DSB complejos en G₀, por lo que actúa de forma similar que la radiación ionizante llegando a provocar muchos rearrreglos cromosómicos en todas las fases del ciclo celular (Mosseso y cols. 2015). En este trabajo, también se detectó en menor escala la presencia de estos DSB complejos en células tratadas con el glifosato y el paraoxón (núcleos con >10 focos), y aunado el hecho de que también se observó un incremento significativo de p-Ku80, proteína asociada específicamente con la maquinaria de reparación c-NHEJ, se

puede explicar la presencia de estos fragmentos en el citoplasma de las células. Por tanto, esta sería la primera vez que se describe este fenómeno de cromotripsis en células normales y como consecuencia de una exposición a xenobióticos. Esto es de gran importancia debido a que este tipo de daño ha sido propuesto como un mecanismo por el cual una célula puede adquirir las características suficientes para transformarse y desencadenar un cáncer (Jones y Jallepalli, 2012; Ly y Cleveland, 2017; Ly y cols. 2019), por lo que detectarlo en células sanas afectadas por la exposición a sustancias químicas como los plaguicidas, implicaría que el riesgo asociado a estos compuestos es mayor de lo que se cree, por lo que se requiere de un mayor estudio.

4. Compuestos negativos en la inducción de DSB o mecanismos de reparación

No se debe de dejar de lado los compuestos que dieron negativo en la inducción de DSB o de alguno de los mecanismos de reparación aquí evaluados. Se debe de considerar que varios factores pudieron influir en estos resultados, entre los más importantes, están las concentraciones y el tiempo de exposición. En el caso de la formación de DSB, es necesario tener en cuenta la cinética de la fosforilación de γ -H2AX debido a que es importante la relación temporal entre la formación de los complejos y la inducción del daño al DNA (Smart y cols. 2008); esta respuesta va a ser dependiente del tipo de compuesto, tratamiento y/o el estado en el que se encuentra la célula (etapa del ciclo celular). Así, es importante hacer un seguimiento del curso-tiempo de la fosforilación de H2AX, tener en cuenta las condiciones experimentales (tiempo de exposición, concentración, fase del ciclo celular, tipo celular, etc), así como el mecanismo de acción del compuesto (estructura química, metabolismo, formación de aductos, agentes intercalantes, etc) (Hershman y cols, 2017; Muslimovic y cols. 2009; Scarpato y cols. 2013; Smart y cols. 2008). Con respecto a aquellos compuestos que indujeron significativamente la presencia de DSB, pero no así el mecanismo de reparación, hay que considerar que en los tratamientos con estos compuestos predominaron las células con menos de 10 focos. Con estas sustancias se observó una tendencia del incremento en la fosforilación de p-Ku80 en comparación con el testigo positivo, siendo el más notorio pentaclorofenol, aunque no fue significativo. Es conocido que cuando se activa el mecanismo de reparación, por cada rompimiento, se requiere de sólo dos moléculas de p-Ku80. Por tanto, existe la posibilidad de que, dado que el número de DSB dentro de los núcleos dañados no superó los diez focos, los niveles de fosforilación de p-Ku80 que se observaron en las membranas fueron suficientes para reparar el daño, caso contrario a lo encontrado con glifosato y paraoxón, en donde se observó la presencia significativa de células con más de 10 focos y en donde la inducción de p-Ku80 fue mayor.

5. Aportaciones

Primero, es importante recalcar la importancia de estudiar los compuestos originales o metabolitos activos de forma individual. Los plaguicidas son sintetizados con el fin de controlar organismos considerados plagas, por lo que se conoce el mecanismo de acción principal de muchos de ellos. Los más modernos, incluso están siendo diseñados para que no afecten a especies para las cuales no están dirigidas, es decir, no habrá riesgo para ellas; esto bajo el supuesto de que el organismo no blanco no cuenta con la proteína o vía que se afecta, tiene un mejor sistema para detoxificarlo o bien, no tiene la capacidad de activarlo (si hablamos de que es el metabolito el que tiene el efecto tóxico), esto por mencionar algunos ejemplos. Sin embargo, se ha reportado que el efecto adverso que tienen estas sustancias en muchas especies, no sólo se limita a las vías metabólicas, órganos o sistemas que tienen en común todos los organismos afectados, sino también a otros niveles que no habían sido considerados, como lo es daño al DNA. Estudios epidemiológicos, *in vivo* e *in vitro* han reportado que muchos plaguicidas pueden afectar a esta molécula, pero el cómo la alteran, ha sido muy poco indagado. Estudiar de forma individual a estos compuestos, permite establecer el o los mecanismos de acción a través de los cuales producen las lesiones en el DNA. En este proyecto sólo abordamos un probable mecanismo: la inducción de rompimientos de doble cadena, y si esto ocurría a través de la inhibición de topoII, evento que pudiera conducir a la formación de translocaciones asociadas a leucemia, idea que surgió como resultado de la asociación de los plaguicidas con el riesgo a desarrollar leucemia infantil, uno de los tres principales tipos de cáncer que afectan a este grupo de edad en todo el mundo y que, en México, ocupa el primer lugar. Así, se seleccionaron ingredientes activos que actualmente son empleados en distintas formulaciones comerciales en nuestro país, independientemente de si su uso está permitido (glifosato, permetrina y propoxur), restringido (pentaclorofenol) o prohibido (endosulfán, metabolito endosulfán lactona, y paratión, metabolito paraoxón), sustancias a las cuales muchas personas están expuestas, incluidos los niños.

Así, el desarrollo de este trabajo permitió responder parcialmente una pregunta que se ha mantenido desde que se postuló a los plaguicidas como posibles agentes inductores de translocaciones asociadas a leucemia infantil, hasta estos últimos años: ¿estos compuestos tienen la capacidad de inducir rompimientos en la doble hélice del DNA que, al ser reparados erróneamente pueden conducir a la generación de estas translocaciones? De los compuestos aquí evaluados se encontró que al menos cinco de ellos produjeron un incremento en la formación de DSB y de los cuales, sólo el glifosato y el paraoxón promovieron la activación significativa del mecanismo de reparación NHEJ. Este mecanismo se ha relacionado con la presencia de microdeleciones y rearrreglos en el DNA como los eventos de translocación. Este tipo de daño se observó en la presente investigación, a través del ensayo de MN, en forma de pequeños fragmentos en el citoplasma celular y de puentes nucleoplásmicos, respectivamente. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que existen plaguicidas con la capacidad de actuar como inductores de DSB y su subsecuente reparación errónea, lo anterior con la idea de que

ulteriormente, este mecanismo puede contribuir al proceso leucemogénico. Continuando con lo aquí encontrado, habría que evaluar si estos eventos se producen *in vivo* como resultado de la exposición a estos plaguicidas, ya sea en un modelo animal o en individuos que utilicen únicamente uno de estos compuestos, lo cual, en la práctica es difícil, pues la exposición a plaguicidas normalmente consiste en una mezcla de compuestos.

Otra interrogante clave que se desprende del postulado anterior para los compuestos químicos inductores de DSB, fue respondida para el glifosato y el paraoxón: ¿la inducción de los DSB se lleva a cabo a través de la inhibición de topoII? En este estudio se encontró que ninguna de estas sustancias tiene esta capacidad, por lo que se propone que otro mecanismo de acción está involucrado en la formación de estas lesiones, siendo el estrés oxidante un candidato dado los antecedentes reportados en la literatura.

Finalmente, con los resultados obtenidos, se ha identificado un mecanismo de acción para compuestos organofosforados que puede conducir a alteraciones permanentes en la estructura del DNA y alterar el funcionamiento normal de las células. Este mecanismo es congruente con los resultados observados en otros estudios, tanto en poblaciones, como en ensayos *in vitro* o *in vivo*.

CONCLUSIONES

Cinco de los nueve compuestos estudiados en este trabajo promovieron la formación de DSB en las concentraciones probadas: los plaguicidas glifosato, pentaclorofenol y propoxur, así como los metabolitos endosulfán lactona y paraoxón.

De los cinco compuestos que indujeron significativamente DSB, sólo el paraoxón y el glifosato promovieron un aumento en el número de células con más de 10 DSB en su núcleo dependiente de la concentración.

El paraoxón y el glifosato fueron los únicos compuestos que indujeron significativamente la fosforilación de Ku80, proteína asociada al mecanismo de reparación c-NHEJ.

No se detectó la participación del mecanismo de reparación HR en células tratadas con los cinco compuestos que indujeron la formación de DSB.

No se detectó la participación del mecanismo de reparación alt-EJ en células tratadas con glifosato o paraoxón.

El paraoxón y el glifosato no actúan como venenos de topoisomerasa II.

El paraoxón y el glifosato indujeron un tipo de daño relacionado con inestabilidad genómica, el cual fue observable en un ciclo celular y en forma de microdeleciones en el citoplasma.

La inducción de DSB y su subsecuente reparación por c-NHEJ condujo a un incremento en el número de células con daño citogenético, principalmente MN.

El tratamiento conjunto del inhibidor catalítico de topoII ICRF-187, con el paraoxón o el glifosato indujo un aumento en la muerte celular.

BIBLIOGRAFÍA

- 3G E-Learning**. 2017. Illustrated Handbook of Toxicology. 3G-Learning. Estados Unidos, 343 pp.
- Albert LA**. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. Revista de toxicología en línea, Retel, 8: 1-17. En: www.sertox.com.ar/retel
- Albino AP**, Huang X, Jorgensen E, Yang J, Gietl D, Traganos F, Darzynkiewicz. 2004. Induction of H2AX Phosphorylation in Pulmonary Cells by Tobacco Smoke. A new Assay for Carcinogens. Cell Cycle, 3(8): 1062-1068.
- Alexander FE**, Patheal SL, Biondi A, Brandalise S, Cabrera MA, Chan LC, Chen Z, Cimino G, Cordoba JC, Gu LJ, Houssein H, iSHII e, Kamel AM, Labra S, Magalhaes QU, Mizutani S, Petridou Eleni, Pombo de Oliveira M, Yuen P, Wiemels JL, Greaves MF. 2001. Transplacental Chemical Exposure and Risk of Infant Leukemia with MLL Gene Fusion. Cancer Research, 51: 2542-2546.
- Alleva R**, Manzella N, Gaetani S, Ciarapica V, Bracci M, Caboni MF, Pasini F, Monaco F, Amati M, Borghi B, Tomasetti M. 2016. Organic honey supplementation reverse pesticide-induced genotoxicity by modulating DNA damage response. Molecular Nutrition & Food Research, 60: 2243-2255.
- Alvarado-Hernandez DL**, Montero-Montoya R, Serrano-García L, Arellano-Aguilar O, Jasso-Pineda Y, Yáñez-Estrada L. 2013. Assessment of exposure to organochlorine pesticides and levels of DNA damage in mother-infant pairs of an agrarian community. Environmental and Molecular Mutagenesis, 54(2): 99-111.
- Álvarez-Moya C**, Reynoso-Silva M, Valdez-Ramírez C, Gómez-Gallardo D, León-Sánchez R, Canales-Aguirre A, Feria-Velasco A. 2014. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. Genetics and Molecular Biology, 37(1): 105-110.
- Anadón A**, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA, Castellano VJ, Martínez M, Martín MT, Nozal MJ, Bernal JL. 2009. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. Toxicology Letters, 190: 91-95.
- Andrievski A**, Wilkins RC. 2009. The response of γ -H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures. International Journal of Radiation Biology, 85(4): 369-376.
- Aparicio T**, Baer R, Gautier J. 2014. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. DNA Repair, 19: 169-175.
- Audebert M**, Riu A, Jacques C, Hillenweck A, Jamin EL, Zalko D, Cravedi JP. 2010. Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. Toxicology Letters, 199(2): 182-192.
- Audebert M**, Dolo L, Perdu E, Cravedi JP, Zalko D. 2011. Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cells lines. Archives of Toxicology, 85: 1463-1473.
- Bagchi D**, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by select pesticides. Toxicology, 104(1-3): 129-140.
- Bajpayee M**, Pandey AK, Zaidi S, Musarrat J, Parmar D, Mathur N, Seth PK, Dhawan A. 2006. DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. Environmental and Molecular Mutagenesis, 47: 682-692.
- Bande OJ**, Osheroff N. 2008. The Efficacy of Topoisomerase II-Targeted Anticancer Agents Reflects Persistence of Drug-Induced Cleavage Complexes in Cells. Biochemistry, 47: 11900-11908.

- Barton O**, Naumann SC, Diemer-Biehs R, Künzel J, Steinlage M, Conrad S, Makharashvili N, Wang J, Feng L, Lopez BS, Paull TT, Chen J, Jeggo PA, Löbrich M. 2014. Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1. *The Journal of Cell Biology*, 206(7): 877-94.
- Basha PM**, Poojary A. 2014. Mitochondrial dysfunction in aging rat brain regions upon chlorpyrifos toxicity and cold stress; an interactive study. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34: 737-756.
- Bejarano F** (Coordinador y editor). 2017. Los plaguicidas Altamente Peligrosos en México. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, A. C. RAPAM, 351 pp.
- Belson M**, Kingsley B, Holmes A. 2007. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environmental Health Perspectives*, 115(1): 138-145.
- Biermann J**, Langen B, Nemes S, Holmberg E, Parris TZ, Werner Rönnerman E, Enggvist H, Kovács A, Helou K, Karlsson P. 2019. Radiation-induced genomic instability in breast carcinomas of the Swedish hemangioma cohort. *Genes Chromosomes & Cancer*, 58(9): 627-635. doi: 10.1002/gcc.22757.
- Bishay K**, Ory K, Olivier MF, Lebeau J, Levalois C, Chevillard S. 2001. DNA damage-related RNA expression to assess individual sensitivity to ionizing radiation. *Carcinogenesis*, 22(8): 1179-1183.
- Bolognesi C**. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 543: 251-272.
- Bolognesi C**, Carrasquilla G, Volpi S, Solomon KR, Marshall EJ. 2009. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five Colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 7(15-16): 986-997.
- Bolognesi C**, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. 2011. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*, 26(1): 19-26.
- Buckley JD**, Robinson LL, Swotinsky R, Garabrant DH, LeBeau M, Manchester P, Nesbit ME, Odom L, Peters JM, Woods WG, Hammond GD. 1989. Occupational Exposures of Parents of Children with Acute Nonlymphocytic Leukemia: A report from the Childrens Cancer Study Group. *Cancer Research*, 49: 4030-4037.
- Bull S**, Fletcher K, Boobis AR, Battershill JM. 2006. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*, 21(2): 93-103.
- Burjanivova T**, Madzo J, Muzikova K, Meyer C, Schneider B, Votava F, Marschalek R, Stary J, Trka J, Zuna J. 2006. Prenatal origin of childhood AML occurs less frequently than in childhood ALL. *BMC Cancer*, 6:100. doi: 10.1186/1471-2407-6-100. En: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/6/100>.
- Burmeister T**, Thiel E. 2001. Molecular genetics in acute and chronic leukemias. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 127: 80-90.
- Carson R**. Joandomènec Ros (Trad.) 2010 [1962]. Primavera Silenciosa. Drakontos Bolsillo. 370 pp.
- Casida JE**. 2009. Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. *Chemical Research in Toxicology*, 22: 609-619.
- Cavas T**, Cinkilic N, Vatan O, Yilmaz D, Coskun M. 2012. In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and γ H2AX foci assays. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104: 212-217.
- Ceccaldi R**, Rondinelli B, D'Andrea AD. 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. Review. *Trends in Cell Biology*, 26(1): 52-64.

- Chen F**, Nastasi A, Shen Z, Brennehan M, Crissman H, Chen DJ. 1997. Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutation Research*, 384: 205-211.
- Christina GY**, Zaini A, Othman I. 2013. CYP2E1 level in peripheral lymphocytes correlates with early pathogenesis of diabetic nephropathy. *Biomedical Research*, 24(1): 153-163.
- [CICLOPLAFEST] Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. Catálogo de Plaguicidas. 2004. COFEPRIS. En: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>. Consulta en agosto de 2017.
- Christmann M**, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193: 3-34.
- [COFEPRIS] Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. 2004. Registro Sanitario de Plaguicidas y Nutrientes. En: <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/registro-sanitario-de-plaguicidas-y-nutrientes-vegetales> (consultado en mayo de 2019).
- Crépet A**, Héraud F, Béchaux C, Gouze ME, Pierlot S, Fastier A, Leblanc JCh, Le Hégarat L, Takakura N, Fessard V, Tressou J, Maximilien R, de Sousa G, Nawaz A, Zucchinni-Pascal N, Rahmani R, Audebert M, Graillot V, Cravedi JP. 2013. The PERICLES research program: An integrated approach to characterize the combined effects of mixtures of pesticide residues of which the French population is exposed. *Toxicology*, 313(2-3): 83-93.
- De Almeida LKS**, Pletschke BI, Frost CL. 2018. Moderate levels of glyphosate and its formulations vary in their cytotoxicity and genotoxicity in a whole blood model and in human cell lines with different estrogen receptor status. *3 Biotech*, 8:438. doi: 10.1007/s13205-018-1464-z.
- de Pagter MS**, van Roosmalen MJ, Baas AF, Renkens I, Duran KJ, van Binsbergen E, Tavakoli-Yaraki M, Hochstenbach R, van der Veken LT, Cuppen E, Kloosterman WP. 2015. Chromothripsis in Health Individuals Affects Multiple Protein-Coding Genes and Can Result in Severe Congenital Abnormalities in Offspring. *The American Journal of Human Genetics*, 96: 651-656.
- Dickey JS**, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM. 2009. H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma*, 118: 683-692.
- Dzwonkowska A**, Hübner H. 1986. Induction of chromosomal aberrations in the Syrian hamster by insecticides tested *in vivo*. *Archives of Toxicology*, 58: 152-156.
- Edwards FL**, Yedjou CG, Tchounwou PB. 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.
- [EPA] Environmental Protection Agency. Registration Review Process. En: <https://www.epa.gov/pesticide-reevaluation/registration-review-process> (consultado en octubre de 2016).
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2012. Guidelines on Prevention and Management of Pesticide Resistance. En: <http://www.fao.org/3/a-bt561e.pdf>
- Farah MA**, Ateeq B, Ahmad W. 2006. Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic test. *Science of the Total Environment*, 364: 200-214.

- Fasching K**, Panzer S, Haas OA, Marschalek R, Gadner H, Panzer-Grümayer R. 2000. Presence of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an *in utero* origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 95(8): 2722-2724.
- Fenech M**, Chang W, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534: 65-75.
- Fenech M**, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond da, Tucker JD, Thomas P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleous, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1): 125-132.
- Felix CA**. 1998. Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400: 233-255.
- Fernandez-Capetillo O**, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair*, 3: 959-967.
- Feurstein S**, Thomay K, Hofmann W, Buesche G, Kreipe H, Thol F, Heuser M, Ganser A, Schlegelberger B, Göhring G. 2018. Routes of Clonal Evolution into Complex Karyotypes in Myelodysplastic Syndrome Patients with 5q Deletion. *International Journal of Molecular Sciences*, 19:3269. doi: 10.3390/ijms19103269.
- Ford, AM**, Ridge SA, Cabrera ME, Mahmoud H, Steel CM, Chan LC, Greaves M. 1993. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukemias. *Nature*, 363: 358-360.
- Ford AM**, Bennett CA, Price CM, Bruin MCA, Van Wering ER, Greaves M. 1998. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 4584-4588.
- Frasca D**, Barattini P, Tocchi G, Guidi L, Pierelli L, Doria G. 2001. Role of DNA-dependent protein kinase in recognition of radiation-induced DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunology*, 13(6): 791-797.
- Frit P**, Barboule N, Yuan Y, Gomez D, Calsou P. 2014. Alternative end-joining pathway(s): Bricolage at DNA breaks. *DNA Repair*, 17: 81-97.
- Gale KB**, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, Greaves MF. 1997. Backtracking leukemia to birth: Identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 13950-13954.
- Gantchev TG**, Hunting DJ. 1998. The *Ortho*-Quinone Metabolite of the Anticancer Drug Etoposide (VP-16) Is a Potent Inhibitor of the Topoisomerase II/DNA Cleavable Complex. *Molecular Pharmacology*, 53: 422-428.
- Garty G**, Chen Y, Salerno A, Turner H, Zhang J, Lyulko O, Bertucci A, Xu Y, Wang H, Simman N, Randers-Pehrson G, Yao YL, Amundson SA, Brenner DJ. 2010. The RABIT: A rapid automated biodosimetry tool for radiological triage. *Health Physics*, 98(2): 209-217.
- Gatica-Porcayo G**. 2018. La letal omnipresencia de los plaguicidas en México. Agencia informativa CONACYT. En: <http://conacytprensa.mx/index.php/ciencia/ambiente/20912-letal-omnipresencia-plaguicidas-mexico> (consultado en noviembre de 2018).
- Genesis R**, Fontana P, Mormile A, Casertano A, Falco M, Conti A, Franzese A, Mozzillo E, Nitsch L, Melis D. 2015. Constitutional chromothripsis involving the critical region of 9q21.13 microdeletion syndrome. *Cytogenetics*, 2015: 8-96. DOI 10.1186/s13039-015-0199-3

- Ghezraoui H**, Piganeau M, Renouf B, Renaud JB, Sallmyr A, Ruis B, Oh S, Tomkinson AE, Hendrickson EA, Giovannangeli C, Jasin M, Brunet E. 2014. Chromosomal Translocations in Human Cells Are Generated by Canonical Nonhomologous End-Joining. *Molecular Cell*, 55: 829-842.
- Gill-Super HJ**, Rothberg PG, Kobayashi H, Freeman AI, Díaz MO, Rowley JD. 1994. Clonal, Nonconstitutional Rearrangements of the *MLL* Gene in Infants Twins With Acute Lymphoblastic Leukemia: In Utero Chromosome Rearrangement of 11q23. *Blood*, 83(3): 641-644.
- Gómez-Arroyo S**, Calderón-Segura ME, Villalobos-Petrini R. 1995. Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26: 324-330.
- Gómez-Arroyo S**, Díaz-Sánchez Y, Meneses-Pérez MA, Villalobos-Pietrini R, De León-Rodríguez J. 2000. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research*, 466: 117-124.
- Gonzalez-Cid M**, Loria D, Matos E. 1990. Genotoxicity of the pesticide propoxur and its nitroso derivative, NO-propoxur, on human lymphocytes *in vitro*. *Mutation Research*, 232: 45-48.
- González-Mille DJ**, Ilizaliturri-Hernández CA, Espinosa-Reyes G, Costilla-Salazar R. 2010. Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Ecotoxicology*, 19: 1238-1248.
- Graillot V**, Takakura N, Le Hegart K, Fessard V, Audebert M, Cravedi JP. 2012a. Genotoxicity of Pesticide Mixtures Present in the Diet of the French Population. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53: 173-184.
- Graillot V**, Tomasetig F, Cravedi JP, Audebert M. 2012b. Evidence of the *in vitro* genotoxicity of methylpyrazole pesticides in human cells. *Mutation Research*, 748: 8-16.
- Greaves M**. 2002. Science, medicine, and the future: Childhood leukaemia. *British Medical Journal*. 324: 283-287.
- Greaves MF**, Wiemels J. 2003. Origins of chromosome translocations in childhood leukemia. *Nature Reviews. Cancer*, 3(9); 639-649.
- Greaves M**. 2005. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Human Development*, 81: 123-129.
- Haim N**, Roman J, Nemeč J, Sinha BK. 1986. Peroxidative free radical formation and O-demethylation of etoposide(VP-16) and teniposide(VM-26). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 135(1): 215-220.
- Harada A**, Matsuzaki K, Takeiri A, Mishima M. 2014. The predominant role of apoptosis in γ H2AX formation induced by aneugens is useful for distinguishing aneugens from clastogens. *Mutation Research*, 771: 23-29.
- Hattori A**, Okamura K, Terada Y, Tanaka R, Katoh-Fukui Y, Matsubara Y, Matsubara K, Kagami M, Horikawa R, Fukami M. 2019. Transient multifocal genomic crisis creating chromothriptic and non-chromothriptic rearrangements in prezygotic testicular germ cells. *BMC Medical Genomics*, 12:77. doi: 10.1186/s12920-019-0526-3.
- Heacock H**, Hertzman C, Demers PA, Gallagher R, Hogg RS, Tschke K, Hershler R, Bajdik CD, Dimish-Ward H, Marion SA, Ostry A, Kelly S. 2000. Childhood cancer in the offspring of male sawmill workers occupationally exposed to chlorophenyl fungicides. *Environmental Health Perspectives*, 108: 499-503.

- Hershman JM**, France B, Hon K, Damoiseaux R. 2017. Direct Quantification of Gamma H2AX by Cell-Based High Throughput Screening for Evaluation of Genotoxicity of Pesticides in a Human Thyroid Cell Line. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58: 522-528.
- Hjalgrim LL**, Madsen HO, Melbye M, Jorgensen P, Christiansen M, Andersen MT, Pallisgaard N, Hokland P, Clausen N, Ryder LP, Schmiegelow K, Hjalgrim H. 2002. Presence of clone-specific markers at birth in children with acute lymphoblastic leukemia. *British Journal of Cancer*, 87: 994-999.
- Hromas R**, Williamson E, Lee SH, Nickoloff J. 2016. Preventing the chromosomal translocations that cause cancer. *Translocations of the American Clinical and Climatological Association*, 127: 176-195.
- Hukkanen J**, Hakkola J, Anttila S, Piipari R, Karjalainen A, Pelkonen O, Raunio H. 1997. Detection of RNA Encoding Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450s in Human Bronchoalveolar Macrophages and Peripheral Blood Lymphocytes. *Molecular Carcinogenesis*, 20: 224-230.
- Iliakis G**, Murmann T, Soni A. 2015. Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutation Research*, 793: 166-175.
- Infante-Rivard C**, Labuda D, Krajcinovic M, Sinnet D. 1999. Risk of Childhood Leukemia Associated with Exposure to Pesticides and with Gene Polymorphism. *Epidemiology*, 10(5): 481-487.
- Infante-Rivard C**, Weichenthal S. 2007. Pesticides and childhood cancer: an update of Zahm and Ward's 1998 review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, part B*, 10: 81-99.
- [**IPCS-INCHEM**]. 1994. International Programme on Chemical Safety Glyphosate. EHC, 159. International Programme on Chemical Safety. En: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>
- [**IRAC**] Insecticide Resistance Action Committee. 2015. Clasificación del Modo de Acción de Insecticidas y Acaricidas IRAC. Comité de Acción contra la Resistencia a Insecticidas España. En: <https://www.irac-online.org/>
- Jacobson-Kram D**, Keller KA (Eds.) 2001. *Toxicology Testing Handbook*. Marcel Dekker, Inc. Estados Unidos, 428 pp.
- Jones LK**, Neat MJ, van Delft FW, Mitchell MP, Adamaki M, Stoneham SJ, Patel N, Saha V. 2003. Cryptic rearrangement involving *MLL* and *AF10* occurring *in utero*. *Leukemia*, 17: 1667-1669.
- Jones MJK**, Jallepalli PV. 2012. Chromothripsis: Chromosomes in Crisis. *Developmental Cell*, 23: 908-917.
- Kagan VE**, Yalowich JC, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Thampatty P, Fabisiak JP. 1999. Mechanism-Based Chemopreventive Strategies Against Etoposide-Induced Acute Myeloid Leukemia: Free Radical/Antioxidant Approach. *Molecular Pharmacology*, 56: 494-506.
- Kanaar R**, Hoeijmaekers JHJ, van Gent DC. 1998. Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends in Cell Biology*, 8: 483-489.
- Kaur G**, Gupta R, Mathur N, RAani L, Kumar L, Sharma A, Singh V, Gupta A, Sharma OD. 2019. Clinical impact of chromothriptic complex chromosomal rearrangements in newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia Research*, 76: 58-64.
- Kawanishi M**, Watanabe T, Hagio S, Ogo S, Shimohara C, Jouchi R, Takayama S, Hasei T, Hirayama T, Oda Y, Yagi T. 2009. Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[a]pyrene, a novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Mutagenesis*, 24(3): 279-284.
- Khanna KK**, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27: 247-254.

- Kersey JH.** 1997. Fifty Years of Studies of the Biology and Therapy of Childhood Leukemia. *Blood*, 90 (11): 4243-4251.
- Kim AS,** Eastmond DA, Preston RJ. 2006. Childhood acute lymphoblastic leukemia and perspectives on risk assessment of early-life stage exposures. *Mutation Research*, 613: 138-160.
- Kim KH,** Kabir E, Jahan SA. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 575: 525-535.
- Kim S,** Jun DH, Kim HJ, Jeong KC, Lee CH. 2011. Development of a High-Content Screening Method for Chemicals Modulating DNA Damage Response. *Journal of Biomolecular Screening*, 16: 259-265.
- Kinashi Y,** Takahashi S, Kashino G, Okayasu R, Masunag S, Suzuki M, Ono K. 2011. DNA double-strand break induction in Ku80-deficient CHO cells following Boron Neutron Capture Reaction. *Radiation Oncology*, 6:106. doi: 10.1186/1748-717X-6-106.
- Koller VJ,** Fürhacker M, Nersesyan A, Misik M, Eisenbauer M, Knasmueller S. 2012. Cytotoxic And DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Archives of Toxicology*, 86: 805-813.
- Kurtas NE,** Xumerle L, Giussani U, Pansa A, Cardarelli L, Bertini V, Valetto A, Liehr T, Bonaglia MC, Errichiello E, Delledonne M, Zuffardi O. 2018. Insertional translocation involving an additional nonchromothriptic chromosome in constitutional chromothripsis: Rule or exception? *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7(2):e00496. doi: 10.1002/mmg3.496.
- LaFiura KM,** Bielawski DM, Posecion NC Jr, Ostrea EM Jr, Matherly LH, Taub JW, Ge Y. 2007. Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associate t(8;21). *Pediatric Blood & Cancer*, 49: 624-628.
- Leiss JK,** Savitz DA. 1995. Home Pesticide Cancer: A Case-Control Study. *American Journal of Public Health*, 85(2); 249-252.
- Lin CM,** Wei LY, Wang TC. 2007. The delayed genotoxic effect of N-nitroso N -propoxur insecticide in mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 928-934.
- Lindberg HK,** Wang X, Järventaus H, Falck GCM, Norppa H, Fenech M. 2007. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research*, 617: 33-45.
- Lovett BD,** Lo Nigro L, Rappaport EF, Blair IA, Osheroff N, Zheng N, Megonigal MD, Williams W, Nowell PC, Felix CA. 2001a. Near-precise interchromosomal recombination and functional DNA topoisomerase II cleavage sites at MLL and AF-4 genomic breakpoints in treatment-related acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) translocation. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17): 9802-9807.
- Lovett BD,** Strumberg D, Blair IA, Pang S, Burden DA, Megonigal MD, Rappaport EF, Rebbeck TR, Osheroff N, Pommier YG, Felix CA. 2001b. Etoposide Metabolites Enhance DNA Topoisomerase II Cleavage near Leukemia-Associated *MLL* Translocation Breakpoints. *Biochemistry*, 40: 1159-1170.
- Luijten MNH,** Lee JXT, Crasta KC. 2018. Mutational game changer: Chromothripsis and its emerging relevance to cancer. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 777: 29-51.
- Luo Q,** Yang J, Zeng QL, Zhu XM, Qian YL, Huang HF. 2006. 50-Hertz Electromagnetic Fields Induce gammaH2AX Foci Formation in Mouse Preimplantation Embryos In Vitro. *Biology of Reproduction*, 75: 673-680.
- Ly P,** Cleveland DW. 2017. After Catastrophe: Emerging Mechanisms of Chromothripsis. *Trends in Cell Biology*, 27(12): 917-930.

- Ly P**, Brunner SF, Shoshani O, Kim DH, Lan W, Pyntikova T, Flanagan AM, Behjati S, Page DC, Campbel PJ, Cleveland DW. 2019. Chromosome segregation errors generate a diverse spectrum of simple and complex genomic rearrangements. *Nature Genetics*, 51: 705-715.
- Ma X**, Buffler PA, Gunier RB, Dahl G, Smith MT, Reinier K, Reynolds P. 2002. Critical windows of exposure to household pesticides and risk of childhood leukemia. *Environmental Health Perspectives*, 110(9): 955-960.
- Mahmoud HH**, Ridge SA, Behm FG, Pui CH, Ford AM, Raimondi SC, Greaves MF. 1995. Intrauterine Monoclonal Origin of Neonatal Concordant Acute Lymphoblastic Leukemia in Monozygotic Twins. *Medical and Pediatric Oncology*, 24: 77-81.
- Maia AT**, Ford AM, Jalali GR, Harrison CJ, Taylor GM, Eden OB, Greaves MF. 2001. Molecular tracking of leukemogenesis in a triplet pregnancy. *Blood*, 98: 478-782.
- Maia AT**, Koechling J, Corbett R, Metzler M, Wiemels JL, Greaves M. 2004. Protracted Postnatal Natural Histories in Childhood Leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 39: 335-340
- Mansfield AS**, Peikert T, Smadbeck JB, Udell JBM, Garcia-Rivera E, Elsbernd L, Erskine CK, Van Keulen VP, Kosari F, Murphy SJ, Ren H, Serla VV, Schaefer Klein JL, Karagouga G, Harris FR, Sosa C, Johnson SH, et al. 2018. Neoantigenic Potential of Complex Chromosomal Rearrangements in Mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(2): 276-287.
- Mañas F**, Peralta L, Raviolo J, García-Ovando H, Weyers A, Ugnia L, Gonzalez-Cid M, Larripa I, Gorla N. 2009. Genotoxicity of glyphosate assessed by comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28: 37-41.
- Mañas F**, Peralta L, Raviolo J, García-Ovando H, Weyers A, Ugnia L, Gonzalez-Cid M, Larripa I, Gorla N. 2008. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 834-837.
- Martínez-Paz P**, Morales M, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2013. Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutation Research*, 758: 41-47.
- Martínez-Valenzuela C**, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Waliszewski S, Calderón-Segura ME, Félix-Gastélum R, Álvarez-Torres A. 2009. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environment International*, 35: 1155-1159.
- Mattsson A**, Lundstedt S, Stenus U. 2009. Exposure of HepG2 Cells to Low Levels of PAH-Containing Extracts from Contaminated Soils Results in Unpredictable Genotoxic Stress Responses. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 59: 337-348.
- McHale CM**, Wiemels JL, Zhang L, Ma X, Buffler PA, Guo W, Loh ML, Smith MT. 2003a. Prenatal Origin of TEL-AML1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in Children Born in California. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 37: 36-43.
- McHale CM**, Wiemels JL, Zhang L, Ma X, Buffler PA, Feusner J, Matthay K, Dahl G, Smith MT. 2003b. Prenatal origin of childhood acute myeloid leukemias harboring chromosomal rearrangements t(15;17) and inv(16). *Blood*, 101(11): 4640-4641.
- Mecdad AA**, Ahmed MH, ElHalwagy MEA, Afify MMM. 2011. A study on oxidative stress biomarkers and immunomodulatory effects of pesticides in pesticide-sprayers. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 1: 93-98.

- Meinert R**, Schüz J, Kaletsch U, Kaatsch P, Michaelis J. 2000. Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma in Childhood and Exposure to Pesticides: Results of a Register-based Case-Control Study in Germany. *American Journal of Epidemiology*, 151(7): 639-646.
- Megonigal MD**, Rappaport EF, Jones DH, Williams TM, Lovett BD, Kelly KM, Lerou PH, Moulton T, Budarf ML, Felix CA. 1998. t(11;22) (q23;q11.2) in acute myeloid leukemia of infants twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 6413-6418.
- Menegaux F**, Baruchel A, Bertrand Y, Lescoeur B, Leverger G, Nelken B, Sommelet D, Hémon D, Clavel J. 2006. Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukemia. *Occupational & Environmental Medicine*, 63: 131-134.
- Middlemore-Risher ML**, Adam BL, Lambert NA, Terry AV. 2011. Effects of chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon on the dynamics and movement of mitochondria in rat cortical neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339: 341-379.
- [MSP] Ministerio de Salud Pública. Intoxicación aguda por plaguicidas. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social - Dirección General de Epidemiología de República Dominicana. En: <http://www.pic.int/Portals/5/download.aspx?d=UNEP-FAO-RC-SHPF-DominicanRep-AnexoIV-28112013.Sp.pdf> (consultado en noviembre de 2018).
- Mladinic M**, Berend S, Vrdoljak AL, Kopjar N, Radic B, Zeljezic. 2009. Evaluation of Genome Damage and Its Relation to Oxidative Stress Induced by Glyphosate in Human Lymphocytes in Vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50: 800-807.
- Mondal NK**, Mukherjee B, Das D, Ray MR. 2010. Micronucleus formation, DNA damage and repair in premenopausal women chronically exposed to high level of indoor air pollution from biomass fuel use in rural india. *Mutation Research*, 697: 47-54.
- Monroy CM**, Cortés AC, Sicard DM, de Restrepo HG. 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas *in vitro* a glifosato. *Biomédica*, 25: 335-345.
- Montecucco A**, Zanetta F, Biamonti G. 2015. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI Journal*, 14: 95-108 – ISSN 1611-2156.
- Moreno-Grau MD**. 2003. *Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgo para la Salud Humana*. McGraw-Hill/Interamericana de España. España, 370 pp.
- Mosesso P**, Pepe G, Ottavianelli A, Schinoppi A, Cinelli S. 2015. Cytogenetic evidence that DNA topoisomerase II is not involved in radiation induced chromosome-type aberrations. *Mutation Research*, 793: 14-18.
- Moquet J**, Barnard S, Rothkamm K. 2014. Gamma-H2AX biodosimetry for use in large scale radiation incidents: comparison of a rapid '96 well lyse/fix' protocol with a routine method. *PeerJ*, 2:e282. doi: 10.7717/peerj.282.
- Muslimovic A**, Nyström S, Gao Y, Hammarsten O. 2009. Numerical Analysis of Etoposide Induced DNA Breaks. *PLoS ONE*, 4 (6): 1-10.
- Nazaryan-Petersen L**, Oliveira IR, Mehrjoy MM, Mendez JMM, Bak M, Bugge M, Kalscheuer VM, Bache I, Hancks DC, Tommerup N. 2019. Multigenic truncation of the semaphoring-plexin pathway by a germline chromothriptic rearrangement associated with Moebius syndrome. *Human Mutation*, 2019:1-6. doi: 10.1002/humu23775.

- Newell F**, Patel K, Gartside M, Krause L, Brosda S, Aoude LG, Loffler KA, Bonazzi VF, Patch AM, Kazakoff SH, Holmes O, Xu Q, Wood S, Leonard C, Lampe G, Lord RV, Whiteman DC, Pearson JV, Nones K, Waddell N, Barbour AP. 2019. Complex structural rearrangements are present in high-grade dysplastic Barrett's oesophagus samples. *BMC Medical Genomics*, 12(1):31. doi: 10.1186/s12920-019-0476-9.
- Nishio A**, Uyeki EM. 1981. Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by organophosphate insecticides and their oxygen analogs. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 8(5-6): 939-946.
- Nitiss JL**. 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews*, 9: 338-350.
- Norppa H**. 2001. Genetic polymorphisms and chromosome damage. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 204: 31-38.
- [OECD/OCDE] Organisation for Economic Co-operation and Development. 2010. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Test Guidelines for the Chemicals. En: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>
- Olsen B**, Wang SY, Svenstrup TH, Chen BPC, Guerra B. 2012. Protein kinase CK2 localizes to sites of DNA double-strand breaks regulating the cellular response to DNA damage. *BMC Molecular Biology*, 13(7). En: <http://biomedcentral.com/1471-2199/13/7>
- Ortiz I**, Ávila-Chávez MA, Torres LG. 2014. Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 4 (1): 26-46.
- Paull TT**, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, 10: 886-895.
- Pelkonen O**, Raunio H. 1997. Metabolic Activation of Toxins: Tissue-specific Expression and Metabolism in Target Organs. *Environmental Health Perspectives*, 105(4): 767-774.
- Pettersson M**, Eisfeldt J, Lundberg ES, Lundin J, Lindstrand A. 2018. Flanking complex copy number variants in the same family formed through unequal crossing-over during meiosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis*, 812: 1-4.
- Pettersson-Roth E**, Reynolds M, Quievryn G, Zhitkovic A. 2005. Mismatch Repair Proteins Are Activators of Toxic Responses to Chromium-DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 25(9): 3596-3607.
- Prasad S**, Srivastava S, Singh M, Shukla Y. 2009. Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of swiss albino mice. *Journal of Toxicology* 2009:308985. doi: 10.1155/2009/308985.
- Pui CH**, Relling MV, Dorwning JR. 2004. Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 350(15): 1535-1548.
- Pui CH**, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. 2011. Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. *Journal of Clinical Oncology*, 29 (5): 551-565.
- Ramírez JA**, Lacasaña M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*, 4(2): 67-75.
- Ramírez-Jiménez R**, Mejía-Saucedo R, Calderón-Hernández J, Montero-Montoya R, Yáñez-Estrada L. 2014. Concentraciones urinarias de metabolitos de plaguicidas organofosforados en niños y adolescentes de una zona agrícola de México. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(4): 87-97. ISSN 2334-2501.
- Redon C**, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(2): 162-169.

- Redon CE**, Weyemi U, Parekh PR, Huang D, Burrell AS, Bonner WM. 2012. γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(7): 743-756.
- Rodríguez-López AG**. 2015. Alteraciones en el ciclo menstrual de adolescentes expuestas no ocupacionalmente a una mezcla de plaguicidas de una zona agrícola de San Luis Potosí. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biomédicas Básicas, Facultad de Medicina, UASLP.
- Rogakou EP**, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10): 5858-5868.
- Rojas-García AE**, Sordo M, Vega L, Quintanilla-Vega B, Solis-Heredia M, Ostrosky-Wegman P. 2009. The role of paraoxonase polymorphisms in the induction of micronucleus in paraoxon-treated human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50: 823-829.
- Rothkamm K**, Krüger I, Thormpson LH, Löbrich M. 2003. Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16): 5706-5715.
- Rothkamm K**, Löbrich M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *PNAS*, 100(9): 5057-5062.
- Rothkamm K**, Horn S. 2009. γ -H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità*, 45(3): 265-271.
- Salehi M**, Jafari M, Saleh-Moqadam M, Asgari A. 2012. The Comparison of the Effect of Diazinon and Paraoxon on Biomarkers of Oxidative Stress in Rat Serum. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 14(3): 18-23.
- Samsel A**, Seneff S. 2015. Glyphosate, pathways to modern diseases III: manganese, neurological diseases, and associated pathologies. *Surgical Neurology International*, 6:45. doi:10.4103/2152-7806.153876.
- Santovito A**, Ruberto S, Gendusa C, Cervella P. 2018. In Vitro evaluation of genomic damage induced by glyphosate on human lymphocytes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 34693-34700.
- Scarpato R**, Verola C, Fabiani B, Bianchi V, Saggese G, Federico G. 2011. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the γ -H2AX focus assay and micronucleus test. *The FASEB Journal*, 25: 685-693.
- Scarpato R**, Castagna S, Aliotta R, Azzarà A, Ghetti F, Filomeni E, Giovannini C, Pirillo C, Testi S, Lombardi S, Tomei A. 2013. Kinetics of nuclear phosphorylation (γ -H2AX) in human lymphocytes treated *in vitro* with UVB, bleomycin and mitomycin C. *Mutagenesis*, 28(4):465-473.
- Seiter K**, Feldman EJ, Sreekantaiah C, Pozzuoli M, Wisberger J, Liu D, Papageorgio C, Weiss M, Kancherla R, Ahmed T. 2001. Secondary acute myelogenous leukemia and myelodysplasia without abnormalities of chromosome 11q23 following treatment of acute leukemia with topoisomerase II-based chemotherapy. *Lukemia*, 15: 963-970.
- Shelke S**, Das B. 2015. Dose response and adaptive response of non-homologous end joining repair genes and proteins in resting human peripheral blood mononuclear cells exposed to gamma radiation. *Mutagenesis*, 30(3): 365-379.
- Shimizu N**, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM. 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology*, 140: 1307-1320.
- Shrivastav M**, De Haro LP, Nickoloff JA. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*, 18: 134-147.

- Shu XO**, Gao YT, Brinton LA, Linet MS, Tu JT, Zheng W, Fraumeni JF. 1988. A Population-Based Case-Control Study of Childhood Leukemia in Shanghai. *Cancer*, 62: 635-644.
- Siviková K**, Dianovsky J. 2006. Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209: 15-20.
- Smart DJ**, Halicka HD, Schmuck G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Williams GM. 2008. Assessment of DNA double-strand breaks and γ H2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. *Mutation Research*, 641: 43-47.
- Sobti RC**, Krishan A, Pfaffenberg CD. 1982. Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells in vitro: organophosphates*. *Mutation Research*, 102: 89-102.
- Soni A**, Siemann M, Pantelias GE, Iliakis G. 2015. Marked contribution of alternative end-joining to chromosome-translocation-formation by stochastically induced DNA double-strand-breaks in G₂-phase human cells. *Mutation Research*, 793: 2-8.
- Steininger A**, Ebert G, Becker BV, Assaf C, Möbs M, Schmidt CA, Grabarczyk P, Jensen LR, Przybylski GK, Port M, Kuss AW, Ullmann R. 2018. Genome-Wide Analysis of Interchromosomal Interaction Probabilities Reveals Chained Translocations and Overrepresentation of Translocations Breakpoints in Genes in a Cutaneous T-Cell Lymphoma Cell Line. *Frontiers in Oncology*, 8:183. doi: 10.3389/fonc.2018.00183.
- Stephens PJ**, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau Kw, Beare D, Stebbing LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ y cols. 2011. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell*, 144: 27-40.
- Suárez-Larios K**. 2012. Evaluación de la presencia de las translocaciones MLL-AF4, TEL-AML1 y AML1-ETO en recién nacidos y sus madres expuestos a plaguicidas organoclorados. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas, Posgrado de Ciencias Biológicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 104 pp.
- Suárez-Larios K**, Salazar-Martínez AM, Montero-Montoya R. 2017. Screening of Pesticides with the Potential of Inducing DSB and Successive Recombinational Repair. *Journal of Toxicology*, 2017: ID 3574840. doi: 10.1155/2017/3574840.
- Teuffel O**, Betts DR, Dettling M, Schaub R, Schäfer BW, Niggli FK. 2004. Prenatal origin of separate evolution of leukemia in identical twins. *Leukemia*, 18: 1624-1629.
- The Nobel Prize**. 2019. MLA style: Paul Müller – Facts. NobelPrice.org. Nobel Media AB. En: <http://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1948/muller/facts/>
- Tisch M**, Schemerzer P, Faulde M, Groh A. 2002. Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 259: 150-153.
- Tisch M**, Faulde MK, Maier H. 2005. Genotoxic effects of pentachlorophenol, lindane, transfluthrin, cyfluthrin, and natural pyrethrum on human mucosal cells of the inferior and middle nasal conchae. *American Journal of Rhinology*, 19(2): 141-151.
- Toulany M**, Lee KJ, Fattah KR, Lin YF, Fehrenbacher B, Schaller M, Chen BP, Chen DJ, Rodemann HP. 2012. Akt Promotes Post-Irradiation Survival of Human Tumor Cells through Initiation, Progression, and Termination of DNA-PKcs-Dependent DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular Cancer Research*, 10(7): 945-957.
- Townsend M**, Peck C, Meng W, Heaton M, Robison R, O'Neill K. 2017. Evaluation of various glyphosate concentrations on DNA damage in human Raji cells and its impact on cytotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 85:79-85.

- [TOXNET] Toxicology Data Network. Portal de consulta de bases de datos para compuestos químicos. En: <https://toxnet.nlm.nih.gov/> (consultado en mayo de 2019).
- Toyooka T**, Ibuki Y. 2005. Coexposure to benzo[a]pyrene and UVA induces phosphorylation of histone H2AX. *FEBS Letters*, 579: 6338-6342.
- Toyooka T**, Ibuki Y. 2006. New Method for Testing Phototoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*, 40: 3603-3608.
- Toyooka T**, Ibuki Y. 2009. Cigarette sidestream smoke induces phosphorylated histone H2AX. *Mutation Research*, 676: 34-40.
- Toyooka T**, Ishihama M, Ibuki Y. 2011. Phosphorylation of Histone H2AX Is a Powerful Tool for Detecting Chemical Photogenotoxicity. *Journal of Investigate Dermatology*, 131: 1313-1321.
- Tuna M**, Amos CI, Mills GB. 2019. Molecular mechanisms and pathobiology of oncogenic fusion transcripts in epithelial tumors. *Oncotarget*, 10: 2095-2111.
- Türkez H**, Togar B. 2011. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract counteracts genotoxicity and oxidative stress of permethrin in human lymphocytes. *The Journal of Toxicological Sciences*, 35(5): 531-537.
- Uematsu N**, Weterings E, Yano K, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, Mari PO, van Gent DC, Chen BPC, Chen DJ. 2007. Autophosphorylation of DNA-PK ϵ s regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *The Journal of Cell Biology*, 177(2): 219-229.
- Ündeger U**, Basaran N. 2005. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology*, 79: 169-176.
- Wang TC**, Chiou JM, Chang YL, Hu MC. 1998. Genotoxicity of propoxur and its N-nitroso derivate in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 19(4): 623-629.
- Watters GP**, Smart DJ, Harvey JS, Austin CA. 2009. H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutation Research*, 679: 50-58.
- Wiemels JL**, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. 1999a. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukemia in children. *Lancet*, 354: 1499-1503.
- Wiemels JL**, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. 1999b. Protracted and Variable Latency of Acute Lymphoblastic Leukemia After TEL-AML1 Gene Fusion in Utero. *Blood*, 94(3): 1057-1062.
- Wiemels JL**, Leonard BC, Wang Y, Segal MR, Hunger SP, Smith MT, Crouse V, Ma X, Buffler PA, Pine SR. 2002a. Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy*, 99(23): 15101-15106.
- Wiemels JL**, Xiao Z, Buffler PA, Maia AT, Ma X, Dicks BM, Smith MT, Zhang L, Feuser J, Wiencke J, Pritchard-Jones K, Kempfski H, Greaves M. 2002b. In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*, 99: 3801-3805.
- [WHO] World Health Organization. 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009. 78 pp.
- [WHO] World Health Organization. Health Topics. En: <https://www.who.int/topics/pesticides/en/> (consultado en agosto de 2016).
- [WHO] World Health Organization. 2018. Pesticide Residues in food. En: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food> (consultado en enero de 2019).
- Wozniak E**, Sicinska P, Michalowicz J, Wozniak K, Reszka E, Huras B, Zakrzewski J, Bukowska B. 2018. The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human

peripheral blood mononuclear cells – genotoxic risk assesement. Food and Chemical Toxicology, 120: 510-522.

Yáñez-Estrada L, Ramírez-Jiménez MR, Rodríguez-Agudelo Y, Calderón-Hernández J, Ramos-Ruiz E. 2018. Evaluación de las alteraciones en el desempeño cognitivo de niños mexicanos expuestos a plaguicidas organofosforados. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, Especial sobre Contaminación y Toxicología por Plaguicidas II, 34: 9-23.

Zhang Y, Rowley JD. 2006. Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. DNA Repair, 5: 1282-1297.

Zhuo X, Zheng N, Felix CA, Blair IA. 2004. Kinetics and regulation of cytochrome P450-mediated etoposide metabolism. Drug Metabolism and Disposition, 32(9): 993-1000.

Zwicker F, Swartman B, Sterzing F, Major G, Webe3r KJ, Huber PE, Thieke C, Debus J, Herfarth K. 2011. Biological in-vivo measurement of dose distribution in patients' lymphocytes by gamma-H2AX immunofluorescence staining: 3D conformal- vs. step-and-shoot IMRT of the prostate gland. Radiation Oncology, 6:62. En: <http://www.ro-journal.com/content/6/1/62>.

ANEXOS

Anexo 1.

Artículo para obtención de Grado:

“Screening of Pesticides with the Potential of Inducing DSB and Successive Recombinational Repair”.

Research Article

Screening of Pesticides with the Potential of Inducing DSB and Successive Recombinational Repair

Karen Suárez-Larios, Ana-María Salazar-Martínez, and Regina Montero-Montoya

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Regina Montero-Montoya; dorinda@unam.mx

Received 11 May 2017; Revised 5 August 2017; Accepted 15 August 2017; Published 10 October 2017

Academic Editor: Orish Ebere Orisakwe

Copyright © 2017 Karen Suárez-Larios et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

A study was realized to ascertain whether eight selected pesticides would induce double strand breaks (DSB) in lymphocyte cultures and whether this damage would induce greater levels of proteins Rad51 participating in homologous recombination or of p-Ku80 participating in nonhomologous end joining. Only five pesticides were found to induce DSB of which only glyphosate and paraoxon induced a significant increase of p-Ku80 protein, indicating that nonhomologous end joining recombinational DNA repair system would be activated. The type of gamma-H2AX foci observed was comparable to that induced by etoposide at similar concentrations. These results are of importance since these effects occurred at low concentrations in the micromolar range, in acute treatments to the cells. Effects over longer exposures in actual environmental settings are expected to produce cumulative damage if repeated events of recombination take place over time.

1. Introduction

Pesticides constitute a heterogeneous group of chemicals, specifically synthesized to control plagues, weeds, and unwanted organisms of all kinds [1]. In 2016, the United States Environmental Protection Agency [2] had about 1,140 active ingredients registered, both organic or inorganic [3]. The authorized organic pesticides include several chemical groups or families [4]. They started being used by the year 1948 in Mexico with DDT and other organochlorides, followed by organophosphates, carbamates, pyrethroids, and herbicides like paraquat and 2,4-D [5].

These compounds are of wide spectrum and show varying degrees of toxicity, not only for target species, but to others, unintendedly, including humans [6]. In agriculture, pesticides are typically applied in mixtures and exposure to these compounds has been associated with chronic adverse health effects including neurological (cognitive problems and Parkinson disease), reproductive, respiratory (asthma), metabolic (diabetes and obesity), and developmental problems and cancer [3, 6], particularly infant and childhood leukemia [7–9] in relation to which they have been described as

promoters [8, 10] since many of them do not induce genetic damage. Genotoxic effects, however, have been documented in ecotoxicological [11] and epidemiological studies [12–16], in animal models [17–20], as well as *in vitro* [21–32]. Biomarkers identified include sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, micronuclei, and DNA breaks observed in the comet assay. Furthermore, there are studies suggesting that pesticides produce translocations associated with childhood leukemia [33–35]. So, it is possible that some of these compounds may induce reciprocal translocations which have been identified in relation to certain subtypes of leukemia, such as t(4;11), t(8;21), and t(12;21) [10, 36].

These alterations can originate in double strand breaks (DSB) and the principal repair mechanisms for these lesions are the canonical nonhomologous end joining (c-NHEJ) and homologous recombination (HR) [37, 38]. It is known that ionizing radiation, benzene, and antineoplastic chemicals, identified as leukemogenic, induce this kind of damage [39–42]. As pesticides have been related to leukemia [8, 34], we wanted to ascertain whether they would induce these lesions that are the primary event in the formation of chromosomal translocations like the ones described [37].

The goal of the present study is to determine whether selected pesticides are capable of inducing DSB in an *in vitro* model and the recombinational pathway ensuing this damage.

2. Material and Methods

2.1. Donors. Healthy young male donors were asked to participate in the study which was explained to them and then were asked to donate 3 ml of blood. They were 21 to 35 years old, nonsmokers, and not alcoholics. Previously to donating the blood, they had not taken medication or were not subjected to radiation for medical purposes. Blood samples were taken with heparinized syringes (Monovette, Sarstedt).

2.2. Reagents. Pesticides endosulfan, glyphosate, pentachlorophenol, permethrin, propoxur, and paraoxon and the metabolites AMPA (aminomethylphosphonic acid, from glyphosate) and endosulfan lactone (from endosulfan) as well as etoposide were purchased to Sigma-Aldrich, Mexico (Table 1). DMSO was purchased from ATCC. The CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation reagent from PROMEGA was used to determine cytotoxicity. The high performance chemiluminescence film kit and the Amersham HyperFilm™ ECL film from GE Healthcare were used for the protein analysis.

2.3. Antibodies. Primary antibodies used were mouse anti-phospho-histone H2AX (Ser 139) and rabbit anti-Rad51 polyclonal antibody, purchased from Millipore; rabbit anti-Ku80 (phosphoT714) polyclonal antibody from Abcam; goat anti-Actin (1-19) polyclonal antibody from Santa Cruz. Secondary antibodies used were Alexa-Fluor 555 goat anti-mouse from Invitrogen, goat anti-rabbit IgG-HRP, goat anti-mouse IgG-HRP, and donkey anti-goat IgG-HRP from Santa Cruz. Mounting medium with DAPI was purchased from Vectashield.

2.4. Treatments to Evaluate Double Strand Breaks (DSB). Four serial dilutions of each pesticide or metabolite, as well for etoposide, were tested (Table 1). Treatments were done in duplicate as follows: 250 microliters of whole blood were placed in 2.25 ml of RPMI-1640 and treated with the corresponding compound and concentration for 1.5 h at 37°C, after which 3 ml of 0.075 M KCl was added and incubation was continued for 30 min. Lymphocytes were then fixed according to the protocol by Andrievski and Wilkins [43] with minor modifications; briefly, cells were recovered by centrifugation at 250g for 10 min at room temperature; the supernatant was removed and formaldehyde was added at a final concentration of 4%. Ten min later, 1 ml PBS with 0.12% Triton X-100 was added, and an incubation of 30 min was allowed at room temperature; thereafter the samples were washed with 1 ml cold PBS supplemented with 4% fetal bovine serum (FBS) and centrifuged for 8 min at 300g at 0°C. Supernatant was discarded and 1 ml of cold 50% methanol in PBS was added. The samples were left at -20°C all night. Tubes were then centrifuged at 300g for 8 min at 0°C, the supernatant

was discarded, 3 ml of cold methanol was added, and samples were kept at -20°C until analysis.

2.5. DSB Identification. Phosphorylated histone H2AX foci were detected by immunofluorescence under the microscope (Nikon Eclipse 80i). Staining of lymphocyte nuclei was done according to Watters et al. [44] with minor modifications. Slides were washed three times with PBS during 30 min and blocked with KCMT buffer with 12% FBS (120 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, and 0.2% Triton X-100) for 1 h at room temperature. Primary anti-phospho-histone H2AX (Ser139) diluted 1:200 in blocking solution was added and was left to incubate overnight at 4°C. Three washes with KCMT were done, 15 min each. Incubation with the secondary antibody was done: Alexa-Fluor 555 goat anti-mouse diluted 1:500 (in blocking solution) for 1 h at room temperature. The slides were washed as with the primary antibody and were rinsed in deionized water before mounting in DAPI mounting medium. They were analyzed for gamma-H2AX foci under a fluorescence microscope with the adequate filters.

Evaluation of foci was done in 2 slides per concentration. 50 cells were evaluated in three different regions per slide and foci were counted on them; in total 300 cells were evaluated per treatment. When a nucleus presented 1 or more foci, it was considered positive, according to Scarpato et al. [45]. The extent of DNA damage was classified in three categories: percentage of undamaged cells (without gamma-H2AX foci), with moderated damage (<10 gamma-H2AX foci) and with severe damage (>10 gamma-H2AX foci). Additionally, the damage was expressed as mean percentage of gamma-H2AX positive nuclei.

2.6. Cytotoxicity. Cytotoxicity was tested using The CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent form PROMEGA and following the general protocol suggested by the manufacturer. Mononuclear cells were isolated from blood using Histopaque-1077 (Sigma). Cells were plated in 96-well plates, 100,000 cells per well, and treated with the compounds, each concentration in triplicate. Treatment took place during 1.5 h at 37°C, after which the reagent was added and incubated for 3 h at 37°C and absorbance at 490 nm was recorded using a 96-well plate reader (Synergy H4 Hybrid, Biotek). The percentage of survival for each treatment was calculated using the following formula: (Abs490 nm of treatment/Abs490 nm of negative control) × 100.

2.7. Western Blot Analysis of Proteins Participating in DNA Recombination. This analysis was done only with compounds that induced gamma-H2AX foci (Table 1). Three serial concentrations were tested in duplicate. Mononuclear cells were isolated with Histopaque-1077. Treatments were applied to cells resuspended in 1 ml RPMI-1640 (500,000 cells per tube) during 1.5 h at 37°C, after which cells were centrifuged at 3000g for 5 min at 4°C. The supernatant was discarded and 600 microliters of 10% 0.5 M sodium azide in PBS was added and vortexed. Centrifugation was done again, the supernatant was discarded, and the cell pellets were kept at -70°C until

TABLE 1: Treatments applied for DSB and protein studies.

Compound	Concentrations (μM)		CAS number
	DNA damage	Protein studies	
Endosulfan	0, 0.01, 0.08, 0.4, 2	—	115-29-7
Glyphosate*	0, 0.4, 2, 10, 50	1.25, 2.5, 5	1071-83-6
Pentachlorophenol*	0, 0.03, 0.15, 0.75, 3.75	0.2, 1, 5	87-86-5
Permethrin*	0, 8, 40, 200, 1000	8, 40, 200	52645-53-1
Propoxur	0, 0.24, 0.48, 0.96, 1.44	—	114-26-1
AMPA	0, 40, 200, 1000, 5000	—	1066-51-9
Endosulfan lactone*	0, 0.08, 0.4, 2, 10	0.017, 0.05, 0.15	3868-61-9
Paraoxon*	0, 0.2, 1, 5, 25	1, 5, 25	311-45-5
Etoposide*	0, 0.4, 2, 10, 50 ³	10, positive control	33419-42-0

*These compounds were used for protein studies; ³50 microM was used as positive control with each pesticide.

used. Two separated experiments were made per compound, with two donors each time.

2.7.1. Protein Extraction and Quantification. RIPA lysis solution containing phosphatase and protease inhibitors was added to each cell pellet. Samples were then sonicated with one pulse, incubated in ice for 15 min, and centrifuged at 13,800g for 15 min. The supernatant was recovered in a 0.5 ml tube. Five microliters of each sample was placed in a 96-well plate for protein quantification. The Lowry assay was performed with the DC Protein Assay kit (Bio-Rad); the plate was agitated in the dark for 15 min at room temperature. The concentration was then determined in a plate reader (VersaMax Tunable) at 750 nm. The samples were then stored at -70°C until use.

2.7.2. Electrophoresis and Transfer. Phosphorylated Ku80 (phospho-T714) and Rad51 were the proteins evaluated. Beta-actin was used as internal control. 35 micrograms of total protein was separated in a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (0.45 micrometers, GE-Healthcare) with a Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). The membrane was incubated with blocking solution (2% blotting-grade blocker milk in TBS) at 4°C overnight and gentle agitation. Two washes were then made with TBS-1% Tween, 10 min each, and one with TBS for 5 min. The membrane was cut at the appropriate level and incubation with each primary antibody was separately set at 4°C overnight with gentle agitation: rabbit anti-Rad51 (1:500 in blocking solution) or rabbit anti-phosphorylated Ku80 (p-Ku80) (1:1000 in blocking solution). Incubation with primary antibody goat anti-actin (1:1000 in blocking solution) was done at 28°C for 1 hr. Membranes were then washed with TBS-1% Tween three times, 10 min each, and with TBS for 5 min at room temperature. Incubation with the secondary antibody was done: goat anti-rabbit IgG-HRP 1:3000 (in blocking solution) for the first two antibodies and donkey anti-goat IgG-HRP 1:3000 (in blocking solution) for the latter, for 1 h at 28°C and agitation. Rinsing was made as with the primary antibodies, and the membranes were exposed and revealed with a luminescence kit (GE Healthcare). Acquisition of optical densities was done with Quantity One

software (Bio-Rad), version 4.1.1. Values obtained for each protein (Rad51 or p-Ku80) were normalized with respect to beta-actin and the mean of normalized negative controls; results are presented as the % with respect to normalized negative controls [46]. Two membranes were done per separated experiment with each compound tested; that is, four data items were obtained for each concentration of the compounds analyzed.

2.8. Statistical Analyses. Statistical calculations were realized with the GraphPad Prism 6 software package: results for gamma-H2AX foci and optical density from western blot were evaluated with the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison as a post hoc test; the value of etoposide as a positive control at the concentration of 50 microM was analyzed with Mann-Whitney U test with respect to the negative control, establishing a p value for significance of <0.05 for all tests. Cytotoxic effect of treatments was analyzed with linear regressions, establishing a p value for significance of <0.05 .

3. Results

3.1. DSB Identification. Among the compounds tested, four showed a significant effect on the number of cells with DSB (Table 2), whereas endosulfan, propoxur, and AMPA showed no effect on this parameter. Pentachlorophenol had a hormetic behavior, inducing gamma-H2AX foci in the lowest concentrations, whereas the effect diminished in the highest (Table 2). As explained in Material and Methods, three categories of nuclei with foci were enumerated: (1) without gamma-H2AX foci, (2) with one to ten foci, and (3) with more than ten foci or those who had clustered foci which could not be enumerated. Endosulfan lactone, permethrin, pentachlorophenol, glyphosate, and paraoxon mainly produced cells showing 1 to 10 foci which were not in relation to the concentration but showed a similar increase in every concentration tested, paraoxon being the only one which showed a consistent increase of DSB with increasing concentrations ($R^2 = 0.1236$, $p = 0.0321$) (Table 2). However, glyphosate and paraoxon showed an increase of cells with more than 10 foci (Table 2), related to the concentration (linear regression, $R^2 = 0.2$, $p = 0.02$ for glyphosate; $R^2 = 0.35$, $p = 0.0003$ for

TABLE 2: Percentage of cells with γ -H2AX foci due to treatments.

Compound	Doses (microM)	Mean of % cells (S.D.)			With total damaged	Median of % cells with total damage	p^* (<i>chi-squared value</i>)
		Without foci	With 1 to 10 foci	With more than 10 foci			
Glyphosate	0	48.33 (2.94)	51.33 (3.33)	0.33 (0.52)	51.67 (2.94)	51.50	
	0.4	31.17 (3.76)	67.17 (3.66)	1.67 (1.37)	68.83 (3.76)	69.00^a	
	2	33.17 (4.07)	57.50 (10.62)	9.33 (7.94)	66.83 (4.07)	65.50	0.0107 (13.13)
	10	30.17 (3.21)	61.00 (10.18)	8.83 (4.36)	69.83 (13.21)	75.00 ^a	
	50	33.67 (4.50)	63.17 (4.71)	3.17 (3.71)	66.33 (4.50)	67.50	
Etoposide	50	3.50 (1.42)	6.83 (4.71)	89.67 (5.20)	96.50 (1.52)	96.50^b	
	0	78.00 (10.12)	21.00 (8.92)	1.00 (1.67)	22.00 (10.12)	21.00	
	0.2	57.33 (17.28)	40.67 (15.93)	2.00 (1.79)	42.67 (17.28)	41.00	
	1	43.33 (13.31)	52.33 (12.23)	4.33 (3.67)	56.67 (13.31)	56.00^a	0.0054 (14.68)
	5	52.00 (5.22)	43.33 (5.47)	4.67 (3.72)	48.00 (5.22)	48.00	
Permethrin	25	42.33 (15.92)	43.67 (24.57)	14.00 (12.71)	57.67 (15.92)	60.00^a	
	50	7.00 (4.86)	4.33 (2.34)	88.67 (5.32)	93.00 (4.86)	91.00^b	
	0	55.33 (6.15)	42.67 (6.15)	2.00 (0.00)	44.67 (6.15)	47.00	
	8	29.00 (16.19)	65.67 (13.65)	5.33 (5.75)	71.00 (16.19)	73.00^a	
	40	36.00 (6.33)	61.00 (5.90)	3.00 (2.10)	64.00 (6.33)	64.00	0.0092 (13.46)
Etoposide	200	24.33 (11.13)	70.33 (7.31)	5.33 (6.02)	75.67 (11.13)	76.00^a	
	1000	36.33 (18.82)	60.00 (16.44)	3.67 (2.94)	63.67 (18.82)	64.00	
	50	0.33 (0.82)	7.00 (3.29)	92.67 (3.01)	99.67 (0.82)	100.00^b	
	0	55.33 (6.15)	42.67 (6.15)	2.00 (0.00)	44.67 (6.15)	47.00	
	0.08	32.67 (5.61)	62.33 (7.31)	5.00 (4.52)	67.33 (5.61)	66.00	
Endosulfan lactone	0.4	27.00 (5.33)	70.33 (4.46)	2.67 (2.42)	73.00 (5.33)	74.00^a	0.0001 (23.30)
	2	27.00 (5.33)	73.67 (3.88)	3.33 (2.73)	77.00 (3.03)	77.00^a	
	10	47.00 (8.08)	51.67 (4.53)	1.33 (1.63)	53.00 (8.07)	53.00	
	50	0.33 (0.82)	7.00 (3.27)	92.67 (3.01)	99.67 (0.82)	100.00^b	
	0	78.00 (10.12)	21.00 (8.92)	1.00 (1.67)	22.00 (10.12)	21.00	
PCP	0.03	48.33 (14.11)	49.00 (13.19)	2.67 (1.63)	51.67 (14.11)	52.00	
	0.15	39.67 (16.71)	56.33 (17.45)	4.00 (2.83)	60.33 (16.71)	60.00^a	0.0259 (11.06)
	0.75	62.67 (23.31)	34.00 (22.52)	3.33 (2.73)	37.33 (23.31)	30.00	
	3.75	68.67 (23.45)	29.00 (23.07)	2.33 (2.34)	31.33 (23.45)	31.00	
	50	7.00 (4.86)	4.33 (2.34)	88.67 (5.32)	93.00 (4.86)	91.00^b	

* Kruskal-Wallis test considering all damaged cells; d.f. 4 in all tests; ^a significant dose compared with the negative control; post hoc Dunn's test, $p < 0.05$. ^b Etoposide results were always significant: Mann-Whitney test, $p < 0.05$. PCP; pentachlorophenol; only compounds with a positive result are presented here considering a p value of <0.05 for significance. See text.

TABLE 3: Cytotoxic effect of pesticides and metabolites that induced double-strand breaks.

	Compound	Survival range (%)	R^2	F	p value*
Pesticide	Glyphosate	100 to 70	0.252	9.431	0.0047
	Permethrin	100 to 100	0.006386	0.06427	0.8050
	Pentachlorophenol	100 to 78	0.007	0.092	0.7669
Metabolite	Endosulfan lactone	100 to 60	0.6787	25.35	0.0003
	Paraoxon	98 to 90	0.1473	2.246	0.1579
Positive control	Etoposide	100 to 96	5.388e – 006	7.004e – 005	0.9934

*Linear regression; the positive control was not cytotoxic at the concentration tested, 50 μ M.

TABLE 4: Detection of Ku80 phosphorylated and Rad51 proteins in mononuclear cells treated with pesticides and metabolites that induced γ -H2AX foci.

Compound	Dose (μ M)	Mean OD (SD)	P-Ku80		Mean OD (SD)	Rad51	
			Median OD	p^* (chi-squared value)		Median OD	p^* (chi-squared value)
Glyphosate	0	100.00 (34.48)	104.05		100.00 (47.93)	104.17	
	1.25	200.0 (63.99)	206.20	0.0297 (7.985)	134.4 (34.57)	122.89	0.4955 (2.559)
	2.5	227.3 (98.69)	190.91		140.8 (41.92)	158.29	
	5	253.9 (130.40)	205.27^a		107.5 (49.28)	113.41	
	Etoposide**	214.2 (48.55)	198.21	0.0286^b	119.3 (11.74)	84.26	0.6571
Paraoxon	0	100.0 (22.11)	102.55		100.0 (50.54)	96.74	
	1	186.64 (39.72)	196.43^a	0.0077 (9.551)	178.8 (73.36)	171.4	0.3812 (3.243)
	5	155.32 (17.06)	159.13^a		115.9 (6.84)	113.0	
	25	154.58 (8.76)	157.79^a		180.6 (95.02)	147.7	
	Etoposide**	155.4 (63.53)	167.30	0.1044	109.5 (25.86)	98.03	0.6571

*Kruskal-Wallis test: P-Ku80 was significant in glyphosate and paraoxon; $p < 0.05$; d.f. 3 in all tests; ^asignificant dose compared with the negative control; post hoc Dunn's test: $p < 0.05$; **Mann-Whitney test: ^b $p < 0.05$; OD: optical density. The results presented correspond to two separate experiments; only compounds who were positive are presented. See text.

paraoxon). Results for lower etoposide concentrations tested (0.4, 2, and 10 μ M) are not presented in this table but in the figure presented in Discussion; a significant correlation with the dose was found, $R^2 = 0.82$ and $p < 0.0001$ for cells with more than 10 foci.

3.2. Cytotoxicity. The same concentrations used to determine DSB were used to assess a cytotoxic effect of the five compounds that produced DSB, finding that glyphosate and endosulfan lactone reduced the number of viable cells in a dose-dependent manner (Table 3), going from 100% viability to 70% with glyphosate and from 100% to 60%, with endosulfan lactone. Pentachlorophenol, permethrin, and paraoxon did not show a cytotoxic effect at the concentrations used.

3.3. Quantification of p-Ku80 and Rad51 Proteins. The five compounds positive to DSB production were used in a set of treatments to determine whether DNA recombination would be induced; pentachlorophenol, even though it induced DSB only in the lowest concentrations tested, was also included in these analyses. P-Ku80 was used to evaluate NHEJ and Rad51, to evaluate HR (Table 4). Glyphosate was found to significantly induce the presence of p-Ku80 in a dose-dependent manner ($p < 0.05$, Figure 1), whereas Rad51 was

not significantly affected. Paraoxon induced p-Ku80 as well, however, not in a dose-dependent manner (Figure 2). The rest of the compounds tested did not show an effect on neither of the proteins studied. Etoposide, the positive control, consistently induced p-Ku80, although with a wide variation between tests, at the concentration used for this analysis (10 μ M) (Figures 1 and 2).

4. Discussion

A search was done to evaluate whether eight known pesticides still in use in our country could induce DSB, a lesion related to the formation of chromosomal rearrangements and leukemia risk.

Four of the compounds tested exhibited an ability to induce this kind of DNA damage, recognized in the form of phosphorylated H2AX foci in the nuclei of normal human lymphocytes, in at least two of the concentrations tested.

It is noticeable that etoposide, an antineoplastic agent, at the concentration used as a positive control of 50 μ M, induced more than 85% of cells with more than 10 foci; however, in lower concentrations etoposide induced foci in a comparable manner as was observed with glyphosate and paraoxon (Figure 3). This amount of damage seems to be

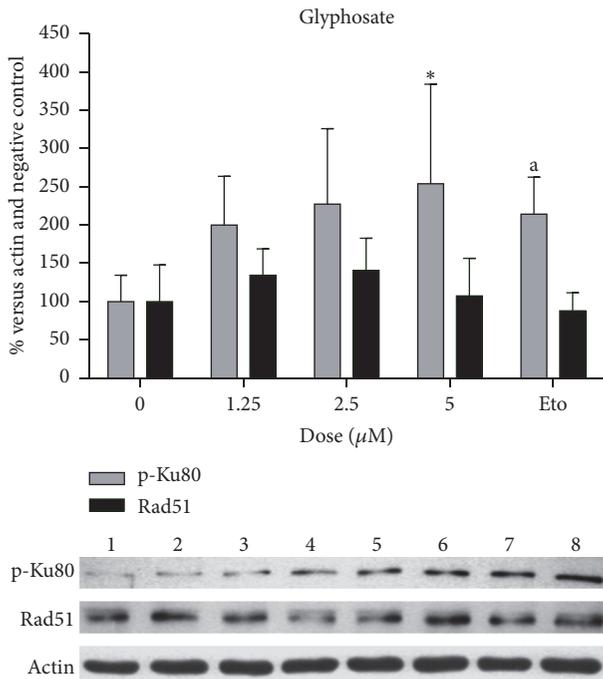


FIGURE 1: Graph: p-Ku80 protein increased due to treatments with glyphosate in a dose-dependent manner (linear regression, $p < 0.05$). Individual concentrations were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison test; the asterisk shows that 5 microM was significantly different from the negative control. The bottom part shows a representative membrane: lane 1, negative control; lanes 2–4, pentachlorophenol (0.2, 1.0, and 5 microM); lanes 5–7, glyphosate (1.25, 2.5, and 5 microM, see graph); lane 8, etoposide (10 microM).

of relevance in relation to the increase of repair proteins like p-Ku80, since only glyphosate and paraoxon produced a significant increase in this protein, whereas the rest of the compounds that induced lower amounts of gamma-H2AX foci did not. In this set of experiments to evaluate proteins participating in DNA recombination, treatments with glyphosate were modified to avoid cytotoxicity, 5 microM being the highest concentration tested. It should be said that our results differ from those of Townsend et al. [47] who found cytotoxicity caused by glyphosate in Raji cells only at higher concentrations (10 mM); this difference indicates that normal human cells are more sensitive to the toxic effects of the compound. Etoposide concentration as a positive control was also lowered to 10 microM to make it more comparable with the treatments with pesticides. As expected, Rad51 was not induced by the treatments given to nonproliferating lymphocytes. This is consistent with previous reports indicating that the HR repair mechanism does not participate in DSB repair in cells in G0/G1 [48–52].

The results presented here point to paraoxon and glyphosate, an insecticide and a herbicide both organophosphates, as inducers of DSB in human cells. Paraoxon is a metabolite of parathion, a compound classified by the WHO toxicity classification [53] as Ia, extremely hazardous, and both are cholinesterase inhibitors, whereas glyphosate

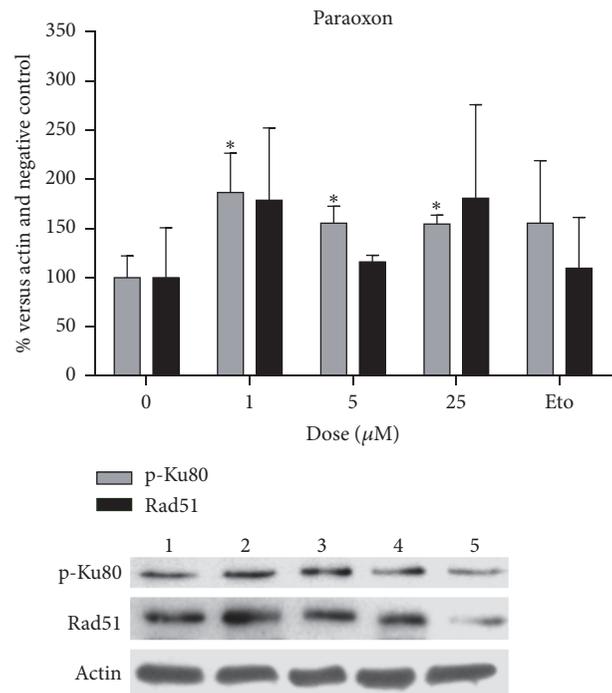


FIGURE 2: Increase in the amount of p-Ku80 protein in cells treated with paraoxon: lane 1, negative control; lanes 2–4, paraoxon (1, 5, and 25 microM); lane 5, etoposide (10 microM). Rad51 did not show significant variation among treatments as is shown in the graph. *Significantly different dose; Kruskal-Wallis; Dunn's post hoc test, $p < 0.05$.

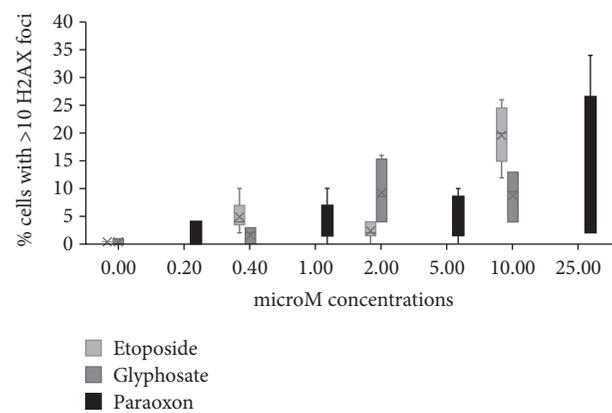


FIGURE 3: Percentage of cells with more than 10 gamma-H2AX foci induced by treatments with etoposide, glyphosate, and paraoxon. The three compounds induced an increase related to the dose; see Results for statistical values of linear regression analyses.

toxicity is under discussion in many fora. The treatments given to the cells in a nonproliferative state induced not only the breakage of DNA, but also the phosphorylation of Ku80, a protein that participates in the c-NHEJ repair pathway. These results agree with those reported in studies with peripheral blood mononuclear cells with DSB induction by radiation, Frasca et al. [54] found that Ku80 was phosphorylated prior to the formation of the Ku70/Ku80 dimer required for the

initiation of repair, whereas Shelke and Das [55] detected an upregulation of Ku80 and other proteins that participate in the c-NHEJ repair mechanism. This c-NHEJ repair pathway is known for being prone to error, introducing microdeletions or microinsertions which could be mutagenic and alter cell behavior if they occur in coding or regulatory sequences [56]. This is one possible outcome of the DSB in nonproliferating cells. Another possibility is that the damage observed was extensive enough as to induce the intervention of the alternative NHEJ (a-NHEJ), via the phosphorylation of Plk-3 and CtIP, necessary for the activation of a-NHEJ in G0/G1 as demonstrated by Barton et al. [57]. This pathway has been demonstrated to be the only one responsible for the formation of chromosomal translocations, of great concern in the development of leukemia, lymphoma, and secondary cancers [51, 56]. Etoposide, our positive control, is well known as a topoisomerase II inhibitor capable of producing complex DSB (defined as many DSB in close proximity, [57] in G0, acting in a similar way as ionizing radiation and producing chromosomal rearrangements in all phases of the cell cycle [40, 58]; the damage induced by this compound in this study was comparable to the damage induced by paraoxon and glyphosate (DSB and Ku80 induction), so the question emerging from these results is whether the outcome for the cells damaged by paraoxon and glyphosate would be similar to the outcome of cells damaged by etoposide and they would also induce chromosomal rearrangements.

5. Conclusions

Eight pesticides were tested for their ability to produce DSB in nonproliferating lymphocytes and to evaluate whether the classical recombinational mechanisms of DNA repair would come into action. Two of them, paraoxon and glyphosate, were found to produce both DSB and the phosphorylation of Ku80, a protein participating in the c-NHEJ recombinational repair pathway.

These results are of importance since these effects occurred at low concentrations in an acute treatment to the cells. Effects over longer exposures in actual environmental settings are expected to produce cumulative damage if repeated events of recombination take place over time.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgments

This work was realized by funds from the University Program to Support Science and Technology (PAPIIT, Project no. IN203011-3) and a fellowship by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. 220284) for Karen Suárez-Larios, M.S., a student at the Ph.D. Program of Biological Science, UNAM. The authors acknowledge the valuable comments of Chemist Guillermina Vázquez and Biologist Juan Pablo Pánico.

References

- [1] WHO, World Health Organization. 2016, www.who.int/topics/pesticides/en/.
- [2] Environmental Protection Agency, EPA. 2016, <https://www.epa.gov/pesticide-reevaluation/registration-review-process>.
- [3] K. Kim, E. Kabir, and S. A. Jahan, "Exposure to pesticides and the associated human health effects," *Science of The Total Environment*, vol. 575, pp. 525–535, 2017.
- [4] CICLOPLAFEST., "Catálogo de Plaguicidas," *Cofepris*, 2004, <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>.
- [5] L.A. Albert, "Panorama de los plaguicidas en México. revista de toxicología en línea," *Retel*, vol. 8, 1, p. 17, 2005, <http://www.sertox.com.ar/retel>.
- [6] C. Bolognesi, A. Creus, P. Ostrosky-Wegman, and R. Marcos, "Micronuclei and pesticide exposure," *Mutagenesis*, vol. 26, no. 1, pp. 19–26, 2011.
- [7] X. Ma, P. A. Buffler, R. B. Gunier et al., "Critical windows of exposure to household pesticides and risk of childhood leukemia," *Environmental Health Perspectives*, vol. 110, no. 9, pp. 955–960, 2002.
- [8] M. Belson, B. Kingsley, and A. Holmes, "Risk factors for acute leukemia in children: a review," *Environmental Health Perspectives*, vol. 115, no. 1, pp. 138–145, 2007.
- [9] C. Infante-Rivard and S. Weichenthal, "Pesticides and childhood cancer: An update of Zahm and Ward's 1998 review," *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, vol. 10, no. 1-2, pp. 81–99, 2006.
- [10] C.-H. Pui, M. V. Relling, and J. R. Downing, "Mechanisms of disease: acute lymphoblastic leukemia," *The New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 15, pp. 1535–1548, 2004.
- [11] D. J. González-Mille, C. A. Ilizaliturri-Hernández, G. Espinosa-Reyes et al., "Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico," *Ecotoxicology*, vol. 19, no. 7, pp. 1238–1248, 2010.
- [12] S. Gómez-Arroyo, Y. Díaz-Sánchez, M. A. Meneses-Pérez, R. Villalobos-Pietrini, and J. De León-Rodríguez, "Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides," *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 466, no. 1, pp. 117–124, 2000.
- [13] C. Bolognesi, "Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies," *Mutation Research*, vol. 543, no. 3, pp. 251–272, 2003.
- [14] S. Bull, K. Fletcher, A. R. Boobis, and J. M. Battershill, "Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: A review," *Mutagenesis*, vol. 21, no. 2, pp. 93–103, 2006.
- [15] C. Martínez-Valenzuela, S. Gómez-Arroyo, R. Villalobos-Pietrini et al., "Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico," *Environment International*, vol. 35, no. 8, pp. 1155–1159, 2009.
- [16] C. Bolognesi, G. Carrasquilla, S. Volpi, K. R. Solomon, and E. J. P. Marshall, "Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five Colombian regions: Association to occupational exposure to glyphosate," *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, vol. 72, no. 15-16, pp. 986–997, 2009.
- [17] A. Dzwonkowska and H. Hübner, "Induction of chromosomal aberrations in the syrian hamster by insecticides tested in vivo," *Archives of Toxicology*, vol. 58, no. 3, pp. 152–156, 1986.

- [18] M. A. Farah, B. Ateeq, and W. Ahmad, "Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests," *Science of the Total Environment*, vol. 364, no. 1-3, pp. 200–214, 2006.
- [19] S. Prasad, S. Srivastava, M. Singh, and Y. Shukla, "Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of swiss albino mice," *Journal of Toxicology*, vol. 2009, 6 pages, 2009.
- [20] P. Martínez-Paz, M. Morales, J. L. Martínez-Guitarte, and G. Morcillo, "Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay," *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 758, no. 1-2, pp. 41–47, 2013.
- [21] M. Gonzalez-Cid, D. Loria, and E. Matos, "Genotoxicity of the pesticide propoxur and its nitroso derivative, NO-propoxur, on human lymphocytes *in vitro*," *Mutation Research*, vol. 232, no. 1, pp. 45–48, 1990.
- [22] S. Gómez-Arroyo, M. Elena Calderón-Segura, and R. Villalobos-Pietrini, "Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 26, no. 4, pp. 324–330, 1995.
- [23] M. Tisch, P. Schmezer, M. Faulde, A. Groh, and H. Maier, "Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells," *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 259, no. 3, pp. 150–153, 2002.
- [24] M. Tisch, M. K. Faulde, and H. Maier, "Genotoxic effects of pentachlorophenol, lindane, transfluthrin, cyfluthrin, and natural pyrethrum on human mucosal cells of the inferior and middle nasal conchae," *American Journal of Rhinology*, vol. 19, no. 2, pp. 141–151, 2005.
- [25] Ü. Ündeğer and N. Başaran, "Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage," *Archives of Toxicology*, vol. 79, no. 3, pp. 169–176, 2005.
- [26] M. Bajpayee, A. K. Pandey, S. Zaidi et al., "DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 47, no. 9, pp. 682–692, 2006.
- [27] C.-M. Lin, L. Y. Wei, and T.-C. Wang, "The delayed genotoxic effect of N-nitroso N-propoxur insecticide in mammalian cells," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, no. 6, pp. 928–934, 2007.
- [28] F. Mañas, L. Peralta, J. Raviolo et al., "Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 72, no. 3, pp. 834–837, 2009.
- [29] A. E. Rojas-García, M. Sordo, L. Vega, B. Quintanilla-Vega, M. Solis-Heredia, and P. Ostrosky-Wegman, "The role of paraoxonase polymorphisms in the induction of micronucleus in paraoxon-treated human lymphocytes," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 50, no. 9, pp. 823–829, 2009.
- [30] H. Türkez and B. Toğar, "Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract counteracts genotoxicity and oxidative stress of permethrin in human lymphocytes," *Journal of Toxicological Sciences*, vol. 36, no. 5, pp. 531–537, 2011.
- [31] V. J. Koller, M. Fürhacker, A. Nersesyan, M. Mišik, M. Eisenbauer, and S. Knasmueller, "Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells," *Archives of Toxicology*, vol. 86, no. 5, pp. 805–813, 2012.
- [32] C. Alvarez-Moya, M. R. Silva, C. Valdez Ramírez et al., "Comparison of the *in vivo* and *in vitro* genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms," *Genetics and Molecular Biology*, vol. 37, no. 1, pp. 105–110, 2014.
- [33] F. E. Alexander, S. L. Patheal, A. Biondi et al., "Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion," *Cancer Research*, vol. 51, pp. 2542–2546, 2001.
- [34] A. S. Kim, D. A. Eastmond, and R. J. Preston, "Childhood acute lymphocytic leukemia and perspectives on risk assessment of early-life stage exposures," *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, vol. 613, no. 2-3, pp. 138–160, 2006.
- [35] K. M. LaFiura, D. M. Bielawski, N. C. Posecion Jr. et al., "Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated t(8;21)," *Pediatric Blood & Cancer*, vol. 49, no. 5, pp. 624–628, 2007.
- [36] M. F. Greaves and J. Wiemels, "Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 9, pp. 639–649, 2003.
- [37] P. D. Aplan, "Causes of oncogenic chromosomal translocation," *Trends in Genetics*, vol. 22, no. 1, pp. 46–55, 2006.
- [38] Y. Zhang and J. D. Rowley, "Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia," *DNA Repair*, vol. 5, no. 9-10, pp. 1282–1297, 2006.
- [39] C. A. Felix, "Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs," *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, vol. 1400, no. 1-3, pp. 233–255, 1998.
- [40] M. S. Brassesco, A. P. Montaldi, and E. T. Sakamoto-Hojo, "Preferential induction of MLL (Mixed Lineage Leukemia) rearrangements in human lymphocyte cultures treated with etoposide," *Genetics and Molecular Biology*, vol. 32, no. 1, pp. 144–150, 2009.
- [41] C. M. Mchale, L. Zhang, and M. T. Smith, "Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment," *Carcinogenesis*, vol. 33, no. 2, pp. 240–252, 2012.
- [42] E. Sage and N. Shikazono, "Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 107, pp. 125–135, 2016.
- [43] A. Andrievski and R. C. Wilkins, "The response of γ -H2AX in human lymphocytes and lymphocyte subsets measured in whole blood cultures," *International Journal of Radiation Biology*, vol. 85, no. 4, pp. 369–376, 2009.
- [44] G. P. Watters, D. J. Smart, J. S. Harvey, and C. A. Austin, "H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint," *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 679, no. 1-2, pp. 50–58, 2009.
- [45] R. Scarpato, C. Verola, B. Fabiani, V. Bianchi, G. Saggese, and G. Federico, "Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the γ -H2AX focus assay and micronucleus test," *FASEB Journal*, vol. 25, no. 2, pp. 685–693, 2011.
- [46] I. Hernández-Reséndiz, A. Román-Rosales, E. García-Villa et al., "Dual regulation of energy metabolism by p53 in human cervix and breast cancer cells," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1853, no. 12, pp. 3266–3278, 2015.
- [47] M. Townsend, C. Peck, W. Meng, M. Heaton, R. Robison, and K. O'Neill, "Evaluation of various glyphosate concentrations on DNA damage in human Raji cells and its impact on cytotoxicity," *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 85, pp. 79–85, 2017.
- [48] F. Chen, A. Nastasi, Z. Shen, M. Brennehan, H. Crissman, and D. J. Chen, "Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52," *Mutation Research - DNA Repair*, vol. 384, no. 3, pp. 205–211, 1997.

- [49] K. Bishay, K. Ory, M.-F. Olivier, J. Lebeau, C. Levalois, and S. Chevillard, "DNA damage-related RNA expression to assess individual sensitivity to ionizing radiation," *Carcinogenesis*, vol. 22, no. 8, pp. 1179–1183, 2001.
- [50] M. Shrivastav, L. P. De Haro, and J. A. Nickoloff, "Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice," *Cell Research*, vol. 18, no. 1, pp. 134–147, 2008.
- [51] R. Ceccaldi, B. Rondinelli, and A. D. D'Andrea, "Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break," *Trends in Cell Biology*, vol. 26, no. 1, pp. 52–64, 2016.
- [52] K. Kostyrko, S. Bosshard, Z. Urban, and N. Mermod, "A role for homologous recombination proteins in cell cycle regulation," *Cell Cycle*, vol. 14, no. 17, pp. 2853–2861, 2015.
- [53] WHO., "The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification," in *Proceedings of the World Health Organization and International Programme on Chemical Safety 2009*, 78 pages, 2010.
- [54] D. Frasca, P. Barattini, G. Tocchi, L. Guidi, L. Pierelli, and G. Doria, "Role of DNA-dependent protein kinase in recognition of radiation-induced DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells," *International Immunology*, vol. 13, no. 6, pp. 791–797, 2001.
- [55] S. Shelke and B. Das, "Dose response and adaptive response of non-homologous end joining repair genes and proteins in resting human peripheral blood mononuclear cells exposed to γ radiation," *Mutagenesis*, vol. 30, no. 3, pp. 365–379, 2015.
- [56] R. Hromas, E. Williamson, S.H. Lee, and J. Nickoloff, "Preventing the chromosomal translocations that cause cancer," *Trans Am Clin Climatol Assoc*, vol. 127, pp. 176–195, 2016.
- [57] O. Barton, S. C. Naumann, R. Diemer-Biehs et al., "Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1," *Journal of Cell Biology*, vol. 206, no. 7, pp. 877–894, 2014.
- [58] P. Mosesso, G. Pepe, A. Ottavianelli, A. Schinoppi, and S. Cinelli, "Cytogenetic evidence that DNA topoisomerase II is not involved in radiation induced chromosome-type aberrations," *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 793, pp. 14–18, 2015.

Anexo 2.

Estudios de leucemia infantil concordante en gemelos monocigóticos con marcadores clonotípicos únicos.

Estudios de leucemia infantil concordante en gemelos monocigóticos con marcadores clonotípicos únicos (Modificado de Suárez-Larios, 2012).							
Marcador Molecular	Leucemia	Sexo	edad de diagnóstico		Aportación	País	Referencia
			1er gemelo	2do gemelo			
Rearreglos en <i>MLL</i>	nALL (L1)	M	5 semanas	5 semanas	1er artículo que reporta un origen clonal y único. Evento no constitutivo.	Reino Unido	Ford y cols. 1993
	ALL	F	2 meses	2 meses			
	nALL	F	9 meses	10 meses			
	ALL	F	Nacimiento	3 meses			
	ALL (L1)	F	2 meses	2 meses	Gemelas dicigóticas. Evento no constitutivo.	Estados Unidos	Gill Super y cols. 1994
	ALL (L1)	F	2 meses	2 meses	Mismo rearreglo en los marcadores encontrados en ambos gemelos. También se evaluaron rearreglos en IGH. Evento no constitutivo.	Estados Unidos (origen hispano)	Mahmoud y cols. 1995
	AML (M2)	F	11.5 meses	13 meses	Plantea posible asociación de la dieta materna (consumo de inhibidores de topo II naturales) y la presencia de los rearreglos. Evento no constitutivo.	Estados Unidos	Megonigal y cols. 1998
<i>TEL-AML1</i>	cALL	F	3 años, 6 meses	4 años, 10 meses	La detección de la del <i>TEL</i> en un gemelo y rearreglos distintos en IGH sugiere la presencia de eventos moleculares independientes durante la promoción de la leucemia.	Países Bajos	Ford y cols. 1998
	ALL (SI) / cALL (L2)	F	5 años, 2 meses	13 años, 11 meses	Pre-diagnosis 9 años antes del desarrollo de la leucemia. Latencia prolongada.	Países Bajos	Wiemels y cols. 1999b
	ALL (L1)	M	23 meses	23 meses	Embarazo triple: 2 gemelos monocigóticos, 1 dicigótico. El 3er hermano sólo presentó la translocación en la TG.	Reino Unido	Maia y cols. 2001
	ALL pre-B	M	4.8 años	5.1 años	Rearreglo en IGH distinto en cada gemelo. Se evaluaron TG.	Suiza	Teuffel y cols. 2004

F – Femenino; M – Masculino; nALL – ALL progenitor de B o nulo; cALL – ALL común; ALL pre-B – ALL de células precursoras B; T-ALL – ALL de células T; NHL – Linfoma no Hodgkin; TG: Tarjeta Guthrie; del*TEL*: delección del gen *TEL* normal; IGH – locus de la inmunoglobulina. * Embarazo de trillizas monocigóticas, la tercer bebé desarrolló la leucemia a los 37 meses.

Anexo 3

Estudios retrospectivos utilizando Tarjetas Guthrie.

Estudios retrospectivos utilizando Tarjetas Guthrie (Modificado de Suárez-Larios, 2012).							
Marcador Molecular	Leucemia	No. de casos	edad de diagnóstico	% de casos positivos	Observaciones	País	Referencia
MLL-AF4	ALL	3	5 meses – 2 años	100%	Primer estudio en evaluar una translocación en TG.	Reino Unido	Gale y cols. 1997
	Pro-B ALL	2	6 meses y 1 año	100%	También presentan mismo rearreglo en IGH.	Austria	Fasching y cols. 2000
	ALL	3	5 años, 1 mes – 8 años, 6 meses	33.33%	Latencia de 6 años en la muestra positiva.	NE	Maia y cols. 2004
MLL-AF6, MLL-AF9 y MLL-AF10	AML	1	1 año, 5 meses;	0%		República Checa	Burjanivova y cols. 2006
		1	1 año, 7 meses;	0%			
		1	5 años, 4 meses	0%			
MLL-AF9 y MLL-AF10	ALL	1	5 años, 9 meses;	0%		NE	Maia y cols. 2004
		1	3 AÑOS	0%			
MLL-AF10	AML (M5)	1	2 años	100%	Se detectó el <i>dic(1;19)</i> en las células leucémicas, no se establece si es prenatal.	Reino Unido	Jones y cols. 2003
TEL-AML1	ALL pre-B	9 1 par de gemelos	2 años – 5 años	66.67%	Inicialmente 12 muestras de bebés unigénitos; 3 fueron descartadas al no amplificar los genes control.	Italia y Reino Unido	Wiemels y cols. 1999b
			4 años	100%			
	ALL pre-B	9	2 años, 11 meses – 6 años, 2 meses	33.33%	Máximo periodo de latencia: 5 años, 8 meses.	Dinamarca	Hjalgrim y cols. 2002
	cALL	14	2 años, 2 meses – 6 años, 8 meses	50%	Eventos secundarios: la <i>delTEL</i> es el más común.	Estados Unidos	McHale y cols. 2003a
	ALL	7	5 años, 10 meses – 11 años, 2 meses	42.86%	Máximo periodo de latencia detectado: 9 años, 4 meses.	NE	Maia y cols. 2004
ALL	3	3 años, 3 meses – 5 años, 7 meses	33.33%	Máximo periodo de latencia detectado: 3 años, 6 meses	República Checa	Burjanivova y cols. 2006	
E2A-PBX1	ALL	15	NE	13.33%	2 pacientes positivos usando la TG: 5 años, 3 meses y 8 años, 7 meses.	Estados Unidos	Wiemels y cols. 2002a
AML1-ETO	AML	10	3 años, 6 meses – 12 años, 2 meses	50%	Detección de la translocación en muestras de 3 pacientes en remisión clínica completa.	Estados Unidos y Reino Unido	Wiemels y cols. 2002b
AML1-ETO; FLT3/ITD; PML-RARA; CBFβ-MYH11	AML	2	1 año, 5 meses – 14 años, 8 meses	Ningún caso dio positivo	Se agruparon todos los casos evaluados para tomar el mín-máx de edad.	República Checa	Burjanivova y cols. 2006
		2					
		4					
		3					
PML-RARA / CBFβ-MYH11	AML	2	¿? – 10 años, 8 meses / ¿? – 9 años, 5 meses	50%		Estados Unidos	McHale y cols. 2003b
		2		50%			

cALL – ALL común; ALL pre-B – ALL de células precursoras B; T-ALL – ALL de células T; TG: Tarjeta Guthrie; *dic*: cromosoma dicéntrico; *delTEL*: delección del gen *TEL* normal; NE: No Especificado. IGH – locus de la inmunoglobulina.