

Universidad Autónoma de Nayarit

Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias

Especialidad en Ciencias Ambientales



Efecto Genotóxico de Temefos en Células HepG2

Tesis

Que para obtener el título de Maestro en Ciencias

Presenta

José Francisco Herrera Moreno

Directora

Dra. Aurora Elizabeth Rojas García

Codirectora

Dra. Irma Martha Medina Díaz

Xalisco Nayarit, mayo de 2015



Tepic, Nayarit, a 14 de mayo de 2015

Dr. Juan Diego García Paredes
Coordinador de Posgrado en Ciencias Biológicas Agropecuarias
(CBAP)
PRESENTE

Por este conducto nos permitimos comunicarle que la tesis del estudiante de maestría **José Francisco Herrera Moreno**, titulada **"Efecto Genotóxico de Temefos en Células HepG2"**, ha sido revisada y aprobada en contenido y formato. Por lo que consideramos que el estudiante puede continuar con los trámites para solicitar fecha de examen de grado.

Sin más por el momento, agradecemos la atención prestada y aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

- Dra. Aurora Elizabeth Rojas Garcia
- Dra. Irma Martha Medina Diaz
- Dra. Yael Yvette Bernal Hernández
- Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco
- M. en C. Carlos Alberto Romero Bañuelos



Handwritten signatures of the listed individuals, including Carlos Alberto Romero Bañuelos.

c.c.p. Archivo AERG



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/109/15

Xalisco, Nayarit., 20 de mayo de 2015

Ing. Alfredo González Jáuregui
Director de Administración Escolar
P r e s e n t e.

Con base al oficio de fecha 14 de mayo de 2015, enviado por los CC. **Dra. Aurora Elizabeth Rojas García, Dra. Irma Martha Medina Díaz, Dra. Yael Yvette Bernal Hernández, Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco y M. en C. Carlos Alberto Romero Bañuelos**, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, se autoriza al **C. José Francisco Herrera Moreno**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestro.

Sin más por el momento, me despido de usted y reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
"Por lo Nuestro a lo Universal"

Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del posgrado



Expediente.

aref.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de contaminación y toxicología ambiental, de la Universidad Autónoma de Nayarit, bajo la dirección de la doctora Aurora Elizabeth Rojas García y la codirección de la doctora Irma Martha Medina Díaz, con apoyo del proyecto CONACyT-C. Básica (#156673).

AGRADECIMIENTOS

A la persona más importante en mi vida, Mamá sabes que todos mis logros y victorias las comparto contigo, hemos crecido juntos y sobre todo hemos luchado por salir adelante como la familia que somos. Agradezco el apoyo inmenso que he recibido de tu parte en esta etapa, y sobre todo a lo largo de mi vida. Eres para mí símbolo de amor, entrega y dedicación, una mujer que ha sabido salir adelante pese a las circunstancias adversas en las que te has afrontado a la vida, como toda una guerrera. Gracias mami por aguantar mi carácter, mis momentos de estrés y por siempre estar conmigo. TU Y YO JUNTOS SIEMPRE ¡TE AMO!

A mi Tía Mayra, sin duda alguna has sido una persona que siempre ha representado para mí un ejemplo de tenacidad y fortaleza, gracias por todo tu apoyo y por compartir mis alegrías, mis tristezas y tantos recuerdos memorables, me siento muy orgulloso de ti, Gracias, ¡Te amo!

A mi Tía Sayra, agradezco todo tu apoyo en este transcurso, valoro mucho el interés de tu parte de saber cómo iba avanzando a lo largo de estos dos años. Me siento muy orgulloso de ti y aprecio el cariño brindado en cada momento. ¡Te amo!

A mis queridos abuelos, gracias por todo el apoyo brindado hacia mi persona, son pilares fundamentales en mi vida y a pesar de que no paso el tiempo que yo quisiera con ustedes, siempre están presentes conmigo. ¡Los amo!

A mi directora y codirectora de tesis: Dra. Aurora Elizabeth Rojas García y Dra. Irma Martha Medina Díaz, gracias por guiarme durante mi formación desde mi tesis de licenciatura hasta hoy, por dejar en mi persona no solo el amor e interés de este mundo maravilloso que nos ofrece la investigación científica, sino también por el apoyo que he recibido para mi formación profesional y personal, por aceptarme en el laboratorio, gracias infinitas por todos sus consejos y su ejemplo, por inculcarme a no rendirme y seguir adelante, por dedicar su tiempo y espacio y ser para mí ejemplo de responsabilidad, honestidad y amistad. Por la confianza otorgada, la voz franca y honesta, por los momentos compartidos, que ahora son

inolvidables en mi vida. Sin duda alguna mi admiración, respeto y cariño sincero para ustedes mis madres académicas.

A mi comité tutorial y asesores: Dra. María de Lourdes Robledo Marengo, he tenido el placer de compartir a su lado mi camino de formación académica, agradezco sus consejos y su apoyo, admiro la labor incansable de una investigadora como usted y agradezco cada contribución para llevar a buen término mi maestría, la quiero mucho. Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco, he valorado y apreciado cada una de las observaciones realizadas en el trayecto de mi formación como maestro en ciencias, aprecio su disponibilidad para apoyarme en la resolución de dudas, en sus comentarios y su excelente actitud, sus palabras de aliento, francas y optimistas y su valiosa contribución para finalizar esta etapa de mi vida profesional, cuenta con mi respeto y cariño sincero, la quiero mucho. Dra. Yael Yvette Bernal Hernández, gracias infinitas por tu apoyo y amistad durante este proceso, sin duda alguna, he aprendido mucho de ti, sobre todo la perseverancia y tenacidad, como valores fundamentales, valoro el tiempo compartido, opiniones y aportaciones hacia mi persona, te quiero mucho. M. en C. Carlos Alberto Romero Bañuelos, sus contribuciones, correcciones, el apoyo brindado y los momentos compartidos, sin duda ayudaron en mi trabajo y crecimiento profesional. Agradezco a cada uno su apoyo y sobretodo las enseñanzas que han forjado mi camino en la investigación científica. Gracias infinitas.

Dra. Ana María Salazar y Q.F.B. Monserrat Sordo Cedeño, gracias por su apoyo en la técnica de micronúcleos, valiosa ayuda y comentarios que impactaron en mi desempeño experimental durante este trayecto.

Agradezco a cada uno de mis maestros, en especial al Dr. Juan Diego García Paredes, coordinador del posgrado y a su equipo de trabajo, gracias por su valioso apoyo y contribuciones durante este proceso.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para llevar a cabo mi formación como maestro en ciencias ambientales.

Amigos y compañeros del Laboratorio de Contaminación y Toxicología Ambiental, agradezco de manera infinita todo el apoyo recibido para llevar a cabo esta meta en mi vida y por ayudarme a cumplir los objetivos planteados, sin duda alguna, su apoyo es invaluable. Alma y Nestor, gracias por compartir el tiempo y convertirse en cómplices y amigos en esta etapa, son parte importante de mi formación, he aprendido mucho de ustedes. Guille y Franc, gracias por los momentos compartidos y sus aportaciones. A mis compañeros estudiantes de laboratorio: Carmelita, Mirna, Gustavo, Pier, y Rigo, gracias por los momentos agradables y de enseñanza que hemos compartido.

A Mayra y Sandra: gracias totales por todo el apoyo que he recibido de su parte, es muy importante para mi poder contar con sus palabras de aliento y cariño, he aprendido de ustedes que la humildad y sencillez son base para un buen desempeño académico y personal, cuentan con mi cariño y respeto sincero. ¡Las quiero mucho! Faby y Paty, gracias por toda su ayuda y apoyo hacia mi persona, cuentan con mi cariño y respeto sincero, valoro mucho sus contribuciones durante mi formación.

A mis apreciados amigos, que son la familia que yo elegí y de quien he recibido apoyo fundamental en momentos difíciles, con quienes he compartido momentos de felicidad y de tristezas, la maestría me otorgó la posibilidad de conocerlos y eso para mi es un regalo de la vida, en estricto orden alfabético y sin olvidarme de ninguno de mis mejores y más queridos hermanos: Diana, Oscar y Paty, gracias infinitas por soportarme, si bien es cierto la vida no me dio la posibilidad de tener hermanos biológicos, pero tengo hermanos de vida que son ustedes.

A mis mejores amigos, es un honor poder contar con personas de la calidad humana como la de ustedes, con el paso de los años nuestra amistad va madurando y haciéndose más fuerte, son parte fundamental en mi vida, gracias por estar conmigo: Alfredo, Anahid, Aurora, Deyrit, Diego, Gema, Isidro, Marines y Yeidy. ¡Los adoro!

DEDICATORIA

El presente trabajo representa una etapa fundamental de transición académica y personal en mi vida. Cumplo objetivos y me he planteado nuevas metas.

Dedico este trabajo y todo lo que implica el haber culminado esta etapa, a la persona que más amo en este mundo, mi mejor amiga y mi compañera de grandes batallas: Yolanda Guadalupe Herrera Moreno

¡Mamá gracias por todo tu amor!

¡Gracias por hacer algo tan grande, por mirar siempre adelante, por enseñarme lo mejor!

TE AMO

La felicidad se alcanza cuando lo que uno piensa, lo que uno dice y lo que uno hace están en armonía

Ghandi

Una persona debe establecer sus metas tan pronto como le sea posible, y dedicar todo su talento y energía para hacerlas realidad. Con mucho esfuerzo puede lograrlo. O puede encontrar algo que sea aún más gratificante. Pero al final, no importa cual sea el resultado, sabrá que ha estado vivo.

Walt Disney

RESUMEN

Temefos es un plaguicida organofosforado usado ampliamente en las campañas de salud y fumigación urbana. A pesar del uso generalizado de este plaguicida, pocos estudios en la literatura han examinado su potencial genotóxico a bajas concentraciones. El objetivo de este estudio fue investigar si temefos tiene un efecto citotóxico, citostático o genotóxico en células HepG2. Para evaluar la citotoxicidad, se utilizó el ensayo colorimétrico MTT. Los efectos citostático y genotóxico se determinaron por el método propuesto por Eastmond y Tucker (1989) y por el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis (MNBC) respectivamente. Se determinó la frecuencia de puentes nucleoplasmicos, gemaciones, células apoptóticas y necróticas. Los tratamientos con temefos (0.5-10 μM) durante 48 horas no afectaron la viabilidad celular, ni modificaron el índice de división nuclear (IN), sin embargo el tratamiento con temefos a 10 μM aumentó significativamente el número de micronúcleos. Los resultados de este estudio sugieren que la biotransformación de temefos podría generar metabolitos genotóxicos en células HepG2.

ABSTRACT

Temephos is an organophosphorus pesticide widely used in health campaigns and urban fumigation. Despite the widespread use of this pesticide, few studies in the literature have examined their genotoxic potential at low concentrations. The aim of this study was to investigate whether temephos has a cytotoxic, cytostatic or genotoxic effect in HepG2 cells. To assess cytotoxicity MTT colorimetric assay was used. The cytostatic and genotoxic effects were determined by the method proposed by Eastmond and Tucker (1989) and the cytokinesis block micronucleus assay (CBMN) respectively. Nucleoplasmic bridges, buds, apoptotic and necrotic cells frequency was determined. Temephos treatments (0.5-10 μM) for 48 hours did not affect cell viability or modified the nuclear division index (NI), but treatment with 10 μM of temephos significantly increased the number of micronuclei. The results of this study suggest that biotransformation may generate temephos genotoxic metabolites in HepG2 cells.

ÍNDICE

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABLAS.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades de plaguicidas.....	1
1.2 Plaguicidas organofosforados.....	1
1.3 Toxicidad de los POF.....	2
1.4 Efectos genotóxicos.....	3
1.5 Generalidades de temefos.....	3
1.5.1 Características fisicoquímicas.....	4
1.5.2 Toxicocinética.....	5
1.5.3 Toxicidad aguda.....	7
1.5.4 Genotoxicidad y carcinogenicidad.....	7
1.6 Células HepG2.....	7
1.7 Ensayo de micronúcleos como biomarcador de efecto genotóxico.....	8
2. JUSTIFICACIÓN.....	9
3. HIPÓTESIS.....	9
4. OBJETIVOS.....	10
5. METODOLOGÍA.....	11
5.1 Diseño del estudio.....	11
5.2 Cultivo celular HepG2.....	11

5.3	Tratamientos con temefos.....	11
5.4	Evaluación de la citotoxicidad celular.....	13
5.5	Evaluación de la citostaticidad celular.....	14
5.6	Cultivo celular para evaluación de genotoxicidad.....	14
5.7	Cosecha celular.....	15
5.8	Lectura de parámetros de genotoxicidad.....	16
5.9	Análisis estadístico.....	16
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
6.1	Citotoxicidad celular.....	17
6.2	Citostaticidad celular.....	19
6.3	Genotoxicidad.....	21
7.	CONCLUSIONES.....	28
8.	PERSPECTIVAS.....	29
9.	REFERENCIAS.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AChE	Acetilcolinesterasa
AMES	Ensayo de mutagenicidad con la bacteria <i>Salmonella typhimurim</i> .
Atm-m³	Atmosferas por metro cúbico.
ATSDR	Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades.
cm²	Centímetro cuadrado.
CO₂	Dióxido de carbono.
Cyt-B	Citocalasina B.
CYP	Citocromo P450.
DL50	Dosis letal 50.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DMEM	Dubelcobs modified eagle medium.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
ENT	Esterasa neurotóxica.
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América
EXTOXNET	The Extension Toxicology Network.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
FISH	Ensayo de hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia.
g/cm³	Gramo por centímetro cúbico.
g/mol	Gramo por mol.
HCl	Ácido clorhídrico.
HepG2	Células de hepatocarcinoma humano.
HSDB	Hazardous Substances Databank.
IN	Índice nuclear.
INCHEM	Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations.
INECC	Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.
Log KOW	Coefficiente de partición octanol-agua.
mg/kg	Miligramo por kilogramo.
M1	Células con 1 núcleo.
M2	Células con 2 núcleos.
M3	Células con 3 núcleos.

mM	Milimolar.
MN	Micronúcleo.
MNBC	Ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis.
MNM	Micronúcleos en células mononucleadas.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
MMC	Mitomicina C.
N	Total de células contadas.
nm	Nanómetro.
NR	Neuropatía retardada.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
POF	Plaguicida organofosforado.
SOS/umu	Ensayo de inducción de mutagenicidad con <i>Salmonella typhimurim</i> .
µg/mL	Microgramo por mililitro.
µL	Micro litro.
µM	Micromolar.
°C	Grado Celsius (Centígrado).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química general de los plaguicidas organofosforados.....	1
Figura 2. Estructura química de temefos.....	4
Figura 3. Rutas de biotransformación de temefos.....	6
Figura 4. Morfología celular de HepG2.....	12
Figura 5. Reducción de MTT.....	13
Figura 6. Viabilidad de células HepG2 tratadas con temefos durante 24 y 48 horas.....	18
Figura 7. Índice de división nuclear (IN) y porcentaje de células binucleadas (BN) en cultivos HepG2 tratados con temefos.....	19
Figura 8. Microfotografías representativas de estructuras nucleares observadas mediante el MNBC en células HepG2.....	19
Figura 9. Frecuencia de puentes nucleoplásmicos y gemaciones en la línea celular HepG2.....	22
Figura 10. Frecuencia de apoptosis y MN en células mononucleadas en la línea celular HepG2.....	23
Figura 11. Frecuencia de MN en la línea celular HepG2.....	24

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de células HepG2 con temefos.....	12
--	----

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de plaguicidas

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2002), un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades humanas o de animales, especies no deseadas de plantas o animales que causen perjuicios o que interfieren de cualquier otra forma en la producción agropecuaria o forestal. Los plaguicidas pueden ser clasificados de acuerdo a diferentes categorías, tales como: uso, composición química, naturaleza química, acción específica, concentración, formulación, modo de acción, grado de toxicidad y persistencia en el ambiente. Con base en su estructura química los plaguicidas se clasifican en: organofosforados (POF), organoclorados, carbamatos, piretroides, entre otros (González-Arias, 2010).

1.2 Plaguicidas organofosforados

Los POF son ésteres sintéticos del ácido fosfórico o fosforotioico. La estructura química de los POF comprende un átomo de fósforo central y su respectiva unión fosfórica ($P=O$) o fosforotioica ($P=S$), R_1 y R_2 generalmente son grupos alquilo o arilo, el grupo (X) es característico de cada especie química y suele contribuir de manera importante en las características físicas, químicas y biológicas del plaguicida (Hreljac y Filipic, 2009) (Figura 1).



Figura 1. Estructura química general de los plaguicidas organofosforados (Modificado de Hreljac y Filipic, 2009).

Los POF se descomponen con mayor facilidad respecto a los plaguicidas organoclorados, se degradan por oxidación e hidrólisis, dando origen a productos solubles en agua, por lo que son catalogados en un rango de no persistentes a moderadamente persistentes. La vida media de POF puede variar de días hasta meses (Ramírez y Lacasaña, 2001). Por otro lado, referente a sus propiedades, los POF, suelen ser liposolubles, atraviesan barreras biológicas y penetran en el sistema nervioso central, pueden tener una mediana tensión de vapor, son degradables al sufrir reacciones hidrolíticas en medio alcalino (Baddi y Varela, 2008). Respecto a la clasificación, estructuralmente se dividen en fosfatos, fosfonatos, fosfinatos, fosforotioatos, fosfonotioatos, fosforoditioatos, fosforotritioatos, fosforamidotioatos.

La forma activa de los POF se denomina oxón, éstos se unen directamente al sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). La tasa de inhibición de la enzima depende del grupo saliente.

1.3 Toxicidad de los POF

El mecanismo de toxicidad aguda de los POF es sobre el sistema nervioso central, mediante la inhibición de la AChE. Esta enzima, modula los niveles del neurotransmisor acetilcolina e interrumpe el impulso nervioso. Dentro de los síntomas ocasionados por los POF se encuentran: pérdida de reflejos, dolor de cabeza, mareos, náuseas, convulsiones, coma y hasta la muerte (Jeyaratnam y Maroni, 1994).

En cuanto a la toxicidad crónica, los POF causan diferentes formas de neuropatía retardada (NR), un amplio rango de efectos neuroconductuales, psicológicos y neurodegenerativos. La evidencia sugiere que a dosis subagudas, los POF pueden interactuar directamente con un amplio rango de enzimas que son blanco para su acción, tal es el caso de la AChE. Así mismo, provocan disrupción de membrana, recambio y fosforilación de proteínas, disfunción mitocondrial, reorganización del citoesqueleto y estrés oxidativo, sin embargo, los mecanismos no están del todo comprendidos (Hargreaves, 2012). Los mayores avances de la NR han sido en el estudio de la fosforilación de la esterasa neurotóxica (ENT), que es la proteína diana de la NR por POF; debido a que la unión de POF con la

ENT produce fosforilación e inhibición de la enzima, este proceso da lugar a la hiperfosforilación de proteínas ubicaças en el citoesqueleto de células nerviosas, alteración del transporte intracelular y origina la NR (Johnson, 1990).

1.4 Efectos genotóxicos

Los POF tienen propiedades alquilantes sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN), al añadir grupos alquilo, principalmente grupos metilo y etilo en las bases nitrogenadas (Preussman *et al.*, 1969; Fest y Schmidt, 1973). Estudios *in vitro* e *in vivo* han evidenciado los efectos genotóxicos de los POF. Al respecto, Chakravarthi *et al.* (2009) evaluaron la inducción de daño al ADN de monocitofos en linfocitos humanos de sangre periférica, y encontraron que este compuesto produce aberraciones cromosómicas e induce daño al ADN, medido mediante la longitud de la cola de cometa. Así también, en estudios llevados a cabo en ratas y ratones expuestos a POF, se encontró que metil pirimifos, produjo daño genotóxico en ratones, aumentó el número de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos y normocromáticos (Alabi *et al.*, 2014). POF tales como clorpirifos, metil paration y malatión causan un sincremento de daño al ADN en linfocitos de rata, mediante el ensayo cometa y ensayo por emisión de fluorescencia (Ojha y Srivastava, 2014). Referente a estudios en humanos, se ha reportado que estos compuestos pueden causar diferentes tipos de alteraciones cromosómicas tales como rupturas de cromosomas, cromosomas dicéntricos, cromosomas en anillo, intercambio de cromátidas hermanas, translocaciones y endoreduplicaciones en linfocitos humanos de sangre periférica (Lieberman *et al.*, 1998). Vivien *et al.* (2013), reportaron que la exposición crónica a POF está asociada con un aumento en la fragmentación de ADN evaluado mediante el ensayo cometa y un aumento en la frecuencia MN en epitelio bucal, en un grupo de agricultores dedicados al cultivo de arroz.

1.5 Generalidades de temefos

Temefos es un POF de amplio uso en campañas de salud pública y en fumigaciones urbanas (Donalisio *et al.*, 2002; EPA, 2008). Debido al uso sanitario que se le da para el control del dengue, este plaguicida se aplica sobre depósitos de agua de uso doméstico así como en diferentes cuerpos de agua. Su nombre

químico es O,O,O',O'-tetrametil-O,O'-tio-di-p-fenileno; comercialmente se le conoce como Abate, Abathion, Acibate, Alabaster, Biothion, Bithion, Difennthos, Ecopro, Fostem, Larvafos, Larvate, Larbate, Nimitex, Protefefos, T. M. Fos, Temefhos, Swebate y Temefos (EPA, 2008). En la Figura 2 se muestra la estructura química de temefos, su fórmula química condensada es C₁₆H₂₀O₆P₂S₃ (INECC, 2013).

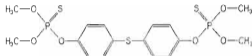


Figura 2. Estructura química de temefos (INECC, 2013).

1.5.1 Características fisicoquímicas

Temefos presenta un punto de fusión de 30.5 °C, densidad relativa de 1.32 g/cm³, peso molecular de 466.48 g/mol, es soluble en compuestos orgánicos como bicloruro de etileno, acetonitrilo, tetracloruro de carbono, éter y tolueno, es poco soluble en agua y es insoluble en metilciclohexano y hexano. La presión de vapor de temefos es de 7.17 x10⁻⁸ torr a 25 °C, la ley de Henry de 1.47 x10⁻⁶ atm.m³.mol⁻¹, es hidrolizado con ácidos y bases fuertes, su punto de ebullición es de 120 a 125 °C. Temefos tiene un elevado valor de coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}= 4 91) característica que aumenta la adsorción en los sedimentos y absorción en los organismos vivos (EPA, 2008).

Temefos es poco persistente; en suelo su vida media es de 30 días, el pH es un factor importante de remoción debido a que en suelos básicos es eliminado por hidrólisis química rápidamente. En sistemas acuáticos, la persistencia de temefos es corta, puede ser eliminado en horas o pocos días; es fotosensible y puede sufrir degradación aerobia. Este plaguicida no se disipa fácilmente en cuerpos de agua en ausencia de luz solar o de microorganismos; además se volatiliza

lentemente cuando se encuentra presente en aguas estancadas (EXTOXNET, 2002; HSDB, 2003; EPA, 2008).

1.5.2 Toxicocinética

En animales, se ha estimado que el porcentaje de absorción de temefos de forma dérmica es de 38%, mientras que de forma inhalada es del 100%. Hasta el momento, no se cuentan con datos de absorción para humanos. En cuanto a la distribución, un estudio realizado en ratas macho Sprague Dawley (de 150 a 200 g de peso), a las que se les administró por vía oral 970 µg y 1357 µg de temefos triliado, se observó que este compuesto se distribuyó principalmente en tejido graso, hígado, riñones y estómago. Sin embargo, tras 72 horas de la administración éste se acumuló en tejido graso (Blinn, 1966). Asimismo, en estudios en ratas, se ha observado un pico máximo de temefos en sangre después de 5-8 horas de su administración, con una vida media de 7 a 10 horas aproximadamente (EXTOXNET, 2002; INCHEM, 2002; HSDB, 2003). La principal ruta de excreción de temefos sin biotransformar y de sus metabolitos sulfoxidados, es a través de las heces, mientras que por la orina se eliminan los metabolitos conjugados o hidrolizados (Blinn, 1966; Ferguson *et al.*, 1985).

En relación a la biotransformación, poco se conoce, sin embargo, se ha descrito que es relativamente estable a la degradación metabólica; su principal ruta de biotransformación es a través de la S-oxidación para formar temefos sulfóxido y temefos sulfona, así como hidrólisis por carboxilesterasas para formar 4,4'-tiodifenol, 4,4'-sulfanildifenol y 4,4'-sulfonildifenol. Además de un metabolismo secundario por glucoronidación o sulfonación de temefos (Blinn, 1966; Ferguson *et al.*, 1985; Verdín-Betancourt, 2013). En la Figura 3 se proponen las rutas de biotransformación propuestas para temefos.

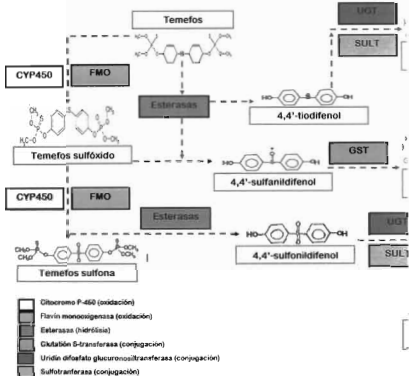


Figura 3. Rutas de biotransformación de temefos (Blinn, 1966; Ferguson et al., 1985).

1.5.3 Toxicidad aguda

La toxicidad aguda de temefos está relacionada con la inhibición de la enzima AChE (EPA, 2008). Debido a su bajo potencial de toxicidad aguda en humanos y a su escasa hidrosolubilidad, no se considera que el uso de temefos para el control del mosquito transmisor del dengue represente un peligro para la población (ATSDR, 2005). Respecto a la toxicidad de temefos en ratas, ésta es relativamente baja, la dosis letal media tiene un rango de 1300 a 4000 mg/kg de peso (Renshaw y Bobbis, 2006).

1.5.4 Genotoxicidad y carcinogenicidad

Un estudio realizado por Aiub *et al.* (2002), evaluó la toxicidad y genotoxicidad de temefos mediante el uso de los ensayos cometa en células de rata Wistar y SOS/umu y AMES/Salmonella, y encontraron que este compuesto indujo lesiones severas al ADN a concentraciones mayores de 1.34 μM . Asimismo, se observó genotoxicidad pero no citotoxicidad en la cepa de *E. coli* PQ37, pero no en la PQ35, a concentraciones mayores de 1.33 μM , particularmente cuando no se utilizó la fracción S9. Temefos no fue mutagénico en el ensayo de AMES con las cepas T97, TA98, TA100 y TA102, con y sin activación metabólica. Sin embargo, a concentraciones superiores de 3.33 μM fue mutagénico para *S. typhimurium* cepas TA98NR, YG7104 y YG108, con y sin actividad metabólica. Además, en un estudio realizado por Bezerra de Melo *et al.* (2008), se evaluó la presencia de MN en células de médula ósea, de ratones tratados oralmente con 27.75, 55.5 y 111.0 mg/kg de temefos y se observó una relación directamente proporcional entre la dosis de temefos y la presencia de MN.

En cuanto a carcinogenicidad, en ratas tratadas crónicamente con temefos por dos años con dosis de 15 mg/Kg/día, no se observó la formación de tumores (EPA, 2008).

1.6 Células HepG2

La línea celular de hepatocarcinoma humano (HepG2), deriva del tejido de hígado de un individuo caucásico de 15 años con hepatocarcinoma celular diferenciado (ATCC, 2013). Esta línea celular, son hepatocitos adherentes que comparten

características morfológicas y funcionales que se utilizan para ensayos basados en la función hepática, metabolismo y toxicidad de compuestos. Las células HepG2 expresan la mayoría de las enzimas de fase I y fase II que participan en la biotransformación de xenobióticos (Wilkening *et al.*, 2003, Young *et al.*, 2006; Jennen *et al.*, 2011). Aproximadamente el 90% de las células HepG2 en el cultivo, tienen de 54 a 56 cromosomas entre los que se incluye el cromosoma XY (Norman, 1990; Lyer *et al.*, 2010).

1.7 Ensayo de micronúcleos como biomarcador de efecto genotóxico

En numerosos estudios se ha utilizado el ensayo de MN como un biomarcador de daño genotóxico ante la exposición a plaguicidas y a mezclas de estos (Revisión en Bolognesi, 2003; Bolognesi *et al.*, 2011). El ensayo de MN por bloqueo de citocinesis (MNBC) es un método citogenético validado para evaluar la frecuencia de MN. La importancia de este ensayo se debe a su gran versatilidad, ya que permite evaluar parámetros como MN, índice nuclear (IN), gemaciones, puentes nucleoplásmicos, células apoptóticas y células necróticas, lo que permite obtener información más completa sobre los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos de un compuesto en particular (Fenech, 2000). El ensayo de MNBC es la prueba de genotoxicidad de uso más frecuente en ensayos con mamíferos, proporciona una medida indirecta, simple y rápida de las aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (Zhuge *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICACIÓN

Temefos es un insecticida utilizado para la eliminación del vector transmisor del dengue. A pesar de su amplio uso son escasos los trabajos que mencionan los efectos adversos producidos por temefos y aún más los relacionados con el efecto genotóxico. Por lo que se considera relevante evaluar el daño genético que produce este insecticida en la línea celular HepG2, a través del ensayo de micronúcleos. Este estudio permitirá conocer el posible potencial genotóxico de temefos en células de origen humano que cuentan con una batería completa de enzimas que biotransforman xenobióticos.

3. HIPÓTESIS

Temefos grado reactivo produce genotoxicidad en células HepG2.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto genotóxico producido por temefos grado reactivo en células HepG2.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto citotóxico ocasionado por la exposición a temefos grado reactivo en células HepG2.
2. Determinar el efecto citostático ocasionado por la exposición a temefos grado reactivo en células HepG2.
3. Evaluar la frecuencia de micronúcleos, gemaciones, puentes nucleoplásmicos, células apoptóticas y células necróticas mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis en cultivos celulares HepG2 tratados con diferentes concentraciones de temefos grado reactivo.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño del estudio

Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado, cada experimento se realizó con sus respectivos controles; como control de vehículo se utilizaron células HepG2 tratadas con dimetil sulfoxido (DMSO <0.05%) y como control positivo se utilizaron células HepG2 tratadas con mitomicina C (1 μ M). Para la evaluación de los parámetros de citotoxicidad, citostaticidad y genotoxicidad, cultivos celulares HepG2 fueron tratados con temefos a concentraciones de 0.5, 1, 2, 5 y 10 μ M y a tiempos de 24 y 48 horas.

5.2 Cultivo celular HepG2

Células HepG2 obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection) (Figura 4), se cultivaron en medio DMEM (Dubelcobs Modified Eagle Medium), el cual fue previamente suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% L-glutamina y 1% de antibióticos-antimicóticos. Las células se mantuvieron en cajas de cultivo de 75 cm² estériles, en una incubadora en condiciones de 5% de CO₂ atmosférico y 37 °C de temperatura. Cuando los cultivos alcanzaron 100% de confluencia celular se realizó la cosecha celular, para la cual, se eliminó el medio de cultivo, se agregaron 2 mL de tripsina al 0.25% con EDTA a 37 °C, se dejaron incubar durante 5 minutos y las cajas se agitaron ligeramente para permitir que las células se despegaran completamente. Posteriormente, se agregó medio de cultivo DMEM (8 mL), se homogeneizó y las células se colocaron en cajas de cultivo nuevas para proceder a incubar nuevamente a 37 °C para su uso posterior.

5.3 Tratamientos con temefos

En la Tabla 1 se presentan los detalles de los tratamientos realizados en células HepG2 para las determinaciones de los diferentes parámetros de citotoxicidad, citostaticidad y genotoxicidad.



Figura 4. Morfología celular de HepG2.

Tabla 1. Tratamientos de células HepG2 con temefos.

Tratamiento (μM)	Medio DMEM (μL)	Volumen agregado de solución de trabajo (μL)	Solución de trabajo (μM)	DMSO (μL)	MMC (μL)	Volumen final (μL)
0.5	6997	3	1166.6	0	0	7000
1	6998.8	1.2	5833.3	0	0	7000
2	6997.6	2.4	5833.3	0	0	7000
5	6997	3	11666.6	0	0	7000
10	6997.7	2.23	31350	0	0	7000
Control de disolvente DMSO	6997	0	-----	3	0	7000
Control (+) MMC	6997.6	-----	-----	0	2.34	7000

5.4 Evaluación de la citotoxicidad celular

Fundamento

La viabilidad celular en HepG2 se determinó mediante el ensayo colorimétrico de MTT de acuerdo a la técnica propuesta por Mosmann (1983). Esta técnica se basa en una reacción de óxido-reducción, en la que la sal de tetrazolio de color amarillo se reduce por acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial y otras reductasas a un cristal formazán de color azul, que es medible espectrofotométricamente (Figura 5).

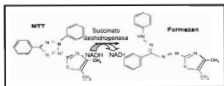


Figura 5. Reducción de MTT (Basado en Mosmann, 1983).

Reactivos

- Kit de ensayo toxicológico *in vitro* basado con MTT.
- MTT (3 (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil tetrazolio).
- Solución solubilizante: Triton X-100 plus al 10%, HCl 0.1 N en isopropanol anhidro.

Procedimiento

Una vez que las células HepG2 estuvieron al 100% de confluencia, se realizó la cosecha celular con tripsina y se realizó el conteo celular en un hemocitómetro. Las células en suspensión se ajustaron a una densidad de 500,000 células/pozo y se sembraron en placas de 6 pozos bajo las condiciones de cultivo señaladas anteriormente, durante 24 horas. Posteriormente, se realizaron los tratamientos con temefos grado reactivo a diferentes concentraciones y tiempos (24 y 48

horas). La viabilidad celular se determinó a través de las lecturas de las muestras a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placa de 96 pozos (μ Quant de Biotek Modelo MQX200).

5.5 Evaluación de la citostaticidad celular

El IN y la proporción de células binucleadas son parámetros utilizados para conocer la respuesta mitogénica celular. El IN se evaluó de acuerdo al método propuesto por Eastmond y Tucker (1989). El cálculo se realizó en 200 células a partir de la frecuencia de células con 1, 2, 4 o más núcleos con la siguiente ecuación: $IN = [M1 + 2(M2) + 3(M4)] / N$, donde M1-M4 representan el número de células con 1 a 4 ó más núcleos y N representa el número total de células contadas.

5.6 Cultivo celular para evaluación de genotoxicidad

Reactivos

- Solución stock de temefos grado reactivo para la técnica de MNBC. La solución se preparó a partir de un estándar de temefos (grado reactivo) marca SUPELCO de 100 mg (Chem Service), con pureza de 97.5%. Directamente en el vial de temefos se agregó 1 mL de DMSO grado biología molecular y se calculó la concentración (igual a 209 mM).
- Células HepG2 (ATCC).
- Medio DMEM suplementado con antibióticos, antimicóticos, aminoácidos no esenciales, L-glutamina y suero fetal bovino, pH 7.1.
- Dimetil sulfóxido grado biología molecular (DMSO).
- Mitomicina C (MMC) 1 μ M.
- Citocalasina-B 3 μ g/mL.

Procedimiento

Después de que las células alcanzaron la confluencia celular (100%), se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos, a una densidad de 500,000 células por pozo, previamente se agregaron 2 mL de medio de cultivo DMEM a cada

pozo. Se incubó en condiciones de 37 °C y 5% de CO₂. A las 24 horas de siembra se realizó el cambio de medio, se agregaron 2 mL de medio DMEM, se incubó nuevamente y a las 24 horas se realizó la exposición a temefos grado reactivo a las diferentes concentraciones y tiempos. El cambio de medio se realizó cada 24 horas; a las 72 horas de siembra se agregó citocalasina B (3 µg/mL) y 24 horas después se realizó la cosecha celular.

5.7 Cosecha celular

Reactivos

- Medio DMEM suplementado con antibióticos, antimicóticos, aminoácidos no esenciales, L-glutamina y suero fetal bovino, pH 7.1.
- Ácido acético (99.90% de pureza).
- Metanol (99.93% de pureza).
- Solución Carnoy's. Metanol y ácido acético en proporción 3:1.
- Hidróxido de sodio 10 M.
- Tripsina con EDTA 0.025%.

Procedimiento

Se retiró el medio de los cultivos celulares, se agregaron 500 µL de tripsina por pozo para despegar las células, después, se neutralizó con 500 µL de medio DMEM (a 37 °C) y se resuspendió en el pozo. Posteriormente, se fijó con 500 µL de solución de Carnoy's (fría) (se observó un cambio de color, de rosa al amarillo), nuevamente se resuspendió ligeramente. El contenido de cada pozo se pasó a tubos de cristal de fondo redondo (13 x 100) y se agregó a cada tubo 1 mL de solución fijadora para realizar lavados (1200 r.p.m./10 minutos), se retiró el sobrenadante y se repitió el proceso de lavado 4 veces. Posterior al último lavado, se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con 500 µL de solución fijadora Carnoy's (fría), para pasar la suspensión celular a portaobjetos esmerilados previamente rotulados, se dejaron secar las laminillas a temperatura ambiente y se procedió a realizar el proceso de tinción con el kit hemacolor (May-

Grünwald Giemsa). La lectura de laminillas se realizó en un microscopio Carl Zeiss AxioStar plus, de luz clara a 100X.

5.8 Lectura de parámetros de genotoxicidad

La lectura de laminillas se realizó en ciego, para lo cual se cubrió la identificación de cada laminilla y se le asignó un número aleatoriamente. La evaluación de MN al igual que la de gemaciones, puentes nucleoplásmicos, células apoptóticas y células necróticas, se realizó en un total de 1000 células binucleadas, mediante la técnica de MNBC. Los criterios que se consideraron para el conteo de biomarcadores de genotoxicidad fueron los establecidos por Fenech *et al.* (2003): a) Células binucleadas, ambos núcleos con membrana intacta y dentro del citoplasma, iguales en tamaño, patrón e intensidad de tinción, pueden estar unidos por un puente nucleoplásmico. b) Los núcleos se pueden tocar, no superponerse, (a menos que los límites sean distinguibles). c) El límite citoplasmático intacto y claramente distinguible con un diámetro de 1/16 a 1/8 con respecto al núcleo principal. Para los MN el diámetro varía entre 1/16 y 1/3 parte de la media del diámetro del núcleo principal. d) No deben de ser refractantes o vinculados con los núcleos principales, pueden tocar, no superponerse a los núcleos distinguiéndose el límite del MN, deben de contar con igual intensidad de tinción, algunas veces más intensa.

5.9 Análisis estadístico

Los efectos de temefos grado reactivo, en células HepG2, se analizaron mediante pruebas paramétricas y no paramétricas, de acuerdo a la distribución obtenida de las variables (ANOVA, Bonferroni, U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis y Dunn).. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se desarrollaron en el programa stata 11.1 (stata statistical software, stata corporation, college station, texas) y GraphPad Prism 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Citotoxicidad celular

De acuerdo con los resultados obtenidos, los tratamientos con temefos no afectaron la viabilidad celular a concentraciones de 0.5-10 μM durante 48 horas (Figura 6). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo (MMC) y control de vehículo (DMSO).

La viabilidad celular se relaciona con la capacidad de una célula para llevar a cabo sus procesos fisiológicos y bioquímicos, este concepto se refiere a la integridad y a la capacidad metabólica celular (Luque y Herráez, 2011). La capacidad metabólica de la célula representa un indicador de la integridad de las mitocondrias y por lo tanto, este parámetro es ampliamente utilizado como reflejo de la viabilidad celular (Eisenbrand *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2007). Diferentes estudios en los que se evalúa la citotoxicidad de POF, han utilizado el ensayo colorimétrico con MTT (Cabello *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Hreljac *et al.*, 2008; Edwards *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Hreljac *et al.* (2008), en el que se utilizó la línea celular HepG2, para conocer el efecto de los POF metil paratión, metil paraoxón y dimefox sobre la capacidad de división celular a concentraciones de 0.01-100 μM , encontraron que metil paratión y metil paraoxón, no afectaron la proliferación celular a concentraciones similares (0.01, 0.1, 1.0 y 10 μM) a las utilizadas en este estudio (0.5-10 μM), contrariamente, al evaluar el potencial citotóxico de dimefox, se observó un aumento en la proliferación celular a concentraciones menores a 100 μM (0.01, 0.1, 1 y 10 μM). Algunos estudios realizados en HepG2, sugieren que los POF ejercen un efecto mitogénico a concentraciones bajas y un efecto citotóxico a concentraciones más altas (Delescluse *et al.*, 1998; Hreljac *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

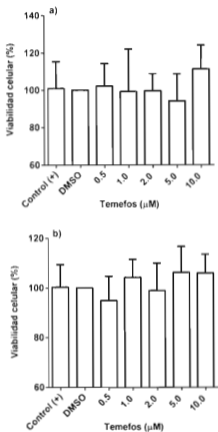


Figura 6. Viabilidad de células HepG2 tratadas con temefos durante 24 (a) y 48 (b) horas. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba a posterior de Dunn. Cada barra representa la media \pm DE de tres experimentos independientes, realizado por triplicado. Control (+). MMC 1 μ M, DMSO: control de vehículo $<0.05\%$.

6.2 Citostaticidad celular

Los tratamientos con temefos no modificaron el índice de división nuclear (IN), ni el porcentaje de células binucleadas (BN) en los cultivos celulares HepG2, lo que sugiere, que este compuesto no tiene un efecto citostático a las concentraciones probadas, en este modelo experimental, (Figura 7). En la Figura 8 se presentan microfotografías representativas de estructuras nucleares observadas mediante el MNBC en células HepG2.

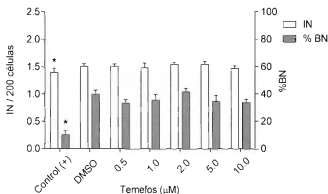


Figura 7. Índice de división nuclear (IN) y porcentaje de células binucleadas (BN) en cultivos HepG2 tratados con temefos. * $p < 0.05$ respecto al control de vehículo. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba a posteriori de Dunn. Cada barra representa la media \pm DE de tres experimentos independientes por triplicado. Control (+): MMC 1 μM , DMSO: control de vehículo $< 0.05\%$.

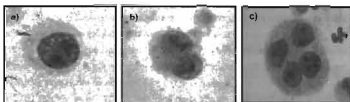


Figura 8. Microfotografías representativas de estructuras nucleares observadas mediante el MNBC en células HepG2. a) Célula mononucleada, b) Célula binucleada, c) Célula polinucleada.

Diversos estudios, han utilizado el IN como medida de la capacidad de proliferación o división celular (Lamy *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2009; Chequer *et al.*, 2012; Nikoloff *et al.*, 2013; Nikoloff *et al.*, 2014). El IN es un indicador que ofrece información sobre el estado de la proliferación en células de origen humano expuestas a xenobióticos, como los POF. Cuando hay alteraciones en el proceso de división celular y aumenta la proporción de células mononucleadas, el IN presentará valores de 1.0. Cuando las células han alcanzado una división nuclear completa, las células tendrán el aspecto de binucleadas y los valores del IN estarán cercanos a 2.0. De acuerdo a la cinética de división celular, se pueden obtener valores mayores a 2.0 cuando se presenta un aumento en la proporción de células polinucleadas (más de dos núcleos), lo que implica que han completado más de una división celular (Fenech y Crott, 2002; Sierra, 2011). En este estudio no se observaron alteraciones en la proliferación de células y por ende en el IN, en HepG2 tratadas con temefos a concentraciones de 0.5-10 μM .

Los resultados de este trabajo difieren con los reportados en otros estudios realizados en el mismo modelo celular, pero con otros plaguicidas. En este contexto, Nikoloff *et al.* (2014), evaluaron los efectos citotóxicos, apoptóticos y genotóxicos del herbicida fluorecloridona y de dos de sus presentaciones (Twin Pack Gold y Rainbow) en células HepG2, a concentraciones de 0.25-15 μM . Los autores encontraron que tanto Twin Pack Gold como Rainbow, a 10 μM , causaron disminución del IN, con respecto al control (1.71 ± 0.03), de 0.6 (1.11 ± 0.09) y 0.42 veces (1.29 ± 0.02), respectivamente.

Estudios en poblaciones humanas, ocupacionalmente expuestas a plaguicidas, han mostrado resultados consistentes del efecto negativo de estos xenobióticos sobre la replicación celular y nuclear. Así, en un estudio realizado en trabajadores (18 a 57 años) que manejan plaguicidas para el control de vectores de enfermedades, en Brasil, se encontró que los aplicadores de plaguicidas tuvieron IN significativamente menores (1.49 ± 0.02) con respecto a un grupo control (1.61 ± 0.02) (Kehdy *et al.*, 2007). Por otra parte, Satar *et al.* (2009) en pacientes intoxicados con POF, encontraron que el IN fue significativamente menor en los pacientes cuando ingresaron al servicio de emergencias por intoxicación, con respecto a su egreso del hospital después de haber recibido tratamiento. Estos

resultados también se han observado en un grupo de trabajadores de Jordania, expuestos a malatión y clorpirifos (con un tiempo de exposición entre 3-30 años). Estos trabajadores tuvieron índices mitóticos menores (1.45 ± 0.08) en linfocitos de sangre periférica, con respecto a individuos control (3.86 ± 0.41) (Omari-Yousif, 2011). Los antecedentes mencionados sugieren que los plaguicidas podrían causar un efecto inmunosupresor a los individuos, lo cual implicaría un aumento en la susceptibilidad a diversos tipos de enfermedades.

6.3 Genotoxicidad

La frecuencia de puentes nucleoplásmicos, gemaciones, apoptosis y micronúcleos en células mononucleadas (MNM), se presentan en las Figuras 9 y 10, respectivamente. De acuerdo a estos datos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos con temefos con respecto al control negativo. Respecto al control positivo, se observó un aumento en la frecuencia de apoptosis con respecto al control negativo.

En la Figura 11, se presenta la frecuencia de MN en células binucleadas, de acuerdo a éstos, el tratamiento con $10 \mu\text{M}$ de temefos causó un incremento en este parámetro de genotoxicidad.

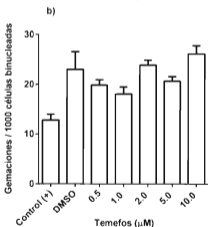
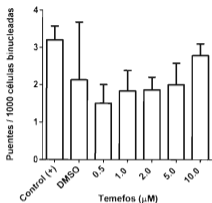


Figura 9. Frecuencia de puentes nucleoplásmicos (a) y gemmaciones (b) en la línea celular HepG2. Las barras representan los resultados de tres experimentos independientes por triplicado \pm DS. * $p < 0.05$ respecto al control de vehículo. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA seguido de la prueba a posteriori de Bonferroni. Control (+): MMC 1 μ M, control de vehículo DMSO <0.05%.

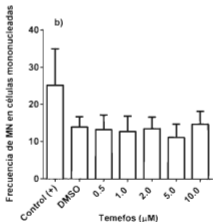
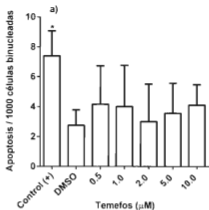


Figura 10. Frecuencia de apoptosis (a) y MN en células mononucleadas (b) en la línea celular HepG2. Las barras representan los resultados de tres experimentos independientes por triplicado \pm DE. * $p < 0.05$ respecto al control de vehículo. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA seguido de la prueba a posteriori de Bonferroni (1) y por la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba a posteriori de Dunn (2). Control (+): MMC 1 μM , control de vehículo DMSO <0.05%.

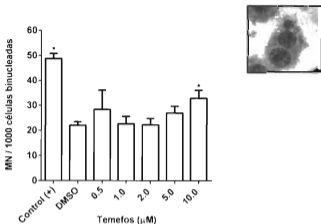


Figura 11. Frecuencia de MN en la línea celular HepG2. Las barras representan los resultados de tres experimentos independientes por triplicado \pm DE. * $p < 0.05$ respecto al control de vehículo. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba a posterior de Dunn. Control (+): MMC 1 μM , control de vehículo DMSO $< 0.05\%$.

Buratti *et al.* (2007) proponen que las concentraciones de POF inferiores a 10 μM , utilizadas en estudios *in vitro*, asemejan condiciones humanas *in vivo* durante la exposición ambiental normal. Por otro lado, cuando se utilizan concentraciones superiores a 100 μM , se refleja la intoxicación accidental aguda. En el presente estudio se utilizó un gradiente de concentración de 0.5 a 10 μM de temefos. Las concentraciones más bajas (de 0.5 a 5 μM) de acuerdo a Buratti, representarían una exposición ambiental normal. Los resultados obtenidos en esta investigación son relevantes, ya que demostraron el potencial genotóxico causado por exposición a bajas concentraciones de temefos, las cuales asemejan a las concentraciones utilizadas en campañas de salud (2.14 μM), de acuerdo con datos de la NOM-032-SSA2-2010.

La genotoxicidad de los POF está relacionada con los procesos de bioactivación, es decir la generación de metabolitos más tóxicos que los compuestos originales

durante los procesos de biotransformación (Vale, 1998). El uso de líneas celulares de mamífero con expresión estable de enzimas de biotransformación, ha hecho posible la evaluación del riesgo relativo de xenobióticos mediante pruebas de toxicidad *in vitro* (Kessova y Cederbaum, 2003). En este sentido, el modelo experimental HepG2 ha permitido demostrar el efecto genotóxico de diversos compuestos (Knasmüller *et al.*, 1999; Wilkening *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2006; Jennen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Respecto a la expresión enzimática para activación de compuestos químicos como los POF, en la línea celular HepG2, se expresan diferentes isoformas de citocromos P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4); esta propiedad representa una herramienta útil para investigaciones referentes a activación metabólica de compuestos mediada por este sistema enzimático [Yoshitomi *et al.* 2001; Zhuge *et al.*, 2003]. Esta línea celular, no presenta la mutación del gen p53 y por lo tanto, permite a las células inducir la ruta de respuesta a daño en el ADN, la detención del crecimiento y activación de vías apoptóticas. Así también, este modelo experimental es adecuado para ensayos de genotoxicidad (Jennen *et al.*, 2010; Westerink *et al.*, 2010).

Referente a la genotoxicidad de temefos, la literatura científica es escasa; Aiub *et al.* (2002) evaluaron el efecto mutagénico de temefos mediante el ensayo cometa, en células de rata Wistar y SOS/umu y AMES/Salmonella, y encontraron lesiones graves en el ADN a concentraciones mayores a 1.34 μM . Además, Bezerra de Mélo *et al.* (2008), evaluaron el efecto mutagénico de temefos mediante el ensayo de MN en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratones, a los que se les administró temefos oralmente a concentraciones de 27.75, 55.5 y 111.0 mg/kg. Los autores encontraron una relación directa entre la dosis y, la frecuencia de MN y de aberraciones cromosómicas. En otro estudio realizado en linfocitos humanos de sangre periférica, en el que se evaluó el potencial genotóxico de temefos mediante el ensayo cometa en células mononucleadas, se encontró que temefos grado reactivo, provocó daño al ADN a concentraciones de 1.0, 2.0, 5.0 y 10 μM , así mismo, encontraron que temefos ocasionó un aumento en la longitud de la cola de cometa en células HepG2, a concentraciones de 0.5 y 10 μM . En el mismo estudio se realizó la evaluación del potencial genotóxico de temefos, mediante el ensayo de MNBC en un sistema *in vitro* de linfocitos humanos de

sangre periférica y no se encontró un aumento en la frecuencia de MN en un rango de 0.5 a 10 μM (Benitez-Trinidad *et al.*, 2015). Las concentraciones utilizadas en ese estudio se encuentran dentro del rango utilizado en este trabajo (0.5-10 μM).

El ensayo cometa evalúa el daño al ADN que puede ser reparado; sin embargo, el ensayo de MNBC, evalúa el daño que no se reparó, es decir el daño permanente. Si bien en este trabajo se evidenció la genotoxicidad de temefos mediante el ensayo de MNBC, aún falta describir los mecanismos a través de los cuáles temefos puede causar efectos deletéreos en el material genético, causando la formación de MN en células HepG2.

De acuerdo con Jennen *et al.* (2011), la línea celular HepG2 tiene la capacidad de modular una respuesta a un daño a través de cascadas de señalización, ya que puede activar GTPasas, SOS1 y el sistema implicado en la carcinogénesis; sin embargo, se podría suponer que los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos o el sistema SOS, pueden ser dianas de los metabolitos resultantes de la bioactivación de temefos, propiciando un efecto genotóxico. Si bien es cierto que temefos no fue citostático, así como tampoco aumentó la frecuencia de puentes nucleoplásmicos, gemaciones, apoptosis y necrosis, en células HepG2, esto puede ser debido a que en las células HepG2 se puede presentar resistencia a las diferentes vías apoptóticas, causado por la presencia de protooncogenes (Met y Ron) y oncogenes como activadores de la progresión celular o bien sobreexpresión de los mismos en línea celular HepG2. Estos protooncogenes están presentes en la mayoría de los tejidos con carcinomas (Desiderio *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2012).

Finalmente, es primordial considerar que las inconsistencias en la genotoxicidad de POF y concretamente del insecticida temefos, pueden ser el resultado del uso de diferentes concentraciones del compuesto activo, las características particulares de los modelos experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, el tiempo de exposición y tratamiento, del biomarcador utilizado, así como los criterios utilizados para evaluar y validar respuestas positivas. Además, es importante señalar que la formulación de los plaguicidas puede modificar la toxicidad de los mismos, ya que se sugiere que la presencia de componentes nocivos utilizados

como excipientes, cuentan ya sea con un efecto tóxico intrínseco o bien con la capacidad de exacerbar la toxicidad del producto puro (Larramendy *et al.*, 2014)

7. CONCLUSIONES

- * Los tratamientos con temefos (0.5 a 10 μM) no ocasionaron citotoxicidad en los cultivos HepG2.
- * Temefos no tiene efecto citostático en la línea celular HepG2 a las concentraciones probadas.
- * Temefos no aumentó la frecuencia de gemaciones, puentes nucleoplásmicos, células apoptóticas o necróticas en HepG2.
- * El tratamiento con 10 μM de temefos aumentó la frecuencia de micronúcleos en células HepG2, lo que sugiere la importancia de la biotransformación en el potencial genotóxico de este insecticida.

8. PERSPECTIVAS

1. Determinar mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), el posible mecanismo aneugénico o clastogénico de temefos.
2. Evaluar el efecto que pudiera tener temefos sobre los principales sistemas de reparación, tales como: reparación por escisión de base, reparación por escisión de nucleótidos o respuesta SOS.
3. Evaluar si temefos grado comercial es capaz de causar daños permanentes en el material genético, tanto en linfocitos como en células HepG2.

9. REFERENCIAS

- Aiub, C.A., Coelho, E.C., Sodré, E., Pinto, L.F., Felzenszwalb, I. (2002). Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genetic Molecular Research*. 30:159-166.
- Alabi, O.A., Ogunwenmo, K.O., Adebusi, T.T., Shobowale, O. D. (2014). Genotoxic potential of pirimiphos-methyl organophosphate pesticide using the mouse bone marrow erythrocyte micronucleus and the sperm morphology assay. *Journal of Environmental and Occupational Science*. 3(2):81-86.
- ATCC (2013). American Type Culture Collection HepG2. [Consultado octubre de 2013]. Disponible en: www.atcc.org
- ATSDR. (2005). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Temephos. [Consultado en enero de 2013]. Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/consultations/west_nile_virus/temephos.html
- Baddi, M. H., Varela S. (2008). Insecticidas organofosforados y sus efectos en el ambiente. *Cultura Cientifica y Tecnológica. Toxicologia de insecticidas*. (28):6-17.
- Bentez-Trinidad, A.B., Herrera-Moreno, J.F., Víquez-Estrada, G., Verdin-Betancourt F.A., Sordo M., Ostrosky-Wegman P., Bernal-Hernández Y.Y., Medina-Díaz I.M., Barrón-Vivanco B.S., Robledo-Marenco, M.L., Salazar, A.M., Rojas-García, A.E. (2015). Cytostatic and genotoxic effect of temephos in human lymphocytes and HepG2 cells *Toxicology in Vitro*. 29:779-786.
- Bezerra de M lo, M.E., da Costa Merlo, K., de Carvalho Fernandes, R.R., Feitosa Luna, C., Nunes Diniz, G.T., Jansen de Almeida Cantanho, M.T., Regis, L. (2008). Mutagenic effects of the organophosphate insecticide temephos on mice bone marrow cells. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 67(3):96-201.

- Blinn, R.C. (1966). Abate insecticide: The metabolic fate of O,O,O,O'-tetramethyl O,O'-thio-p-phenylene phosphothioate in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17:118-122.
- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 543:251-272.
- Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. (2011). Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*, 26(1):19-26.
- Buratti, F.M., Leonni C., Testai, E. (2007). The human metabolism of organophosphorothionate pesticides: Consequences for toxicological risk assesment. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2:37-44.
- Cabello, G., Galaz, S., Botella, L., Calaf, G., Pacheco, M., Stockert, J.C., Villanueva A., Cañete, M., Juaranz, A. (2003). The pesticide malathion induces alterations in actin cytoskeleton and in cell adhesion of cultured breast carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, (3)23:697-704.
- Chakravarthi, B. K., Naravaneni, R., Philip, G. H., Reddy, C. S. (2009). Investigation of monocrotophos toxic effects on human lymphocytes at cytogenetic level. *African Journal of Biotechnology*, 8(10):2042-2046.
- Chen, Q., Seol, D.W., Carr, B., Zarnegar, R. (1997). Co-Expression and Regulation of Met and Ron Proto-Oncogenes in Human Hepatocellular Carcinoma Tissues and Cell Lines. *Hepatology*, (26)1:59-66.
- Chequer, F.M., Venâncio, V.P., Pires Bianchi, M.L., Greggi Antunes, L.M. (2012). Genotoxic and mutagenic effects of erythrosine B, a xanthene food dye, on HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50:3447-3451.
- Delescluse, C., Ledirac, N., de Sousa, G., Pralavorio, M., Lesca, P., Rahmani, R. (1998). Cytotoxic effects and induction of cytochromes P450 1A1:2 by insecticides, in hepatic or epidermal cells: binding capability to the Ah receptor. *Toxicology Letters*, 96,97:33-39.

- Desiderio, M.A., Pogliaghi, G., Dansi, P. (1998). Hepatocyte Growth Factor-Induced Expression of Ornithine Decarboxylase, c-met, and c-myc Is Differently Affected by Protein Kinase Inhibitors in Human Hepatoma Cells HepG2. *Experimental Cell Research*, 242:401-409.
- Donalisio, M.R., Ferreira Leite, O., Caporale Mayo, R., Pinheiro M.J., Souza, A., Rangel, O., A, V.R., Oliveira, S.S., Matias, V.L. (2002). Use of temephos for control of field population of *Aedes aegypti* in America Sao Paulo, Brazil. *Dengue Bulletin*, 26:173-177.
- Eastmond, D.A., Tucker, J.D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13:34-43.
- Edwards, F.L., Yedjou, C.G., Tchounwou, P.B. (2011). Involvement of oxidative stress in methyl parathion and parathion-induced toxicity and genotoxicity to human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environmental Toxicology*, 28:342-348.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40(2):193-236.
- EPA. (2008). U.S. Environmental Protection Agency. Temephos, reregistration eligibility Decision (RED). [Consultado enero de 2013]. Disponible en: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/temephos_red.htm#I
- EXTOXNET. (2002). The Extension Toxicology Network. Pesticide information profile for temephos. [Consultado octubre de 2012]. Disponible en: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/pyrethrins-ziram/temephos-ext.html>
- FAO. (2002). Food and Agriculture Organization of the United Nations. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. [Consultado octubre de 2013]. Disponible: <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPP/Pesticid/Code/Download/code.pdf>

- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*. 455:81-95.
- Fenech, M., Bonassi, S., Turner, J., Lando, C., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cao, J., De Luca, G., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hadjidekova, V.V., Hrelia, P., Jaworska, A., Joksic, G., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Martelli, A., McKay, M.J., Migliore, L., Mirkova, E., Muller, W.U., Odagiri, Y., Orsiere, T., Scarfi, M.R., Silva, M.J., Sofuni, T., Surrallés, J., Trenta, G., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno, A. (2003) Human Micronucleus project Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research*. 534:65-75.
- Fenech, M., Crott, J.W. (2002) Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes evidence for breakage fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*. 504:131-136.
- Ferguson, P., Medon, P., Nasri, E. (1985). Temephos (Abate) metabolism and toxicity in rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 14:143-147.
- Fest, C., Schmidt, K.J. (1973). The chemistry of organophosphorus pesticides. Second Edition, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York, USA. pp.122-135.
- González Arias, C.A., Robledo Marengo, M.L., Medina Díaz, I.M., Velázquez Fernández, J.B., Girón Pérez, M.I., Quintanilla Vega, B., Ostrosky Wegman, P., Pérez Herrera, N.E., Rojas García, A.E. (2010). Patrón de Uso y Venta de Plaguicidas en Nayarit, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26(3), 221-228.
- Hargreaves, A.J. (2012) Neurodegenerations induced by organophosphorous compounds. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 724:189-204.

- Hreljac, I., Zajc, I., Lah, T., Filipic, M. (2008). Effects of Model Organophosphorous Pesticides on DNA Damage and Proliferation of HepG2 Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 49:360-367.
- Hreljac, I., Filipic, M. (2009). Organophosphorous pesticides enhance the genotoxicity of benzo(a)pyrene by modulating its metabolism. *Mutation Research*. 671:84-92.
- HSDB. (2003). Hazardous Substances Databank: Temefos. National Library of Medicine, National Toxicology Program. [Consultado octubre 2013]. Disponible en: <http://www.toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>
- INCHEM. (2002). Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations. Data sheets on pesticides. No. 8 Rev. 1: Temefos. Geneva: Food and Agricultural Organization, World Health Organization. [Consultado octubre de 2014]. Disponible en: http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest8_e.htm
- INECC. (2013). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. [Consultado mayo de 2014]. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/temefos.pdf>
- Jennen, D.G., Magkoufopoulou, C., Ketelslegers, H.B., van Herwijnen, M.H., Kleinjans, J.C., van Delft, J.H. (2010). Comparison of HepG2 and HepaRG by wholegenome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicological Science*. 115:66–79.
- Jennen, D., Ruiz-Aracama, A., Magkoufopoulou, C., Peijnenburg, A., Lommen, A., van Delft, J., Kleinjans, J., (2011). Integrating transcriptomics and metabonomics to unravel modes-of.action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in HepG2 cells. *BioMed Central Systems Biology*. 5:139.
- Jeyaratnam, J., Maroni, M. (1994). Organophosphorous Compounds. Chapter 3. *Toxicology*. 91:1-116.

- Jiménez, N., González, M., Fernández, C., López, J. (2007). Estudio de la biocompatibilidad *in vitro* de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidonaína. *Biomecánica*.15(1):63-71.
- Jin, X., Chen, Q., Tang, S.S., Zou, J.J., Chen, K.P., Zhang, T., Xiao, X.L. (2009). Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis. *Toxicology In Vitro*. 23(7):1209-1214.
- Johnson, M.K. (1990) Organophosphates and delayed neuropathy--is NTE alive and well?. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1;102(3):385-399.
- Kehdy, F.S., Cerqueira, E.M., Bonjardim, M.B., Camelo, R.M., Castro, M.C. (2007). Study of the cytogenetic effects of occupational exposure to pesticides on sanitation workers in Belo Horizonte, Brazil. *Genetic Molecular Research*. 30:6(3):581-593.
- Kessova, I., Cederbaum A.I. (2003). CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Current Molecular Medicine*. 3(6) 509-518.
- Knasmüller, S., Schwab, C.E., Land, S.J., Wang, C.Y., Sanyal, R., Kundi, M., Parzefall, W., Darroudi, F. (1999). Genotoxic Effects of heterocyclic aromatic amines in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*.14:533-539.
- Lamy, E., Kassie, F., Gminski, R., Schmeiser, H.H., Mersch-Sundermann, V. (2004). 3-Nitrobenzantrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells. *Toxicology Letters*. 146:103–109.
- Larramendy, M. L., Nikoloff, N., Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S. (2014). Genotoxicity and Cytotoxicity Exerted by Pesticides in Different Biotic Matrices-An Overview of More Than a Decade of Experimental Evaluation. *Environmental And Analytical Toxicology* (4)4:2-10.

- Li, M.Y., Deng, H., Zhao, J.M., Dai, D., Tan, X.Y. (2003). PPARgamma pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells. *World Journal of Gastroenterology*. 9(6): 1220-1226.
- Lieberman, A.D., Craven, M.R., Lewis, H.A., Nemenzo, J.H. (1998). Genotoxicity from domestic use of organophosphate pesticides. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 40(11):954-957.
- Luque Cabrera, J., Herráez Sánchez, A. (2011). Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Ed. Elsevier Madrid, España. pp.129-131.
- Lyer, V.V., Yang, H., Mananthi, G., Lerapetritou, C.M., Roth, C. (2010). Effects of glucose and insulin on HepG2-C3A cell metabolism. *Biotechnology and Bioengineering, Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2(107):347-356.
- Moore, P.D., Yedjou, C.G., Tchounwou, P.B. (2010). Malathion-Induced Oxidative Stress, Cytotoxicity, and Genotoxicity in Human Liver Carcinoma (HepG2) Cells. *Environmental Toxicology*. 25(3) 221-226.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.
- NOM-032-SSA2-2010. Norma Oficial Mexicana: Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. Diario Oficial de la Federación. Lunes 21 de julio de 2003.
- Norman, J. (1990). HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 4:161-168.
- Nikoloff, N., Escobar, L., Soloneski, S., Larramendy, M.L. (2013). Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and Chemical Toxicology*. 62:777-781

- Nikoloff, N., Larramendy, M.L., Soloneski, S. (2014). Assessment of DNA damage, cytotoxicity, and apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells after flurochloridone herbicide exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 65:233–241.
- Ojha, A., Srivastava, N. (2014). In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. *Mutation Research*, 761:10–17.
- Omarí Yousif I. A. (2011) Micronucleus analysis and mitotic index in a Jordanian population exposed to pesticides of organophosphate: malathion and chlorpyrifos. *Caryologia*, 64(2).173-178.
- Preussman, R., Schneider, H., Epple, F. (1969). Untersuchungen sur wachweis alkylierender agentien. *Arzneimittel Forschung*, 19:1059-1073.
- Ramírez, J. A., Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de prevención de riesgos laborales*, 4(2):67-75.
- Renshaw, W., Bobbis, A. (2006). Temephos. En: Joint by FAO and WHO, with the support of the international programme on chemical safety/joint meeting of the FAO panel of experts o pesticides residues in food and the environment and WHO core assessment group. *Pesticide residues in food Toxicological Evaluations*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Rome, Italy. pp. 403-426.
- Satar, S., Kayraldiz, A., Rencuzogullari, E., Karakoc, E., Sebe, A., Avci, A., Yesilagac, H., Topaktas, M. (2009). The genotoxicity and cytotoxicity among patients diagnosed with organophosphate poisoning. *Bratislavské lekárske listy*, 110(8):476-479.
- Sierra, C.Y.B. (2011). Evaluación del efecto genotóxico de la radiación ionizante en médicos ortopedistas expuestos laboralmente, en cuatro instituciones de salud en Bogotá, Colombia. Tesis de magister en toxicología. [Consultado en enero de 2014]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/5309/1/bngithyesenyasierracano.2011.pdf>

- Vale, J.A. (1998). Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicol Letters*. 102-103:649-652.
- Verdín-Betancourt, F. A. (2013). Efecto genotóxico del plaguicida organofosforado temefos, evaluado mediante el ensayo cometa en células HepG2. Tesis profesional Universidad Autónoma de Nayarit. pp. 2-6.
- Vivien H., Hashim Z., Ismail P., Said S., Omar D., Bahri Mohd Tamrin SH. (2013). Biological monitoring of genotoxicity to organophosphate pesticide exposure among rice farmers: Exposure-effect continuum study. *JOHE*, Winter-spring, 2(1-2):27-36.
- Wang Q., Ye, Y.J., Wan, J.X., Sun, P., Zhu, Y., Au, W., Xia, Z.L., (2012). mRNA expression levels among cell regulatory and DNA damage genes in benze-exposed workers in China. *Journal Occupational Environmental Medicine*. 54:1467-1470
- Wei, W., Hu, Z., Fu, H., Tie, Y., Zhang, H., Wu, Y., Zheng, X., (2012). MicroRNA-1 and microRNA-499 downregulate the expression of the ets1 proto-oncogene in HepG2 cells. *Oncology Reports*. 28(2):701-706.
- Westerink, W.M., Stevenson, J.C., Horbach, G.J., Schoonen, W.G. (2010). The development of RAD51C, Cystatin A, p53 and Nrf2 luciferase-reporter assays in metabolically competent HepG2 cells for the assessment of mechanism-based genotoxicity and of oxidative stress in the early research phase of drug development. *Mutation Research*. 696:21-40.
- Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A. (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug metabolism and Disposition*. 31:1035-104.
- Wu, J.C., Chye, S.M., Shih, M.K., Chen, C.H., Yang, H.L., Chen, S.C. (2010). Genotoxicity of dicrotophos, an organophosphorous pesticide, assessed with different assays in vitro. *Environmental Toxicology*. 27(5): 307-15.
- Yoshitomi, S., Ikemoto, K., Takahashi, J., Miki, H., Namba, M., Asahi, S. (2001). Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450

subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. *Toxicology In Vitro*. 15(3):245-56.

Young, S.C., Wang, C.J., Hsu, J.D., Hsu, J.L., Chou, F.P. (2006). Increased sensitivity of HepG2 cells toward the cytotoxicity of cisplatin by the treatment of piper betel leaf extract. *Archives of Toxicology*. 80:319-327.

Zhuge, J., Luo, Y., Yu, Y.N. (2003). Heterologous expression of human cytochrome P450 2E1 in HepG2 cell line. *World Journal of Gastroenterology*. (12):2732-2736.



