



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**“Evaluación de la Genotoxicidad del Malatión en comparación con el Dimetil  
Tiofosfato (DMTP) en células humanas”**

**TESIS**

Que presenta:

**A.Q.B. DAVID SEBASTIÁN HERNÁNDEZ TOLEDANO**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE TOXICOLOGÍA**

**Directora de tesis:**

Dra. Libia Vega Loyo

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética e Inmunotoxicología del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Libia Vega Loyo. Esta tesis se financió con el proyecto 153468 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del CONACyT a través de la beca de Maestría No. 613984.

## AGRADECIMIENTOS

A la directora de esta tesis la Dra. Libia Vega Loyo por la oportunidad de trabajar en este laboratorio, así como por su apoyo, confianza y enseñanza que me permitieron llevar a cabo este trabajo y crecer intelectualmente.

A la M. en C. Elizabet Estrada Muñiz, Auxiliar de Investigación del Departamento de Toxicología por el apoyo técnico y asesoría durante la estandarización de las técnicas que se utilizaron en este trabajo experimental.

A mis asesoras la Dra. María Betzabet Quintanilla Vega y a la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por sus comentarios y recomendaciones acerca del proyecto.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme el apoyo económico que me permitió realizar mis estudios de maestría satisfactoriamente.

Agradezco al CINVESTAV y al Departamento de Toxicología por la enseñanza y orientación académica recibida durante la maestría.

Gracias a mi familia y amigos por su apoyo durante la realización de mis estudios de maestría, especialmente a mis padres y a mi hermano que me alentaron a continuar mi formación académica y lograr mis metas.

A mis compañeros de generación por su amistad y compañerismo durante los dos años del posgrado.

A todos mis compañeros de laboratorio por los buenos momentos, su apoyo, la confianza y sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigos que conocí durante mi estancia en la ciudad con quienes pude compartir los buenos y los malos momentos, por compartir conmigo sus costumbres y tradiciones, por su paciencia, confianza y apoyo emocional, y principalmente por todas las lecciones de vida que aprendí gracias a ellos.

## RESUMEN

Los plaguicidas organofosforados (OP) son compuestos sintéticos que se emplean en el control de plagas tanto en la agricultura, sector salud como de manera doméstica. Estos compuestos metabolizan rápidamente en el organismo para producir varios compuestos, entre los que se encuentran los Dialquil-Fosfatos (DAPs). Los DAPs se consideran no reactivos y se emplean como biomarcadores de exposición, por lo que se utilizan para asociar la exposición a OP con la aparición de enfermedades como el cáncer. Estudios previos demostraron que la exposición a los DAPs dietiltiofosfato (DETP), dietilditiofosfato (DEDTP), dimetilfosfato (DMP) y dimetilditiofosfato (DMDTP), induce efectos genotóxicos en líneas celulares hepáticas humanas, por lo cual se sugiere que estos metabolitos pueden contribuir en el riesgo del desarrollo de enfermedades asociadas a daños al ADN tras la exposición a OP.

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de la capacidad genotóxica del DAP metilado, dimetiltiofosfato (DMTP) en comparación al malatión, un compuesto padre de los DAPs metilados, en las líneas celulares humanas hepáticas HepG2 y WRL-68, así como en células mononucleadas de sangre periférica (PBMCs) con y sin la presencia de inhibidores de los Citocromos (CYP). Para cumplir con ello evaluamos la citotoxicidad de estos compuestos mediante el ensayo de reducción de sales de tetrazolio (MTT) y rojo neutro, demostrando que exposiciones de 0.1 hasta 100  $\mu\text{M}$  por 48 h de DMTP y de malatión no son citotóxicos. La evaluación genotóxica del malatión y el DMTP (0.1, 1, 5 y 25  $\mu\text{M}$ ) se realizó por el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) y mostró un aumento en la formación de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (NPB) y gemaciones nucleares (NBud) en las PBMC estimuladas, y en las líneas WRL-68 y HepG2, presentando una mayor frecuencia en estas últimas. No se observaron efectos citostáticos del malatión y el DMTP. De acuerdo con el índice NPB/MN se determinó que el daño al ADN producido por el malatión fue de tipo clastogénico, mientras que el DMTP indujo daño de tipo aneuploidógeno, sugiriendo diferencias en los blancos moleculares y mecanismos de acción entre el malatión y el DMTP. Para evaluar la participación de las enzimas del CYP, las células HepG2 y WRL-68 se trataron con DMTP (25  $\mu\text{M}$ ) en presencia de Sulconazol (50  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor inespecífico de la actividad de los CYPs, en donde observamos una disminución de la frecuencia de MN.

Con estos resultados concluimos que el DMTP es genotóxico, generando efectos aneuploidógenos, y es posible que estos efectos sean parte de la genotoxicidad total asociada a la exposición al malatión. Así mismo se determinó que el daño al ADN inducido por este metabolito únicamente ocurre bajo condiciones metabólicas, por lo que se sugiere que es un efecto dependiente de la bioactivación por parte de las enzimas CYP.

## ABSTRACT

Organophosphate pesticides (OP) are synthetic compounds used for plague control in agriculture, health sectors and domestically. These compounds have a short lifetime in the organism because they are quickly metabolized to produce many metabolites like Dialkyl-phosphates (DAPs). DAPs are considered as no reactive compounds and employed as exposure biomarkers, that's why they have been used to associate OP exposure to the development of some illness related to the acetylcholinesterase (AChE) inhibition and genotoxic effects, like cancer. Previous reports demonstrated that exposure to diethyl thiophosphate (DETP), diethyl dithiophosphate (DEDTP), dimethyl phosphate (DMP) and dimethyldithiophosphate (DMDTP) induce genotoxic effects on human hepatic cell lines, whereby it suggested that these metabolites can contribute to the risk of development of illness associated to DNA damage after OP exposure.

The aim of the present work is the evaluation of the genotoxic capacity of dimethylthiophosphate (DMTP) in comparison to malathion, a parent pesticide of methylated DAPs, in human hepatic cell lines HepG2 and WRL-68, as well as in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with or without the presence of Cytochrome inhibitor. To achieve this aim, we performed a cytotoxic evaluation of these compounds by the reduction of tetrazolium salts MTT and neutral red assays, demonstrating that exposure to 0.1 to 100  $\mu\text{M}$  for 48 h DMTP and malathion were not cytotoxic. Genotoxic evaluation of Malathion and DMTP (0.1, 1, 5 and 25  $\mu\text{M}$ ) by Cytokinesis-Block Micronucleus assay (CBMN) showed a rise in the frequency of micronucleus (MN), nucleoplasmic bridges (NPB) and nuclear buds (NBud) formation on PBMCs, especially on WRL-68 and HepG2. We don't observe cytostatic effects with malathion and DMTP treatments. In accordance to NPB/MN index, it indicated that DNA damage produced by malathion was clastogenic, while DMTP induces aneuploidic effects, suggesting differences in molecular targets and action mechanism between malathion and DMTP. To evaluate the participation of CYP enzymes, HepG2 and WRL-68 were treated with DMTP (25  $\mu\text{M}$ ) in the presence of Sulconazole (50  $\mu\text{M}$ ), a non-specific activity inhibitor of CYPs, where we observed a decrease in the MN frequency.

With these results, we conclude that DMTP is genotoxic generating aneuploidic effects, and it's possible that this effect can contribute to the total genotoxic effect associated with malathion exposure. Also, we observed that DNA damage induced by this metabolite occurs only in metabolic conditions, so it suggested that genotoxicity is dependent on bioactivation by CYP450 enzymes.

<b>ÍNDICE GENERAL .....</b>	<b>Página</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Plaguicidas Organofosforados.....	1
1.1.1 Uso de los plaguicidas OP en México .....	3
1.2 Toxicocinética .....	3
1.2.1 Absorción .....	3
1.2.2 Distribución .....	4
1.2.3 Metabolismo .....	4
1.3 Exposición a OP .....	8
1.4 Efectos Biológicos de los Compuestos OP .....	10
1.4.1 Carcinogenicidad .....	13
1.4.2 Genotoxicidad de los OP.....	14
1.4.2.1 Malatión .....	15
1.4.2.2 DAPs.....	15
1.5 Justificación .....	17
1.6 Hipótesis.....	18
1.7 Objetivos .....	18
1.7.1 Objetivo general .....	18
1.7.2 Objetivos particulares .....	18
2. MÉTODOS .....	19
2.1 Estrategia experimental.....	19
2.2 Cultivo de PBMCs .....	19
2.2.1 Características .....	19
2.2.2 Procedimiento .....	19
2.3 Cultivos de líneas celulares .....	20
2.3.1 Características .....	20
2.3.2 Procedimiento .....	21
2.4 Tratamientos .....	21
2.5 Viabilidad celular por el metabolismo del MTT .....	22
2.5.1 Principio .....	22
2.5.2 Procedimiento .....	22
2.6 Viabilidad celular por incorporación de rojo neutro .....	22
2.6.1 Principio .....	22
2.6.2 Procedimiento .....	23
2.7 Formación de MN con inhibición de la citocinesis (CBMN).....	23

2.7.1	Principio .....	23
2.7.2	Procedimiento .....	24
2.8	Análisis de los Resultados .....	25
3.	RESULTADOS .....	26
3.1	Viabilidad celular por el metabolismo del MTT .....	26
3.2	Viabilidad por incorporación de rojo neutro.....	28
3.3	Ensayo de formación de MN con bloqueo de la citocinesis (CBMN) .....	31
3.3.1	Citostaticidad .....	31
3.3.2	Genotoxicidad .....	31
3.3.3	Posible mecanismo de producción de genotoxicidad.....	37
3.4	Participación de los CYPs en la genotoxicidad del DMTP.....	39
4.	DISCUSIÓN .....	43
5.	CONCLUSIONES .....	48
6.	PERSPECTIVAS .....	49
7.	REFERENCIAS .....	50
8.	ANEXOS.....	58
8.1	Hoja de seguridad del malatión .....	58
8.2	Hoja de seguridad del DMTP.....	68
8.3	Participaciones en congresos .....	72
8.3.1	Primer Coloquio Interdisciplinario 20/30 Xenobióticos y señalización.....	72

## **INDICE DE TABLAS**

## **Página**

Tabla 1. Plaguicidas OP y DAPs producidos a partir de ellos. ....	8
Tabla 2. Niveles de DAPs en distintas muestras biológicas humanas. ....	9
Tabla 3. Estudios que asocian la aparición de algunos tipos de cáncer con la exposición a OPs. ....	12
Tabla 4. Estudios que demuestran efectos genotóxicos de compuestos OP. ....	14
Tabla 5. Número de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas y el NDI en PBMCs estimuladas, HepG2 y WRL-68 tras el ensayo de formación de MN. ....	33
Tabla 6. Comparación entre el malatión y el DMTP en los efectos genotóxicos. ....	37
Tabla 7. Número de células con MN y con NPB inducidas por el malatión y DMTP en PBMCs estimuladas, HepG2 y WRL-68 tratadas por 48 h. ....	38
Tabla 8. Número de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas y el NDI en HepG2 y WRL-68 tratadas con sulconazol. ....	42
Tabla 9. Número de células con MN y con NPB inducidas por DMTP con y sin sulconazol en HepG2 y WRL-68 tratadas por 48 h. ....	42

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Estructura los plaguicidasOP.....	2
Figura 2. Diagrama que representa la toxicocinética de los plaguicidas OP. ....	5
Figura 3. Mecanismo de reacción sugerido para la desulfuración oxidativa de compuestos OP.....	6
Figura 4. Metabolismo general de los plaguicidas OP.....	6
Figura 5. Estructuras y constantes de ionización de los DAPs, .....	7
Figura 6. Predicciones <i>in silico</i> del metabolismo del DMTP.....	17
Figura 7. Estrategia experimental. ....	19
Figura 8. Evaluación de la citotoxicidad por el ensayo de actividad mitocondrial MTT de PBMCs humanas (A) y PBMCs estimuladas (B), tratadas con malatión o DMTP.....	27
Figura 9. Evaluación de la citotoxicidad por el ensayo de actividad mitocondrial MTT de las células hepáticas HepG2 (A) y WRL-68 (B), tratadas con malatión o DMTP.....	28
Figura 10. Evaluación de la citotoxicidad por el ensayo de incorporación de RN del malatión o DMTP en PBMCs humanas (A) y PBMCs estimuladas (B) .....	29
Figura 11. Evaluación de la citotoxicidad por el ensayo de incorporación de RN del malatión o el DMTP en las células hepáticas HepG2 (A) o WRL-68 (B).....	30
Figura 12. Frecuencia de formación de MN (A), NPB (B) y NBud (C) inducidos por el malatión, DMTP o Taxol (T, 0.01 $\mu$ M) por 48 h en PBMCs estimuladas. ....	34
Figura 13. Frecuencia de formación de MN (A), NPB (B) y NBud (C) inducidos por el malatión, DMTP o Taxol (T, 0.01 $\mu$ M) por 48 h en células HepG2.. ....	35
Figura 14. Frecuencia de formación de MN (A), NPB (B) y NBud (C) inducidos por el malatión, DMTP o Taxol (T, 0.01 $\mu$ M) por 48 h en células hepáticas WRL-68. ...	36
Figura 15. Efecto inhibitorio del sulconazol (S, 50 $\mu$ M) en la de formación de MN (A), NPB (B) y NBud (C) inducidos por DMTP (25 $\mu$ M) en células HepG2 .....	40
Figura 16. Efecto inhibitorio del sulconazol (S, 50 $\mu$ M) en la de formación de MN (A), NPB (B) y NBud (C) inducidos por el DMTP (25 $\mu$ M) en células WRL-68.....	41
Figura 17. Efecto genotóxico del DMTP y el malatión sobre células humanas. ....	47

## **ABREVIATURAS**

<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>BChE</b>	Butilcolinesterasa
<b>BrdU</b>	5'-bromodeoxiuridina
<b>CBMN</b>	Formación de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis
<b>CE</b>	Carboxilesterasa
<b>CYP</b>	Citocromos
<b>Cyt-B</b>	Citocalasina-B
<b>DAP</b>	Dialquil-fosfatos
<b>DEDTP</b>	Dietilditiofosfato
<b>DEP</b>	Dietilfosfato
<b>DETP</b>	Dietiltiofosfato
<b>DMDTP</b>	Dimetilditiofosfato
<b>DMP</b>	Dimetilfosfato
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMTP</b>	Dimetiltiofosfato
<b>FDA</b>	Diacetato de fluoresceína
<b>MDA</b>	Malonaldehído
<b>MN</b>	Micronúcleos
<b>N7-MedG</b>	N7-metildeoxiguanosina
<b>NBud</b>	Gemaciones nucleares
<b>NPB</b>	Puentes nucleoplásmicos
<b>OP</b>	Organofosforados
<b>PBMCs</b>	Células Mononucleadas de Sangre Periférica
<b>PBS</b>	Solución Amortiguadora de Fosfatos
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>RN</b>	Rojo Neutro
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Plaguicidas Organofosforados

Los plaguicidas son un grupo amplio de compuestos químicos diseñados para controlar plagas de diversos tipos, por lo que existen distintos grupos, entre los que encontramos insecticidas, herbicidas, fungicidas y rodenticidas. Estos plaguicidas pueden clasificarse además de acuerdo con su ingrediente activo en: organofosforados (OP), carbamatos, organoclorados, derivados de carbamidas, etc. (Kapka-Skrzypczak *et al.*, 2011).

Los plaguicidas OP surgieron alrededor de 1820 con las reacciones de esterificación de alcoholes con ácido fosfórico. Dado su alto potencial tóxico, estos compuestos se emplearon como agentes bélicos. Posterior a la Segunda Guerra Mundial se elaboraron más de 50,000 compuestos OP, y en 1970 alrededor de 200 OP estaban disponibles en el mercado para controlar plagas (Chambers *et al.*, 2010). Los compuestos OP se encuentran entre los plaguicidas de mayor uso en el mundo, pues tienen un espectro amplio de aplicaciones, tanto en la agricultura como de manera doméstica y en el sector salud para controlar vectores de enfermedades específicas como la malaria, dengue, zika, chikungunya, además de ser económicos (Barr *et al.*, 2004). Los plaguicidas OP se biodegradan rápidamente disminuyendo su permanencia en el ambiente (Soltaninejad y Abdollahi, 2009). A pesar de sus beneficios, también generan un potencial riesgo a la población en general y al ambiente (Kapka-Skrzypczak *et al.*, 2011).

Los OP son ésteres o tioésteres del ácido fosfórico y sus derivados. La estructura química general comprende un átomo central de fósforo con el característico enlace fosfórico (P=O) o tiosfosfórico (P=S) (Eleršek y Filipi 2011) (Figura 1). Normalmente, los grupos R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son grupos arilo o alquilo que pueden unirse directamente al átomo de fósforo o a través de un átomo de oxígeno o de azufre (formando fosfatos o fosfotioatos). El grupo X puede referirse a halógenos, grupos alifáticos, aromáticos o heterocícllos. Estos sustituyentes también pueden unirse al átomo de fósforo por medio de un átomo de oxígeno o azufre, y son conocidos como grupos salientes, debido a que se liberan del átomo de fósforo cuando el compuesto OP se hidroliza por alguna

fosfotriesterasa o bien al interactuar con las proteínas blanco (Sogorb y Vilanova, 2002).

Los plaguicidas OP inhiben la función de algunas esterasas, como la acetilcolinesterasa (AChE), la butilcolinesterasa (BChE) y la carboxilesterasa hepática (ali-esterasa), la paraoxonasa (A-esterasas) y otras esterasas no específicas (Soltaninejad y Abdollahi 2009). De todas estas, la inhibición de la AChE representa el efecto adverso más importante, ya que se trata de una enzima crítica para controlar adecuadamente la transmisión nerviosa a órganos efectores, así como dentro del sistema nervioso central (Bates y Campbell, 2008).

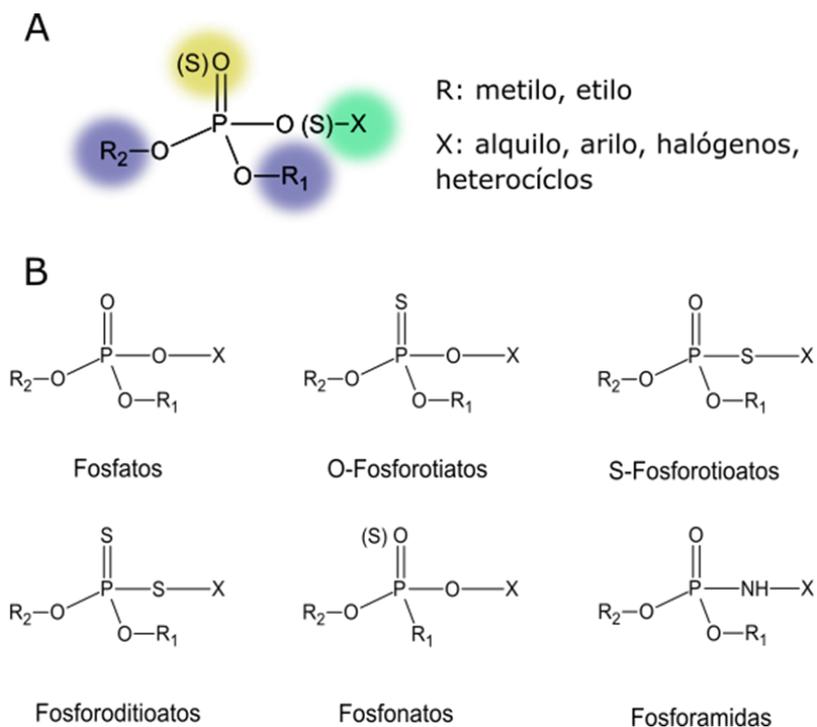


Figura 1. Estructura los plaguicidas organofosforados. Estructura general de los OP (A), los grupos R son sustituyentes arilo o alquilo, mientras X representa al grupo saliente. Grupos de OP representativos (B) (Modificado de Eleršek y Filipi, 2011; Maroni *et al.*, 2000).

La exposición a plaguicidas OP puede ocurrir de un gran número de fuentes, como suelo, polvo, prendas, agua y alimentos contaminados. Aun cuando la mayoría de la población se encuentra expuesta, existen diferentes riesgos a la salud en relación al

grado de exposición pues existen subgrupos de la población con mayor riesgo a presentar efectos adversos, como la población ocupacionalmente expuesta, así como grupos susceptibles como los niños y adultos mayores (McCauley *et al.*, 2001).

### **1.1.1 Uso de los plaguicidas OP en México**

En la actualidad los plaguicidas OP se utilizan principalmente como insecticidas en la agricultura y para controlar vectores en el sector salud. La demostración de los efectos tóxicos agudos ha llevado a la prohibición y restricción de su uso, sin embargo, aún existen países donde sus políticas aprueban el uso de varios de ellos. En México, el registro para el uso, comercialización y disposición de los plaguicidas está a cargo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), así como la Secretaría de Salud. Sin embargo, existe poca información sobre el uso, consumo e inversión de estos plaguicidas. Algunos estudios señalan que los plaguicidas OP constituyen el 50% de los insecticidas que se emplean en México, tanto de manera urbana como agrícola (Quintanilla-Vega *et al.*, 2010). De acuerdo con el catálogo de plaguicidas emitido por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en 2016, se encuentran aprobados 51 plaguicidas OP, principalmente para usarse como insecticidas en la agricultura. Este mismo documento enlista únicamente 19 plaguicidas prohibidos en México, de los cuales 2 son OP (Alatorre *et al.*, 2016).

## **1.2 Toxicocinética**

### **1.2.1 Absorción**

Los compuestos OP se pueden absorber rápidamente por todas las vías: respiratoria, gastrointestinal, ocular y dérmica (Figura 2). La absorción vía dérmica es lenta, pero puede generar un efecto adverso si la exposición es prolongada y puede empeorar si el agente es lipofílico y se encuentra en una formulación con un solvente y un emulsificante. Normalmente, esta vía de exposición ocurre en poblaciones ocupacionalmente expuestas al mezclar, manipular y aplicar el insecticida o bien por

contacto con superficies contaminadas. La exposición por vía oral es normalmente accidental, principalmente en niños, aunque también puede estar relacionada a intentos de suicidio en adultos. La exposición vía inhalatoria ocurre durante la aplicación de los plaguicidas OP (Kwong, 2002; Timchalk, 2010).

### **1.2.2 Distribución**

Una vez dentro del organismo, los compuestos OP llegan a la circulación sistémica donde se distribuyen y se acumulan rápidamente en el tejido graso, hígado y riñones. Los fosforotioatos (P=S) son más lipofílicos que los fosfatos (P=O), por lo que se almacenan principalmente en el tejido adiposo (Figura 2). Los fosforotioatos se biotransforman a su forma activa de fosfato (P=O) por una desulfuración oxidativa mediada por los citocromos P450 (CYP) (Kwong, 2002).

### **1.2.3 Metabolismo**

Las reacciones de biotransformación que ocurren a los compuestos OP una vez dentro del organismo buscan la desactivación de estos compuestos, principalmente por reacciones de oxidación e hidrólisis, así como la conjugación con glutatión (Sogorb y Vilanova, 2002). Sin embargo, estos procesos metabólicos pueden generar la activación de algunos compuestos OP no tóxicos a sus formas de oxón (P=O), los cuales son potentes inhibidores de la AChE (Sams *et al.*, 2000). La bioactivación de los compuestos OP suele ocurrir por reacciones de oxidación entre las que se encuentran: la desulfuración oxidativa de los tiofosfatos, la oxidación del grupo sulfuro a sulfóxidos y sulfonas, la oxidación de grupos amidas, la hidroxilación de grupos alquilo, etc. Estas reacciones se llevan a cabo por los sistemas de monooxigenasas, principalmente por los CYPs y las flavinas monooxigenasas (Jokanovi, 2001), principalmente en tejidos hepáticos, aunque también se reporta en tejidos extra-hepáticos (Timchalk, 2010).

La desactivación de los OP se realiza mediante oxidaciones o hidrólisis de uno de los enlaces con el fósforo, generando grupos funcionales polares que impiden su acción como agente anticolinesterasa. Esta biotransformación genera, además, metabolitos hidrosolubles, los cuales se pueden eliminar rápidamente en la orina. Las principales

enzimas implicadas en la desactivación de los plaguicidas OP pertenecen al sistema de los CYPs, principalmente CYP1A2, CYP3A4, CYP2B6, CYP2C19 y CYP2D6 (Buratti, *et al.*, 2005; Jokanovi, 2001), así como las carboxilesterasas (CE) y las fosfotriesterasas conocidas como A-esterasas, por ejemplo, la paroxonasa 1 (Jokanovi, 2001).

Se sabe que una vez que los OP entran en contacto con las enzimas del sistema de los CYPs, el átomo de azufre del compuesto OP se une al átomo de oxígeno que se encuentra unido al átomo de hierro del grupo hemo en el sitio catalítico de la enzima permitiendo llevar a cabo la reacción de desulfuración oxidativa (Figura 3) (Rydberg, 2012). Algunos autores proponen que el OP deberá unirse de manera diferente para permitir otro tipo de reacciones como la desalquilación oxidativa (Ptashne *et al.*, 1971). En el caso de las A-esterasas y carboxilesterasas, los compuestos OP se unen a residuos de serina o histidina en los sitios catalíticos para la hidrólisis de los enlaces éster en las moléculas de los OP (Jokanovi, 2001).

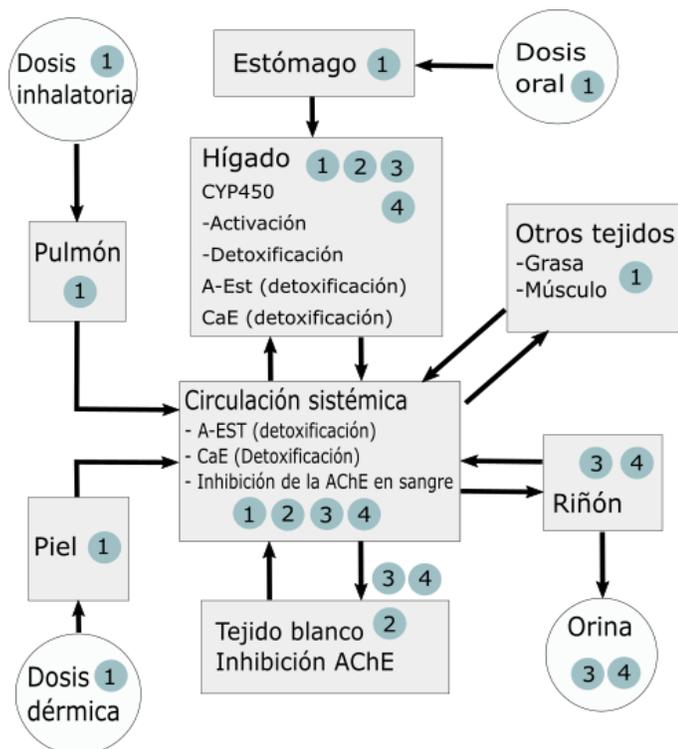


Figura 2. Diagrama que representa la toxicocinética de los plaguicidas organofosforados. Los números indican el tipo de compuesto: 1; compuesto padre, 2; Oxón, 3; metabolito específico, 4; DAPs (Modificado de Timchalk, 2010).

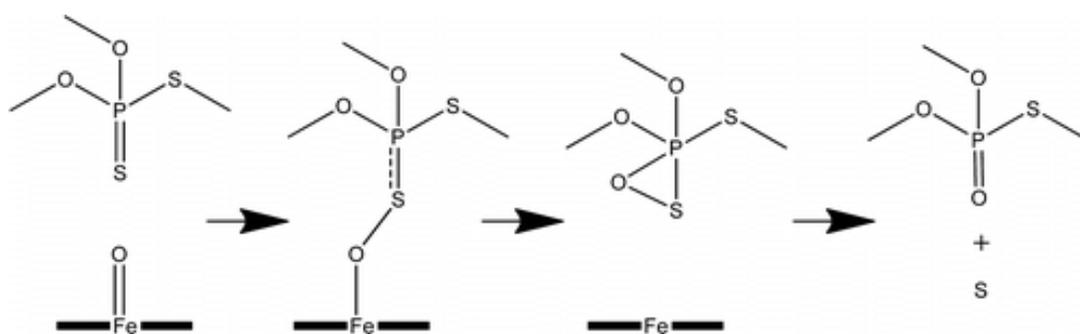


Figura 3. Mecanismo de reacción sugerido para la desulfuración oxidativa de compuestos OP. El símbolo —Fe— representa el grupo hemo (Rydberg, 2012).

Se describe que tanto los CYPs como las A-esterasas producen los DAPs, compuestos estables, sin un aparente efecto anticolinesterasa (Figura 4). Los DAPs que se forman dependen de los sustituyentes alquílicos del compuesto padre, así como del número de átomos de azufre que posea la molécula del compuesto padre (Figura 5). Como se presenta en la tabla 1, un mismo compuesto puede dar lugar a distintos DAPs, debido a las diferentes reacciones de biotransformación a las que se pueda someter, por ejemplo, el malatión puede producir los tres DAPs metilados: el dimetilditiofosfato (DMDTP), el dimetiltiofosfato (DMTP) y el dimetilfosfato (DMP), mientras que un plaguicida etilado como el Terbufos producirá los DAPs etilados: dietilditiofosfato (DEDTP), el Dietiltiofosfato (DETP) y el dietilfosfato (DEP).

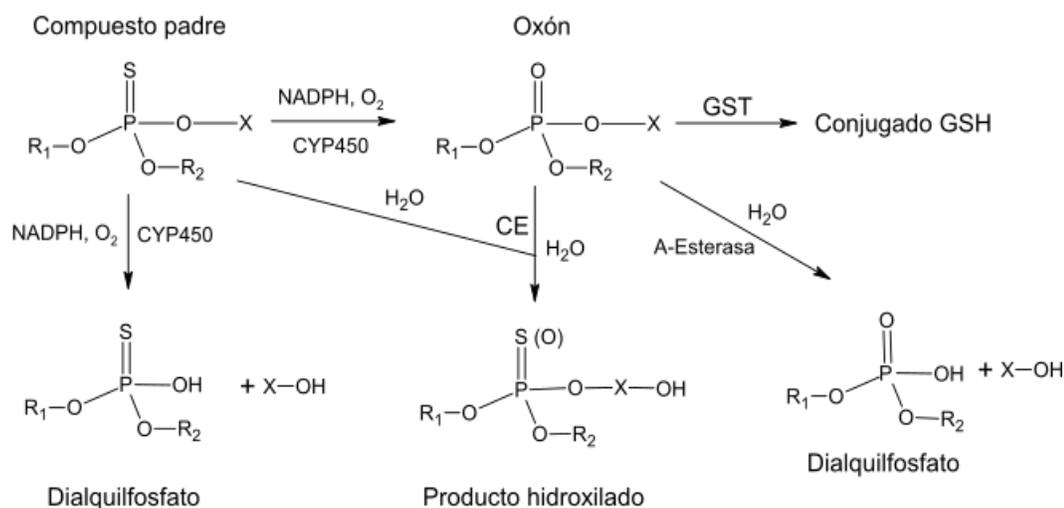


Figura 4. Metabolismo general de los plaguicidas organofosforados (Buratti *et al.*, 2007).

### 1.2.4 Eliminación

Los plaguicidas OP se metabolizan rápidamente y generan oxones, DAPs, especies reactivas de oxígeno (ROS) y residuos orgánicos específicos de cada plaguicida. Los oxones a su vez se pueden hidrolizar a DAPs, los cuales son compuestos altamente polares, ácidos y solubles en agua, por lo que se eliminan, o bien pueden conjugarse con grupos sulfatos o glucorónidos (Kavvalakis y Tsatsakis, 2012; Barr *et al.*, 2004).

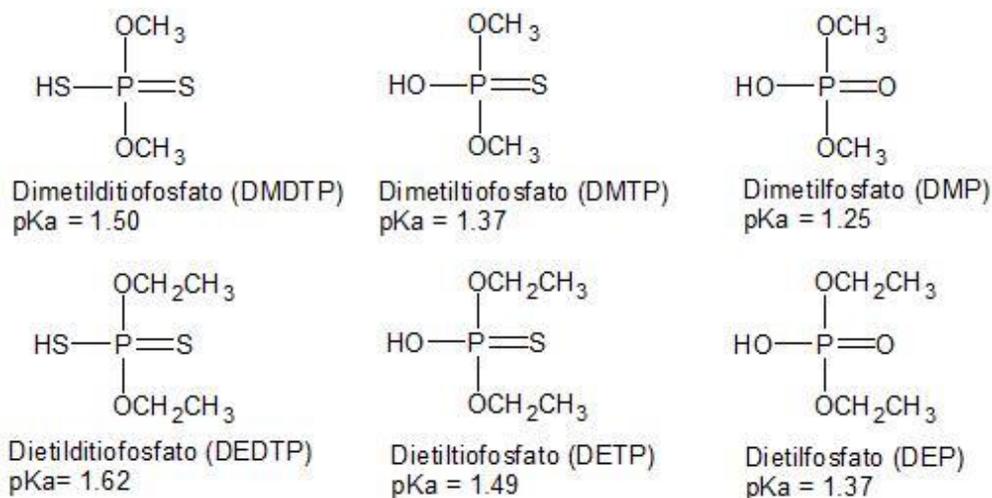


Figura 5. Estructuras y constantes de ionización de los Dialquil fosfatos, en la parte superior se muestran los DAPs metilados, y en la parte inferior los DAPs etilados (Duggan *et al.*, 2003).

La eliminación de los metabolitos ocurre en su mayoría por la orina, y en menor proporción por las heces y aire expirado. El tiempo de eliminación de los compuestos OP y algunos de sus metabolitos se determina por su polaridad, lo que puede favorecer su almacenamiento en tejidos grasos, aumentando su persistencia en el organismo (Vale, 1998). Algunos reportes refieren que el tiempo de vida media de los metabolitos de los plaguicidas OP, tales como los DAPs pueden llegar a ser igual o mayores a 100 h en el organismo, siendo mayor que los tiempos de vida media de los compuestos padres. Esto aunado a su estabilidad son el motivo por el cual los DAPs se emplean como biomarcadores de exposición a plaguicidas OP (Tabla 2), principalmente evaluados en muestras de orina, aunque algunos estudios reportan su detección en otras matrices como cabello, sangre, fluido amniótico, meconio, leche materna, etc., tanto en

población general como en personas ocupacionalmente expuestas (Drevenkar, *et al.*, 1993; Kavvalakis y Tsatsakis, 2012; Vasilic *et al.*, 1992).

Tabla 1. Plaguicidas OP y DAPs producidos a partir de ellos.

Plaguicida	DAP <sup>a</sup>			Plaguicida	DAP <sup>a</sup>		
	DMP	DMTP	DMDTP		DMP	DMTP	DMDTP
Monocrotofos	DMP			Dimetoato	DMP	DMTP	DMDTP
Vaponite	DMP			Malatión	DMP	DMTP	DMDTP
Diclorvós	DMP			Metidatión	DMP	DMTP	DMDTP
Dicrotofós	DMP			Fosmet	DMP	DMTP	DMDTP
Mevinfós	DMP			Cloretoxifos	DEP	DETP	
Naled	DMP			Clorpirifos	DEP	DETP	
Tetraclorvinfós	DMP			Coumafos	DEP	DETP	
Triclorfón	DMP			Diazinon	DEP	DETP	
Fenclorfós	DMP	DMTP		Etil paratión	DEP	DETP	
Acefate	DMP	DMTP		Demetón	DEP	DETP	
Clorpirifos metil	DMP	DMTP		Metil Paratión	DEP	DETP	
Fenitrotión	DMP	DMTP		Quinalfós	DEP	DETP	
Fentión	DMP	DMTP		Disulfoton	DEP	DETP	DEDTP
Metamidofós	DMP	DMTP		Etión	DEP	DETP	DEDTP
Pirimifós metil	DMP	DMTP		Forate	DEP	DETP	DEDTP
Temefos	DMP	DMTP		Fosalone	DEP	DETP	DEDTP
Azinfos metil	DMP	DMTP	DMDTP	Terbufos	DEP	DETP	DEDTP

<sup>a</sup>DAP; dialquilfosfato, DMP; dimetilfosfato, DMTP; dimetiltiofosfato, DMDTP; dimetilditiofosfato, DEP; dietilfosfato, DETP; dietilfosfato, DEDTP; dietilditiofosfato (Duggan *et al.*, 2003).

### 1.3 Exposición a OP

Un biomonitoreo que realizó el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos en el año 2001 mostró que más del 90% de la población general presenta uno o más DAPs en la orina, indicando que las fuentes de DAPs en el ambiente son ubicuas. Esto puede deberse a que los residuos de los OP en el ambiente, ya sea en cuerpos de agua, suelos e inclusive plantas, pueden,

Tabla 2. Niveles de DAPs en distintas muestras biológicas humanas.

Estudio	N	Observaciones	μmol/L		
			DMDTP	DMTP	DMP
Estudios en orina con resultados corregidos por creatinina					
Bouvier <i>et al.</i> , 2006	12	Trabajadores con plantas (E)	0.204	0.015	-
	9	Trabajadores con mascotas (E)	0.153	-	-
	20	Población general (G)	0.221	0.007	-
Cocker <i>et al.</i> , 2002a	917	Varios grupos ocupacionales (E)	33	-	-
Apra <i>et al.</i> , 2000	195	6-7 edad (G)	0.1167	0.1043	0.0141
Heudorf y Angerer, 2001	1146	Población general 0-20 edad(G)	0.40270	0.5446	0.03887
Estudios en orina					
Fenske y Leffingwel, 1989	20	Trabajadores mezclando o aplicando malatión en huertos de cítricos (E)	-	10.560	16.020
García <i>et al.</i> , 2000	28	Periodo de aplicación (E)	1.58047	3.0258	0.47600
	6	Periodo control (G)	1.58047	3.5184	-
Griffith y Duncan, 1985	594	Rociadores y cosechadores de cítricos (E)	1.13794	0.6333	1.34869
	332	Rociadores de cítricos (E)	1.01150	0.5629	0.87268
	262	Cosechadores de cítricos (E)	2.46554	1.0555	1.98337
Lu <i>et al.</i> , 2000	62	Familias de Agricultores (E)	-	0.2814	0.03173
	14	Familias referencia (G)	-	0.1407	0.0238
Dulaurent <i>et al.</i> , 2006	19	Adultos en área rural (G)	0.12707	0.0323	ND
Ueyama <i>et al.</i> , 2006	23	Adultos (G)	0.11189	0.0077	-
	25	Adultos (E)	0.14350	0.0288	-
Estudios en meconio					
Whyatt y Barr, 2001	20	Niños (G)	101.150	ND	ND
Tsatsakis <i>et al.</i> , 2009	38	Niños (G)	0.067-4.67	0.06-4.68	-

(G); Población general, (E); Población ocupacionalmente expuesta, ND; No detectado.

hidrolizarse, ya sea debido a la temperatura o a reacciones fotoquímicas. Por lo tanto, es probable que los DAPs estén presentes en el agua alimentos y plantas de consumo (Duggan *et al.*, 2003), además de que puedan existir otras fuentes de exposición a OP y/o DAPs que no se han identificado aún. Estudios en el estado de Durango, realizados en agricultores de vegetales expuestos a plaguicidas OP encontraron los 6 tipos de DAPs en muestras de orina, siendo los DAPs etilados los más frecuentes, mientras que los DAPs metilados se reportaban en el 50% de las muestras y en concentraciones mayores a los DAPs etilados (Sánchez-Peña *et al.*, 2004). Así mismo en el estado de Morelos, un estudio realizado en floricultores demostró un resultado similar, donde el 90% de los sujetos evaluados poseían DAPs en orina, de los cuales el DMP y el DMTP fueron los más frecuentes, y los DAPs metilados se encontraron en mayores concentraciones (Blanco-Muñoz *et al.*, 2010). Otros estudios realizados en zonas urbanas de Canadá han demostrado la presencia de los DAPs, principalmente los metilados, en las muestras de orina de adolescentes y adultos (Ye *et al.*, 2016).

Existen estudios que reportan haber encontrado concentraciones de DAPs en otro tipo de matrices, entre los que se encuentran el líquido amniótico de mujeres embarazadas no asociadas a exposiciones ocupacionales en donde se reportan concentraciones de 0.32-2.8 ppb de DMP y 0.31-1 ppb DEP en (Bradman *et al.*, 2003; Kavvalakis y Tsatsakis, 2012). Así mismo, al evaluar la exposición a OP durante la gestación se han encontrado niveles de DAPs en meconio, tanto metilados como etilados en el rango de 0.5-739.5 ppb (Tsatsakis *et al.*, 2009; Whyatt y Barr, 2001). Algunos estudios prueban que los DAPs pueden rastrearse en muestras de cabello, tanto de poblaciones ocupacionalmente expuestas como en la población en general, en donde se han reportado concentraciones de 51.2-812.9 pg/mg (Margariti y Tsatsakis, 2009; Tsatsakis *et al.*, 2010).

#### **1.4 Efectos Biológicos de los Compuestos OP**

Los efectos tóxicos que se reportan por la exposición a los compuestos OP se asocian con la inhibición de las esterasas, principalmente la AChE, que conlleva a la acumulación de acetilcolina en los sitios muscarínicos y causa un aumento en las

secreciones, broncoconstricción, bradicardia, taquicardia y un incremento en la motilidad gastrointestinal, además de miosis lo que resulta en una visión borrosa. En los sitios nicotínicos, la acumulación de acetil colina ocasiona fasciculación muscular y parálisis flácida. Una exposición aguda a compuestos OP en el sistema nervioso central causa dolores de cabeza, insomnio, mareos, confusión, somnolencia, convulsiones, coma y depresión respiratoria. Síntomas posteriores a la exposición incluyen debilidad muscular, dificultad para respirar y pérdida de la sensibilidad (Kamanyire y Karalliedde, 2004).

Debido a que el tiempo de vida media de los compuestos OP en el organismo es corto, los estudios epidemiológicos e *in vivo* emplean las concentraciones de los DAPs para asociar los efectos tóxicos con la exposición a estos compuestos. Sin embargo, no se conocen los mecanismos de acción específicos de los DAPs que participen en los efectos adversos a la salud que se observan en estudios epidemiológicos. Existen estudios que relacionan la concentración de los DAPs con la aparición y desarrollo de algunas enfermedades, como el cáncer, infertilidad masculina asociada a alteraciones en las células espermáticas, déficit de atención y problemas de hiperactividad en niños, problemas respiratorios como el asma y bronquitis crónicas, problemas en el desarrollo que pueden implicar una disminución del crecimiento del feto, así como el tiempo de gestación, asociados a bajo peso al nacer, así como alteraciones hormonales en hombres ocupacionalmente expuestos (Blanco-Muñoz *et al.*, 2010; Bouchard *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 1990; Harley *et al.*, 2011; Sánchez-Peña *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2016).

Existen estudios epidemiológicos que sugieren que los compuestos OP presentan un potencial efecto mutagénico al asociar la aparición de casos de leucemias y linfomas no-Hodgkin con los niveles de DAPs en orina de distintas poblaciones, entre las que se incluyen grupos de riesgo como infantes, mujeres y personas ocupacionalmente expuestas (Tabla 3). (Brown *et al.*, 1990; Cantor *et al.*, 1992, De Roos, 2003; Kato *et al.*, 2004; Soldin *et al.*, 2009; Waddell *et al.*, 2001).

Tabla 3. Estudios que asocian la aparición de algunos tipos de cáncer con la exposición a plaguicidas organofosforados.

<b>Cáncer</b>	<b>Plaguicida</b>	<b>Población</b>	<b>Tipo de Exposición</b>	<b>Referencia</b>
Próstata n = 1,516 casos 4,994 controles	Azinfos-Metil OR=1.70 IC 95% 1.11-2.60	Agricultores (Canadá)	Ocupacional	(Band <i>et al.</i> , 2011)
Próstata n = 1,962	Terbufos RR=1.29 IC 95% 1.02-1.64	Aplicadores de plaguicidas (E.U.)	Ocupacional	(Koutros <i>et al.</i> , 2013)
Linfoma de no- Hodgkin n = 910 casos 1,016 controles	Glifosato OR=2.02 IC 95% 1.10-3.71	Hombres y mujeres (Suecia)	Ambiental	(Eriksson <i>et al.</i> , 2008)
Leucemia n = 21,016	Forato RR= 1.53 IC 95% 0.99-2.37	Aplicadores de plaguicidas (Canadá)	Ocupacional	(Mahajan <i>et al.</i> , 2006)
Mama n = 30,003	Cualquier OP RR=1.20 IC 95% 1.01-1.43	Esposas de agricultores (E.U.)	Ambiental	(Lerro <i>et al.</i> , 2015)
Ovario n = 30,003	Diazinon RR= 1.87 IC 95% 1.02-3.43	Esposas de agricultores (E.U.)	Ambiental	(Lerro <i>et al.</i> , 2015)
Tiroides n = 30,003	Malatión RR=2.04 IC 95% 1.14-3.63	Esposas de agricultores (E.U.)	Ambiental	(Lerro <i>et al.</i> , 2015)

### 1.4.1 Carcinogenicidad

La carcinogénesis es un proceso que implica mecanismos de acción múltiples. Entre los mecanismos propuestos en la literatura se encuentra la inducción de estrés oxidante, la formación de aductos en el ADN, además de alteraciones epigenéticas (en genes supresores de tumores y oncogenes) y procesos inflamatorios, estos últimos como consecuencia de la exposición en etapas tempranas del desarrollo del individuo (Purdue *et al.*, 2006).

El estrés oxidante, como consecuencia del metabolismo de los plaguicidas OP, se considera uno de los mecanismos principales implicados en la carcinogénesis asociada con la exposición a plaguicidas OP. Estudios *in vivo* e *in vitro* encuentran que la exposición a los compuestos padres aumenta la aparición de biomarcadores de daño genético (8-OH-guanosina y micronúcleos (MN)), daño citotóxico (malondialdehído (MDA)), así como un aumento de ROS y la disminución de glutatión (Blasiak y Kowalik, 1999; Muniz *et al.*, 2008).

También se reporta que la alquilación del ADN, a causa de la exposición a plaguicidas OP metilados, ocurre principalmente en la guanina, en donde la N7-metildeoxiguanosina (N7-MedG) se presenta como un aducto persistente, permitiendo su acumulación durante exposiciones crónicas y se presenta con mayor frecuencia en comparación con otros productos de la alquilación del ADN, por lo que se emplea como un biomarcador de exposición a agentes metilantes (Gómez-Martín *et al.*, 2015).

Un estudio realizado por Hreljac y colaboradores planteó además que el efecto de los plaguicidas OP sobre el material genético depende del tipo de compuesto OP, por lo que emplearon tres compuestos OP modelo: el metil paratión (fosforotionato), el metil paraoxón (fosfato) y el dimefox (fosforotofluoridato) como tratamiento en células HepG2 y observaron que los compuestos indujeron daño directo sobre el ADN, modificando además la expresión de genes de respuesta al daño genético como *p21* (inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1A), *MDM2* (ubiquitin ligasa E3 regulador negativo de p53) y *GADD45a* (sensores de arresto celular y reparación del ADN). En este estudio se observó que los compuestos responsables de generar el daño genético son los fosforotionatos (Hreljac *et al.*, 2008).

### 1.4.2 Genotoxicidad de los OP

El potencial genotóxico de un compuesto es uno de los principales factores de riesgo para presentar efectos a largo plazo asociados con la exposición al mismo, tales como carcinogénesis y efectos tóxicos sobre el sistema reproductor, que se asocian con exposiciones prolongadas a plaguicidas (Bolognesi, 2003). Diversos estudios *in vitro*, *in vivo* y epidemiológicos reportan una asociación entre la exposición a compuestos OP y respuestas genotóxicas como aberraciones cromosómicas, formación de MN, intercambio de cromátidas hermanas y rompimiento de cadenas del ADN (Bolognesi, 2003) (Tabla 4).

Tabla 4. Estudios que demuestran efectos genotóxicos de la exposición a compuestos OP.

<b>Población/Unidad Experimental</b>	<b>Exposición</b>	<b>Biomarcador de daño</b>	<b>Referencia</b>
Población expuesta accidentalmente	Dimetoato	Rompimiento de cadenas de ADN	(Larripa <i>et al.</i> , 1983)
Aplicadores de plaguicidas	Dimetoato, Fenitrotión, Gromor, Malatión, Paratión, Urea y DDT	Aberraciones cromosómicas Rompimiento de cadenas de ADN	(Rupa <i>et al.</i> , 1988)
Linfocitos de Ratas Sprague Dawley	Clorpirifos	MN Rompimiento de cadenas de ADN	(Bhaskar <i>et al.</i> , 1995)
Línea celular HepG2	Metil Paratión, Metil Paraoxón, Dimefox	Rompimiento de cadenas de ADN	(Hreljac <i>et al.</i> , 2008)
Linfocitos humanos	Diazinon	MN	(Muranli <i>et al.</i> , 2015)

Para evaluar la genotoxicidad de un compuesto se emplean distintos tipos de técnicas entre las que destacan la hibridación fluorescente *in situ*, la tinción diferencial del material genético (Hoeschst/Giemsa) en conjunto con la incorporación de 5'-bromodeoxiuridina (BrdU), la frecuencia de formación de MN, la electroforesis de una sola célula (ensayo cometa), entre otras (Kapka-Skrzypczak *et al.*, 2011).

#### **1.4.2.1 Malatión**

El malatión es un compuesto OP alifático introducido en 1950, es uno de los plaguicidas OP más viejos y es utilizado en la agricultura para distintos cultivos, almacenes de granos, jardines, áreas residenciales, ornamentos y en programas de erradicación de plagas como por ejemplo: hormigas, pulgones, orugas, moscas de la fruta, saltamontes, avispones, polillas, ácaros, mosquitos, escorpiones, arañas, avispas y gorgojos, así como ectoparásitos de ganado, caballos, cerdos, aves de corral y mascotas (IARC, 2017).

Al igual que el resto de OP, el malatión después de ser bioactivado puede inhibir la actividad de distintas B-esterasas, como la acetilcolinesterasa generando los efectos neurotóxicos asociados a la exposición a OP. Además de este efecto el malatión ha sido estudiado por su potencial genotóxico, en estudios llevados a cabo tanto *in vivo* como *in vitro*. En poblaciones humanas ocupacionalmente expuestas se ha observado que la exposición a este plaguicida incrementa el daño al ADN, la frecuencia de micronúcleos, la frecuencia del intercambio de cromátides hermanas, así como la presencia aberraciones cromosómicas en linfocitos. En cultivos celulares se ha registrado daño al ADN en las células hepáticas HepG2, incremento de niveles de 8-OH-guanosina en PBMCs, así como mutaciones en el gen HPRT y aberraciones cromosómicas en linfocitos T (IARC, 2017).

#### **1.4.2.2 DAPs**

En un estudio previo se evaluó la capacidad genotóxica de dos de los DAPs que se producen en la biotransformación de algunos plaguicidas OP etilados (DEDTP y DETP), en células mononucleadas de sangre periférica humanas (PBMCs), HeLa (células altamente proliferativas), WRL-68 y HepG2 (líneas celulares hepáticas

humanas embrionarias y transformadas, respectivamente). En este estudio se encontró que tras la exposición a los DAPs, se observó un aumento en el daño al material genético únicamente en las líneas celulares hepáticas HepG2 y WRL-68. Así mismo, la adición de sulconazol, un inhibidor de las enzimas del CYP que se une covalentemente al átomo de hierro del grupo hemo (Balding *et al.*, 2008), disminuyó el efecto genotóxico en estas células. Este estudio sugiere entonces que los DAPs etilados, al igual que los compuestos OP, tienen una actividad genotóxica en células humanas que parece estar relacionada con su metabolismo mediado por los CYPs (Vega *et al.*, 2009).

Aun cuando no hay estudios que hablen de los posibles mecanismos de biotransformación de estas moléculas, existen softwares predictivos que emplean análisis estadísticos y datos publicados en la literatura para sugerir posibles sitios en donde una molécula puede metabolizarse, así como las posibles enzimas implicadas en el proceso. La evaluación en los softwares SMARTCyp y MetaPrint2D dan como resultados que los átomos de azufre y fósforo en las moléculas de los DAPs metilados como el DMTP pueden ser susceptibles a reacciones mediadas por enzimas como el CYP2D6 o CYP2C (Figura 6) (Adams *et al.*, 2011; Rydberg *et al.*, 2010). Otro estudio previo demostró que la exposición a los DAPs metilados DMDTP y DMP en PBMCs, HeLa, HepG2 y WRL-68 indujo daño al ADN de manera concentración-dependiente en los 4 tipos celulares (Romero-Martínez, 2015). Sin embargo, hasta el momento se desconocen los mecanismos por los cuales los DAPs contribuyen en el efecto genotóxico de los compuestos OP.

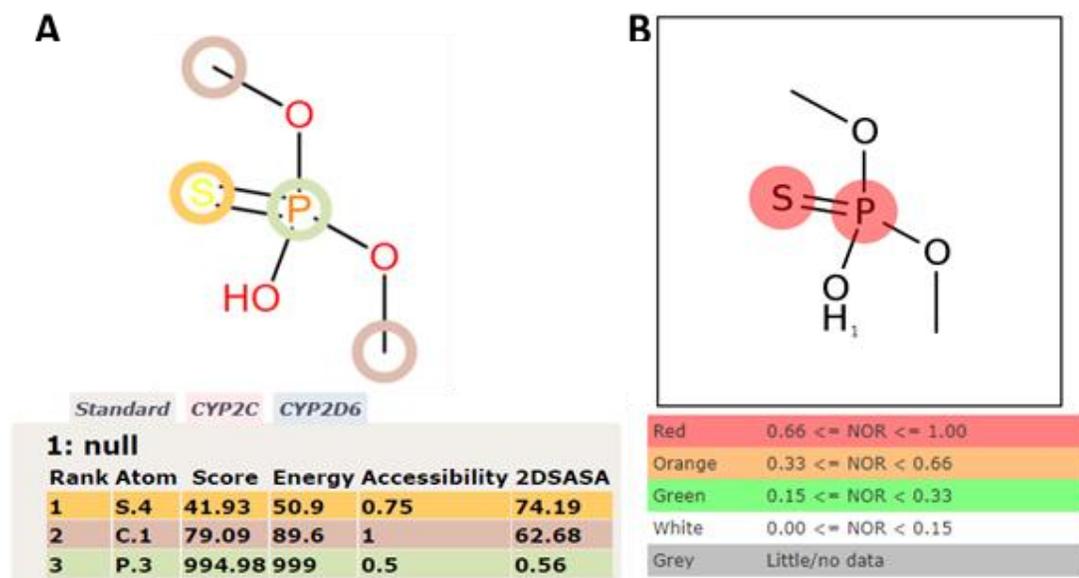


Figura 6. Predicciones *in silico* del metabolismo del DMTP. (A) Resultado de posibles enzimas metabolizadoras, se muestran los parámetros de energía de unión, accesibilidad de la molécula y la accesibilidad por átomo en modelos 3D (2DSASA) (SMARTCyp). (B) Resultados que muestran la relación de ocurrencia normalizada (NOR): la probabilidad relativa de que el metabolismo ocurra en un sitio particular de la molécula (MetaPrint2D).

## 1.5 Justificación

Los plaguicidas OP son compuestos sintéticos que se utilizan para controlar plagas tanto en la agricultura y sector salud, como de manera doméstica. Estos compuestos se metabolizan rápidamente en el organismo y producen DAPs que tienen una mayor permanencia en el organismo que el compuesto padre. A la fecha, no se han reportado efectos tóxicos directamente relacionados con los DAPs.

Los DAPs se encuentran en la orina, la sangre y el cabello de personas ocupacionalmente expuestas a plaguicidas, así como en la población general, sin que se identifique una fuente de exposición específica. La exposición crónica a los plaguicidas OP se asocia con el desarrollo de linfoma no Hodgkin y con ciertos tipos de leucemias, así como con la aparición de efectos genotóxicos en linfocitos y espermatozoides de personas ocupacionalmente expuestas. Otros estudios encuentran rompimiento de cadenas de ADN y aberraciones cromosómicas de cultivos celulares de hígado, además de la formación de MN en linfocitos tras la exposición a plaguicidas OP. A pesar de esto, se desconoce si existe o no una participación de los DAPs en este

proceso. Estudios previos demostraron que la exposición a DEDTP, DETP, DMDTP y DMP indujo un efecto genotóxico en células hepáticas, indicando la posibilidad de que la capacidad de los compuestos OP de producir un daño genotóxico podría estar mediada por los DAPs o su generación en el organismo.

## **1.6 Hipótesis**

Si los metabolitos metilados de plaguicidas OP como el malatión son genotóxicos, entonces el DMTP inducirá el aumento de la frecuencia de MN en células humanas.

## **1.7 Objetivos**

### **1.7.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto genotóxico del malatión y el DMTP en PBMCs y en las líneas celulares humanas WRL-68 y HepG2.

### **1.7.2 Objetivos particulares**

- Evaluar la formación de MN generados por el malatión y DMTP en PBMCs y en las líneas celulares WRL-68 y HepG2.
- Determinar la participación de las enzimas del CYP450 en el efecto genotóxico del malatión y los DAPs metilados.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Estrategia experimental

A continuación, se muestra la estrategia experimental de este proyecto (Figura 7).

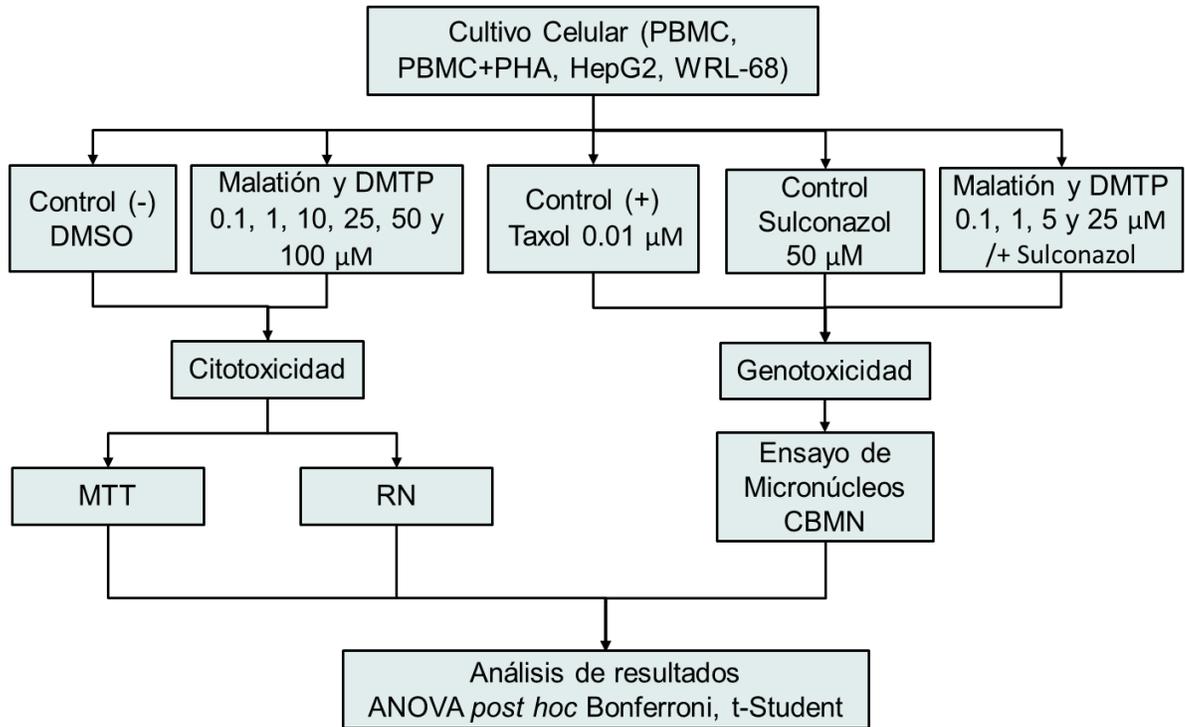


Figura 7. Estrategia experimental.

### 2.2 Cultivo de PBMCs

#### 2.2.1 Características

Las PBMCs son células sanguíneas que tienen un núcleo redondo, principalmente conformadas por linfocitos, monocitos y células dendríticas. Las PBMCs se obtienen de muestras sanguíneas de personas sanas y se aíslan por gradientes de densidad. En cultivo son células redondas no adherentes por lo que se mantienen en suspensión (Končarević *et al.*, 2014).

#### 2.2.2 Procedimiento

Se realizó una invitación abierta a personas del CINVESTAV para la donación libre y voluntaria de muestras de sangre para obtener PBMCs. La sangre periférica se colectó

por venopunción, empleando una jeringa con heparina, previo consentimiento a través de una carta de consentimiento informado. Los procedimientos se aprobaron por el Comité de Bioética de Salud en Seres Humanos (COBISH) del CINVESTAV Folio 045/2017. Las PBMCs se separaron empleando un gradiente de densidad de Ficoll (Histopaque) y centrifugando a 2000 rpm por 25 min. El suero se descartó y la fase con PBMCs se recuperó y se realizaron 2 lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Posteriormente, las células se resuspendieron en 2 ml de PBS y se contaron mediante un hemocitómetro con la tinción de azul de tripano (1:1) para ajustar a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado por calor, 1% de L-glutamina (200 mM) y 1% de aminoácidos no esenciales (100 mM). Las células se sembraron en placas de 96 pozos, colocando 200  $\mu$ l por pozo ( $2 \times 10^5$  células/pozo). La placa se incubó a 37° C con CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, a un grupo de PBMCs se les agregó fitohemaglutinina (PHA) para inducir la proliferación celular, procurando tener una concentración final de 5  $\mu$ g/ml en la suspensión celular.

## **2.3 Cultivos de líneas celulares**

### **2.3.1 Características**

La línea celular HepG2 se aisló de una biopsia hepática de un paciente masculino de 15 años con carcinoma hepatocelular. Las células secretan una variedad de proteínas plasmáticas como albúmina, alfa-2-macroglobulina, alfa-1-antitripsina, transferrina y plasminógeno. Estos hepatocitos son adherentes con una morfología epitelial. Las células responden a estimulación con hormonas de crecimiento humanas (ECACC, 2013b).

Las células WRL-68 poseen una morfología similar a hepatocitos y células de cultivos primarios de hígado. Estas células secretan albúmina y alfa-fetoproteína y expresan enzimas específicas del hígado, tales como la aspartato aminotransferasa, gamma-glutamil transpeptidasa y la fosfatasa alcalina. Son células embrionarias humanas no transformadas, adherentes y con morfología epitelial. Esta línea celular expresa

marcadores similares a las células HeLa, por lo que son indistinguibles en un perfil de ADN por PCR (ECACC, 2013c).

### **2.3.2 Procedimiento**

Las líneas celulares HepG2 y WRL-68 se incubaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 1% de amino ácidos no esenciales (100 mM), 1% de piruvato de sodio (100 mM) y 1% de antibiótico-antimicótico 100X a 37° C en condiciones húmedas con 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 80%, posteriormente se subcultivaron, para lo que se removió el medio de cultivo de las células y se lavaron con PBS. A la caja de cultivo se le agregó una solución de tripsina (0.5% v/v) temperada a 37° C en cantidad suficiente para cubrir la superficie de la caja. El cultivo se incubó por 5 min, y se verificó el desprendimiento de las células mediante observaciones en un microscopio invertido con contraste de fases. Cuando más del 90% de las células estaban desprendidas se les agregó 3 ml de medio de cultivo a 37° C. La suspensión celular se recuperó y se centrifugó a 1500 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo a 37 °C. El número de células se determinó empleando un hemocitómetro azul de tripano (1:1) para realizar el ajuste de la densidad celular a 12,500 células/ml en medio DMEM suplementado. Las células se sembraron en cajas de 96 pozos, colocando 200 µl por pozo (2500 células/pozo) y se incubaron a 37° C con 5% CO<sub>2</sub> (ThermoFisher Scientific) para las pruebas de viabilidad y en cajas de 12 pozos (6000 células/pozo) sobre cubreobjetos redondos (18 mm de diámetro), previamente esterilizados para el ensayo de formación de MN.

### **2.4 Tratamientos**

Se prepararon soluciones stock de DMTP y malatión 200 mM en DMSO, a partir de las cuales se obtuvieron diluciones para alcanzar las concentraciones en cada pozo de la caja de cultivo de 0.1, 1, 10, 25, 50 y 100 µM en medio de cultivo sin suplementar. Las líneas celulares, los PBMCs en reposo y las PBMCs estimuladas por 24 h con PHA

se expusieron a los compuestos por 48 h y posteriormente se cosecharon y se procesaron para evaluar la viabilidad celular y la frecuencia de MN.

## **2.5 Viabilidad celular por el metabolismo del MTT**

### **2.5.1 Principio**

Es un ensayo colorimétrico que consiste en la conversión de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en formazán por medio de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, generando un cambio de coloración del medio de amarillo a azul. Se asume que esta conversión sólo ocurre en células con mitocondrias activas, y por tanto la cantidad de formazán representa el número de células vivas presentes en el medio (Mosmann, 1983).

### **2.5.2 Procedimiento**

Se agregaron 20 µl de una solución de MTT (5 mg/ml en PBS estéril) en cada pozo de los cultivos celulares y se incubaron por 4 h en el caso de las PBMCs en reposo y estimuladas y 2 h en el caso de las líneas celulares a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se agregaron 100 µl de DMSO a las PBMCs en reposo y estimuladas, y 200 µl para las líneas celulares y se agitaron por 10 min hasta disolver el formazán. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro de microplaca a una longitud de onda de 490 nm y 620 nm como referencia. Los valores de la actividad mitocondrial se ajustaron respecto al control negativo (DMSO 0.0125%), considerado como el 100% de actividad.

## **2.6 Viabilidad celular por incorporación de rojo neutro**

### **2.6.1 Principio**

El ensayo de citotoxicidad de rojo neutro (RN) es un procedimiento basado en la habilidad de las células viables de incorporar y unir al colorante supravital RN. El RN es un colorante catiónico débil que se difunde a través de la membrana plasmática y se concentra en los lisosomas donde se une electrostáticamente a la matriz lisosomal

aniónica. Cuando las células presentan alteraciones en la superficie celular o en la membrana de los lisosomas, disminuye la cantidad de RN retenido en el cultivo. La concentración del colorante RN desorbido del cultivo celular es directamente proporcional al número de células vivas y la citotoxicidad se expresa como la reducción de la incorporación del RN después de la exposición al xenobiótico de interés.

### **2.6.2 Procedimiento**

Después de 46 h de incubación con los tratamientos el medio de cultivo se retiró y los pozos se lavaron con 250 µl de PBS estéril y posteriormente se adicionaron 250 µl por pozo de una solución temperada de RN (25 µg/ml disuelto en medio de cultivo suplementado) y se incubaron por 2 h más a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Al término de la incubación el medio de cultivo se retiró y los pozos se lavaron con PBS estéril. Posteriormente se agregaron 100 µl de una solución recién preparada de agua/etanol/ácido acético (49:50:1) y la microplaca se agitó por 10 min para disolver el RN. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro de microplaca a una longitud de onda de 540 nm. Los resultados se ajustaron respecto al control negativo (DMSO 0.0125%).

## **2.7 Formación de MN con inhibición de la citocinesis (CBMN)**

### **2.7.1 Principio**

Durante la telofase, los residuos de cromosomas y cromosomas rezagados producto de un daño genotóxico o mala segregación cromosómica se envuelven por una membrana nuclear, dentro de la cual el material genético comienza a descondensarse de manera gradual hasta asumir la morfología de un núcleo en interfase, pero de un tamaño menor. Dado que los MN se expresan después de la división celular, el ensayo emplea un bloqueador de la citocinesis, la citocalasina B (Cyt-B), un inhibidor de la polimerización de la actina que impide la formación del anillo constrictor requerido para la citocinesis. De esta manera es posible evaluar las células divididas como células binucleadas en las cuales se determinará la presencia de MN (Fenech, 2000). El ensayo de CBMN además permite evaluar la frecuencia de re-arreglos cromosómicos por

medio de puentes nucleoplásmicos (NPB), amplificaciones de ADN y complejos de reparación por medio de gemaciones nucleares (NBud), así como citostaticidad por el índice de duplicación nuclear (NDI).

### **2.7.2 Procedimiento**

Las PBMCs se trataron con malatión y DMTP (0.1, 1, 5 y 25  $\mu\text{M}$ ) por 72 h empleando como control positivo Taxol (0.01  $\mu\text{M}$ ) y como control negativo DMSO (0.0125%). A las 44 h de incubación se añadió Cyt-B (6  $\mu\text{g/ml}$ ), y se incubaron por 28 h más a 37° C para bloquear la citocinesis. Transcurrido el tiempo del tratamiento las células se recuperaron y se lavaron con PBS estéril, la suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm por 10 min, el sobrenadante se descartó y se agregó cloruro de potasio (0.075 M) incubando a temperatura ambiente. A los 10 min se agregó una solución de prefijado Metanol/ácido acético (3:5 v/v) a 4° C. La suspensión se centrifugó y el botón de células se lavó con metanol absoluto a -20° C por 10 min y posteriormente se fijó con una solución de Carnoy (metanol/ ácido acético 3:1 v/v) por 10 min. Cumplido este tiempo se realizaron extendidos en portaobjetos previamente lavados y desengrasados. Los portaobjetos se dejaron secar por 24 h.

La tinción se realizó empleando una solución acuosa del colorante Giemsa con modificación de Wolbach al 10%. Las laminillas se incubaron con el colorante por 15 min. Al término de la incubación se retiró el colorante con agua corriente y se sumergieron en una solución de etanol al 70%. Las laminillas se dejaron secar y posteriormente se evaluaron en el microscopio óptico.

Las células HepG2 y WRL-68 se cultivaron sobre cubreobjetos redondos y se trataron con malatión y DMTP (0.1, 1, 5 y 25  $\mu\text{M}$ ) por 72 h empleando como control positivo Taxol (0.01  $\mu\text{M}$ ) y como control negativo DMSO (0.0125%). Las células se expusieron a Cyt-B (6  $\mu\text{g/ml}$ ) 44 h después del inicio de los tratamientos y se incubaron por 28 h más a 37° C. Una vez transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo se retiró, se realizó un lavado con PBS y se agregó cloruro de potasio (0.075 M) a los cultivos y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Las células se fijaron con una solución de Carnoy (metanol/ ácido acético 3:1 v/v) por 10 min a 4 °C. Los cubreobjetos se retiraron de la caja de 12 pozos y se dejaron secar. Posteriormente las laminillas se

tiñeron con una solución acuosa del colorante Giemsa con modificación de Wolbach al 15%. Los cubreobjetos se incubaron con el colorante por 15 min. Al término de la incubación se retiró el colorante con agua corriente y se sumergieron en una solución de etanol al 70%, se dejaron secar y posteriormente se fijaron a portaobjetos con medio de montaje Entellan.

El procedimiento se repitió tratando las células con Sulconazol (50  $\mu\text{M}$ ) más DMTP (25  $\mu\text{M}$ ) por 72 h, agregando Cyt-B (6  $\mu\text{g/ml}$ ) a las 44 h del inicio del tratamiento. Las células se procesaron de la misma manera descrita anteriormente.

Para evaluar las muestras se cuantificaron 1000 células binucleadas por muestra y se identificó la frecuencia de aparición de MN, NPB y NBud, así como el número de células multinucleadas, siguiendo los criterios establecidos previamente (Thomas y Fenech, 2011) para determinar el índice de duplicación nuclear (NDI) a partir de la siguiente fórmula  $\text{NDI} = (M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4)/N$ , donde  $M_1 - M_4$  representa el número de células con 1 a 4 núcleos y N el total de células viables registradas.

## **2.8 Análisis de los Resultados**

Se realizó un análisis descriptivo de los resultados expresando los valores como medias  $\pm$  desviación estándar (DE) y análisis de varianza mediante la prueba de ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de Bonferroni para comparar los niveles de tratamientos con los respectivos controles. La prueba t de Student se utilizó para comparar entre el DMTP y el DMTP con sulconazol. Por último, se realizó una prueba de ANOVA de dos vías para la comparación entre los efectos del malatión y el DMTP. Se utilizó un valor de  $p < 0.05$  para establecer la significancia estadística. Los resultados se analizaron utilizando los programas Microsoft Excel (2016) y GraphPad Prisma 5 (5.01).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Viabilidad celular por el metabolismo del MTT

Para conocer si el malatión y su metabolito DMTP generaban citotoxicidad se realizó el ensayo de viabilidad celular mediante el metabolismo del MTT. En las PBMCs, el malatión y DMTP no presentaron efectos sobre la actividad mitocondrial a ninguna de las concentraciones que se utilizaron (0-100  $\mu$ M) (Figura 8A). Así mismo, al tratar a las PBMCs estimuladas con PHA, malatión ó DMTP no se observaron cambios a ninguna concentración (Figura 8B). Por el contrario, en las células HepG2, el DMTP redujo la actividad mitocondrial de manera significativa ( $p < 0.05$ ) a partir de la concentración de 25  $\mu$ M, observándose además una respuesta concentración dependiente, mientras que, el tratamiento con el malatión aumentó la actividad mitocondrial en todas las concentraciones, a valores mayores del 150% respecto al control negativo (Figura 9A). De manera similar, en las células WRL-68, el DMTP disminuyó la actividad mitocondrial a partir de la concentración de 50  $\mu$ M, mientras que el malatión aumentó la actividad mitocondrial a valores mayores que el control negativo (Figura 9B). Los tratamientos con el malatión sugieren un aumento de la actividad metabólica que pudiera deberse a una respuesta al estrés o inclusive proliferación de las células. Sin embargo, este efecto puede atribuirse también a una interacción entre el malatión o algunos de sus metabolitos con grupos reductores, como el DMDTP, capaces de reducir la sal de tetrazolio a formazán y por tanto generar falsos positivos como lo sugieren Riss *et al.*, (2004), quienes explican que la presencia de compuestos con grupos reductores como -SH puede reducir las sales de tetrazolio a formazán.

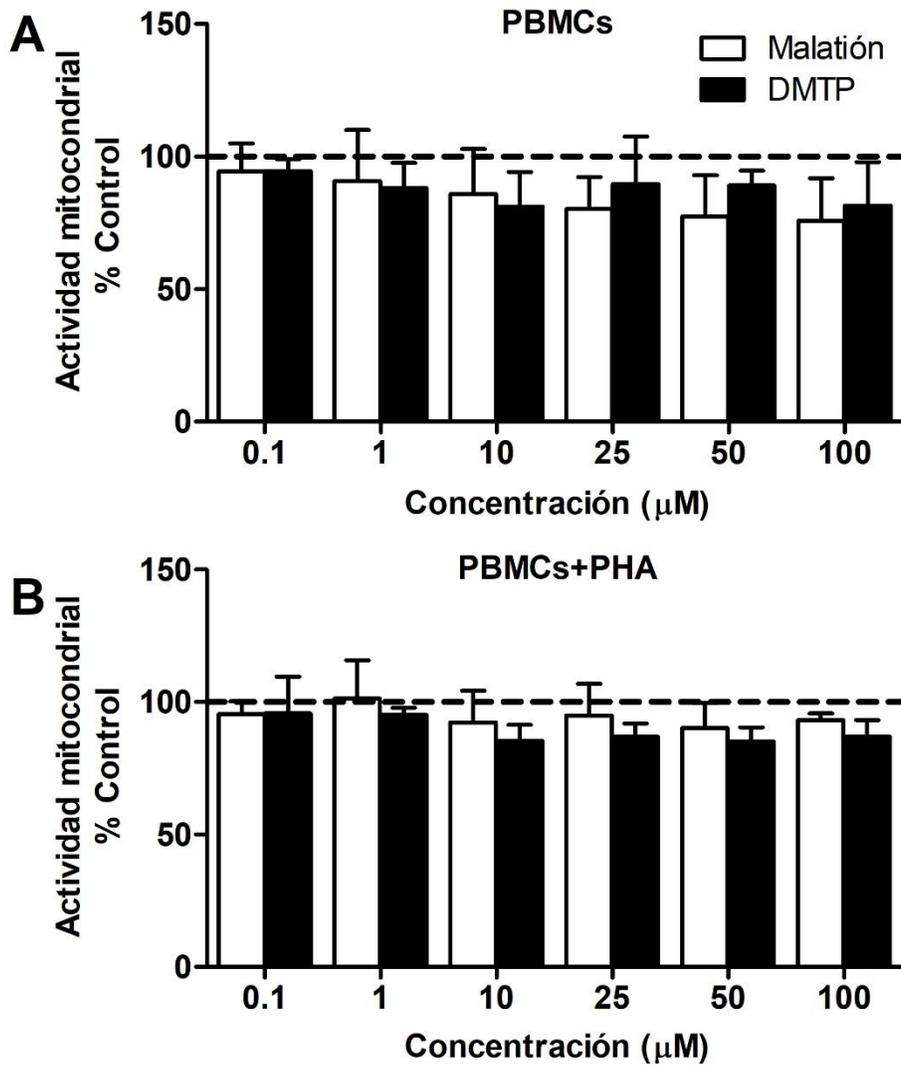


Figura 8. Evaluación de la citotoxicidad por el ensayo de actividad mitocondrial MTT de PBMCs humanas (A) y PBMCs estimuladas (B), tratadas con malatión o DMTP por 48 h. Los datos representan el promedio del % respecto al control negativo (DMSO)  $\pm$  D.E. (n=3). No se encontraron diferencias significativas tomando una  $p < 0.05$ , ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni control vs. malatión o DMTP.

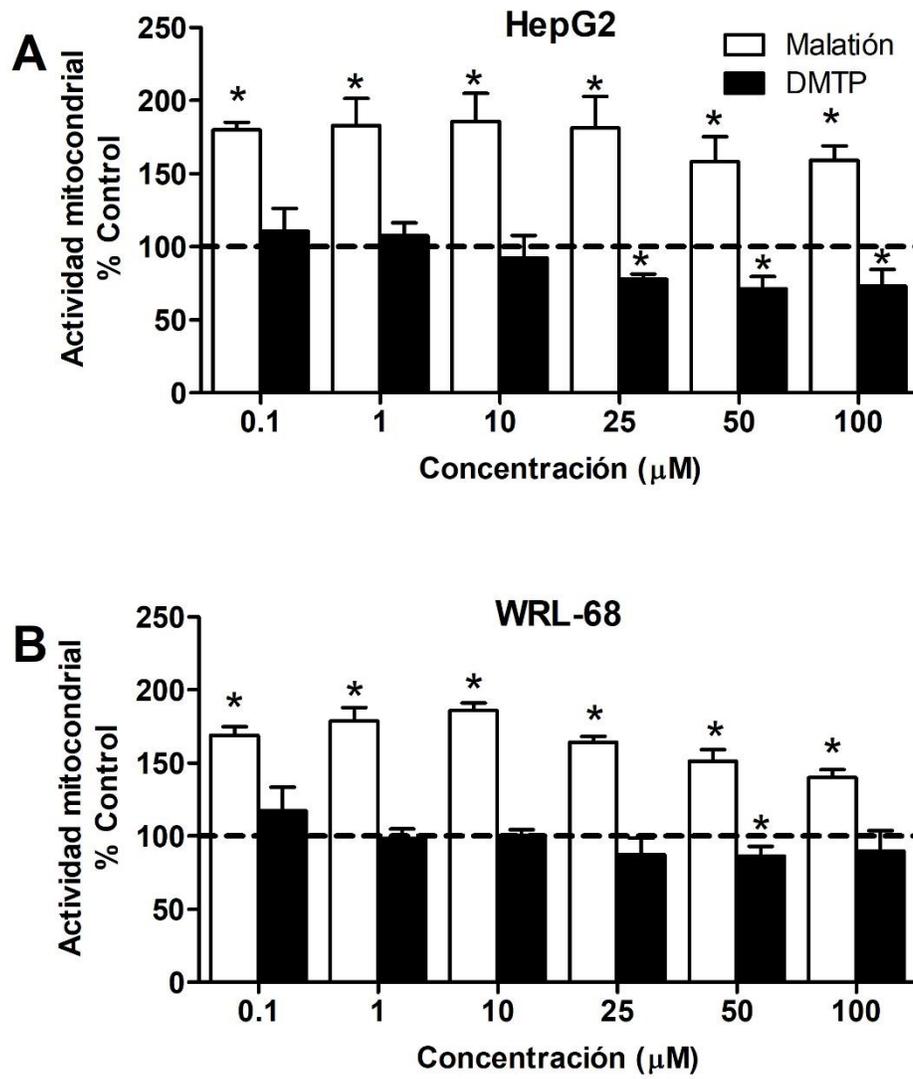


Figura 9. Evaluación de la citotoxicidad por el ensayo de actividad mitocondrial MTT de las células hepáticas HepG2 (A) y WRL-68 (B), tratadas con malatión o DMTP por 48 h. Los datos representan el promedio del % respecto al control negativo (DMSO)  $\pm$  D.E. (n=3) \* $p < 0.05$ , ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni del control vs. malatión o DMTP.

### 3.2 Viabilidad por incorporación de rojo neutro

Debido a que la prueba de MTT podría enmascarar los efectos de toxicidad del Malatión decidimos realizar otra prueba de viabilidad utilizando la incorporación del rojo neutro bajo las mismas condiciones de cultivos y tratamiento. De la misma manera que en el ensayo de MTT, las PBMCs y las PBMCs estimuladas no presentaron efectos

citotóxicos significativos tras el tratamiento con los compuestos OP (Figura 10), y en este caso los tratamientos con el malatión o el DMTP tampoco afectaron la viabilidad de las células hepáticas HepG2 y WRL-68 a ninguna de las concentraciones que se utilizaron (Figura 11).

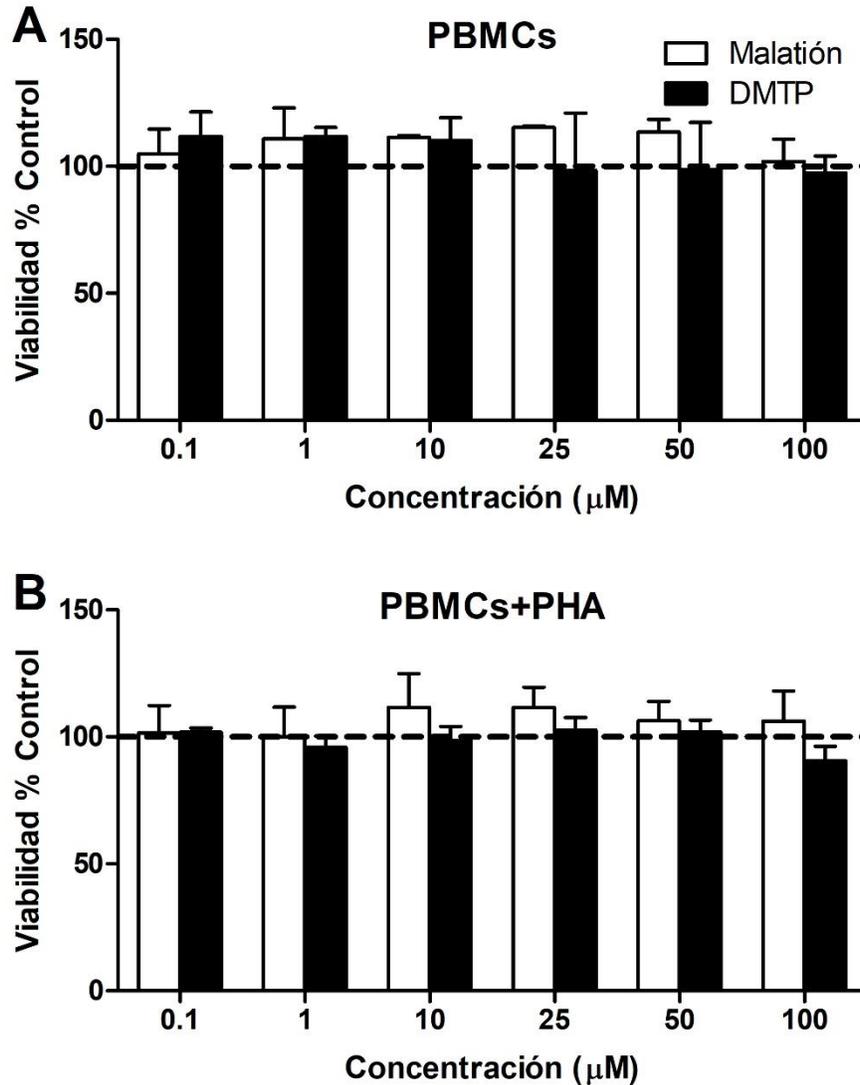


Figura 10. Evaluación de la citotoxicidad por el ensayo de incorporación de RN del malatión o DMTP en PBMCs humanas (A) y PBMCs estimuladas (B), tratadas por 48 h. Los datos representan el promedio del % respecto al control negativo (DMSO)  $\pm$  D.E. (n=3). No se encontraron diferencias significativas tomando una  $p < 0.05$ , ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni control vs. malatión o DMTP.

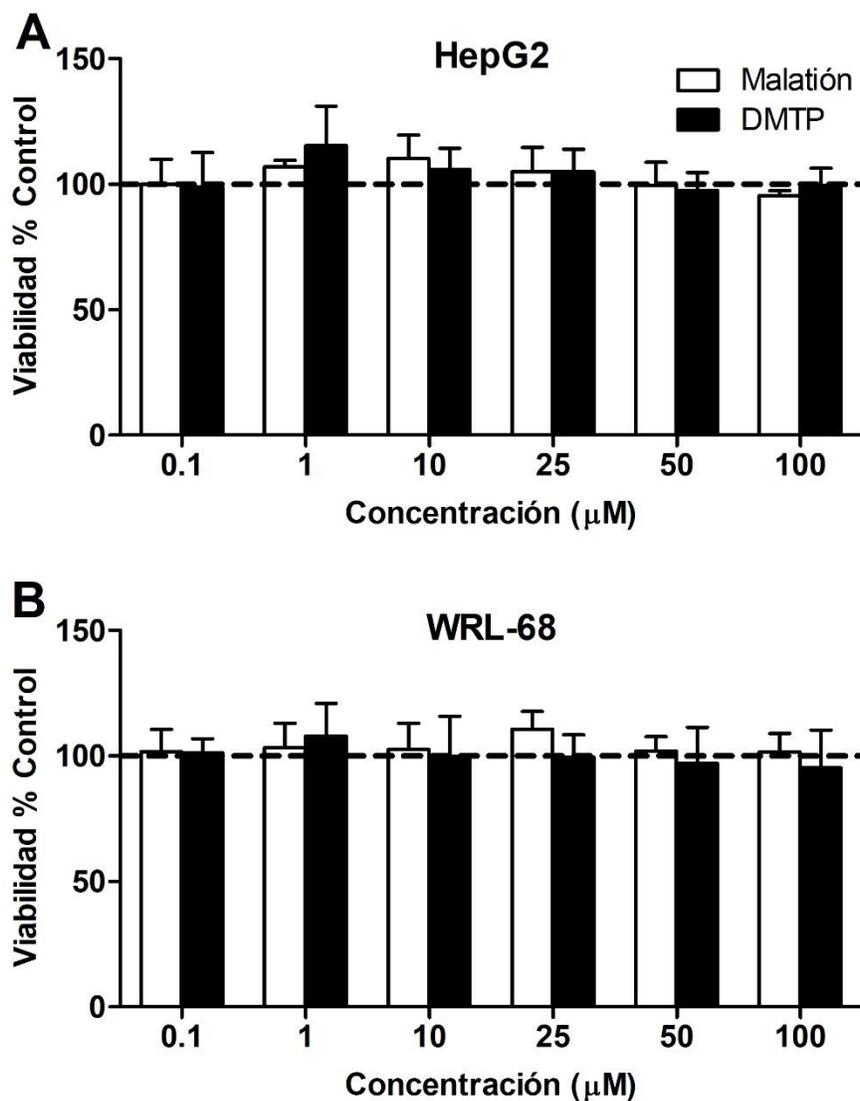


Figura 11. Evaluación de la citotoxicidad por el ensayo de incorporación de RN del malatión o el DMTP en las células hepáticas HepG2 (A) o WRL-68 (B), tratadas por 48 h. Los datos representan el promedio del % respecto al control negativo (DMSO)  $\pm$  D.E. (n=3). No se encontraron diferencias significativas tomando una  $p < 0.05$ , ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni control vs. malatión o DMTP.

Sabiendo que las concentraciones del malatión y DMTP que se utilizaron no producían efectos citotóxicos, la genotoxicidad encontrada en las células expuestas a estos OP no se debería a procesos de muerte celular, y considerando además que la acumulación de daños en el ADN podría tener consecuencias biológicas importantes en una célula viable, se procedió a escoger un rango de concentraciones (0-25 µM) que tuvieran

importancia biológica para la evaluación de la genotoxicidad, de acuerdo con las concentraciones de DAPs encontradas en orina de poblaciones expuestas reportadas en la literatura (Bouvier *et al.*, 2006; Cocker *et al.*, 2002b; Fenske y Leffingwel, 1989; García *et al.*, 2000).

### **3.3 Ensayo de formación de MN con bloqueo de la citocinesis (CBMN)**

#### **3.3.1 Citostaticidad**

La evaluación de la genotoxicidad y de efectos citostáticos del malatión y del DMTP se realizó por el ensayo de formación CBMN en las PMBCs estimuladas y en las células HepG2 y WRL-68. Tras la exposición a los compuestos OPs no se observaron efectos citostáticos significativos en ningún tipo celular de acuerdo con el índice de duplicación nuclear (Tabla 5), indicando un estado proliferativo de las células viables que completaron al menos una división nuclear, la cual es necesaria para la identificación de MN, NPB y NBud en el ensayo CBMN.

#### **3.3.2 Genotoxicidad**

Cuando se evaluó la genotoxicidad en las PBMCs estimuladas se observó una tendencia concentración-dependiente, siendo únicamente a 5 y 25  $\mu\text{M}$  de ambos tratamientos que generaron un aumento significativo en la frecuencia de MN respecto al control (Figura 12A), sin presentar diferencias entre el efecto del malatión y del DMTP ( $p=0.8471$ , tabla 6). La frecuencia de NPB y NBud en estas células mostró una tendencia a incrementar dependiente de la concentración con el tratamiento del malatión, aunque fue únicamente significativo a la concentración más alta (25  $\mu\text{M}$ ) respecto al control, mientras que el DMTP no presentó diferencias respecto al control. Se observó además una diferencia significativa entre el efecto que produjo la exposición al malatión y el DMTP a 25  $\mu\text{M}$  en la inducción de NPB y NBud ( $p=0.0003$ , tabla 6) (Figuras 12B y 12C).

Cuando se expusieron las células HepG2 a los compuestos OP, el aumento en la frecuencia de MN fue significativo a todas las concentraciones que se utilizaron y se observó que el DMTP presentó un comportamiento dependiente de la concentración y a partir de 5  $\mu\text{M}$  fue significativamente mayor que el efecto del tratamiento con

malatión ( $p < 0.001$ , tabla 6) (Figura 13A). En el caso de los NPB, el tratamiento con el malatión indujo un aumento significativo a partir de  $1 \mu\text{M}$ , sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos del DMTP y malatión ( $p = 0.1728$ , tabla 6) (Figura 13B). En cuanto a las NBud inducidas por los OP, el tratamiento con el malatión solo indujo un aumento significativo de NBud a  $1 \mu\text{M}$ , mientras que el DMTP mostró aumento a las concentraciones más altas ( $5$  y  $25 \mu\text{M}$ ) (Figura 13C). No se observaron diferencias entre los tratamientos ( $p = 0.3685$ , tabla 6).

Al tratar a las células WRL-68 con los compuestos OP se observó un aumento en la frecuencia de MN que fue significativo a todas las concentraciones con ambos tratamientos, donde el DMTP presentó una tendencia concentración-dependiente, pero esta vez sin presentar diferencia con el malatión (Figura 14A). Así mismo, el malatión presentó un aumento significativo en la inducción de NPB a todas las concentraciones utilizadas, sin mostrar una respuesta dependiente de la concentración. De manera contraria, el DMTP no generó un aumento significativo en la frecuencia de NPB (Figura 14B). Por otro lado, no se observaron diferencias en la inducción de NBud respecto al control con ninguno de los tratamientos de OP (Figura 14C). Cabe mencionar que la frecuencia de inducción de MN, NPB y NBud en las células HepG2 y WRL-68 resultó mayor en comparación a la frecuencia observada en las PBMCs estimuladas, lo que podría indicar que el efecto genotóxico del malatión y el DMTP es dependiente de condiciones metabólicas presentes en las células hepáticas.

Tabla 5. Número de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas y el NDI en PBMCs estimuladas, HepG2 y WRL-68 tras el ensayo de formación de micronúcleos.

Células	Compuesto	No. Células Mononucleadas	No. Células Multinucleadas	NDI	
PBMCs + PHA	DMSO	508 ± 24.6	41 ± 17.8	1.62 ± 0.05	
	Malatión (µM)				
	0.1	617.3 ± 135.7	37.3 ± 8.4	1.50 ± 0.13	
	1	549.6 ± 108.1	40.7 ± 10.4	1.57 ± 0.11	
	5	512.2 ± 122.1	42.8 ± 5.6	1.62 ± 0.12	
	25	570.7 ± 34.50	49.2 ± 8.1	1.58 ± 0.06	
	DMTP (µM)				
	0.1	591.3 ± 145.7	28.2 ± 7.3	1.49 ± 0.16	
	1	566.8 ± 166.9	37.3 ± 17.4	1.55 ± 0.16	
	5	602.33 ± 90.8	43 ± 19.9	1.53 ± 0.15	
	25	554 ± 127.2	32.7 ± 12.3	1.55 ± 0.16	
	Taxol 0.01 µM	649.8 ± 136.7	33.83 ± 10.2	1.45 ± 0.11*	
	HepG2	DMSO	61.3 ± 9.3	12.3 ± 2.3	1.97 ± 0.01
		Malatión (µM)			
0.1		148.2 ± 3.2	18.2 ± 5.8	1.87 ± 0.04	
1		124.7 ± 18.9	18.2 ± 6.4	1.93 ± 0.03	
5		237.8 ± 143.9	17.5 ± 3.8	1.82 ± 0.13	
25		217.8 ± 128.1	15.5 ± 3.9	1.83 ± 0.11	
DMTP (µM)					
0.1		157.7 ± 90.8	16.5 ± 7.4	1.89 ± 0.07	
1		168.0 ± 32.1	17.5 ± 9.0	1.88 ± 0.02	
5		131.8 ± 30.2	15.3 ± 5.5	1.91 ± 0.03	
25		148.7 ± 93.8	17.3 ± 5.5	1.90 ± 0.09	
Taxol 0.01 µM		45 ± 8.7	20.3 ± 2.5	2.02 ± 0.01	
WRL-68		DMSO	51 ± 3.9	12.2 ± 49	1.99 ± 0.01
		Malatión (µM)			
	0.1	230.8 ± 29.7	15.3 ± 3.3	1.81 ± 0.03*	
	1	216.2 ± 69.5	16.8 ± 3.1	1.83 ± 0.07*	
	5	171.2 ± 18.5	16 ± 1.5	1.88 ± 0.02*	
	25	151.2 ± 53.5	17.3 ± 3.8	1.90 ± 0.05	
	DMTP (µM)				
	0.1	177.7 ± 29.9	16 ± 1.5	1.87 ± 0.02*	
	1	135.7 ± 4.0	18.3 ± 3.8	1.92 ± 0.00	
	5	152.5 ± 28.6	13.8 ± 2.0	1.89 ± 0.02	
	25	180.2 ± 29.9	14.8 ± 1.0	1.86 ± 0.02*	
	Taxol 0.01 µM	55 ± 16.9	13.5 ± 5.2	1.98 ± 0.02	

\*p<0.05 tratamiento vs. DMSO, ANOVA de una vía *pos hoc* Bonferroni. <sup>a</sup>NDI, índice de duplicación nuclear.

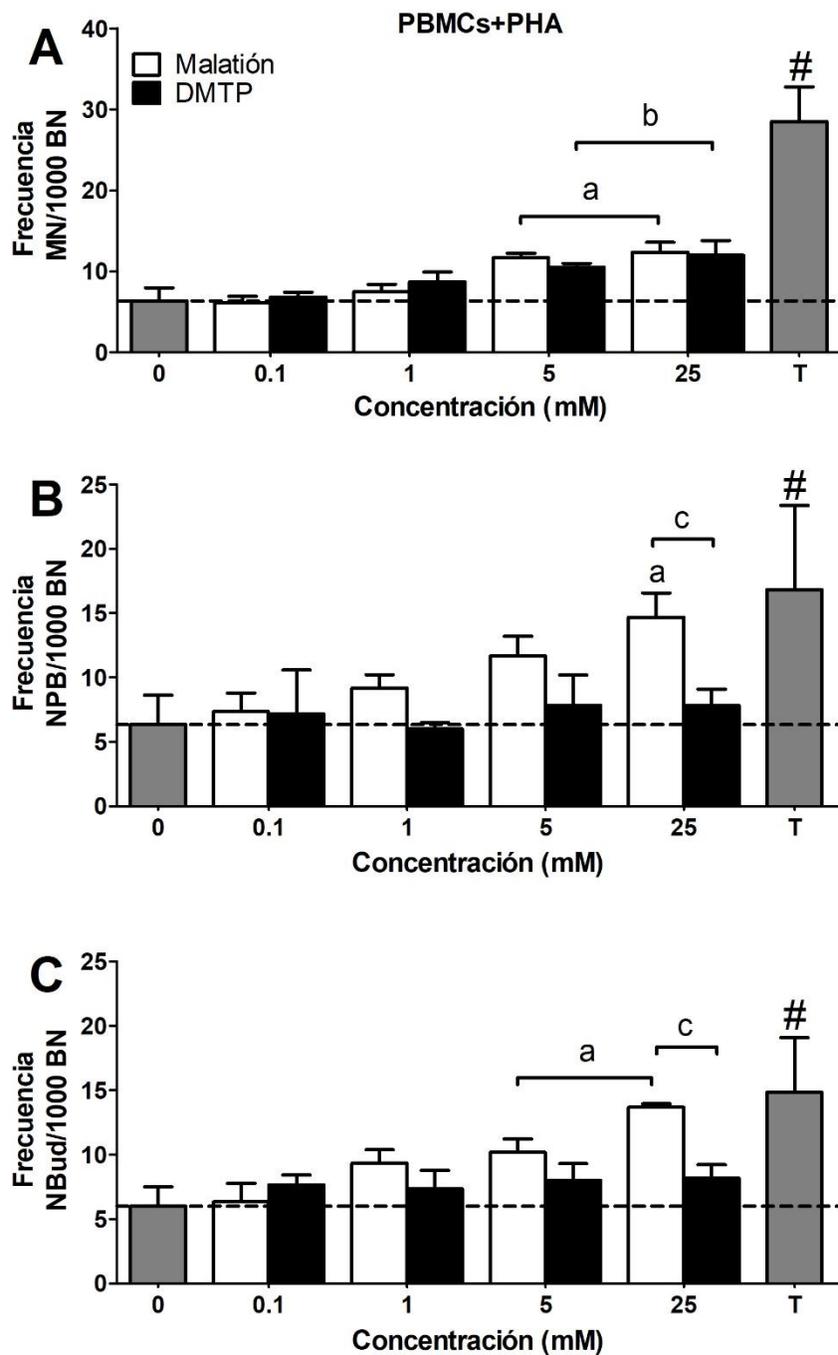


Figura 12. Frecuencia de formación de MN (A), NPB (B) y NBud (C) inducidos por el malatión, DMTP o Taxol (T, 0.01  $\mu$ M) por 48 h en PBMCs estimuladas. Los datos representan la frecuencia en 1000 células binucleadas  $\pm$  D.E. (n=3), ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni, <sup>a</sup>p<0.05 DMSO (0) vs. malatión, <sup>b</sup>p<0.05 DMSO (0) vs. DMTP, <sup>c</sup>p<0.05 malatión vs. DMTP; #p<0.05, prueba t-Student DMSO (0) vs. Taxol (T).

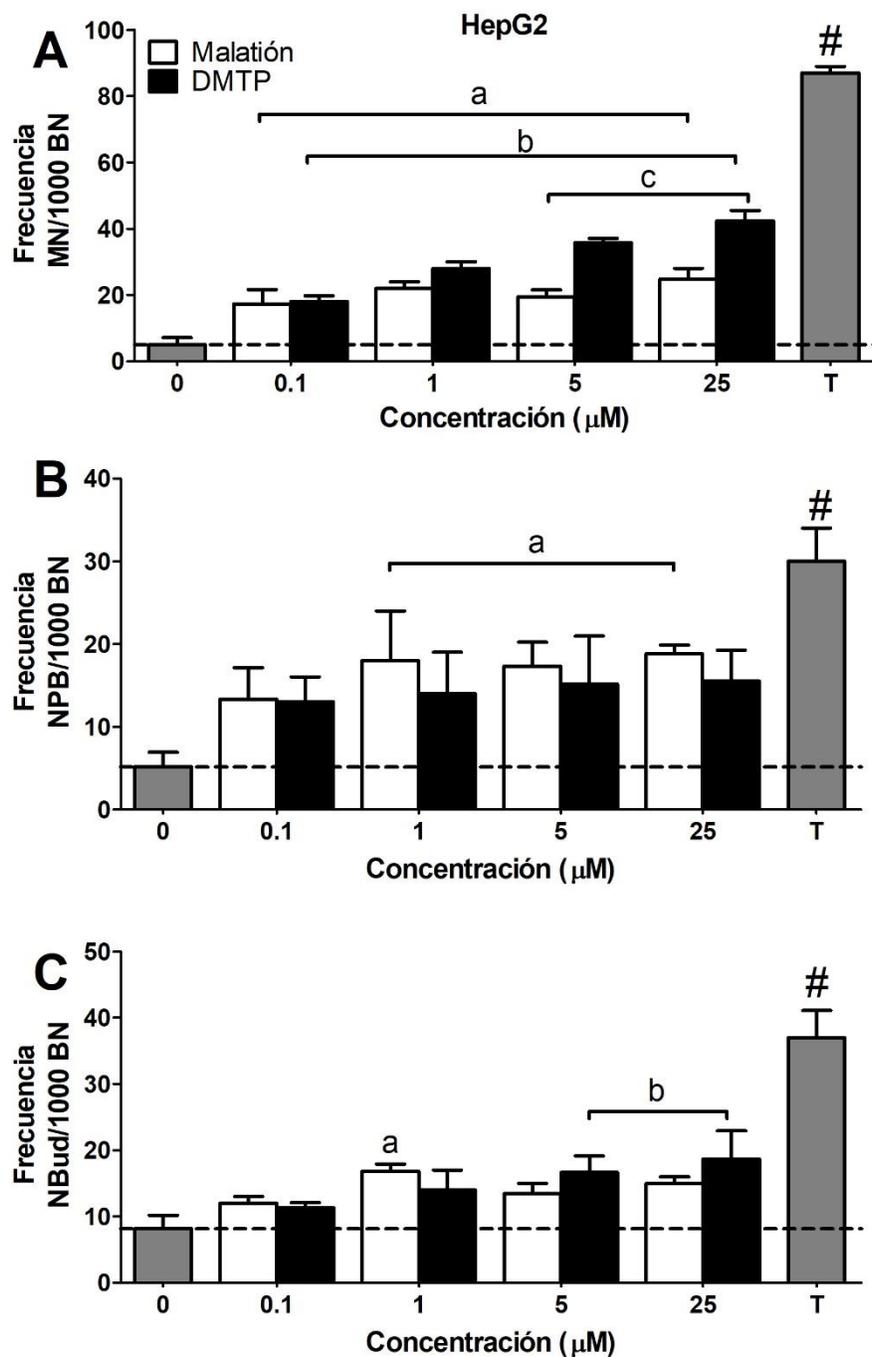


Figura 13. Frecuencia de formación de MN (A), NPB (B) y NBud (C) inducidos por el malatión, DMTP o Taxol (T, 0.01 μM) por 48 h en células hepáticas HepG2. Los datos representan la frecuencia en 1000 células binucleadas ± D.E. (n=3), ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni, <sup>a</sup>p<0.05 DMSO (0) vs. malatión, <sup>b</sup>p<0.05 DMSO (0) vs. DMTP, <sup>c</sup>p<0.05 malatión vs. DMTP; #p<0.05, prueba t-Student DMSO (0) vs. Taxol (T).

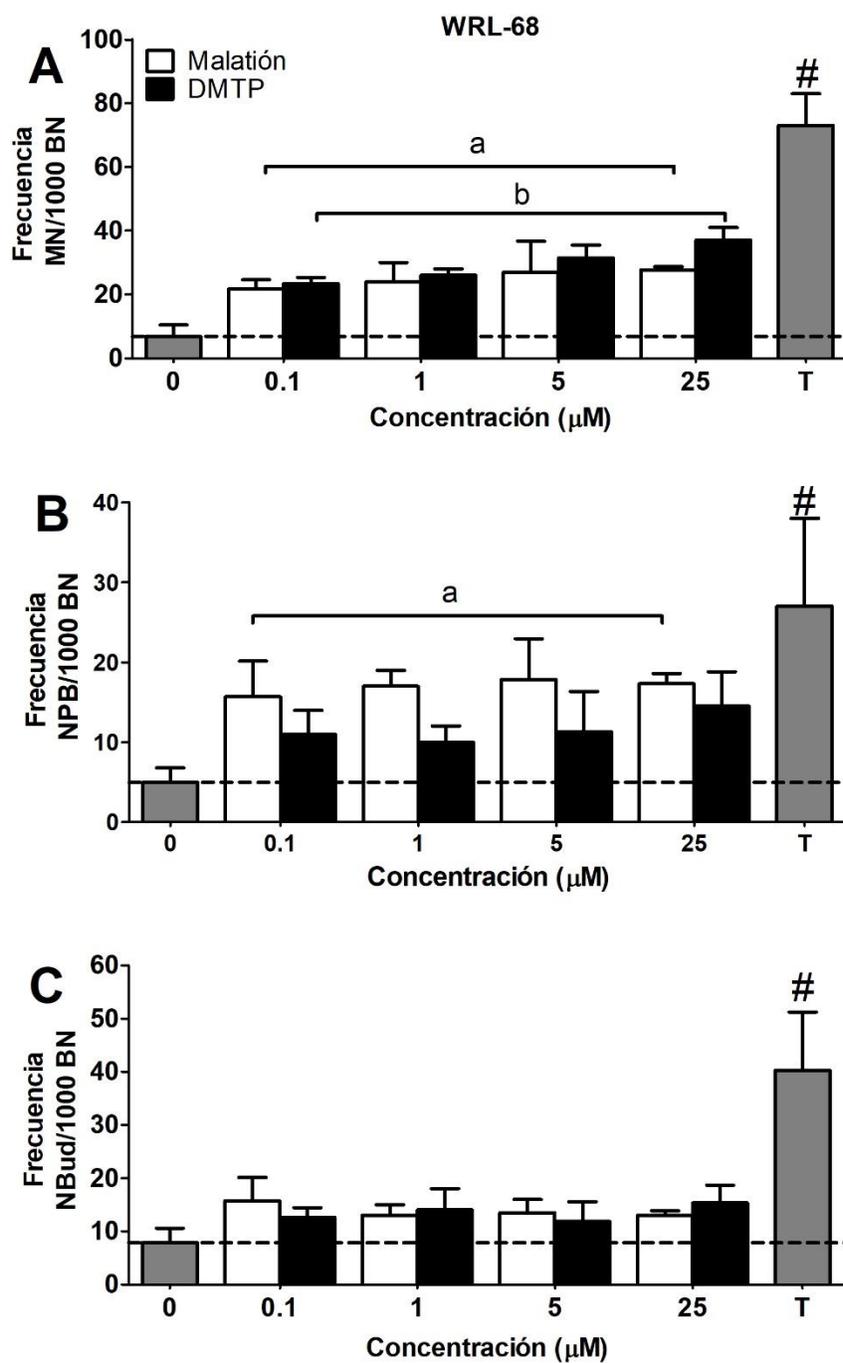


Figura 14. Frecuencia de formación de MN (A), NPB (B) y NBud (C) inducidos por el malatión, DMTP o Taxol (T, 0.01 μM) por 48 h en células hepáticas WRL-68. Los datos representan la frecuencia en 1000 células binucleadas ± D.E. (n=3), ANOVA de una vía post-hoc Bonferroni, <sup>a</sup>p<0.05 DMSO (0) vs. malatión, <sup>b</sup>p<0.05 DMSO (0) vs. DMTP, <sup>c</sup>p<0.05 malatión vs. DMTP; #p<0.05, prueba t-Student DMSO (0) vs. Taxol (T).

Tabla 6. Valor *p* de la comparación entre malatión y DMTP en los efectos genotóxicos.

	PBMCs+PHA	HepG2	WRL-68
MN	0.8471	<0.0001*	0.0385*
NPB	0.0003*	0.1728	0.0030*
NBud	0.0003*	0.3685	0.7926

\**p*<0.05, ANOVA de dos vías malatión vs. DMTP.

### 3.3.3 Posible mecanismo de producción de genotoxicidad

De acuerdo con lo reportado por Thomas y Fenech en 2003, se realizó el cálculo de la relación NPB/MN, para sugerir un posible modo de acción del malatión y del DMTP (Tabla 7). Este método sugiere que valores cercanos a 1 indicarían un mecanismo de acción genotóxica relacionado con daños clastogénicos, mientras que valores cercanos a 0 indicarían una mayor participación de daños por efectos aneuploidógenos. En el caso de las PBMCs estimuladas, los valores que se obtuvieron en los tratamientos con el malatión fueron cercanos a 1, sugiriendo que existe un efecto principalmente clastogénicos del malatión, mientras que los valores que se obtuvieron con el DMTP se encontraron entre 0.5 y 1, sugiriendo un componente tanto clastogénico como aneuploidogeno en su modo de acción genotóxica. Este índice ha sido utilizado únicamente en las PBMCs y líneas celulares linfoblásticas, sin embargo, decidimos calcular este índice para observar que ocurriría en las células hepáticas HepG2 y WRL-68. La relación NPB/MN con los tratamientos con malatión se encontró entre 0.5 y 1, indicando la participación de ambos componentes, tanto clastogénicos como aneuploidógenos, siendo predominante el primero, mientras que, con el tratamiento con el DMTP, los valores se encontraron entre 0 y 0.5, indicando un componente aneuploidógeno predominante en su genotoxicidad, de manera similar a las PBMCs.

Tabla 7. Número de células con MN y con NPB inducidas por el malatión y DMTP en PBMCs estimuladas, HepG2 y WRL-68 tratadas por 48 h.

Células	Compuesto	MN	NPB	NPB/MN
PBMCs + PHA	DMSO	6.3 ± 1.6	6.3 ± 2.3	1.00 ± 0.25
	Malatión (µM)			
	0.1	6.16 ± 0.8	7.3 ± 1.4	1.20 ± 0.09
	1	7.5 ± 0.9	9.2 ± 1.0	1.30 ± 0.09
	5	11.7 ± 0.6*	11.7 ± 1.5	1.00 ± 0.14
	25	12.3 ± 1.3*	14.7 ± 1.9*	1.20 ± 0.21
	DMTP (µM)			
	0.1	6.8 ± 0.6	7.2 ± 3.4	1.00 ± 0.56
	1	8.7 ± 1.3	6.0 ± 0.5	0.70 ± 0.09
	5	10.5 ± 0.5	7.8 ± 2.4	0.76 ± 0.27
	25	12 ± 1.8*	7.8 ± 1.3	0.67 ± 0.19
	Taxol 0.01 µM	28.5 ± 4.2*	16.8 ± 6.5*	0.58 ± 0.16
	HepG2	DMSO	5 ± 2.8	5.2 ± 1.7
Malatión (µM)				
0.1		17.3 ± 4.3*	13.3 ± 3.8	0.80 ± 0.21
1		22.2 ± 2.9*	18.5 ± 6.1*	0.88 ± 0.36
5		19.5 ± 2.0*	17.3 ± 2.8*	0.90 ± 0.15
25		24.8 ± 3.2*	18.8 ± 1.0*	0.76 ± 0.05
DMTP (µM)				
0.1		18.0 ± 1.8*	13.0 ± 3.0	0.72 ± 0.11
1		28.5 ± 2.8*	14.2 ± 5.3*	0.51 ± 0.23
5		35.8 ± 1.3*	15.2 ± 5.8*	0.42 ± 0.15
25		42.3 ± 3.2*	15.5 ± 3.8*	0.37 ± 0.11
Taxol 0.01 µM		87.3 ± 2.5*	30.7 ± 4.0*	0.35 ± 0.05*
WRL-68		DMSO	6.8 ± 3.6	5.0 ± 1.8
	Malatión (µM)			
	0.1	20.5 ± 4.4*	15.7 ± 4.5*	0.72 ± 0.29
	1	23.5 ± 7.2*	17.7 ± 2.3*	0.81 ± 0.12
	5	27.3 ± 9.7*	17.8 ± 5.1*	0.67 ± 0.16
	25	27.7 ± 1.0*	17.3 ± 1.3*	0.63 ± 0.02
	DMTP (µM)			
	0.1	23.3 ± 2.0*	11.0 ± 3.0	0.48 ± 0.17
	1	26.8 ± 2.3*	10.5 ± 2.3	0.39 ± 0.08*
	5	31.5 ± 4.0*	11.3 ± 5.0	0.36 ± 0.17*
	25	37.0 ± 4.0*	14.5 ± 4.3*	0.39 ± 0.12*
	Taxol 0.01 µM	73.3 ± 9.5*	29.0 ± 8.8*	0.36 ± 0.07*

\*p<0.05, ANOVA de una vía *pos hoc* Bonferroni tratamiento vs. DMSO. <sup>a</sup>MN, células con MN; <sup>b</sup>NPB, células con NPB.

### 3.4 Participación de los CYPs en la genotoxicidad del DMTP

Para conocer si la genotoxicidad del DMTP dependía de la actividad metabólica mediada por las enzimas del CYP450, como se sospecha por referencias previas (Vega *et al.*, 2009), las células hepáticas HepG2 y WRL-68 se trataron con DMTP (25  $\mu$ M) en co-tratamiento con nitrato de sulconazol (50  $\mu$ M) como inhibidor inespecífico de la actividad de los CYPs. La inhibición de los citocromos resultó en la disminución significativa de la frecuencia de formación de MN inducidos por el DMTP en las células HepG2 (Figura 15A). Por lo contrario, se observó una disminución en la frecuencia de NPB y NBud que no fue diferente a las inducidas por el control (Figura 15B y 15C).

De igual forma, en las células WRL-68, el DMTP en co-tratamiento con el sulconazol redujo la frecuencia de MN de manera significativa (Figura 16A); sin embargo, no se observaron diferencias en la frecuencia de NPB y NBud en el co-tratamiento respecto al tratamiento con el DMTP (Figuras 16B y 16C). Estos resultados sugieren la participación de enzimas del sistema de los CYP450 en la formación de MN en las células HepG2 y WRL-68.

Adicionalmente a los efectos en la genotoxicidad del DMTP, el sulconazol disminuyó la tasa de replicación de las células HepG2 y WRL-68 de manera significativa (Tabla 8), tanto en el tratamiento únicamente con sulconazol como en el co-tratamiento. Sin embargo, de acuerdo con Fenech y colaboradores (2000), el valor obtenido en el NDI refiere a que parte de las células completaron al menos un ciclo celular permitiendo evaluar los biomarcadores de daño genotóxico. Esto nos llevó a evaluar además el cociente NPB/MN para establecer si el sulconazol había afectado el modo de acción del DMTP. Los valores del cociente obtenido por exposición del DMTP y el sulconazol indican un componente clastogénico (0.77 y 0.99 en células HepG2 y WRL-68 respectivamente) en el daño al ADN en comparación con los valores del tratamiento únicamente con DMTP que indican un componente aneuploidógeno (0.37 y 0.39 en células HepG2 y WRL-68 respectivamente) (Tabla 9) sugiriendo un cambio en el modo de acción o bien la disminución en el componente aneuploidógeno atribuida al DMTP.

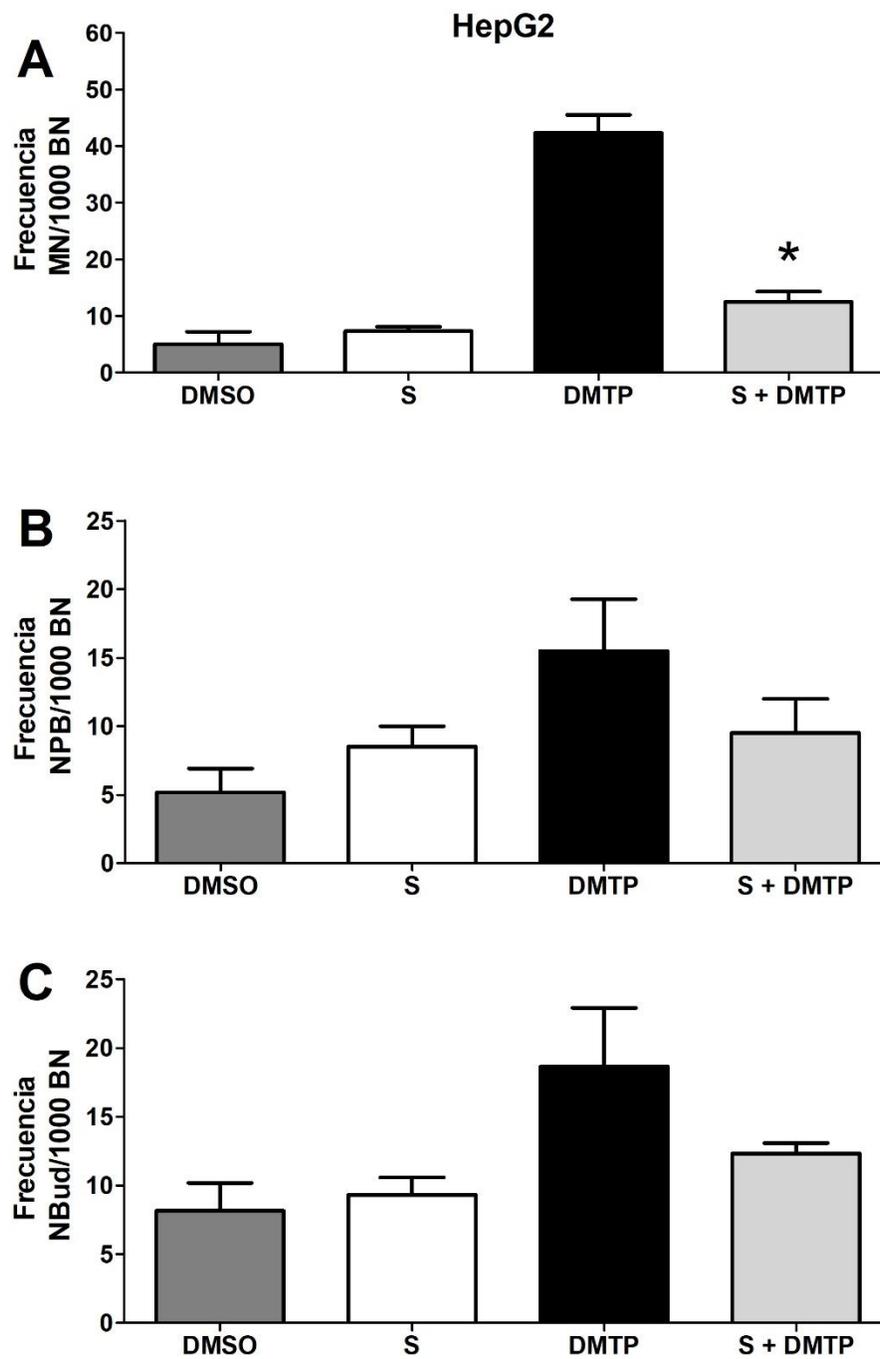


Figura 15. Efecto inhibitorio del sulconazol (S, 50  $\mu$ M) en la de formación de MN (A), NPB (B) y NBud (C) inducidos por el DMTP (25  $\mu$ M) en las células hepáticas HepG2 expuestas por 48 h. Los datos representan la frecuencia en 1000 células binucleadas  $\pm$  D.E. (n=3). \* $p$ <0.05, prueba t-Student DMTP (25  $\mu$ M) vs. sulconazol+DMTP (S+25  $\mu$ M).

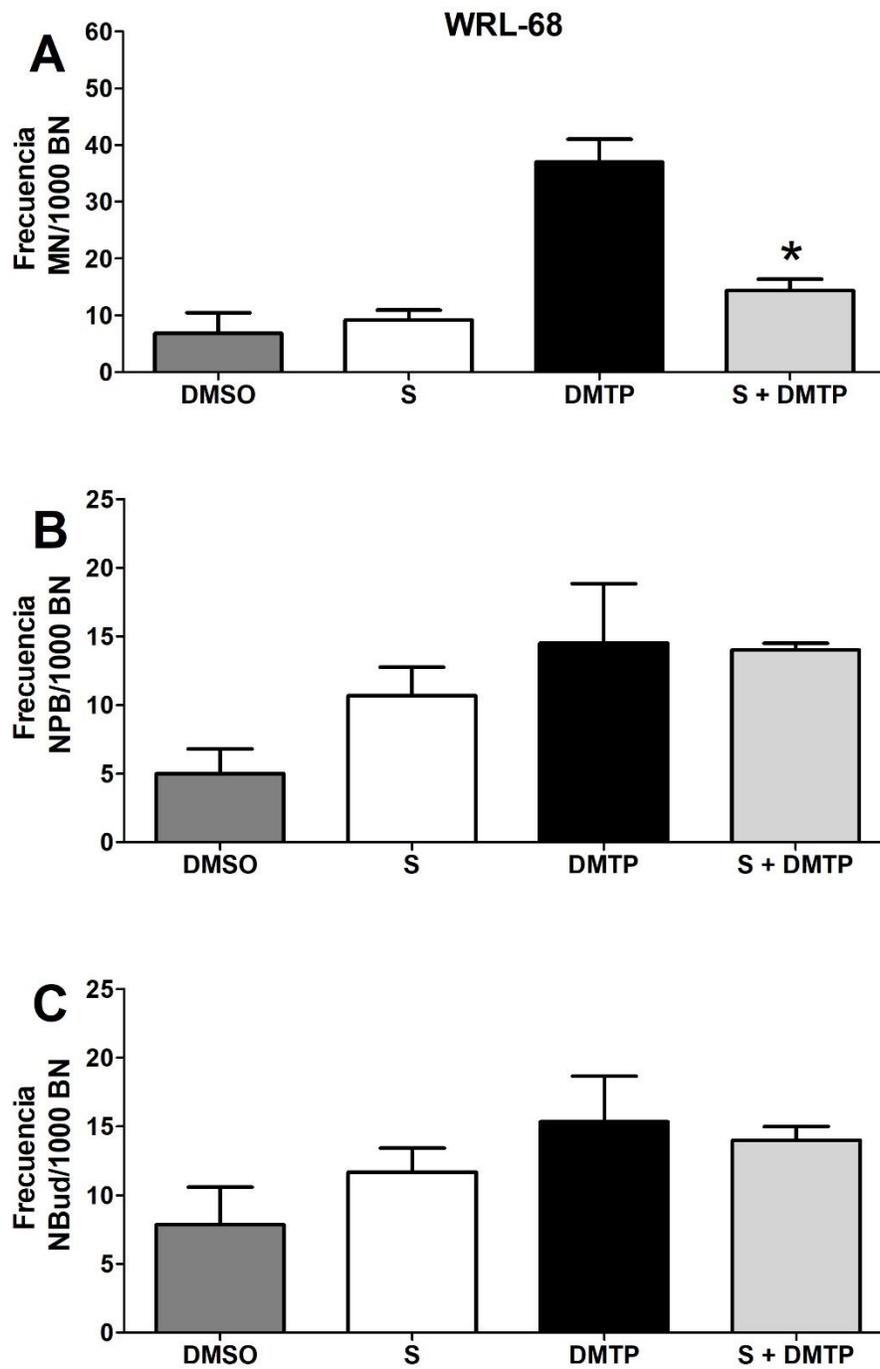


Figura 16. Efecto inhibitorio del sulconazol (S, 50  $\mu$ M) en la de formación de MN (A), NPB (B) y NBud (C) inducidos por el DMTP (25  $\mu$ M) en las células hepáticas WRL-68 expuestas por 48 h. Los datos representan la frecuencia en 1000 células binucleadas  $\pm$  D.E. (n=3) \* $p$ <0.05, prueba t-Student DMTP (25  $\mu$ M) vs. sulconazol+DMTP (S+25  $\mu$ M).

Tabla 8. Número de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas y el índice de duplicación nuclear (NDI) en células HepG2 y WRL-68 tratadas con sulconazol.

Células	Compuesto	No. Células Mononucleadas	No. Células Multinucleadas	NDI
HepG2	DMSO	61.3 ± 9.3	12.3 ± 2.3	1.97 ± 0.01
	Sulconazol 50 µM	429.5 ± 82.3	8.2 ± 3.4	1.60 ± 0.08*
	DMTP 25 µM	148.7 ± 93.8	17.3 ± 5.5	1.90 ± 0.09
	DMTP 25 µM + Sulconazol 50 µM	553.2 ± 31.3	9.0 ± 0	1.47 ± 0.02*
WRL-68	DMSO	51 ± 3.9	12.2 ± 4.9	1.99 ± 0.01
	Sulconazol 50 µM	435.2 ± 14.8	10.2 ± 3.2	1.59 ± 0.01*
	DMTP 25 µM	180.2 ± 29.9	14.8 ± 1.0	1.86 ± 0.02*
	DMTP 25 µM + Sulconazol 50 µM	370.2 ± 29.5	6.8 ± 2.4	1.65 ± 0.03*

\*p<0.05, ANOVA de una vía *post hoc* Bonferroni tratamientos vs. DMSO. <sup>a</sup>NDI, índice de duplicación nuclear.

Tabla 9. Número de células con MN y con NPB inducidas por DMTP con y sin sulconazol en células HepG2 y WRL-68 tratadas por 48 h.

Células	Compuesto	MN	NPB	NPB/MN
HepG2	DMSO	5 ± 2.8	5.2 ± 1.7	1.40 ± 0.24
	Sulconazol 50 µM	7.3 ± 0.8	8.5 ± 1.5	1.24 ± 0.33
	DMTP 25 µM	42.3 ± 3.2	15.5 ± 3.8	0.37 ± 0.11
	DMTP 25 µM + Sulconazol 50 µM	12.3 ± 2.2	9.5 ± 2.5	0.77 ± 0.09*
WRL-68	DMSO	6.8 ± 3.6	5.0 ± 1.8	0.76 ± 0.13
	Sulconazol 50 µM	9.2 ± 1.8	10.7 ± 2.0	1.22 ± 0.46
	DMTP 25 µM	37 ± 4.0	14.5 ± 4.3	0.39 ± 0.12
	DMTP 25 µM + Sulconazol 50 µM	14.2 ± 2.0	14.0 ± 0.5	0.99 ± 0.18*

\*p<0.05, t -Student DMTP vs. DMTP + Sulconazol. <sup>a</sup>MN, células con MN; <sup>b</sup>NPB, células con NPB.

#### 4. DISCUSIÓN

Los plaguicidas OP son compuestos sintéticos de amplia distribución a los que se asocian una gran cantidad de efectos tóxicos, entre los que destacan los efectos neurotóxicos y el desarrollo de enfermedades tales como cáncer. A la fecha, la mayoría de los estudios contempla únicamente a los compuestos padres y sus oxones como principales causantes de los efectos adversos, dejando de lado al resto de los metabolitos, los cuales se consideran como compuestos no reactivos, y por lo tanto no tóxicos.

Los pocos estudios que evalúan los efectos de los DAPs, considerados los metabolitos finales de la biotransformación de los plaguicidas OP, muestran que estos compuestos pueden llegar a tener efectos citotóxicos (Lima y Vega, 2005), inmunomoduladores (Esquivel-Sentíes *et al.*, 2010) y genotóxicos (Vega *et al.*, 2009).

En este estudio determinamos que el metabolito metilado DMTP es genotóxico, tanto en células no transformadas (PBMCs) como en células hepáticas transformadas (HepG2) y células hepáticas embrionarias (WRL-68), esto a través del aumento en la frecuencia de formación de MN (formación de fragmentos acéntricos de cromosomas y/o mal segregación cromosómica), de NPB (generación de cromosomas dicéntricos) y de NBud (amplificación del ADN). Algunos reportes indican que el DMTP es el metabolito más abundante del malatión (40-50%), una vez que entra en el organismo (Krieger y Dinoff, 2000), por lo que es posible que gran parte del daño al ADN inducido por la exposición al malatión se deba en gran medida al DMTP formado.

El modo de acción del malatión para producir daño al ADN no es claro aún, pero se sugiere que puede deberse al aumento de estrés oxidante, o bien a través de la formación de aductos (Bedford y Robinson, 1972; Imamura y Talcott, 1985; Lukaszewicz-Hussain, 2010; Ojha y Srivastava, 2014). De acuerdo con el índice NPB/MN calculado en este estudio, se sugiere que el daño asociado al malatión es principalmente de tipo clastogénico, lo cual concuerda con estudios que reportan la formación de MN sin cinetocoro en PBMCs tras la exposición al malatión, demostrando que en su mayoría correspondían a MN formados por fragmentos acéntricos de cromosomas (Titenko-Holland *et al.*, 1997). Esto sugiere a que el modo

de acción de los plaguicidas OP es por medio de la ruptura del ADN, debido al estrés oxidante o los aductos generados tras el metabolismo de los OPs (Cicchetti y Argentin, 2003; Cicchetti *et al.*, 1999) generando fragmentos acéntricos, cromosomas dicéntricos y amplificación del ADN en respuesta al daño, que se observan como un aumento en la frecuencia de MN, NPB y NBud, respectivamente.

Por otro lado, al evaluar el índice NPB/MN del DMTP observamos que el tipo de daño inducido es principalmente de tipo aneuploidógeno, indicando que este metabolito podría actuar de manera indirecta al alterar la función de algunas enzimas o proteínas de la maquinaria mitótica, generando MN por efectos aneuploidógenos y explicando por qué no se observan aumentos significativos en la inducción de marcadores de daño debido a efectos clastogénicos como los NPB y NBud tras la exposición al metabolito. Algunos reportes indican que los compuestos OP tienen la capacidad de unirse a proteínas como la tubulina, inhibiendo su polimerización para formar microtúbulos por medio de la fosforilación de residuos de tirosina (Jiang *et al.*, 2010). También se ha reportado la inhibición de la actividad de proteínas asociadas al movimiento de componentes intracelulares como la kinesina y la dineína (Terry & Jr, 2012); lo que produciría errores en la separación de los cromosomas durante la mitosis y generaría aneuploidías, como las descritas en células espermáticas de personas ocupacionalmente expuestas a plaguicidas OP (Padungtod *et al.*, 1999; Recio *et al.*, 2001).

La diferencia en el tipo del daño que cada compuesto produce podría explicarse por la presencia de los distintos metabolitos del malatión (maloxón, malatión mono- y Diácido, etc.) (Buratti *et al.*, 2007), los cuales podrían tener distintos blancos moleculares asociados a la generación de efectos clastogénicos como la producción de ROS, mientras que el DMTP y el resto de los DAPs que se forman inducirían efectos aneuploidógenos, que en conjunto corresponderían al daño total producido por la exposición al compuesto padre.

De la misma manera que como se demuestra con el DEDTP y DETP (Vega *et al.*, 2009), la genotoxicidad del DMTP se observa en mayor proporción en las células hepáticas, sugiriendo que este efecto de los DAPs es dependiente de las condiciones metabólicas de la célula. Aun cuando el metabolismo de los DAPs no se ha dilucidado,

se sugiere que estos pueden ser sustratos de enzimas del sistema de los CYPs, llevando a cabo reacciones tales como desulfuración oxidativa o desalquilación (Buratti *et al.*, 2005; Rydberg, 2012) para producir otro metabolito, probablemente otro DAP (Vega *et al.*, 2009), y a su vez intermediarios altamente reactivos capaces de interactuar con otras biomoléculas para producir un efecto genotóxico. Este metabolito secundario y/o intermediario podría formarse a través de CYPs implicados en el metabolismo de los compuestos OP, tales como el CYP3A4, CYP2D6, CYP1A2, etc. (Choi *et al.*, 2006; Sams *et al.*, 2000), siguiendo una ruta de biotransformación similar a la de los plaguicidas OP durante la desulfuración oxidativa (Rydberg, 2012) para generar un posible intermediario altamente reactivo, capaz de unirse a sus moléculas blanco.

De acuerdo con nuestros resultados, la inhibición de la actividad de los CYPs en las células hepáticas mediante el uso del sulconazol resulta en una disminución importante de la actividad genotóxica del DMTP, que a su vez se refleja en el índice NPB/MN y demuestra la participación de las enzimas del CYP en la generación de los efectos citotóxicos de los DAPs. Considerando que en las células hepáticas adultas el CYP más abundante es el CYP3A4 (Hakkola, *et al.*, 1998), esta enzima podría ser un potencial candidato responsable del metabolismo del DMTP. En el caso de las células WRL-68, estas poseen el CYP3A7 (Lacroix *et al.*, 1997), una forma embrionaria del CYP3A4, motivo por el cual las células podrían responder de manera similar que las HepG2. Mientras que, en las PBMCs, el CYP3A4 se encuentra en menor abundancia (Lee *et al.*, 2010), explicando porque se observó una respuesta diferente por la exposición a los compuestos OPs. Sin embargo, la respuesta que se observó con el tratamiento del malatión puede deberse a la participación de otros CYPs u otras enzimas, o bien a que el malatión pudiera tener mecanismos de acción diferentes que no dependieran de una activación por parte de enzimas del CYP450, como la fosforilación de proteínas.

Por otro lado, se pudo observar que la inhibición de los CYPs en las células HepG2 y WRL-68 no generó una disminución en la inducción de NPB o NBud, asociados a rearrreglos cromosómicos debido al rompimiento del ADN y amplificación del material genético por procesos de reparación (Thomas y Fenech, 2011), respectivamente, por lo

que es probable que exista otro mecanismo de genotoxicidad de los DAPs independiente de los CYP, capaz de generar daño sobre el ADN.

Basándonos en nuestros resultados podemos sugerir que el DMTP, y probablemente el otros DAPs, son compuestos con efectos tóxicos dependientes de su bioactivación en el organismo, por lo cual no deben ser considerados únicamente como biomarcadores de exposición a los plaguicidas OPs. Cabe mencionar que la formación de MN en células humanas se considera un biomarcador de daño importante, ya que su presencia está asociada con aberraciones cromosómicas y procesos de inestabilidad genética que se observan durante el desarrollo de distintos tipos de cáncer (Bonassi *et al.*, 2007). En la actualidad existen estudios que reportan una asociación entre la exposición a OPs con un aumento del riesgo a desarrollar cáncer de próstata, pulmón, leucemia, linfoma de no-Hodgkin, entre otros (Band *et al.*, 2011; Eriksson *et al.*, 2008; Lerro *et al.*, 2015; Mahajan *et al.*, 2006), sin embargo, estos estudios no contemplan la participación de sus metabolitos. Considerando que los DAPs tienen tiempos de vida media mayores en el organismo que los compuestos padres (Vasilić *et al.*, 1999), su presencia en todo tipo de poblaciones y que poseen efectos genotóxicos, sería de utilidad tener en cuenta la participación de estos los DAPs en las evaluaciones epidemiológicas, principalmente en los estudios en poblaciones ocupacionalmente expuestas que presentarían un mayor riesgo al desarrollo de cáncer.

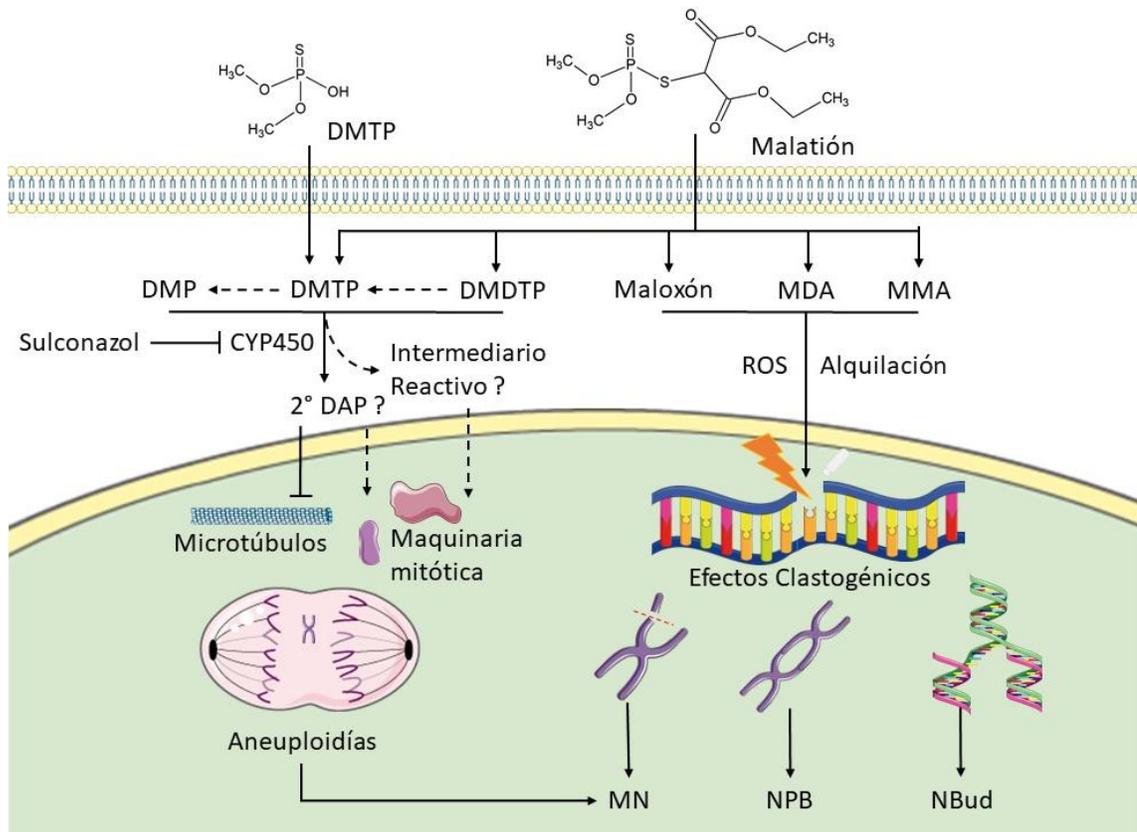


Figura 17. Efecto genotóxico del DMTP y el malatión sobre células humanas.

## 5. CONCLUSIONES

- El malatión y el DMTP a las concentraciones empleadas no producen efectos citotóxicos ni citostático en PBMCs ni en las células hepáticas HepG2 y WRL-68.
- La exposición a malatión y su metabolito DMTP causa efectos genotóxicos en leucocitos (PBMCs), y en mayor medida en las células hepáticas (HepG2 y WRL-68).
- El malatión causa efectos principalmente de tipo clastogénico, mientras que el DMTP tiene efectos aneuploidógenos, por lo que es probable que tengan distintos mecanismos y blancos moleculares.
- La genotoxicidad del DMTP se relaciona con la actividad metabólica de las células y la actividad de las enzimas del CYP450.
- Debido a sus tiempos de vida media en el organismo y su efecto genotóxico en células humanas, los DAPs pueden considerarse como compuestos potencialmente tóxicos y no únicamente como biomarcadores de exposición a los plaguicidas OP.

## 6. PERSPECTIVAS

- Elucidar los posibles blancos moleculares de los compuestos OP y DAPs para producir daño al ADN, mediante la identificación de aductos en el ADN o de unión a proteínas como la tubulina.
- Determinar los mecanismos de acción implicados en la generación de la genotoxicidad de los DAPs, identificando la presencia de fragmentos o cromosomas completos en los MN inducidos, así como la generación de ROS.
- Identificar el o los CYPs y otras enzimas como las esterasas implicadas en la genotoxicidad de los DAPs, mediante el uso de inhibidores específicos.
- Identificar la presencia de metabolitos secundarios o intermediarios reactivos por la exposición a DAPs, mediante el reconocimiento de moléculas marcadas en sistemas *in vitro*.
- Evaluar la participación de todos los metabolitos de los OP en la genotoxicidad asociada a la exposición a OP.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (s. f.).  
Some organophosphate insecticides and herbicides.

## 7. REFERENCIAS

- Adams, S., Carlsson, L., Boyer, S., y Glen, R. (2011). MetaPrint2D-React metabolic product predictor. Cambridge: University of Cambridge.
- Alatorre, R. del C., Gallága, J. C., Conde, P. del C., y Rosales, J. A. (2016). *Catálogo de plaguicidas COFEPRIS*. Mexico.
- Apra, C., Strambi, M., Novelli, M. T., Lunghini, L., y Bozzil, N. (2000). Biologic Monitoring of Exposure to Organophosphorus Pesticides in 195 Italian Children. *Environmental Health Perspectives*, 108, 521-525.
- Balding, P. R., Porro, C. S., McLean, K. J., Sutcliffe, M. J., Maréchal, J.-D., Munro, A. W., y Visser, S. P. (2008). How do Azoles Inhibit Cytochrome P450 Enzymes? A Density Functional Study. *The Journal of Physical Chemistry A*, 112, 12911-12918.
- Band, P., Abanto, Z., y Bert, J. (2011). Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia farmers. *Prostate*, 71, 168-183.
- Barr, D. B., Bravo, R., Weerasekera, G., Caltabiano, L. M., Whitehead, R. D., Olsson, A., Caudill, S., Shoher, S., Pirkle, J., Sampson, E., Jackson, R., y Needham, L. L. (2004). Concentrations of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in the U.S. population. *Environmental Health Perspectives*, 112, 186-200.
- Bates, N., y Campbell, A. (2008). Organophosphate Insecticides. *Handbook of Poisoning in Dogs and Cats*, 199-204.
- Bedford, C. T., y Robinson, J. (1972). The Alkylating Properties of Organophosphates. *Xenobiotica*, 2, 307-337.
- Bhaskar Gollapudi, B., Mendrala, A. L., y Ann Linscombe, V. (1995). Evaluation of the genetic toxicity of the organophosphate insecticide chlorpyrifos. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 342, 25-36.
- Blanco-Muñoz, J., Morales, M. M., Lacasaña, M., Aguilar-Garduño, C., Bassol, S., y Cebrián, M. E. (2010). Exposure to organophosphate pesticides and male hormone profile in floriculturist of the state of Morelos, Mexico. *Human Reproduction*, 25, 1787-1795.
- Blasiak, J., y Kowalik, J. (1999). Effect of paraoxon-methyl and parathion-methyl on DNA in human lymphocytes and protective action of vitamin C. *Pesticide Science*, 55, 1182-1186.
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 543, 251-272.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28, 625-631.
- Bouchard, M. F., Bellinger, D. C., Wright, R. O., y Weisskopf, M. G. (2010). Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Urinary Metabolites of Organophosphate Pesticides. *Pediatrics*, 125, e1270-e1277.
- Bouvier, G., Blanchard, O., Momas, I., y Seta, N. (2006). Environmental and biological monitoring of exposure to organophosphorus pesticides: Application to

- occupationally and non-occupationally exposed adult populations. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 16, 417-426.
- Bradman, A., Barr, D. B., Claus Henn, B. G., Drumheller, T., Curry, C., y Eskenazi, B. (2003). Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environmental health perspectives*, 111, 1779-82.
- Brown, L. M., Blair, A., Cantor, K. P., Gibson, R., Schuman, L. M., Everett, G. D., Cantor, K. P., Schuman, L. M., Burmeister, L. F., Van Lier, S. y Dick, F. (1990). Pesticide Exposures and Other Agricultural Risk Factors for Leukemia among Men in Iowa and Minnesota. *Cancer Research*, 50, 6585-6591.
- Buratti, F. M., D'Aniello, A., Volpe, M. T., Meneguz, A., y Testai, E. (2005). Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome P450 isoforms. *Drug Metabolism and Disposition*, 33, 295-302.
- Buratti, F. M., Leoni, C., y Testai, E. (2007). The Human Metabolism of Organophosphorothionate Pesticides: Consequences for Toxicological Risk Assessment F. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2, 37-44.
- Cantor, K. P., Blair, A., Everett, G., Gibson, R., Burmeister, L. F., Brown, L. M., Schuman, L. y Dick, F. R. (1992). Pesticides and other Agricultural Risk-Factors for Non-Hodgkins-Lymphoma among Men in Iowa and Minnesota. *Cancer Research*, 52, 2447-2455.
- Chambers, H. W., Meek, E. C., y Chambers, J. E. (2010). Chapter 64 – Chemistry of Organophosphorus Insecticides. En *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1395-1398).
- Choi, K., Joo, H., Rose, R. L., y Hodgso, E. (2006). Metabolism of chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon by human hepatocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 20, 279-291.
- Cicchetti, R., y Argentin, G. (2003). The role of oxidative stress in the in vitro induction of micronuclei by pesticides in mouse lung fibroblasts. *Mutagenesis*, 18, 127-132.
- Cicchetti, R., Bari, M., y Argentin, G. (1999). Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with CREST staining: an in vivo study in mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 439, 239-248.
- Cocker, J., Mason, H. J., Garfitt, S. J., y Jones, K. (2002a). Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicology Letters*, 134, 97-103.
- Cocker, J., Mason, H. J., Garfitt, S. J., y Jones, K. (2002b). Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicology Letters*, 134, 97-103.
- De Roos, A. J. (2003). Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occupational and Environmental Medicine*, 60, 11e-11.
- Drevenkar, V., Vasilić, Ž., Štengl, B., Fröbe, Z., y Rumenjak, V. (1993). Chlorpyrifos metabolites in serum and urine of poisoned persons. *Chemico-Biological Interactions*, 87, 315-322.
- Duggan, A., Charnley, G., Chen, W., Chukwudebe, A., Hawk, R., Krieger, R., Ross, J., Yarborough, C. (2003). Di-alkyl phosphate biomonitoring data: Assessing cumulative exposure to organophosphate pesticides. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 382-395.

- Dulaurent, S., Saint-Marcoux, F., Marquet, P., y Lachâtre, G. (2006). Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 831, 223-229.
- ECACC. (2013a). ECACC General Cell Collection: HepG2. Recuperado 16 de junio de 2017, a partir de [http://www.phenaculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85011430&collection=ecacc\\_gc](http://www.phenaculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85011430&collection=ecacc_gc)
- ECACC. (2013b). ECACC General Cell Collection: WRL 68 (HeLa derivative). Recuperado 16 de junio de 2017, a partir de [http://www.phenaculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=89121403&collection=ecacc\\_gc](http://www.phenaculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=89121403&collection=ecacc_gc)
- Eleršek, T., y Filipi, M. (2011). Organophosphorus Pesticides - Mechanisms of their Toxicity. *Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure*, 243-260.
- Eriksson, M., Hardell, L., Carlberg, M., y Akerman, M. (2008). Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. *International Journal of Cancer*, 123, 1657-1663.
- Esquivel-Senties, M.S., Barrera, I., Ortega, A., Vega, L. (2010). Organophosphorous pesticide metabolite (DEDTP) induces changes in the activation status of human lymphocytes by modulating the interleukin 2 receptor signal transduction pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 248 122–133..
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455, 81-95.
- Fenske, R. A., y Leffingwel, J. T. (1989). Method for the Determination of Dialkyl Phosphate Metabolites in Urine for Studies of Human Exposure to Malathion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 995-998.
- García, A. M., Sabater, M. C., Mendoza, M. T., Ballester, F., y Carrasco, J. M. (2000). Exposure to Organophosphate Pesticides in a General Population Living in a Rice Growing Area: An Exploratory Study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65, 764-771.
- Gómez-Martín, A., Altakroni, B., Lozano-Paniagua, D., Margison, G. P., de Vocht, F., Povey, A. C., y Hernández, A. F. (2015). Increased N7-methyldeoxyguanosine DNA adducts after occupational exposure to pesticides and influence of genetic polymorphisms of paraoxonase-1 and glutathione S-transferase M1 and T1. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56, 437-445.
- Griffith, J. G., y Duncan, R. C. (1985). Alkyl Phosphate Residue Values in the Urine of Florida Citrus Fieldworkers Compared to the National Health and Nutrition Examination Survey (HANES) Sample. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 210-215.
- Hakkola, J., Tanaka, E., y Pelkonen, O. (1998). Developmental expression of cytochrome P450 enzymes in human liver. *Pharmacology y toxicology*, 82, 209-17.
- Harley, K. G., Huen, K., Schall, R. A., Holland, N. T., Bradman, A., Barr, D. B., y Eskenazi, B. (2011). Association of organophosphate pesticide exposure and paraoxonase with birth outcome in mexican-american women. *PLoS ONE*, 6. doi:10.1371/journal.pone.0023923
- Heudorf, U., y Angerer, J. (2001). Metabolites of Organophosphorous Insecticides in Urine Specimens from Inhabitants of a Residential Area. *Environmental*

- Research*, 86, 80-87.
- Hreljac, I., Zajc, I., Lah, T., y Filipi, M. (2008). Effects of model organophosphorus pesticides on DNA Damage and Proliferation of HepG2 Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49, 360-367.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2017). Some organophosphate insecticides and herbicides. Lyon: IARC.
- Imamura, T., y Talcott, R. E. (1985). Mutagenic and alkylating activities of organophosphate impurities of commercial malathion. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 155, 1-6.
- Jiang, W., Duysen, E. G., Hansen, H., Shlyakhtenko, L., Schopfer, L. M., y Lockridge, O. (2010). Mice treated with chlorpyrifos or chlorpyrifos oxon have organophosphorylated tubulin in the brain and disrupted microtubule structures, suggesting a role for tubulin in neurotoxicity associated with exposure to organophosphorus agents. *Toxicological Sciences*, 115, 183-93.
- Jokanovi, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166, 139-160.
- Kamanyire, R., y Karalliedde, L. (2004). Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occupational Medicine*, 54, 69-75.
- Kapka-Skrzypczak, L., Cyranka, M., Skrzypczak, M., y Kruszewski, M. (2011). Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure-state of the art. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 18, 294.
- Kato, I., Watanabe-Meserve, H., Koenig, K. L., Baptiste, M. S., Lillquist, P. P., Frizzera, G., Burke, J. S., Moseson, M. y Shore, R. E. (2004). Pesticide product use and risk of non-Hodgkin lymphoma in women. *Environmental Health Perspectives*, 112, 1275-1281.
- Kavvalakis, M. P., y Tsatsakis, A. M. (2012). The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure. *Forensic Science International*, 218, 111-122.
- Končarević, S., Lößner, C., Kuhn, K., Prinz, T., Pike, I., y Zucht, H.-D. (2014). In-Depth Profiling of the Peripheral Blood Mononuclear Cells Proteome for Clinical Blood Proteomics. *International Journal of Proteomics*, 2014, 1-9.
- Koutros, S., Beane Freeman, L. E., Lubin, J. H., Heltshe, S. L., Andreotti, G., Barry, K. H., DellaValle, C., Hoppin, J. A., Sandler, D. P., Lynch, C. F., Blair, A. y Alavanja, M. C. R. (2013). Risk of Total and Aggressive Prostate Cancer and Pesticide Use in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 177, 59-74.
- Krieger, R. I., y Dinoff, T. M. (2000). Malathion deposition, metabolite clearance, and cholinesterase status of date dusters and harvesters in California. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38, 546-53.
- Kwong, T. C. (2002). Organophosphate Pesticides: Biochemistry and Clinical Toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24, 144-149.
- Lacroix, D., Sonnier, M., Moncion, A., Cheron, G., y Cresteil, T. (1997). Expression of CYP3A in the human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *European Journal of Biochemistry*, 247, 625-34.
- Larripa, I., Matos, E., Vinuesa, L., & Salum, B. (1983). Sister chromatid exchanges in a human population accidentally exposed to an organo phosphorus pesticide.

- Revista Brasileira de Genetica*, 6, 719-728.
- Lee, C.Y., Lai, T. Y., Wu, Y. M., Hu, R. H., Lee, P. H., Hsu, L. C., y Tsai, M. K. (2010). Gene Expression of P-glycoprotein and Cytochrome P450 3A4 in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Correlation With Expression in Liver. *Transplantation Proceedings*, 42, 834-836.
- Lerro, C. C., Koutros, S., Andreotti, G., Friesen, M. C., Alavanja, M. C., Blair, A., Hoppin, J. A., Sandler, D. P., Lubin, J. H., Ma, X., Zhang, Y., y Beane Freeman, L. E. (2015). Organophosphate insecticide use and cancer incidence among spouses of pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Occupational and Environmental Medicine*, 72, 736-744.
- Lima, A., y Vega, L. (2005). Methyl-parathion and organophosphorous pesticide metabolites modify the activation status and interleukin-2 secretion of human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Letters*, 158, 30-38.
- Lu, C., Fenske, R. A., Simcox, N. J., y Kalman, D. (2000). Pesticide Exposure of Children in an Agricultural Community: Evidence of Household Proximity to Farmland and Take Home Exposure Pathways. *Environmental Research*, 84, 290-302.
- Lukaszewicz-Hussain, A. (2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98, 145-150.
- Mahajan, R., Bonner, M. R., Hoppin, J. A., & Alavanja, M. C. R. (2006). Phorate exposure and incidence of cancer in the agricultural health study. *Environmental Health Perspectives*, 114, 1205-9.
- Margariti, M. G., & Tsatsakis, A. M. (2009). Analysis of dialkyl phosphate metabolites in hair using gas chromatography-mass spectrometry: A biomarker of chronic exposure to organophosphate pesticides. *Biomarkers*, 14, 137-147.
- Maroni, M., Colosio, C., Ferioli, A., & Fait, A. (2000). Biological monitoring of pesticide exposure: A review. *Toxicology*, 143, 5-118.
- McCauley, L. A., Lasarev, M. R., Higgins, G., Rothlein, J., Muniz, J., Ebbert, C., & Phillips, J. (2001). Work characteristics and pesticide exposures among migrant agricultural families: A community-based research approach. *Environmental Health Perspectives*, 109, 533-538.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Muniz, J. F., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev, M., Koshy, M., Kow, Y. W., Nazar-Stewart, V., y Kisby, G. E. (2008). Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilot study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 227, 97-107.
- Muranli, F. D. G., Kanev, M., y Ozdemir, K. (2015). Genotoxic effects of diazinon on human peripheral blood lymphocytes. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66, 153-158.
- Ojha, A., y Srivastava, N. (2014). In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 761, 10-17.
- Padungtod, C., Hassold, T. J., Millie, E., Ryan, L. M., Savitz, D. A., Christiani, D. C., y Xu, X. (1999). Sperm aneuploidy among Chinese pesticide factory workers: scoring by the FISH method. *American journal of industrial medicine*, 36, 230-8.

- Ptashne, K., Wolcott, R., y Neal, R. (1971). Oxygen-18 studies on the chemical mechanism of the mixed function oxidase catalyzed desulfuration and dearylation reactions of parathion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 179, 380-385.
- Purdue, M. P., Hoppin, J. A., Blair, A., Dosemeci, M., y Alavanja, M. C. R. (2006). Occupational exposure to organochlorine insecticides and cancer incidence in the Agricultural Health Study. *International Journal of Cancer*, 649, 642-649.
- Quintanilla-Vega, B., Pérez-Herrera, N., & Rojas-García, E. (2010). Epidemiological studies of anticholinesterase pesticide poisoning in Mexico. En T. Satoh y R. Gupta, *Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity and Epidemiology* (pp. 471-480). John Wiley and Sons.
- Recio, R., Robbins, W. A., Borja-Aburto, V., Morán-Martínez, J., Froines, J. R., Hernández, R. M., y Cebrián, M. E. (2001). Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. *Environmental health perspectives*, 109, 1237-40.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., y Minor, L. (2004). *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Romero-Martínez, J., & Vega, L. (2015). *Evaluación de los efectos genotóxicos del dimetilfosfato (DMP) y del dimetilditiofosfato (DMDTP) in vitro*. Tesis de licenciatura. Instituto Politécnico Nacional.
- Rupa, D. S., Rita, P., Reddy, P. P., y Reddi, O. S. (1988). Screening of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of vegetable garden workers. *Human toxicology*, 7, 333-6.
- Rydberg, P. (2012). Theoretical study of the cytochrome P450 mediated metabolism of phosphorodithioate pesticides. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8, 2706-2712.
- Rydberg, P., Gloriam, D. E., Zaretski, J., Breneman, C., y Olsen, L. (2010). SMARTCyp: A 2D Method for Prediction of Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1, 96-100.
- Sams, C., Mason, H. J., y Rawbone, R. (2000). Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxicology Letters*, 116, 217-221.
- Sánchez-Peña, L. C., Reyes, B. E., López-Carrillo, L., Recio, R., Morán-Martínez, J., Cebrián, M. E., y Quintanilla-Vega, B. (2004). Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, 108-113.
- Sogorb, M. A., y Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128, 215-228.
- Soldin, O. P., Nsouly-Maktabi, H., Genkinger, J. M., Loffredo, C. A., Ortega-Garcia, J. A., Colantino, D., Barr, D. B., Luban, N. L., Shad, A. T., y Nelson, D. (2009). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia and Exposure to Pesticides. *Therapeutic Drug Monitoring*, 31, 495-501.
- Soltaninejad, K., y Abdollahi, M. (2009). Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*,

- 15, RA75-A90.
- Terry, A. V., y Jr. (2012). Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics*, 134, 355-65.
- ThermoFisher Scientific. (2017). Subculturing Adherent Cells. Recuperado 20 de junio de 2017, a partir de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/subculturing-adherent-cells.html>
- Thomas, P., y Fenech, M. (2011). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. *Methods in Molecular Biology*, 682, 217-234.
- Timchalk, C. (2010). Chapter 66 – Organophosphorus Insecticide Pharmacokinetics. En *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1409-1433).
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A. M., y Smith, M. T. (1997). Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 388, 85-95.
- Tsatsakis, A. M., Barbounis, M. G., Kavalakis, M., Kokkinakis, M., Terzi, I., y Tzatzarakis, M. N. (2010). Determination of dialkyl phosphates in human hair for the biomonitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Journal of Chromatography B*, 878, 1246-1252.
- Tsatsakis, A. M., Tzatzarakis, M. N., Koutroulakis, D., Toutoudaki, M., y Sifakis, S. (2009). Dialkyl phosphates in meconium as a biomarker of prenatal exposure to organophosphate pesticides: A study on pregnant women of rural areas in Crete, Greece. *Xenobiotica*, 39, 364-373.
- Ueyama, J., Saito, I., Kamijima, M., Nakajima, T., Gotoh, M., Suzuki, T., Shibata, E., Kondo, T., Miyamoto, K., Takamatsu, J., Hasegawa, T., y Takagi, K. (2006). Simultaneous determination of urinary dialkylphosphate metabolites of organophosphorus pesticides using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 832, 58-66.
- Vale, J. A. (1998). Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 102-103, 649-652.
- Vasilić, Ž., Drevenkar, V., Rumenjak, V., Štengl, B., y Fröbe, Z. (1992). Urinary excretion of diethylphosphorus metabolites in persons poisoned by quinalphos or chlorpyrifos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22, 351-357.
- Vasilić, Ž., Štengl, B., y Drevenkar, V. (1999). Dimethylphosphorus metabolites in serum and urine of persons poisoned by malathion or thiometon. *Chemico-Biological Interactions*, 119-120, 479-487.
- Vega, L., Valverde, M., Elizondo, G., Leyva, J. F., y Rojas, E. (2009). Diethylthiophosphate and diethyldithiophosphate induce genotoxicity in hepatic cell lines when activated by further biotransformation via Cytochrome P450. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 679, 39-43.
- Waddell, B. L., Zahm, S. H., Baris, D., Weisenburger, D. D., Holmes, F., Burmeister, L. F., Cantor, K. P., y Blair, A. (2001). Agricultural use of organophosphate pesticides and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among male farmers (United States). *Cancer Causes and Control*, 12, 509-517.

- Whyatt, R. M., & Barr, D. B. (2001). Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environmental Health Perspectives*, *109*, 417-20.
- Ye, M., Beach, J., Martin, J. W., y Senthilselvan, A. (2016). Urinary dialkyl phosphate concentrations and lung function parameters in adolescents and adults: Results from the canadian health measures survey. *Environmental Health Perspectives*, *124*, 491-497.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Hoja de seguridad del malatión

# SIGMA-ALDRICH

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

## FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

Versión 5.3  
Fecha de revisión 12/29/2015  
Fecha de impresión 08/09/2017

### 1. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO Y DE LA COMPAÑÍA

#### 1.1 Identificadores del producto

Nombre del producto : Malation

Referencia : 36143  
Marca : Sigma-Aldrich  
No. Índice : 015-041-00-X

No. CAS : 121-75-5

#### 1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos identificados : Reactivos para laboratorio, Síntesis de sustancias

#### 1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Compañía : Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V.  
Parque Industrial Toluca 2000  
Calle 6 Norte No. 107  
50200 TOLUCA  
MEXICO

Teléfono : +52 (0)1-800-007-5300  
Fax : +52 (0)1-800-712-9920

#### 1.4 Teléfono de emergencia

Teléfono de Urgencia :

### 2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

#### 2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

##### Clasificación SGA de acuerdo con 29 CFR 1910 (OSHA HCS).

Toxicidad aguda, Oral (Categoría 4), H302  
Sensibilización cutánea (Categoría 1), H317  
Carcinogenicidad (Categoría 1B), H350  
Toxicidad acuática aguda (Categoría 1), H400  
Toxicidad acuática crónica (Categoría 1), H410

Para el texto íntegro de las Declaraciones-H mencionadas en esta sección, véase la Sección 16.

#### 2.2 Elementos de las etiquetas del SGA, incluidos los consejos de prudencia

Pictograma



Palabra de advertencia Peligro

Indicación(es) de peligro

H302 Nocivo en caso de ingestión.  
H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.  
H350 Puede provocar cáncer.  
H410 Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Declaración(es) de prudencia

P201 Pedir instrucciones especiales antes del uso.

P202	No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.
P261	Evitar respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.
P264	Lavarse la piel concienzudamente tras la manipulación.
P270	No comer, beber ni fumar durante su utilización.
P272	Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.
P273	Evitar su liberación al medio ambiente.
P280	Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.
P301 + P312 + P330	EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico si se encuentra mal. Enjuagarse la boca.
P302 + P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
P308 + P313	EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.
P333 + P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P363	Lavar las prendas contaminadas antes de volver a usarlas.
P391	Recoger el vertido.
P405	Guardar bajo llave.
P501	Eliminar el contenido/ el recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

**2.3 Peligros no clasificados de otra manera - ninguno(a)**

**3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES**

**3.1 Sustancias**

Formula	: C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>
Peso molecular	: 330,36 g/mol
No. CAS	: 121-75-5
No. CE	: 204-497-7
No. Índice	: 015-041-00-X

**Componentes peligrosos**

Componente	Clasificación	Concentración
<b>Malathion</b>	Acute Tox. 4; Skin Sens. 1; Carc. 1B; Aquatic Acute 1; Aquatic Chronic 1; H302, H317, H350, H410	<= 100 %

Para el texto integro de las Declaraciones-H mencionadas en esta sección, véase la Sección 16.

**4. PRIMEROS AUXILIOS**

**4.1 Descripción de los primeros auxilios**

**Recomendaciones generales**

Consultar a un médico. Mostrar esta ficha de seguridad al doctor que esté de servicio. Retire a la persona de la zona peligrosa.

**Si es inhalado**

Si aspiró, mueva la persona al aire fresco. Si ha parado de respirar, hacer la respiración artificial. Consultar a un médico.

**En caso de contacto con la piel**

Eliminar lavando con jabón y mucha agua. Consultar a un médico.

**En caso de contacto con los ojos**

Lavarse abundantemente los ojos con agua como medida de precaución.

**Si es tragado**

Nunca debe administrarse nada por la boca a una persona inconsciente. Enjuague la boca con agua. Consultar a un médico.

#### 4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

Los síntomas y efectos más importantes conocidos se describen en la etiqueta (ver sección 2.2) y / o en la sección 11

#### 4.3 Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente

Sin datos disponibles

---

### 5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

#### 5.1 Medios de extinción

##### Medios de extinción apropiados

Usar agua pulverizada, espuma resistente al alcohol, polvo seco o dióxido de carbono.

#### 5.2 Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla

Óxidos de carbono, Óxidos de azufre, Óxidos de fósforo

#### 5.3 Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios

Si es necesario, usar equipo de respiración autónomo para la lucha contra el fuego.

#### 5.4 Otros datos

Sin datos disponibles

---

### 6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

#### 6.1 Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia

Utilícese equipo de protección individual. Evitar respirar los vapores, la neblina o el gas. Asegúrese una ventilación apropiada.

Equipo de protección individual, ver sección 8.

#### 6.2 Precauciones relativas al medio ambiente

Impedir nuevos escapes o derrames si puede hacerse sin riesgos. No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado. La descarga en el ambiente debe ser evitada.

#### 6.3 Métodos y material de contención y de limpieza

Empapar con material absorbente inerte y eliminar como un desecho especial. Guardar en contenedores apropiados y cerrados para su eliminación.

#### 6.4 Referencia a otras secciones

Para eliminación de desechos ver sección 13.

---

### 7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

#### 7.1 Precauciones para una manipulación segura

Evítese el contacto con los ojos y la piel. Evitar la inhalación de vapor o neblina.

Ver precauciones en la sección 2.2

#### 7.2 Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades

Conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Los contenedores que se abren deben volverse a cerrar cuidadosamente y mantener en posición vertical para evitar pérdidas.

Temperatura de almacenaje recomendada 2 - 8 °C

#### 7.3 Usos específicos finales

Aparte de los usos mencionados en la sección 1.2 no se estipulan otros usos específicos

---

### 8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN/ PROTECCIÓN INDIVIDUAL

#### 8.1 Parámetros de control

##### Componentes con valores límite ambientales de exposición profesional.

Componente	No. CAS	Valor	Parámetros de control	Base
Malathion	121-75-5	TWA	10.000000 mg/m3	Límites de exposición recomendados de NIOSH, EE.UU.
	Observaciones	Potencial para la absorción cutánea		

		TWA	15.000000 mg/m3	Límites de Exposición Ocupacional (OSHA), EE.UU - Tabla Z-1 Límites para los contaminantes del aire
		Designación de la piel		
		TWA	15.000000 mg/m3	Límites de Exposición Ocupacional (OSHA), EE.UU - Tabla Z-1 Límites para los contaminantes del aire
		Designación de la piel Substancia catalogada; para más información véase el documento OSHA 1910.1009		
		TWA	1.000000 mg/m3	Valores límite (TLV) de la ACGIH, USA
		Inhibición de la colinesterasa Las sustancias para las que existe un Índice de Exposición Biológica o Índices (véase la sección BEI ®), consulte BEI ® para el plaguicida inhibidor de acetilcolinesterasa No clasificados como cancerígenos en humanos Riesgo de absorción cutánea		

## 8.2 Controles de la exposición

### Controles técnicos apropiados

Manipular con las precauciones de higiene industrial adecuadas, y respetar las prácticas de seguridad. Lávense las manos antes de los descansos y después de terminar la jornada laboral.

### Protección personal

#### Protección de los ojos/ la cara

Caretas de protección y gafas de seguridad. Use equipo de protección para los ojos probado y aprobado según las normas gubernamentales correspondientes, tales como NIOSH (EE.UU.) o EN 166 (UE).

#### Protección de la piel

Manipular con guantes. Los guantes deben ser inspeccionados antes de su uso. Utilice la técnica correcta de quitarse los guantes (sin tocar la superficie exterior del guante) para evitar el contacto de la piel con este producto. Deseche los guantes contaminados después de su uso, de conformidad con las leyes aplicables y buenas prácticas de laboratorio. Lavar y secar las manos.

#### Protección Corporal

Traje de protección completo contra productos químicos, El tipo de equipamiento de protección debe ser elegido según la concentración y la cantidad de sustancia peligrosa al lugar específico de trabajo.

#### Protección respiratoria

Donde el asesoramiento de riesgo muestre que los respiradores purificadores de aire son apropiados, usar un respirador que cubra toda la cara con combinación multi-proposito (EEUU) o tipo ABEK (EN 14387) respiradores de cartucho de respuesto para controles de ingeniería. Si el respirador es la única protección, usar un respirador suministrado que cubra toda la cara Usar respiradores y componentes testados y aprobados bajo los estándares gubernamentales apropiados como NIOSH (EEUU) o CEN (UE)

#### Control de exposición ambiental

Impedir nuevos escapes o derrames si puede hacerse sin riesgos. No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado. La descarga en el ambiente debe ser evitada.

## 9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

### 9.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

- |  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| a) Aspecto                               | Forma: líquido<br>Color: incoloro |
| b) Olor                                  | Sin datos disponibles             |
| c) Umbral olfativo                       | Sin datos disponibles             |
| d) pH                                    | Sin datos disponibles             |
| e) Punto de fusión/ punto de congelación | Sin datos disponibles             |

f)	Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición	156 - 157 °C (313 - 315 °F) a 1.00 hPa (0.75 mmHg)
g)	Punto de inflamación	Sin datos disponibles
h)	Tasa de evaporación	Sin datos disponibles
i)	Inflamabilidad (sólido, gas)	Sin datos disponibles
j)	Inflamabilidad superior/inferior o límites explosivos	Sin datos disponibles
k)	Presión de vapor	Sin datos disponibles
l)	Densidad de vapor	Sin datos disponibles
m)	Densidad relativa	1.230 g/cm <sup>3</sup>
n)	Solubilidad en agua	ligeramente soluble
o)	Coefficiente de reparto n-octanol/agua	log Pow: 5.0
p)	Temperatura de auto-inflamación	Sin datos disponibles
q)	Temperatura de descomposición	Sin datos disponibles
r)	Viscosidad	Sin datos disponibles
s)	Propiedades explosivas	Sin datos disponibles
t)	Propiedades comburentes	Sin datos disponibles

## 9.2 Otra información de seguridad

Sin datos disponibles

---

## 10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

### 10.1 Reactividad

Sin datos disponibles

### 10.2 Estabilidad química

Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas.

### 10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas

Sin datos disponibles

### 10.4 Condiciones que deben evitarse

Sin datos disponibles

### 10.5 Materiales incompatibles

Agentes oxidantes fuertes, Corroe metales.

### 10.6 Productos de descomposición peligrosos

Otros productos de descomposición peligrosos - Sin datos disponibles  
En caso de incendio: véase sección 5

---

## 11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

### 11.1 Información sobre los efectos toxicológicos

#### Toxicidad aguda

LDLO Oral - Humanos - hembra - 246 mg/kg

Observaciones: Vasculares: Disminución de la TA no caracterizada en la sección autónoma Pulmones, torax o Respiración: Edema pulmonar crónico El contacto prolongado con la piel puede producir irritación de la piel y/o dermatitis.

LDLO Oral - Humanos - macho - 471 mg/kg  
Observaciones: Conducta: Coma Vasculares: Disminución de la TA no caracterizada en la sección autonómica  
Pulmones, torax o Respiración: Disnea

DL50 Oral - Rata - 1,000 - 1,350 mg/kg

DL50 Oral - Pájaro (salvaje) - 400 mg/kg

Inhalación: Sin datos disponibles

DL50 Cutáneo - Conejo - 8,790 mg/kg

Sin datos disponibles

**Corrosión o irritación cutáneas**

Sin datos disponibles

**Lesiones o irritación ocular graves**

Ojos - Conejo

Resultado: No irrita los ojos

**Sensibilización respiratoria o cutánea**

Sin datos disponibles

**Mutagenicidad en células germinales**

Humanos

leucocito

análisis citogenéticos

Humanos

linfocito

análisis citogenéticos

Humanos

linfocito

inhibición de ADN

Humanos

fibroblasto

otros sistemas de ensayos de mutación

Humanos

leucocito

intercambio de cromátides

Humanos

fibroblasto

intercambio de cromátides

Hamster

ovario

análisis citogenéticos

Hamster

Pulmones

análisis citogenéticos

Hamster

Pulmones

intercambio de cromátides

Hamster

ovario

intercambio de cromátides

Humanos

linfocito

síntesis no prevista de ADN

Humanos  
linfocito  
test de micronúcleo

Ratón  
análisis citogenéticos

Ratón  
análisis citogenéticos

Ratón  
análisis citogenéticos

Hamster  
análisis citogenéticos

#### **Carcinogenicidad**

IARC: 2A - Group 2A: Probably carcinogenic to humans (Malathion)

NTP: En este producto no se identifica ningún componente, que presente niveles mayores que o iguales a 0.1%, como agente carcinógeno conocido o anticipado por el (NTP) Programa Nacional de Toxicología.

OSHA: No se identifica ningún componente de este producto, que presente niveles mayores que o igual a 0,1% como cancerígeno o como carcinógeno potencial por la (OSHA) Administración de Salud y Seguridad Ocupacional.

#### **Toxicidad para la reproducción**

Sin datos disponibles

Toxicidad para la reproducción - Rata - Oral

Efectos sobre la Fertilidad: Mortalidad postimplantación: (p.e.: nº total de implantaciones muertas o reabsorbidas por nº total de implantaciones)

Toxicidad para la reproducción - Rata - Oral

Efectos sobre el Neonato: Índice de lactancia o destete (nº de individuos vivos al destete/nº individuos vivos en el 4º día Efectos sobre el Neonato: Estadísticas de crecimiento Efectos sobre el Neonato: Otros efectos postnatales

Toxicidad para la reproducción - Rata - No informado

Efectos sobre el Aparato Reprodutor: Espermatogénesis (incluyendo material genético, morfología, motilidad y recuento de los espermatozoides) Efectos sobre el Aparato Reprodutor: Testículos, epidídimo y espermiducto

Sin datos disponibles

Toxicidad para el desarrollo - Rata - Oral

Anormalidades Específicas del Desarrollo: Sistema Urogenital

Toxicidad para el desarrollo - Conejo - Oral

Efectos sobre el Feto o Embrión: Otros efectos sobre el embrión

#### **Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única**

Sin datos disponibles

#### **Toxicidad específica en determinados órganos - exposiciones repetidas**

Sin datos disponibles

#### **Peligro de aspiración**

Sin datos disponibles

#### **Información Adicional**

RTECS: WM8400000

Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

---

## 12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

### 12.1 Toxicidad

Toxicidad para los peces	mortalidad LOEC - <i>Lepomis macrochirus</i> - 0.079 mg/l - 7.0 d
	mortalidad NOEC - <i>Ptychocheilus lucius</i> - 1.68 mg/l - 32 h
	CL50 - <i>Lepomis macrochirus</i> - 0.046 mg/l - 96.0 h
Toxicidad para las dafnias y otros invertebrados acuáticos	CE50 - <i>Daphnia magna</i> (Pulga de mar grande) - 0.002 mg/l - 48 h
Toxicidad para las algas	CE50 - <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (alga verde) - 4.06 mg/l - 72 h

### 12.2 Persistencia y degradabilidad

Sin datos disponibles

### 12.3 Potencial de bioacumulación

Bioacumulación	<i>Oryzias latipes</i> - 168 h - 12.8 µg/l
	Factor de bioconcentración (FBC): 12
	Observaciones: Puede acumularse en los organismos acuáticos.

### 12.4 Movilidad en el suelo

Sin datos disponibles

### 12.5 Resultados de la valoración PBT y mPmB

La valoración de PBT / mPmB no está disponible ya que la evaluación de la seguridad química no es necesaria / no se ha realizado

### 12.6 Otros efectos adversos

No se puede excluir un peligro para el medio ambiente en el caso de una manipulación o eliminación no profesional. Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

---

## 13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

### 13.1 Métodos para el tratamiento de residuos

#### Producto

Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada.

#### Envases contaminados

Eliminar como producto no usado.

---

## 14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

### DOT (US)

Número ONU: 3082 Clase: 9 Grupo de embalaje: III  
Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas: Environmentally hazardous substance, liquid, n.o.s. (Malathion)  
Cantidad Reportable (RQ): 100 libras  
Contaminante marino: no  
Riesgo de intoxicación por inhalación: No

### IMDG

Número ONU: 3082 Clase: 9 Grupo de embalaje: III EMS-No: F-A, S-F  
Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas: ENVIRONMENTALLY HAZARDOUS SUBSTANCE, LIQUID, N.O.S. (Malathion)  
Contaminante marino: no

### IATA

Número ONU: 3082 Clase: 9 Grupo de embalaje: III

Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas: Sustancia líquida peligrosa para el medio ambiente, n.e.p. (Malathion)

---

## 15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

### SARA 302 Componentes

Este material no contiene productos químicos sujetos a los requisitos reportados por SARA Título III, sección 302.

### SARA 313 Componentes

Los siguientes componentes están sujetos a los niveles de referencia establecidos por SARA Título III, Sección 313:

	No. CAS	Fecha de revisión
Malathion	121-75-5	2007-07-01

### SARA 311/312 Peligros

Peligro Agudo para la Salud, Peligro para la Salud Crónico

### Massachusetts Right To Know Componentes

	No. CAS	Fecha de revisión
Malathion	121-75-5	2007-07-01

### Pennsylvania Right To Know Componentes

	No. CAS	Fecha de revisión
Malathion	121-75-5	2007-07-01

### New Jersey Right To Know Componentes

	No. CAS	Fecha de revisión
Malathion	121-75-5	2007-07-01

### Prop. 65 de California Componentes

Este producto no contiene ninguna sustancia química conocida para el de Estado de California que pueden causar cáncer, defectos de nacimiento, o cualquier otro daño reproductivo.

---

## 16. OTRA INFORMACIÓN

### Texto íntegro de las Declaraciones-H referidas en las secciones 2 y 3.

Acute Tox.	Toxicidad aguda
Aquatic Acute	Toxicidad acuática aguda
Aquatic Chronic	Toxicidad acuática crónica
Carc.	Carcinogenicidad
H302	Nocivo en caso de ingestión.
H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
H350	Puede provocar cáncer.
H400	Muy tóxico para los organismos acuáticos.
H410	Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

### Clasificación HMIS/NFPA

Peligro para la salud:	2
Peligro Crónico para la Salud:	
Inflamabilidad:	0
Peligro Físico	0

### Clasificación NFPA

Peligro para la salud:	2
Peligro de Incendio:	0
Peligro de Reactividad:	0

### Otros datos

Copyright 2015 Sigma-Aldrich Co. LLC. Se autoriza la reproducción en número ilimitado de copias para uso exclusivamente interno.

La información indicada arriba se considera correcta pero no pretende ser exhaustiva y deberá utilizarse únicamente como orientación. La información contenida en este documento esta basada en el presente estado de nuestro conocimiento y es aplicable a las precauciones de seguridad apropiadas para el producto. No representa

ninguna garantía de las propiedades del producto. La Corporación Sigma-Aldrich y sus Compañías Afiliadas, no responderán por ningún daño resultante de la manipulación o contacto con el producto indicado arriba. Dirijase a [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com) y/o a los términos y condiciones de venta en el reverso de la factura o de la nota de entrega.

**Información suministrada por**  
Corporación Sigma-Aldrich  
Product Safety – Americas Region  
1-800-521-8956

Versión: 5.3

Fecha de revisión:  
12/29/2015

Fecha de impresión:  
08/09/2017

## 8.2 Hoja de seguridad del DMTP

### Hoja de Datos de Seguridad

*Emisión* 1.0  
*Revisión* 24.12.2014  
*Fecha de emisión* 12.01.2017



página 1 de 4

### 1 Identificación de la sustancia

#### Identificación de la sustancia

*Identificación de la sustancia* O,O-Dimethyl thiophosphate

*Identificación adicional* O,O-Dimethyl hydrogen phosphorothioate

*N° del catálogo Biosynth* Q-201495

*REACH No.* Un número de registro no está disponible para esta sustancia, ya que la sustancia o sus usos están exentos del registro, el tonelaje anual no requiere registro o dicho registro está previsto para una fecha posterior.

#### Uso de la sustancia / preparación

*Usos identificados* intermedios básicos

*Restricciones de uso* no apto para uso en alimentos, para uso en laboratorio únicam

*Compañía* BIOSYNTH AG  
Rietlistrasse 4  
CH-9422 STAAD

*Teléfono* +41 (0)71 858 20 20

*Correo* welcome@biosynth.ch

#### Número de emergencia

*Teléfono* +41 (0)71 858 20 20 horario de oficina

### 2 Identificación de peligros

#### Etiquetado GHS

*Lista regulatoria*  
EC1272/08

#### Consejos de prudencia

P261 Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P262 Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa.

#### Información adicional

¡Precaución! A nuestro mejor saber y entender las propiedades toxicológicas de este material no han sido investigadas en fo

### 3 Composición / información de los ingre

#### Información relacionada con la sustancia

*Nombre de la sustancia* O,O-Dimethyl thiophosphate

*Sinónimos* O,O-Dimethyl hydrogen phosphorothioate

*N° CAS* [1112-38-5]

*Fórmula* C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>PS

### 4 Medidas de primeros auxilios

**Primeros auxilios: Ojos**

Lavar los ojos inmediatamente con suficiente aguacorrente durante al menos 10 a 15 minutos manteniendo los párpados separ, Consultar a un oftalmólogo.

**Primeros auxilios: Piel**

Lavar inmediatamente con suficiente agua y jabóndurante al menos 15 minutos. Quitar la ropa y el calzado contaminados. Lavar la ropa contaminada antes de volver a utilizarla. Llamar a un médico.

**Primeros auxilios: Ingestión**

Lavar la boca con agua siempre que la persona esté consciente. Llamar a un médico.

**Primeros auxilios: Inhalación**

Retirar a la víctima al aire fresco y mantenerlaabrigada y en descanso. Si la respiración es irregular o se ha interrumpido, administrar respiración artificial. Llamar a un médico.

**Comentarios para el médico: Tratamiento**

Tratar en forma sintomática.

---

## 5 Medidas de lucha contra incendios

**Medios de extinción**

**Apropiados**

espuma, polvo extintor seco, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), rocío de agua

**Peligros durante la extinción de incendios**

vapores tóxicos

**Equipo protector para combatir incendios**

Utilizar un aparato respirador autónomo y ropa deprotección química.

**Otros consejos para combatir incendios**

No inhalar los gases de explosión y combustión. Recoger el agua contaminada de la extinción de incendios por separado. Esta no debe ser descarga en desagües. Retirar los recipientes que no se hayan dañado del área inmediata de peligro si esto puede hacerse en forma segura.

---

## 6 Medidas que deben tomarse en caso de vertido accidental

**Precauciones personales**

Utilizar aparato respirador en caso de exposicióna vapores/polvos/aerosoles. Proporcionar ventilación adecuada.

**Precauciones ambientales**

No permitir que penetre en el suelo/subsuelo. No permitir que ingrese a aguas superficiales o desagües. Asegurarse de que toda el agua residual sea recolectada y tratada a través de una planta de tratamiento de aguas.

**Métodos para la limpieza o recolección**

no disponible

**Otras medidas para combatir escapes accidentales**

Recolectar en recipientes cerrados y apropiados para su eliminación. Limpiar las áreas contaminadas en forma exhaustiva. Ventilar el área afectada.

---

## 7 Manipulación y almacenamiento

**Manipulación**

**Consejos para la manipulación**

Evitar el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Evitar la ingestión y la inhalación. Evitar la exposición prolongada o repetida. Quitar la ropa contaminada y lavarla antes de volver a utilizarla. Lavarse cuidadosamente tras la manipulación.

---

**Almacenamiento**

**Temperatura de almacenamiento**

almacenar a temperatura ambiente

**Requisitos de almacenamiento**

Mantener alejado de materiales incompatibles. Almacenar en un área fresca, seca y bien ventilada, lejos de productos incompatibles.

---

**8 Controles de exposición / protección personal**

**Controles de exposición**

**Higiene industrial**

Se requiere ventilación mecánica. Ducha de seguridad y ducha para ojos.

**Equipo de protección personal**

**Protección respiratoria**

Utilizar un respirador aprobado por NIOSH/MSHA o por el estándar europeo EN 149.

**Protección de las manos**

Utilizar guantes compatibles resistentes a los productos químicos para evitar exposición de la piel.

**Protección ocular**

Utilizar lentes protectores o gafas de seguridad para productos químicos apropiadas según lo descrito por OSHA.

**Protección corporal**

Utilizar guantes y ropa resistente a los productos químicos para evitar la exposición de la piel.

**Consejos para la manipulación segura**

Lavar la ropa contaminada antes de reutilizarla. Utilizar ropa protectora apropiada para evitar la exposición.

---

**9 Propiedades físicas y químicas**

**Forma**

polvo

**Transición de fase líquida a gaseosa**

172 °C

**Masa molar**

142,11 g/mol

**Densidad**

1,369 g/cm<sup>3</sup>

**Punto de combustión**

58,1 °C

---

**10 Estabilidad y reactividad**

**Condiciones a evitar**

materiales incompatibles

**Sustancias a evitar**

oxidantes fuertes

**Productos de descomposición**

óxidos de fósforo, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), óxidos de azufre, monóxido de carbono

---

**11 Información toxicológica**

---

**Otra información relevante de toxicidad**  
No tenemos conocimiento de ninguna información toxicológica.

---

## 12 Información ecológica

**Biodegradación**  
no hay información disponible

**Bioacumulación**  
no hay información disponible

**Distribución en el medio ambiente**  
no hay información disponible

---

## 13 Consideraciones para la eliminación

### Consejos para la eliminación y el empaque

*Consejos para la eliminación*

Disolver o mezclar el material con un solvente combustible y quemar en un incinerador químico equipado con un dispositivo d, Eliminar los residuos de acuerdo con Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz (KrW-/AbfG).

*Consejos para el empaque*  
no disponible

---

## 14 Información de transporte

**Transporte por carretera (ADR/GGVS)**  
*no regulado*

**Transporte por aire (IATA)**  
*no regulado*

---

## 15 Otras regulaciones

**Lista regulatoria**  
no disponible

---

## 16 Información adicional

### Etiquetado GHS

*Lista regulatoria*  
EC1272/08

*Consejos de prudencia*

P261 Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.  
P262 Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa.

### **8.3 Participaciones en congresos**

#### **8.3.1 Primer Coloquio Interdisciplinario 20/30 Xenobióticos y señalización celular.**

Hernández Toledano David, Estrada Muñiz Elizabet, Vega Loyo Libia. Evaluación de la genotoxicidad de los Dialquil-fosfatos metilados Dimetil Tiofosfato (DMTP) y Dimetil ditiofosfato (DMDTP) en células humanas. Realizado del 3 al 5 de agosto del 2017 en Tequisquiapan, Querétaro, México.