



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**“LAS GTPasas COMO BLANCO DE METABOLITOS DE PLAGUICIDAS
ORGANOFOSFORADOS EN EL RE-ARREGLO DEL CITOESQUELETO Y LA
MIGRACIÓN CELULAR DE MACRÓFAGOS MURINOS”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. DAVID SEBASTIÁN HERNÁNDEZ TOLEDANO

Para obtener el grado de:

DOCTOR 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 doctorado No. 780423 y Recursos Propios del Laboratorio de Citogenética e Inmunotoxicología.

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 intelectual y profesionalmente.

A mis asesores la Dra. María Betzabet Quintanilla Vega, Dra. Ema Calderón Aranda, Dra. Gloria Benítez King y Dr. José Manuel Hernández Hernández por sus comentarios y recomendaciones acerca del proyecto.

A la M. en C. Elizabet Estrada Muñiz, Auxiliar de Investigación del Departamento de Toxicología por el apoyo técnico y asesoría con el cultivo celular, los ensayos de viabilidad y los ensayos de actividad que se utilizaron durante este trabajo experimental.

Al M. en C. Iván José Galván Mendoza de la Unidad de microscopia confocal del LaNSE, por el apoyo técnico durante el uso del microscopio confocal.

A la M. en C. María del Rosario García Aguilar por su apoyo técnico y asesoría durante el uso del citómetro de flujo.

Al Dr. Bulmaro Cisneros del Departamento de Genética y Biología Molecular por facilitarnos los cultivos de fibroblastos humanos.

A todos mis compañeros del Laboratorio 30 por su apoyo académico y personal durante mis estudios de doctorado.

A mi familia y amigos que me apoyaron para que pudiera dedicarme completamente a mis estudios.

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

Agradezco al CINVESTAV y al Departamento de Toxicología por la enseñanza y orientación académica recibida durante mis estudios de posgrado.

RESUMEN

Los compuestos organofosforados (OP) son compuestos sintéticos con efectos neurotóxicos agudos ya que inhiben a la enzima acetilcolinesterasa. Sin embargo, estudios recientes indican que los OP poseen diversos blancos moleculares, lo que podría explicar su participación en el desarrollo de distintas enfermedades después de la exposición crónica. Entre estos blancos se encuentran proteínas del citoesqueleto como la actina y la tubulina. Estudios *in vitro* muestran que los plaguicidas OP y sus metabolitos inespecíficos dialquilfosfatos (DAP) pueden alterar procesos celulares asociados con el citoesqueleto tales como la movilidad, el tráfico vesicular y la fagocitosis, además de alterar vías de señalización que son importantes en el funcionamiento correcto de las células.

Por lo tanto, este trabajo busca evaluar el efecto del malatión (plaguicida OP) y sus metabolitos DAP, sobre la funcionalidad del citoesqueleto asociada a procesos como la movilidad (ensayo de cierre de herida) y la fagocitosis (captura de partículas de zimósán), en macrófagos de la línea celular RAW264.7 expuestos a concentraciones de 0.01-1 μM . Nuestros resultados mostraron que tanto el malatión como sus metabolitos dimetilditiofosfato (DMDTP), dimetiltiofosfato (DMTP) y dimetilfosfato (DMP), *in vitro* redujeron la polimerización de actina y retrasaron el inicio de la polimerización de tubulina a concentraciones entre 0.01 y 1 μM . En los macrófagos, el malatión y sus metabolitos (0.01 μM) indujeron morfologías alargadas, pseudópodos, filopodios y estructuras ramificadas de actina por todo el cuerpo celular. Cuando evaluamos el efecto sobre la migración celular, observamos que el DMTP y el DMP indujeron significativamente la migración celular, con efectos mayores a concentraciones bajas (0.01-0.1 μM). Por otro lado, no se observaron efectos relevantes sobre la capacidad fagocítica.

Estos cambios en el citoesqueleto de actina y el incremento en la migración celular sugirieron la participación de los DAP en la activación de las GTPasas pequeñas, proteínas reguladoras del re-arreglo del citoesqueleto de actina y tubulina. Observamos que el malatión y el DMP 0.01 μM inhibieron la actividad de la GTPasa RhoA, mientras que el DMTP y el DMP (0.01 μM) indujeron la actividad de Rac1 y Cdc42 desde los 5 min y hasta las 2 h. La inhibición química de la activación de Rac1 y Cdc42 previno los efectos del DMP sobre el citoesqueleto, mostrando que los efectos de los DAP son dependientes de la vía de Rac1 y Cdc42. Estos resultados sugieren que los OP metilados, especialmente el DMP, pueden interferir en funciones celulares asociadas al citoesqueleto a través de la activación de Rac1 y Cdc42. Estas GTPasas podrían representar blancos moleculares no-colinérgicos implicados en los efectos tóxicos producidos por la exposición a los compuestos OP.

ABSTRACT

Organophosphate compounds (OP) are synthetic substances with acute neurotoxic effects because of their inhibition of acetylcholinesterase. However, recent reports showed that OP has diverse molecular targets, which may explain its role in the development of diseases related to OP chronic exposure. Among these molecular targets, we can identify cytoskeletal proteins such as actin and tubulin. *In vitro* reports in different cell lines revealed that OP and its metabolites dialkylphosphates (DAP) affect cellular activities related to the cytoskeleton, such as cell motility, vesicular transport, and phagocytosis, in addition to the alteration of cell signal pathways, which are essential for the correct performance of cells.

For that reason, this work evaluated the effect of malathion (an OP pesticide) and its DAP metabolites, on cytoskeleton functionality related to cellular process as motility (wound healing assay) and phagocytosis (zymosan particles capture), using the macrophage murine cell line RAW264.7 exposed to concentrations of 0.01-1 μM . Our results showed that malathion and its metabolites dimethyldithiophosphate (DMDTP), dimethylthiophosphate (DMTP), and dimethylphosphate (DMP), *in vitro*, reduced the actin polymerization and delayed tubulin polymerization at 0.01 μM and 1 μM . On murine macrophages, malathion, and its DAP (0.01 μM) produced widespread morphologies pseudopods, filopodia formation, and branched actin structures. When we evaluated the effect on cell migration, we observed that DMTP and DMP significantly induced cell migration, showing the greatest induction at the lowest concentrations (0.01-0.1 μM). Also, no similar effects were observable in the phagocytosis assay.

The changes in actin cytoskeleton and the enhanced cell migration suggested a role of DAP in the activation of the cytoskeleton regulation proteins, such as small GTPases, regulatory proteins related to the re-arrangement of actin and tubulin cytoskeleton. We observed that malathion and DMP at 0.01 μM inhibited the RhoA GTPase activity, while DMTP and DMP (0.01 μM) increased Rac1 and Cdc42 activity from 5 min up to 2 h. The chemical inhibition of Rac1 and Cdc42 prevented the effects of DMP in the cytoskeleton, showing that cytoskeleton alterations caused by DAP depend on the Rac1 and Cdc42 pathways. Our results suggest that methyl OP and its DAP, specially DMP, interfered in cellular functions related to the cytoskeleton through the activation of Rac1 and Cdc42 GTPases, that may represent non-cholinergic molecular targets that can be related to toxic effects produced by the OP compound exposure.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Compuestos Organofosforados	14
1.1.1 Dialquilfosfatos (DAP)	14
1.1.2 Efectos Biológicos	16
1.1.3 OP y el citoesqueleto.....	18
1.2 Citoesqueleto.....	20
1.2.1 Actina	20
1.2.2 Tubulina	21
1.2.3 Filamentos intermedios	21
1.2.4 GTPasas	21
1.2.5 Cinasas	23
1.3 Respuesta inmune	25
1.3.1 Inmunotoxicidad de los compuestos OP	25
1.3.1.1 Inmunotoxicidad de los DAP.....	26
1.2 Justificación	28
1.3 Hipótesis.....	29
1.4 Objetivos.....	29
1.4.1 Objetivo General	29
1.4.2 Objetivos Específicos	29
2. MÉTODOS.....	30
2.1 Estrategia Experimental	30
2.2 Línea Celular RAW264.7	30
2.2.1 Características	30
2.2.2 Cultivo	31
2.3 Cultivo Celular GM03440.....	31
2.3.1 Características	31
2.3.2 Cultivo	32
2.4 Tratamientos.....	32
2.5 Viabilidad por Incorporación de Rojo Neutro	33
2.5.1 Principio	33
2.5.2 Procedimiento	33
2.6 Ensayo de Polimerización de Actina	34
2.6.1 Principio	34
2.6.2 Procedimiento	34
2.7 Ensayo de Polimerización de Tubulina	35
2.7.1 Principio	35
2.7.2 Procedimiento	35
2.8 Evaluación Morfológica de las Células por Microscopía de Fluorescencia.....	35
2.8.1 Principio	35
2.8.2 Procedimiento	36
2.9 Ensayo de Cierre de Herida	37
2.9.1 Principio	37
2.9.2 Procedimiento	37

2.10	Ensayos de Actividad de GTPasas (G-LISAS)	38
2.10.1	Principio.....	38
2.10.2	Procedimiento.....	38
2.11	Ensayo de Fagocitosis por Captura de Partículas de Zimosán.....	39
2.11.1	Principio.....	39
2.11.2	Procedimiento.....	39
2.12	Análisis Estadístico de Resultados	40
3.	RESULTADOS	41
3.1	Viabilidad por Incorporación de Rojo Neutro (RN)	41
3.2	Polimerización de Actina	42
3.3	Polimerización de tubulina.....	45
3.4	Organización del Citoesqueleto.....	47
3.5	Ensayo de cierre de herida.....	54
3.6	Efecto de los OP sobre la Actividad de las GTPasas de la Familia Rho ..	56
3.7	Inhibición de las GTPasas Rac1 y Cdc42.....	59
3.7.1	Morfología.....	59
3.7.2	Migración celular.....	61
3.8	Fagocitosis	62
4.	DISCUSIÓN.....	65
5.	CONCLUSIONES	75
6.	PERSPECTIVAS	76
7.	REFERENCIAS	77
8.	ANEXOS	88
8.1	Hojas de Seguridad.....	88
8.1.1	Malatión.....	88
8.1.2	DMDTP.....	91
8.1.3	DMTP	93
8.1.4	DMP	94
8.2	Productos Derivados del Trabajo de Tesis	96
8.2.1	Artículos de Investigación	96
8.2.2	Artículos de Revisión	96
8.2.3	Capitulos de Libro.....	96
8.2.4	Participación en Congresos	96

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Proteínas identificadas con aductos de OP en residuos de tirosina y/o lisina.	18
Tabla 2. Efectos de compuestos OP sobre células inmunes.	26
Tabla 3. Clasificación de la morfología celular después de la exposición a OP.	51
Tabla 4. Clasificación de la morfología celular después de la inhibición de Rac1 y/o Cdc42.	60
Tabla 5. Resumen de efectos del malatión y sus DAP sobre el citoesqueleto	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fórmula general de los compuestos OP.....	14
Figura 2. Metabolismo general de los plaguicidas organofosforados.....	15
Figura 3. Estructuras y constantes de ionización de los dialquilfosfatos	16
Figura 4. Representación esquemática de la migración celular	23
Figura 5. Esquema representativo del papel del citoesqueleto durante la fagocitosis mediada por receptores FcγR y presentación de antígenos.	24
Figura 6. Evaluación de la citotoxicidad por el ensayo de incorporación de RN.....	41
Figura 7. Curva representativa del efecto de los compuestos OP sobre la polimerización de actina utilizando un ensayo basado en fluorescencia.....	43
Figura 8. Efecto de los DAP y el malatión sobre la tasa de polimerización, la cantidad máxima de polimerización y el tiempo medio de polimerización de actina durante el ensayo de polimerización acelular	44
Figura 9. Curva representativa del efecto de los compuestos OP sobre la polimerización de tubulina utilizando un ensayo basado en fluorescencia.....	46
Figura 10. Efecto de los DAP y el malatión sobre la tasa de polimerización, la cantidad máxima de polimerización y el tiempo medio de polimerización de tubulina durante el ensayo de polimerización acelular	47
Figura 11. Efectos sobre la morfología celular tras la exposición a OP.	50
Figura 12. Inmunofluorescencias de células RAW264.7 tratadas con los compuestos OP malatión, DMDTP, DMTP y DMP	52
Figura 13. Número de filopodios por célula (A) y longitud de filopodios (B) de células tratadas con malatión y sus metabolitos.	53
Figura 14. Organización del citoesqueleto de actina de fibroblastos humanos GM03440.....	54
Figura 15. Efecto de la exposición a los compuestos organofosforados malatión (A), DMDTP (B) DMTP (C) y DMP (D) por 48 h sobre la migración celular de macrófagos RAW264.7 evaluada por el ensayo de cierre de herida.	55
Figura 16. Efecto de los DAP sobre la actividad de las GTPasas de la familia Rho	58
Figura 17. La inhibición de Rac1 y Cdc42 previenen los cambios morfológicos inducidos por el DMP. Organización del citoesqueleto de actina (rojo) de células RAW264.7 después del pretratamiento con los inhibidores de Rac1 o Cdc42 y el tratamiento con DMP.	60
Figura 18. Efecto de la inhibición de Rac1 y Cdc42 en la migración celular inducida por DMP.....	61

Figura 19. Efecto de los DAP en la fagocitosis. (A) Porcentaje de células positivas a zimosán marcado con FITC y (B) la intensidad media de fluorescencia (IMF) de células RAW264.7 tratadas con malatión o sus DAP62

Figura 20. Porcentaje de células positivas a zimosán marcado con FITC de células RAW264.7 tratadas con DMP (1 μ M) y/o PMA (50 nM).63

ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterasa
APC	Células presentadoras de antígenos
Arp2/3	Proteínas asociadas a Actina 2/3
BChE	Butilcolinesterasa
Cdc42	Homólogo de la proteína 42 de control de la división celular
CE	Carboxilesterasa
CPO	Clorpirifos oxón
CYP	Citocromos
Cyt-B	Citocalasina B
DAP	Dialquilfosfatos
DEDTP	Dietilditiofosfato
DEP	Dietilfosfato
DETP	Dietiltiofosfato
DFP	Diisopropilfluorofosfato
DMDTP	Dimetilditiofosfato
DMP	Dimetilfosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTP	Dimetiltiofosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FA	Adhesiones focales
FcγR	Receptores de la fracción cristalizable gamma
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
GAP	Proteína activadora de GTPasas
GDI	Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Factor intercambiador de guanina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GTP	Guanosina trifosfato
HRP	Peroxidasa de rábano
IP3	Inositol trifosfato
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos
MFI	Intensidad Media de Fluorescencia
MT	Microtúbulos
MTOC	Centro Organizador de Microtúbulos
NO	Óxido nítrico
OP	Organofosforados
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PFA	Paraformaldehído
PKC	Protein Cinasa C
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
Rac1	Sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras
RhoA	Miembro de la familia homóloga Ras
RN	Rojo Neutro
ROCK	Cinasa asociada a Rho
RTK	Receptor Tirocin Cinasa

SFB	Suero Fetal Bovino
SFK	Cinasas de la familia Src
TRITC	Tetrametilrodamina
WASp	Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich
WAVE	Miembro 1 de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Compuestos Organofosforados

Los compuestos organofosforados (OP) abarcan una gran variedad de ésteres y/o tioésteres del ácido fosfórico. La estructura química general de estos compuestos consiste en un átomo central de fósforo con enlaces fosfóricos (P=O) o tiofosfóricos (P=S) (Eleršek y Filipi, 2011) representados de manera general con la fórmula mostrada en la Figura 1. Dos sustituyentes alquílicos (R1 y R2) están directamente unidos al átomo de fósforo o mediante enlaces con átomos de oxígeno o de azufre. El grupo saliente (X) puede referirse a distintos sustituyentes como grupos halogenados, alifáticos, aromáticos o heterocíclicos. Estos sustituyentes se liberan cuando la molécula se hidroliza por enzimas como las fosfotriesterasas o bien al interactuar con proteínas blanco (Sogorb y Vilanova, 2002).

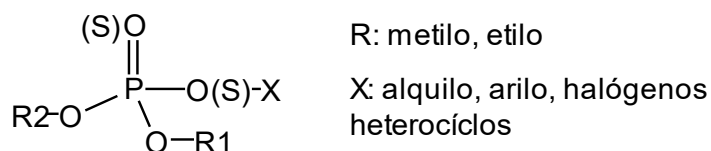


Figura 1. Fórmula general de los compuestos OP.

Los primeros OP se sintetizaron en Francia en el siglo XIX con la intención de desarrollar insecticidas y nuevos agentes bélicos. En la actualidad, se sintetizan gran variedad de compuestos OP entre los que se encuentran plaguicidas (malatión, paratión, diazinón, clorpirifos, etc.), agentes bélicos (somán, sarín, tabún, entre otros), agentes oftálmicos (ectotiofato, isofluorato), antihelmínticos (triclorfón), herbicidas (tribufos, merfos), así como solventes, plastificantes, aditivos de alta presión para lubricantes, retardantes de flama, entre otros. (Terry, 2012).

1.1.1 Dialquifosfatos (DAP)

Los Dialquifosfatos (DAP) son compuestos OP altamente polares, ácidos y solubles en agua, conocidos por ser productos del metabolismo de los plaguicidas OP tras reacciones de hidrolisis, desalquilaciones o desulfuraciones oxidativas mediadas

por enzimas del citocromo P450 y algunas esterasas (Figura 2) (Kavvalakis y Tsatsakis, 2012).

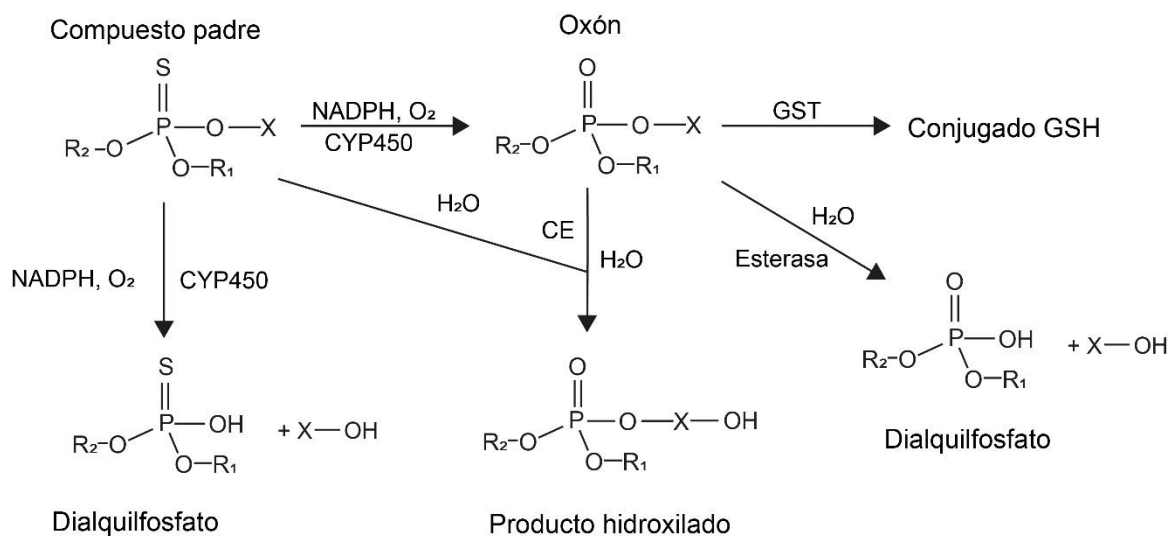


Figura 2. Metabolismo general de los plaguicidas organofosforados (Buratti *et al.*, 2007).

De este grupo de compuestos se han identificado al menos seis compuestos DAP: el dimetilditiofosfato (DMDTP), el dimetiltiofosfato (DMTP), el dimetilfosfato (DMP), el dietilditiofosfato (DEDTP), el dietiltiofosfato (DETP) y el dietilfosfato (DEP) (Figura 3). Algunos reportes refieren que el tiempo de vida media de estos metabolitos pueden llegar a ser igual o mayores a 100 h en el organismo, siendo mayor que el tiempo de vida media de los compuestos padres que los originan. Esto, aunado a su estabilidad, son los motivos por los cuales los DAP se emplean como biomarcadores de exposición a los plaguicidas OP, principalmente evaluados en muestras de orina, aunque algunos estudios reportan su detección en otras matrices como cabello, sangre, fluido amniótico, meconio, leche materna, entre otras, tanto en población general como en personas ocupacionalmente expuestas (Drevenkar *et al.*, 1993; Kavvalakis y Tsatsakis, 2012; Vasilić *et al.*, 1992).

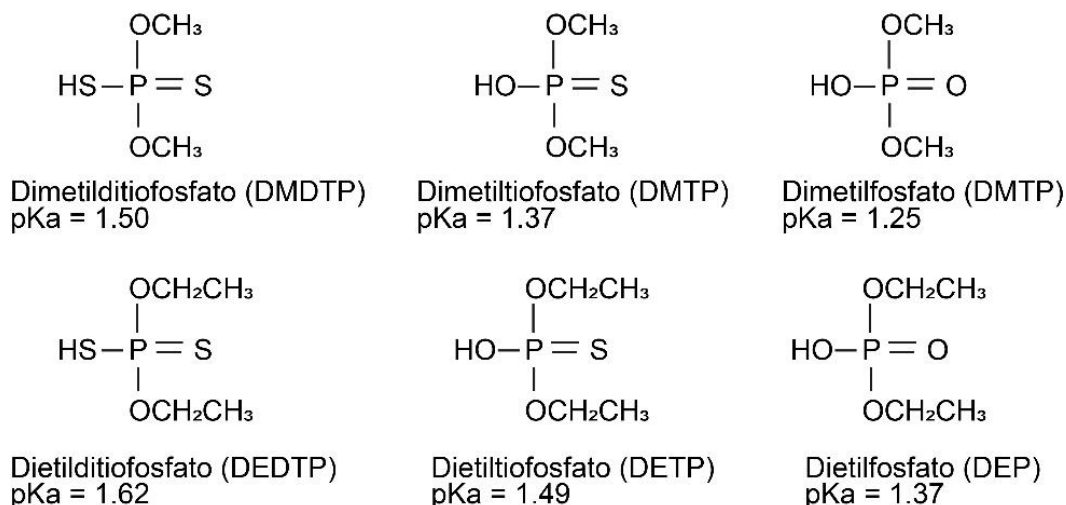


Figura 3. Estructuras y constantes de ionización de los dialquilfosfatos (Duggan *et al.*, 2003).

1.1.2 Efectos Biológicos

Los compuestos OP se unen de manera covalente a los residuos de serina del sitio activo de las enzimas en la superfamilia de las serina hidrolasas (Lockridge y Schopfer, 2010) tales como la acetilcolinesterasa (AChE), la butilcolinesterasa (BChE) y la carboxilesterasa hepática (ali-esterasa), la paraoxonasa (A-esterasa) y otras esterasas no específicas (Soltaninejad y Abdollahi, 2009). La inhibición de la AChE representa el efecto adverso más significativo tras exposiciones agudas, ya que se trata de una enzima crítica para controlar adecuadamente la transmisión nerviosa a distintos órganos, así como dentro del sistema nervioso central. La acumulación de la acetilcolina provoca efectos neurotóxicos llevando a un aumento de la actividad secretora de algunos órganos, alteraciones en el sistema cardiovascular y respiratorio y conduciendo a fallas respiratorias y muerte (Bates y Campbell, 2008).

Sin embargo, la exposición crónica a bajas de compuestos OP que no inhiben la actividad de la AChE, se asocian al desarrollo de algunas patologías como el déficit cognitivo, la enfermedad de Parkinson, la disfunción neurológica, la enfermedad de la guerra del Golfo y depresión entre otras (Lockridge y Schopfer, 2010). También se asocian con el incremento en la frecuencia de aparición de algunos tipos de cáncer como de próstata, leucemia, linfoma de no-Hodgkin, de tiroides, entre otros

(Band *et al.*, 2011; Eriksson, *et al.*, 2008; Lerro *et al.*, 2015; Mahajan, *et al.*, 2006)(Band, *et al.*, 2011; Eriksson, *et al.*, 2008; Lerro *et al.*, 2015; Mahajan, *et al.*, 2006), alteraciones embrionarias, infertilidad, asma y bronquitis (Harley *et al.*, 2011; Sánchez-Peña *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2013), por mencionar algunas. La gran variedad de efectos a largo plazo, que se asocian con la exposición crónica a bajas de compuestos OP, ha llevado a sugerir que estos compuestos poseen otros blancos moleculares además de la AChE y otras hidrolasas que puedan contribuir a explicar los efectos retardados y persistentes tras la exposición crónica a OP (Terry, 2012).

El grupo de Lockridge y colaboradores encontraron que algunos compuestos OP, entre los que se encuentran plaguicidas (clorpirifos, diclorvos, dimetoato, diazinón), y algunos agentes de guerra (somán, sarín) son capaces de formar aductos con distintas proteínas (Tabla 1). Estos estudios señalan que los OP pueden interactuar de manera covalente con residuos de tirosina y de lisina, además de los ya descritos residuos de serina, lo que altera la funcionalidad de las proteínas al bloquear o alterar los estados de fosforilación o acetilación (Terry, 2012). Esto afectaría a distintos procesos celulares entre los que se incluyen la regulación del ciclo celular, la remodelación de la cromatina, la replicación del ADN, la transcripción, la función de las proteínas chaperonas y la remodelación del citoesqueleto (Lockridge y Schopfer, 2010). Estudios recientes encontraron además que la formación de aductos en los residuos de lisinas, específicamente en los plaguicidas OP como el clorpirifos, diazinón y diclorvos, son capaces de generar entrecruzamientos isopeptídicos con residuos de ácido glutámico o aspártico dentro de la misma proteína. (Lockridge y Schopfer, 2023) La formación de este enlace covalente resulta en agregados de mayor peso molecular, principalmente identificados en la tubulina durante ensayos *in vitro* (Schopfer y Lockridge, 2018). Aunque aún no se ha evaluado la relevancia toxicológica de la formación de estos agregados, los autores sugieren que dichos agregados isopeptídicos podrían estar relacionados con los efectos no colinérgicos de los compuestos OP.

Entre las proteínas identificadas como potenciales blancos no colinérgicos de los compuestos OP, encontramos a la actina, la tubulina, algunas proteínas de filamentos intermedios (Tabla 1) y otros componentes principales del citoesqueleto.

Tabla 1. Proteínas identificadas con aductos de OP en residuos de tirosina y/o lisina.

Proteína	Péptido	Referencia
Albúmina humana	NALLVRY ₄₁₁ TKKVPQ AFK ₂₁₂ AWAVAR K ₄₁₄ VPQVSTPTLVEVSR Y ₄₁₁ TKK ₄₁₄ VPQVSTPTLVEVSR LK ₁₉₉ CASLQK LAK ₃₅₁ TYETTLEK	(Li, <i>et al.</i> , 2007)
Albúmina bovina	NALIVRY ₄₁₀ TRKVPQ	(Schopfer, <i>et al.</i> , 2005)
Albúmina de ratón	NAILVRY ₄₁₁ TQKAPQ YEKLGEY ₄₀₁ GFQNAI	(Lockridge y Schopfer, 2010)
Alfa tubulina bovina	EVRTGTY ₈₃ RQLFHP DVNAAIATIK ₃₃₆ TK LSVDY ₁₆₁ GK ₁₆₃ K LDHK ₃₉₄ FDLMYAK	(Grigoryan <i>et al.</i> , 2008)
Beta tubulina bovina	EATGGK ₅₈ Y ₅₉ VPRAVL SRGSQQY ₂₈ 1RALTVP SKIREEY ₁₅₉ PDRIMN	(Grigoryan <i>et al.</i> , 2008)
Beta tubulina de ratón	LERINVY ₅₀ Y ₅₁ NEATGN	(Schopfer <i>et al.</i> , 2010)
Transferrina humana	RKPVDEY ₂₅₇ KDCHLA RKPVEEY ₅₉₃ ANCHLA	(Li <i>et al.</i> , 2009)
Kinesina Humana	YLVRASY ₁₅₇ LEIYQE	(Grigoryan, <i>et al.</i> , 2009)
Transferrina de ratón	RKPVQDY ₂₅₇ EDCY ₂₆₁ LARIPS	(Li <i>et al.</i> , 2009)
ATP sintasa de ratón	QKILQDY ₄₃₁ KSLQDI	(Grigoryan, <i>et al.</i> , 2009)
Queratina 1 humana	LEQQNQVLQTK ₂₁₁ WELLQQVD TSTR	(Grigoryan, <i>et al.</i> , 2009)
Actina bovina	VAPEEHPTLLTEAPLNPK ₁₁₃ AN DLTDYLMK ₂₉₁ ILTER EITALAPSTMK ₃₂₆ IK	(Grigoryan, <i>et al.</i> , 2009)
Cofilina 1 y 2	YALY ₈₅ DATYETK	(Bui-Nguyen, <i>et al.</i> , 2014)

1.1.3 OP y el Citoesqueleto

Estudios *in vitro* demuestran que la exposición a plaguicidas OP puede alterar la morfología y la organización del citoesqueleto, así como modificar algunas

funciones que requieren de una re-organización de sus componentes. En 2001, Carlson y Ehrich observaron que la exposición a paratión y paraoxón en células de neuroblastoma SH-SY5Y, produce una disminución en el contenido de microfilamentos de actina y una reorganización de la proteína, cambiando de filamentos a señales punteadas (Carlson y Ehrich, 2001). En 2003, Cabello y colaboradores encontraron que la exposición a malatión (16 a 128 $\mu\text{g/ml}$) ocasionaba cambios morfológicos, aparición de vacuolas perinucleares, así como pérdida de adhesión de las células de cáncer de mama MCF-7. Estos cambios se explicaron por la disminución de la expresión de moléculas de adhesión como la E-cadherina y la β -catenina, así como cambios en la distribución de los microfilamentos, pérdida de la señal de la faloidina conjugada con isocianato de tetrametil rodamina B (marcador de actina) y deformación de estructuras tipo lamelipodios, además de un aumento en la expresión de las GTPasas RhoA y Rac1 (Cabello *et al.*, 2003).

Por su parte, Schafer y colaboradores en 2013 observaron alteraciones en la morfología de células dendríticas derivadas de la línea celular THP-1 tras la exposición a plaguicidas OP tales como dimetoato y clorpirifos, pues registraron un acortamiento y daño de las dendritas de estas células. Además se observó la reducción de la fosforilación y la actividad de proteínas implicadas en vías de señalización como Akt y ERK (Schäfer *et al.*, 2013). En 2014, Bui-Nguyen y colaboradores encontraron que la exposición a diclorvos en células hepáticas humanas HepaRG generó aductos con distintas proteínas, entre las que encontraron actina, tubulina y cofilina. Además, encontraron que la exposición por 4 h era suficiente para incrementar la cantidad de proteínas como actina y tubulina, y de manera contraria, una exposición por 24 h causaba una reducción en la concentración relativa de proteínas estructurales, así como de proteínas reguladoras del citoesqueleto. Un análisis *in silico* de sus resultados reveló que la formación de aductos de diclorvos podría afectar múltiples funciones celulares como la adhesión y la remodelación, la diferenciación y el transporte celular (Bui-Nguyen *et al.*, 2014). El grupo de Terry y colaboradores ha reportado que la exposición a concentraciones nanomolares de clorpirifos, clorpirifos oxón y

diisopropilfluorofosfato (DFP) puede alterar el transporte vesicular en axones de células nerviosas de ratas. Dado que el efecto fue similar entre estos plaguicidas OP, los autores sugieren que a pesar de las diferencias químicas, los compuestos OP afectan de manera similar el transporte vesicular anterógrado (Gao *et al.*, 2017; 2016).

Por otro lado, en un estudio previo describe que el metabolito dialquilfosfato metilado DMTP indujo la formación de micronúcleos a partir de efectos aneuploidogénicos (Hernández-Toledano *et al.*, 2020), es decir, por la alteración de los elementos de la maquinaria de segregación cromosómica, entre los que destacan el citoesqueleto de tubulina y sus proteínas motoras, lo que sugiere que al igual que otros compuestos OP, los metabolitos DAP podrían afectar elementos del citoesqueleto.

1.2 Citoesqueleto

El citoesqueleto es una estructura dinámica que se extiende desde la membrana plasmática y la envoltura nuclear y tiene como función dar forma y mantener la organización interna de la célula, además de proveer soporte mecánico que permite a las células llevar a cabo funciones esenciales como la replicación, la diferenciación y el movimiento. El citoesqueleto se compone de distintos elementos entre los cuales destacan los microfilamentos de actina, los microtúbulos (MT) de tubulina y otras proteínas que conforman los filamentos intermedios (Ramaekers y Bosman, 2004).

1.2.1 Actina

Los microfilamentos (F-actina) de aproximadamente 7 nm de diámetro, son uno de los tres componentes filamentosos del citoesqueleto, los filamentos consisten principalmente de actina monomérica, la cual forma un polímero helicoidal de moléculas de actina globular (G) y algunas proteínas de unión a actina, que en conjunto contribuyen a formar varios tipos de estructuras de (Ohashi *et al.*, 2017). La red de microfilamentos de actina es importante para formar las estructuras subcelulares que participan en distintas funciones celulares tales como la forma de

la célula, el movimiento y el tráfico de membranas como la fagocitosis y la autofagia (Mostowy y Shenoy, 2015).

1.2.2 Tubulina

Los MT son polímeros largos formados por 13 protofilamentos asociados covalentemente y conformados por heterodímeros de alfa/beta tubulina que forman tubos huecos de aproximadamente 25 nm de diámetro (Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2004). En conjunto los MT con las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) y proteínas motoras como las dineínas y las kinesinas, participan en varias actividades celulares como el transporte vesicular, la formación del huso mitótico, la formación de cilios y la polarización de células (Ohashi *et al.*, 2017).

1.2.3 Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios son estructuras de aproximadamente 10 nm de diámetro. Las proteínas de estos filamentos las codifican poco más de 65 genes. Las proteínas están repartidas en una clasificación de 5 tipos, de acuerdo con sus dominios, secuencia y la estirpe celular. La queratina, la vimentina, la desmina, la periferina y la proteína ácida fibrilar glial, y los neurofilamentos son ejemplos de estas proteínas, las cuales tienen diversas funciones específicas dependiendo del tipo celular (Oshima, 2007). Estos filamentos no polares poseen un comportamiento menos dinámico que los MT, sin embargo, son estructuras móviles y flexibles que proveen, entre otras cosas, mecano-protección, además de regular una variedad de señales de crecimiento y estrés celular (Mostowy y Shenoy, 2015).

1.2.4 GTPasas

En el funcionamiento del citoesqueleto, además de los elementos filamentosos, participan proteínas reguladoras del citoesqueleto, tales como las proteínas de la familia de las Rho GTPasas, principalmente RhoA, Rac1 y Cdc42. Se requiere la activación de estas proteínas para dirigir distintos procesos celulares como la citocinesis, la adhesión y la motilidad, así como el tráfico vesicular, la pinocitosis y la fagocitosis (Collard, 1996) (Figuras 4 y 5). Las Rho GTPasas pueden encontrarse

en dos estados interconvertibles; un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP, funcionando como interruptores. Los cambios entre los estados unido GTP o GDP se regulan por inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI), proteínas activadoras de GTPasas (GAP) y factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), encargados de catalizar el intercambio entre GTP y GDP (Biro *et al.*, 2014).

Una vez que se activan, las proteínas de la familia Rho pueden cumplir diversos papeles en la remodelación del citoesqueleto. RhoA influye directamente en la generación de la fuerza contráctil, vía miosina, a través de las cinasas asociadas a Rho (ROCK), así como en la cinética de la polimerización de actina a través de las forminas como mDia, necesaria para formar fibras de estrés y puntos de adhesiones focales. Durante la migración, favorece la maduración de sitios de adhesión definiendo la parte posterior de la célula, también conocida como urópodo (Mammoto *et al.*, 2004). Las GTPasas Rac son moduladoras pleiotrópicas de una variedad de procesos celulares, incluyendo la dinámica de polimerización de la actina y la formación de protrusiones de tipo laminar tales como lamelipodios o prolongaciones temporales con filamentos de actina ramificados conocidos como pseudópodos, que definen el frente de la célula. La formación de estas estructuras ocurre vía proteínas de la familia WAVE para activar al complejo Arp2/3, implicado en la nucleación de actina (Biro *et al.*, 2014) (Figura 4).

Por su parte, Cdc42 es uno de los principales moduladores del citoesqueleto, ya que participa en procesos como la migración, la polarización de las células y el tráfico vesicular (Figura 5). Se requiere Cdc42 activa para formar lamelipodios y filopodios vía proteínas de la familia WASp y Arp2/3, que son necesarios para dar dirección durante la migración celular (Biro *et al.*, 2014). Cdc42 también participa en la polaridad de la célula al contribuir en la localización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y el aparato de Golgi durante procesos como la migración y la fagocitosis (Ridley *et al.*, 2003).

Para cumplir de manera eficiente con distintas funciones celulares, se requiere de una regulación fina del citoesqueleto que permita la reorganización de las

membranas, la localización de receptores, el reclutamiento de intermediarios de vías de señalización, cambios en la morfología de las células, así como la inducción y/o inhibición de actividades celulares que lleven a la activación, la proliferación y la supervivencia (Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2004).

1.2.5 Cinasas

Además de las GTPasas pequeñas, las cinasas de la familia Src (SFK) tienen un papel importante en el funcionamiento del citoesqueleto. Estas cinasas regulan vías de señalización río abajo de varios receptores de membrana implicados en el desarrollo, la adhesión y la migración celular, así como en la función de células inmunes. Por ejemplo, cinasas como Src, Hck, Fgr y Lyn participan en la motilidad, así como en la formación de la copa fagocítica y polimerización de actina en macrófagos (Abram, 2008; Berton *et al.*, 2005).

Aunque el citoesqueleto es importante en todos los tipos celulares, en algunas de las células como las del sistema inmune cumple mayor cantidad de funciones, ya que participa en más funciones esenciales como: activación, migración, la fagocitosis, la presentación de antígenos, secreción de citocinas, reciclamiento de receptores, el tráfico vesicular y las interacciones célula-célula.

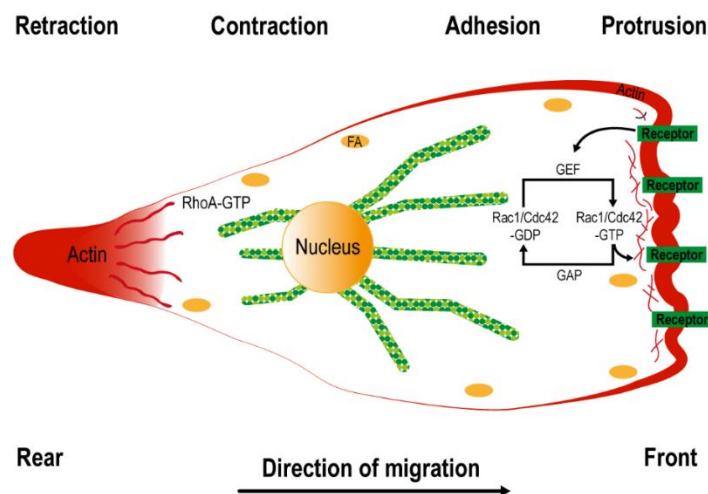


Figura 4. Representación esquemática de la migración celular dividida en 4 fases: la generación de protrusiones delanteras, adhesión celular, contracción para la generación de la fuerza requerida para la movilidad y la retracción del extremo posterior. MTC, centro organizador de MT; FA, adhesiones focales; GAP, proteínas activadoras de GTPasas; GEF, factor intercambiador de guanina; (Modificado de Simon y Hilbi, 2015).

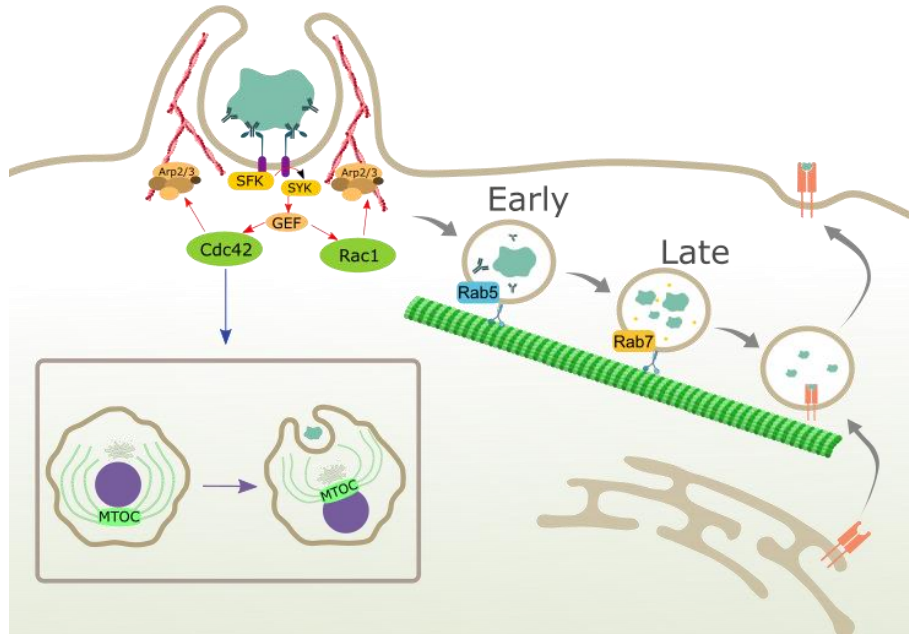


Figura 5. Esquema representativo del papel del citoesqueleto durante la fagocitosis mediada por receptores de la fracción cristalizante gamma (Fc γ R) y presentación de antígenos. Una vez reconocido el antígeno, las cinasas de la familia Src (SFK) se encargan de activar las GTPasas pequeñas para la formación de la copa fagocítica, la reubicación del centro organizador de microtúbulos (MTOC), así como de atraer MT que faciliten el transporte del fagosoma y la presentación de antígenos (Modificado de Wen-*et al.*, 2016).

Por ejemplo, la activación de la respuesta inmune adquirida está mediada por la presentación de antígenos por parte de células presentadoras (APC), tales como los macrófagos y las células dendríticas, sirviendo como una interfaz entre ambos tipos de respuesta (innata y adquirida). Durante este proceso, las células requieren de una reorganización de sus componentes, dando una orientación y generando una polaridad en la célula, el aumento de la expresión de receptores para facilitar el reconocimiento de antígenos y células efectoras, cambios de morfología como la generación de estructuras celulares como lamelipodios y filopodios que permita el movimiento y la fagocitosis, así como del transporte vesicular durante el procesamiento de antígenos y secreción de citocinas. En éstos procesos los componentes del citoesqueleto se vuelven esenciales para mantener las funciones de las células inmunes (Lin y Wang, 2017).

1.3 Respuesta Inmune

El sistema inmune se compone de un conjunto de células, tejidos y sus productos solubles que reconocen, atacan y destruyen entidades internas o externas que amenazan con poner en riesgo la salud de un individuo (Cruse *et al.*, 2004). Para ello, el sistema inmune puede montar dos tipos de respuestas, una respuesta innata y la respuesta adaptativa.

La respuesta innata no depende de una exposición previa a un antígeno. Esta incluye barreras físicas, moléculas del complemento, citocinas y células fagocíticas. Mientras que la respuesta adquirida es un mecanismo de protección contra un agente particular, infeccioso, patógeno, exógeno o interno alterado (antígeno). Esta respuesta es mediada por linfocitos T y B, después de la exposición al antígeno y se caracteriza por ser específica, tener memoria y capacidad de identificar entre lo propio y lo extraño (Mak *et al.*, 2014).

La renovación, la activación y la diferenciación de las células inmunes es necesaria para mantener un estado fisiológico inmunocompetente, ya que una alteración en cualquiera de sus funciones podría incrementar el riesgo del desarrollo de enfermedades, tales como el cáncer, la hipersensibilidad y la autoinmunidad. Cuando un compuesto puede alterar una o más funciones inmunes se conoce como un compuesto inmunotóxico (Corsini *et al.*, 2013).

1.3.1 Inmunotoxicidad de los Compuestos OP

En los últimos 30 años han surgido reportes que indican que algunos compuestos OP pueden afectar la respuesta del sistema inmune, provocando cambios histopatológicos en tejidos y órganos inmunes y alteraciones en la maduración y función de poblaciones de leucocitos (Galloway y Handy, 2003).

Hermanowicz y Kossman reportaron que la exposición ocupacional a mezclas de plaguicidas OP estaba asociada con un aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas en vías respiratorias. Así mismo, reportaron alteraciones en la adherencia de las células polimorfonucleares extraídas de los individuos de estas poblaciones (Hermanowicz y Kossman, 1984). Otro estudio señala que una pre-

exposición a plaguicidas OP puede afectar la resolución de infecciones. En este caso, personas con leishmaniasis cutáneas expuestas crónicamente a clorpirifos tuvieron infecciones con síntomas más graves y un retraso en la curación de lesiones/infecciones a pesar de ser tratados con medicamentos en comparación con personas con la infección pero sin exposición a los plaguicidas (Al-Dawood, *et al.*, 2009). Así mismo, estudios *in vivo* e *in vitro* reportan los efectos de los compuestos OP sobre células inmunes y su actividad. En la Tabla 2 se muestran algunos de estos estudios.

Tabla 2. Efectos de compuestos OP sobre células inmunes.

Organismo	OP	Efecto en sistema inmune	Referencia
Codorniz Japonesa	Malatión	↑ morbilidad, ↓ población de linfocitos	(Nain <i>et al.</i> , 2011)
Humanos	Diclorvos, DIMP, DEMP	Alteración en la vía de exocitosis, ↓ perforinas y granzimas, ↓ actividad citotóxica de NK y CTL	(Li y Kawada, 2006)
Ratas albinas	Malatión Metilparatión	↓ actividad fagocítica de NK ↓ citotoxicidad dependiente anticuerpos	(Zabrodskii, 2018)
<i>Chilina gibbosa</i>	Azinfos metil	↓ de actividad fagocítica de hialinocitos	(Herbert <i>et al.</i> , 2018)
Ratones Balb/c	Sarín	↓ de actividad fagocítica de macrófagos peritoneales y pulmonares	(Kassa <i>et al.</i> , 2004)
Células RAW264.7	Diazinon	↓ de actividad fagocítica y aumento de expresión de MHCII y proteínas asociadas a presentación de antígenos (CD40, CD80 y CD86).	(Ogasawara <i>et al.</i> , 2017)

1.3.1.1 Inmunotoxicidad de los DAP

Existen evidencia de que los DAP pueden tener un efecto sobre las células de la respuesta inmune a varios niveles. Por ejemplo, Esquivel Sentíes y colaboradores mostraron que la exposición a DEDTP (1-50 μ M), uno de los DAP etilados,

disminuyó la proliferación, la secreción de citocinas como la interleucina (IL)-2, la IL-10 y el interferón (IFN)- γ en linfocitos T CD4+ aislados de muestras de sangre humana. También reportaron alteración en los estados de fosforilación de proteínas intracelulares como ERK, JNK, p38 y SOCS3, llegando a la conclusión que la exposición a DEDTP puede alterar vías de señalización ocasionando que las células T no puedan responder a futuros retos antigénicos (Esquivel-Sentíes *et al.*, 2010).

En 2016, un estudio preliminar encontró que la exposición a dos metabolitos etilados, DETP y DEP a concentraciones de 1 a 5 μ M, disminuyó la actividad citolítica de células NK aisladas de ratones Balb/c hembras co-cultivadas con células linfoides humanas K562 (Cibrian *et al.*, 2016). Este hallazgo concuerda con lo reportado por Li y colaboradores quienes reportaron la disminución, dependiente de la concentración (0-4 mM), de la actividad citolítica de células NK humanas y murinas *in vitro* tras la exposición a plaguicidas OP como el diclorvos y el dimetoato, así como a subproductos de la síntesis del sarín como el DIMP y el DEMP por 4 h (Li *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Li y Kawada, 2006).

En 2019, Medina Buelvas y colaboradores reportaron que la administración única del metabolito etilado DEDTP (0.01 g/kg i.p.) incrementó la concentración de IL-10 y IL-6 en ratones C57BL/6J después de una semana de la exposición, e incrementó la cantidad de macrófagos antiinflamatorios M2 en ratones Balb/c tras 20 días después de la exposición. Además, la exposición a DEDTP también causó un incremento en el área y volumen de tumores inducidos en ratones C57BL/6J y Balb/c (Medina-Buelvas *et al.*, 2019), sugiriendo la modificación de la respuesta inmune ante un reto antigénico.

Así mismo, en el trabajo doctoral de Medina-Buelvas, se reportó que la administración de DEDTP (0.01 g/kg i.p.) 24 h previas a la infección parasitaria por *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino, incrementó la carga parasitaria y el daño cardíaco causado por un incremento del infiltrado de células inflamatorias y la fibrosis. El análisis de los macrófagos peritoneales de estos ratones Balb/c mostró un incremento en la proporción de macrófagos M2, especialmente las subpoblaciones M2a, M2b y M2d (Medina-Buelvas *et al.*, 2019b). Además, estos

macrófagos presentaron una disminución en la actividad fagocítica aproximadamente en un 50% de macrófagos M1, M2a y M2c. Mientras que el tratamiento con DEDTP 0.1 μ M incrementó la migración celular de macrófagos peritoneales en un ensayo de cierre de herida tras 96 h (Medina-Buelvas, 2019).

La presencia de efectos inmunotóxicos relacionados con las exposiciones a plaguicidas OP y/o sus DAP podrían indicar la presencia de blancos moleculares implicados en las diferentes actividades celulares que comprenden la vigilancia inmunológica. Para cumplir adecuadamente estas funciones, es necesario un citoesqueleto finamente regulado y con la capacidad de reorganizarse durante los procesos de activación, proliferación, diferenciación, secreción, interacciones celulares y fagocitosis. Dado que los elementos del citoesqueleto pueden verse modificados por los plaguicidas OP, resulta de interés evaluar la capacidad de los OP y los DAP de afectar actividades celulares, como la migración y la fagocitosis, a través de la evaluación de la organización del citoesqueleto.

1.2 Justificación

Además de los efectos asociados a la inhibición de la AChE, los compuestos OP, como plaguicidas, agentes de guerra y sus metabolitos, pueden afectar los componentes del citoesqueleto. Éste es un sistema complejo de fibras y proteínas asociadas, importantes para mantener la morfología celular, y para realizar diversas funciones como la migración, la fagocitosis, la división celular y el transporte vesicular.

Estudios previos muestran que la exposición a diversos compuestos OP, incluyendo al DMTP, un metabolito dialquilfosfato, induce micronúcleos como consecuencia de afectaciones en la maquinaria de segregación de cromosomas. Los DAP son capaces de inducir efectos inmunotóxicos al disminuir la actividad citolítica, la secreción de citocinas, la fagocitosis y un incremento en la migración en células como linfocitos, células NK y macrófagos, las cuales cuentan con un citoesqueleto altamente dinámico. Por lo tanto, es posible que los compuestos OP como el

malatión y sus metabolitos DAP afecten las funciones de estas células de la respuesta inmune como resultado de la alteración de los elementos del citoesqueleto y/o sus proteínas asociadas.

1.3 Hipótesis

Si los compuestos OP, como el malatión y sus metabolitos DAP, impiden la polimerización, la organización y/o la función de microfilamentos y MT de actina y tubulina, entonces se disminuirán procesos celulares como la migración y la fagocitosis en macrófagos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

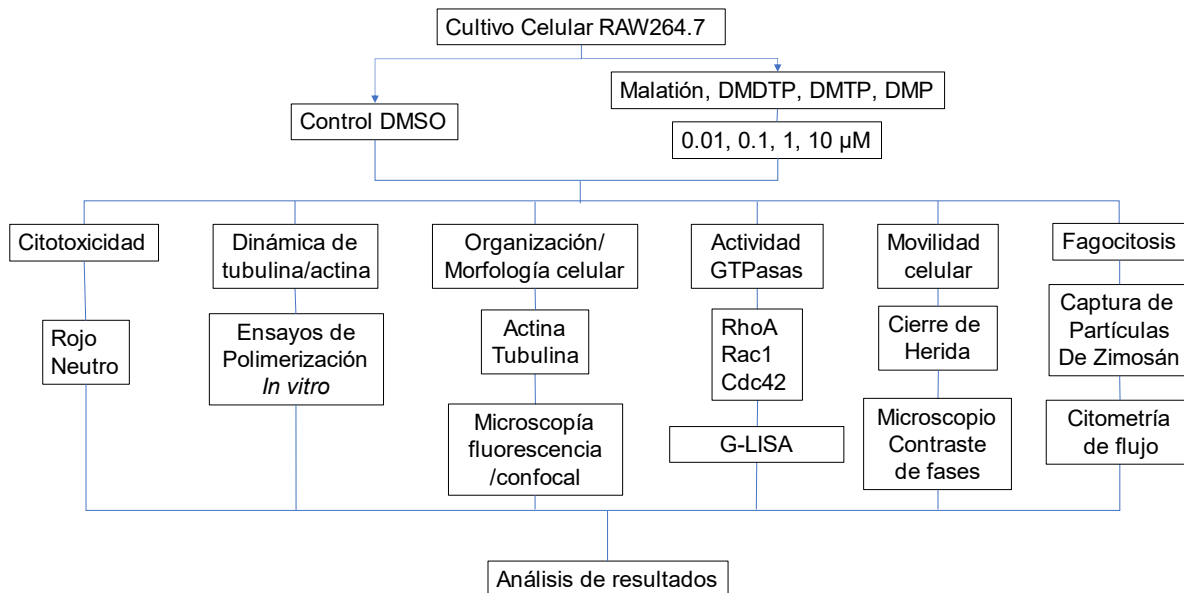
Evaluar el efecto del malatión y sus DAP sobre los componentes del citoesqueleto de actina y tubulina de macrófagos y su asociación con la movilidad y la fagocitosis.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto del malatión y sus DAP sobre la dinámica de la actina y la tubulina por medio de ensayos de polimerización acelular.
- Determinar el efecto del malatión y sus DAP sobre la morfología y la organización del citoesqueleto de macrófagos mediante microscopía confocal.
- Estudiar el efecto del malatión y sus DAP sobre las GTPasas de la familia Rho (RhoA, Rac1 y Cdc42) mediante ensayos de actividad (G-LISAS).
- Cuantificar el efecto del malatión y sus DAP sobre la migración de macrófagos mediante el ensayo de cierre de herida.
- Evaluar el efecto del malatión y sus DAP sobre el proceso de fagocitosis mediante el ensayo de captura de partículas de zimósán.

2. MÉTODOS

2.1 Estrategia Experimental



2.2 Línea Celular RAW264.7

2.2.1 Características

La línea celular RAW264.7 se compone de células murinas de tipo monocito/macrófago semi-adherentes establecidas a partir de líquido ascítico de un tumor inducido con el virus de leucemia de Abelson en ratones Balb/c machos (Taciak *et al.*, 2018). Estas células mantienen la capacidad de realizar procesos como pinocitosis, fagocitosis, producción de óxido nítrico (NO), sensibilidad a agonistas de receptores Toll-like (TLR) y motilidad (Bowdish, 2016). En su membrana expresan marcadores de macrófagos maduros como Mac-1, Mac-2 y F4/80 (Leenen, Jansen y van Ewijk *et al.*, 1986) y expresan proteínas reguladoras del citoesqueleto como RhoA, Rac1 y Cdc42 (Ueta *et al.*, 2019). Se describen como un cultivo genéticamente heterogéneo. Los macrófagos llevan a cabo diferentes funciones celulares como parte de su capacidad de vigilancia inmunológica, muchas de ellas asociadas con la modificación constante de membranas y elementos del citoesqueleto, lo que permite ser un modelo para la evaluación de efectos sobre el citoesqueleto.

2.2.2 Cultivo

Las células RAW264.7 se incubaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina (200 mM) y 1% de antibiótico-antimicótico 100X (penicilina 10,000 U/ml, estreptomina 10,000 µg/ml, 9 anfotericina B 25 µg/ml) a 37 °C en cámara húmeda con 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80%, posteriormente se subcultivaron. Se removió el medio de cultivo de las células y se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄ y 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4). A la caja de cultivo se le agregó una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en PBS a una concentración de 5 mM, pH 8, temperada a 37 °C en cantidad suficiente para cubrir la superficie de la caja. El cultivo se incubó por 5 min, y con ayuda de una micropipeta se desprendieron las células. Cuando más del 90% de las células estaban desprendidas se les agregó 2 ml de medio de cultivo y la suspensión celular se recuperó en un tubo falcon de 15 ml, el cual se centrifugó a 420 × g por 5 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 ml de medio de cultivo a 37 °C. El número de células se determinó empleando un hemocitómetro y la tinción con azul de tripano (1:1) para realizar el ajuste de la densidad celular requerida en cada ensayo. Las células se sembraron y se mantuvieron a 37 °C en condiciones húmedas con 5% de CO₂. Las células se utilizaron durante los primeros 8 pases.

2.3 Cultivo Celular GM03440

2.3.1 Características

Las células GM03440 provienen de un cultivo primario de fibroblastos humanos no transformados obtenidos de la biopsia de piel de la pierna de un donante masculino aparentemente sano. Estas células mantienen la morfología típica de los fibroblastos, además de mantener la formación de estructuras especializadas de actina como las fibras de estrés.

2.3.2 Cultivo

Las células GM03440 se incubaron en medio MEM (*Minimum Essential Medium*) suplementado con 15% de SFB y 1% de aminoácidos no esenciales (10 mM) a 37 °C en condiciones húmedas con 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 90%, posteriormente se subcultivaron. 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-EDTA a una concentración de 0.25 mg/ml, temperada a 37 °C en cantidad suficiente para cubrir la superficie de la caja. El cultivo se incubó por 2 min para despegar las células. Cuando más del 90% de las células estaban desprendidas se les agregó 2 ml de medio de cultivo fresco y la suspensión celular se recuperó en un tubo de 15 ml, el cual se centrifugó a 420 × g por 5 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 ml de medio de cultivo a 37 °C. El número de células se determinó empleando un hemocitómetro y la tinción con azul de tripano (1:1) para realizar el ajuste de la densidad celular requerida en cada ensayo. Las células se sembraron y se mantuvieron a 37 °C en condiciones húmedas con 5% de CO₂. Las células se utilizaron durante los primeros 5 pases.

2.4 Tratamientos

Los tratamientos se prepararon a partir de soluciones stock (0.2 M) de los compuestos OP: malatión, DMDTP, DMTP y DMP en dimetilsulfóxido (DMSO) y se conservaron a -20 °C. Para las soluciones de trabajo, las soluciones stock se diluyeron en medio de cultivo según fue necesario para alcanzar las concentraciones deseadas. Las células se trataron con malatión, o los metabolitos DMDTP, DMTP y DMP o DMSO al 0.05% como control del vehículo. Las concentraciones de los OP (0.01-10 µM) fueron elegidas a partir de las concentraciones encontradas en poblaciones expuestas a OP (Michalakis *et al.*, 2014; Tsatsakis *et al.*, 2009). Para la inhibición de las GTPasas Rac1 y Cdc42, se prepararon soluciones stock de NSC23766 (94 mM) y ML-141 (122 mM) en DMSO. Las soluciones stock se diluyeron en DMEM para obtener soluciones de trabajo de NSC23766 (25 µM) y de ML-141 (10 µM).

2.5 Viabilidad por Incorporación de Rojo Neutro

2.5.1 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. La citotoxicidad se expresa como la reducción de la incorporación del RN después de la exposición al xenobiótico de interés en comparación con el control negativo (sin exposición al compuesto de interés) (Borenfreund y Puerner, 1985).

2.5.2 Procedimiento

Las células RAW264.7 fueron cultivadas en placas de 96 pozos a una densidad de 2×10^4 células/pozo. Después de 45 h de incubación con los tratamientos de malatión, DAP (0.01-10 μM) o NaAsO_2 (20 μM) como control positivo de muerte celular, se retiró el medio de cultivo y los pozos se lavaron con 250 μl de PBS estéril, posteriormente se adicionaron 250 μl por pozo de una solución de RN (25 $\mu\text{g/ml}$ disuelto en PBS estéril, pH 6.8) y se incubaron por 2 h más a 37 °C y 5% CO_2 . Al término de la incubación se retiró el medio de cultivo y los pozos se lavaron con PBS estéril. Posteriormente, se agregó 100 μl de una solución recién preparada de agua destilada/etanol absoluto/ácido acético glacial (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 con respecto al vehículo (DMSO 0.05%). Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado para cada tratamiento.

2.6 Ensayo *in vitro* de Polimerización de Actina

2.6.1 Principio

Este ensayo emplea monómeros de G-actina marcados con pireno, que al polimerizarse y formar F-actina aumenta la cantidad de fluorescencia generada por el pireno. Dicha fluorescencia se registra en el tiempo utilizando un fluorómetro. La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de actina polimerizada.

2.6.2 Procedimiento

Se preparó una solución amortiguadora de actina (0.15 mg/ml) (5 mM Tris HCl, pH 8.0 y 0.2 mM CaCl₂). La solución se mantuvo en hielo durante una hora para favorecer el desacoplamiento de los polímeros de F-actina. Posteriormente, la solución se centrifugó a 20854 × g a 4 °C durante 30 min. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en hielo. De esta solución se agregó 100 µl por pozo en una placa de 96 pozos de fondo oscuro que se colocó dentro del fluorómetro TECAN Infinite 200 y se determinó la fluorescencia basal por 3 min a una longitud de onda de excitación de 365 nm y 407 nm de emisión. Transcurrido este tiempo se agregaron los tratamientos con los compuestos OP o DMSO al 0.05% como control negativo, y un control positivo de polimerización que consistió únicamente en la solución inductora de polimerización, el volumen final de los tratamientos fue de 10 µl. El registro de los datos continuó por 20 min con el fin de evaluar si los compuestos pudieran inducir la polimerización de la actina. Posteriormente, a cada pozo se agregó la solución amortiguadora de polimerización (50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.005 M carbonato de guanodina y 1 mM ATP) y el registro continuó por 100 min más. Los resultados que se obtuvieron se graficaron y, a partir de las curvas que se obtuvieron, se estimaron los valores de la intensidad máxima de fluorescencia, la velocidad de polimerización y el tiempo medio de polimerización en la porción lineal de las curvas, tal como está descrito en la literatura (Doolittle *et al.*, 2013). Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado para cada condición.

2.7 Ensayo *in vitro* de Polimerización de Tubulina

2.7.1 Principio

Este ensayo acelular se basa en que la formación de MT (promovida por la presencia de iones de magnesio y guanosina trifosfato (GTP); la polimerización de la tubulina genera turbidez en el medio que se puede detectar por cambio en la absorbancia de la solución a 350 nm.

2.7.2 Procedimiento

Se preparó una solución de tubulina porcina en una solución amortiguadora GPEM (80 mM PIPES, 1 mM MgCl₂ y 1 mM GTP, en 10% de glicerol) hasta alcanzar una concentración de 2 mg/ml. La solución se mezcló de dos a tres veces con una micropipeta y se conservó en hielo. En una placa de 96 pozos precalentada a 37 °C, se colocó 5 µl de las soluciones con los tratamientos a una concentración 10X, así como DMSO al 0.05% como control del vehículo y 3 µM de paclitaxel como control positivo de polimerización de la tubulina. La placa se incubó por 1 min a 37 °C y posteriormente se agregó 50 µl de solución de tubulina por pozo. Las absorbancias de las muestras se registraron inmediatamente usando un lector de placa de fluorescencia TECAN infinite 200 a una longitud de onda de excitación de 350 nm y 407 nm de emisión durante 90 min, manteniendo la placa a una temperatura de 37 °C. Los datos se graficaron para determinar los valores de la intensidad máxima de fluorescencia, la velocidad de polimerización y el tiempo medio de polimerización en la porción lineal de las curvas. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado para cada condición.

2.8 Evaluación de la Morfológica de las Células por Microscopía de Fluorescencia

2.8.1 Principio

La microscopía de fluorescencia se basa en la iluminación fluorescente de proteínas u otras moléculas intracelulares con una longitud de onda definida, cercana al punto máximo del espectro de excitación del fluoróforo empleado y la detección de la luz emitida a una longitud de onda mayor (Ettinger y Wittmann, 2014). Esta técnica

permite la identificación de estructuras tales como los filamentos del citoesqueleto al marcar proteínas asociadas a este, haciendo visible su estructura, mientras que, otras estructuras celulares se mantienen invisibles permitiendo su evaluación (Herberich *et al.*, 2010).

2.8.2 Procedimiento

Las células RAW264.7 se cultivaron sobre cubreobjetos redondos de 18 mm en una caja de 12 pozos a una densidad de 100,000 células/pozo con medio DMEM con 0.5% de SFB suero fetal bovino durante 12 h. Las células se trataron con los compuestos OP a una concentración de 0.01 y 1 μ M, como control negativo se empleó DMSO al 0.05% y como control positivo de la modificación del citoesqueleto se utilizó forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a una concentración de 50 nM. Después de 2 h de tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X a 37 °C en tres ocasiones durante 5 min y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% a 37 °C por 10 min. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X en tres ocasiones y se permeabilizaron con Tritón X100 al 1% durante 20 min a temperatura ambiente. Para teñir la tubulina, las células se incubaron con una solución bloqueadora de BSA al 5% y Tritón X100 al 0.1% en PBS, por una hora a temperatura ambiente. Las células se trataron con una solución de anticuerpo anti-alfa tubulina (B-7, sc-5286, Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:50 por 2 h en una cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron con una solución de Tritón X100 al 1% por 5 min en tres ocasiones para retirar el exceso de anticuerpo primario. Posteriormente, las muestras se incubaron con una solución del anticuerpo secundario anti-ratón IgG conjugado con Alexa 488 (1:500) (ab150105, Abcam) y con faloidina conjugada con isocianato de tetrametilrodamina (TRITC) para marcar los microfilamentos de actina en una dilución 1:250. Las muestras se incubaron por 2 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Las células se lavaron en 3 ocasiones con Tritón X100 al 0.1%, y posteriormente con agua desionizada. A continuación, las muestras se montaron en portaobjetos con el medio Vectashield con DAPI (H-1200, Vector Laboratories). Los bordes de los cubreobjetos se sellaron con barniz de uñas transparente y las muestras se dejaron

secar durante al menos una hora. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado para cada condición. Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 para evaluar la morfología celular y se clasificaron las células de 10 campos aleatorios por muestra con ayuda de las herramientas “count/size” y “sorting tool” del software Image Pro-Plus versión 5.0. La organización del citoesqueleto de actina y tubulina se evaluó mediante el microscopio confocal TCS SP8 (Leica Microsystems), mientras que la identificación y cuantificación de los filopodios se realizó con ayuda del plugin FiloQuant (versión 1.0) (Jacquemet *et al.*, 2017) del software ImageJ.

2.9 Ensayo de Cierre de Herida

2.9.1 Principio

El ensayo de cierre de herida (“wound healing”) es un método desarrollado para evaluar la migración celular *in vitro*. Está basado en la observación de la migración celular hacia una herida creada en una monocapa de células. En respuesta a la disponibilidad de espacio libre, las células en las orillas de la herida, las cuales ya no se encuentran inhibidas por contacto, proliferarán y se moverán hacia el centro de la región libre hasta cubrir la herida (Ascione *et al.*, 2017).

2.9.2 Procedimiento

Las células RAW264.7 se cultivaron en una caja de 24 pozos a una densidad de 200,000 células/pozo en medio DMEM suplementado con 0.5% de SFB, 1% de L-glutamina (200 mM) y 1% de antibiótico-antimicótico 100X a 37 °C en condiciones húmedas con 5% de CO₂ por 24 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron tratadas con mitomicina C (4 µg/ml) e incubadas por 2 h más. Al término de la incubación, se realizó la herida de manera vertical en la monocapa utilizando una punta de micropipeta de 200 µl, el medio se descartó y se realizaron dos lavados con PBS estéril. Se colocó el medio DMEM suplementado con los respectivos tratamientos a probar, empleando 50 nM de PMA como control positivo. Se identificaron y se fotografiaron dos campos de la herida por cada pozo a las 0 y 48 h. Las fotografías se analizaron con el software ImageJ para determinar el área del

cierre de la herida. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado para cada condición.

2.10 Ensayos de Actividad de GTPasas (G-LISAS)

2.10.1 Principio

El ensayo desarrollado por la compañía Cytoskeleton Inc., consiste en una técnica de ELISA que utiliza placas de 96 pozos que se encuentran recubiertos con una proteína efectora capaz de unirse a las GTPasas activas (unidas a GTP). Las proteínas activas presentes en los lisados celulares podrán unirse a los pozos, mientras que, las proteínas inactivas serán removidas durante los lavados. El grado de actividad de las GTPasas se calcula al comparar las lecturas entre lisados con proteínas activas contra aquellos que no cuenten con GTPasas activas.

2.10.2 Procedimiento

La evaluación de la actividad de las GTPasas RhoA, Cdc42 y Rac1 se realizó empleando los kits de activación G-LISA (BK124, BK127 y BK128, respectivamente) de la marca Cytoskeleton Inc. (Denver, CO, EE. UU.). Para ello, se sembraron 1.5×10^6 células RAW264.7 en cajas p60 y se incubaron con medio DMEM suplementado con 0.5% de SFB por 24 h. Posteriormente, los cultivos se trataron con DMSO al 0.05% (vehículo), los DAP o el malatión a $0.01 \mu\text{M}$ por al menos 5 min. Inmediatamente después, los cultivos se lavaron con PBS frío y se lisaron con solución de lisis fría (Tris pH7.5, MgCl_2 , NaCl, IGEPAL y SDS) suplementado con inhibidores de proteasas (pepstatina A $1 \mu\text{M}$, leupeptina $1.5 \mu\text{M}$, benzamidina 1mM y Na-p-tosil-L-arginin metil ester (TAME) 0.4mM). Los lisados se recuperaron en tubos eppendorf y se centrifugaron a 12,000 rpm ($15,322 \times g$) por 1 min a 4°C . Los sobrenadantes se recolectaron y se almacenaron a -70°C . Las muestras se ajustaron con solución de lisis para alcanzar una concentración de proteína de 0.5mg/ml . A cada muestra se le agregó un volumen igual de solución amortiguadora de unión y se colocaron en la placa tratada con las proteínas de efectoras de las GTPasas. La placa se incubó en agitación constante en un agitador orbital a 300 rpm por 30 min a 4°C . Después de ese tiempo, el sobrenadante se descartó y los pozos se lavaron en dos ocasiones con solución de lavado. Se agregó una solución

reveladora de antígenos y la placa se incubó por 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los pozos se lavaron y se agregaron 50 µl por pozo de la solución de anticuerpo anti-RhoA (1:250), anti-Rac1 (1:50) o anti-Cdc42 (1:20) según fue el caso. Se incubó por 45 min en agitación constante a 300 rpm. La placa se lavó nuevamente y se incubó con 50 µl por pozo de un anticuerpo secundario conjugado con HRP por 45 min en agitación a 300 rpm. Al término de este tiempo el sobrenadante se descartó y se agregaron 50 µl de la solución de detección de peroxidasa de rábano (HRP). La reacción se detuvo a los 15 min y se determinó la absorbancia en cada pozo usando el lector de microplacas Multiskan FC (ThermoFisher Scientific) usando un filtro de 490 nm. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado para cada condición.

2.11 Ensayo de Fagocitosis por Captura de Partículas de Zimosán

2.11.1 Principio

El ensayo de captura de partículas consiste en el uso de partículas de zimosán, un peptidoglicano antigénico proveniente de la pared celular de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales se encuentran marcadas con fluorescencia. Estas partículas pueden visualizarse y cuantificarse con técnicas como citometría de flujo, que cuantifica la proporción de células que interactuaron y fagocitaron las partículas basado en la señal de fluorescencia positiva, mientras que la intensidad media de fluorescencia refleja la cantidad de partículas fagocitadas por célula.

2.11.2 Procedimiento

Se sembraron células RAW264.7 (1×10^5 células/pozo) en cajas de 12 pozos con medio DMEM suplementado con 0.5% de SFB por 4 h. Posteriormente, los cultivos se trataron con DMSO (vehículo), los DAP o el malatión a 0.01 µM por 2 h. Inmediatamente después, los cultivos se incubaron con partículas de zimosán previamente opsonizadas con suero de ratones Balb/c en una relación 1:10 (células:partículas) a 37 °C por 60 min. Los cultivos se lavaron en dos ocasiones con PBS 1x y las células se recolectaron con una solución de tripsina/EDTA diluida 1:2 en PBS. Las muestras se centrifugaron a 1,500 rpm ($420 \times g$) por 5 min y se lavaron con PBS en dos ocasiones. Las células se fijaron con una solución de

paraformaldehído al 1% y azida de sodio al 0.02% y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su análisis en un citómetro de flujo. Se cuantificaron 10,000 eventos usando el citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences) y los datos se analizaron con el software FlowJo V10.0.7, en el que se identificaron el porcentaje de células positivas a la marca de FITC y la intensidad media de fluorescencia de dicha población. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado para cada condición.

2.12 Análisis Estadístico de Resultados

Se realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk de los resultados y análisis descriptivos de los resultados expresando los valores con una distribución normal como medias \pm desviación estándar (DE). Se realizaron pruebas de ANOVA de una vía para determinar la significancia estadística de los datos. Posterior a esta prueba, se realizaron pruebas *post-hoc* de Bonferroni. Además, se realizó la prueba t de Student para comparar los tratamientos contra el control positivo o negativo, según el caso. Se utilizaron valores de $p < 0.05$ para establecer la significancia estadística.

3. RESULTADOS

3.1 Viabilidad por Incorporación de Rojo Neutro (RN)

Para establecer las concentraciones de los compuestos con las cuales trabajar y garantizar que los efectos observados no se debieran a que los compuestos eran citotóxicos realizamos la evaluación de la viabilidad celular por el ensayo de incorporación de RN en cultivos de células RAW264.7 tratadas con el malatión y sus metabolitos (DMDTP, DMTP y DMP) por 48 h. En estos ensayos observamos que ninguno de los tratamientos presentó efectos significativos sobre la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones empleadas (0.01-10 μM) (Figura 6).

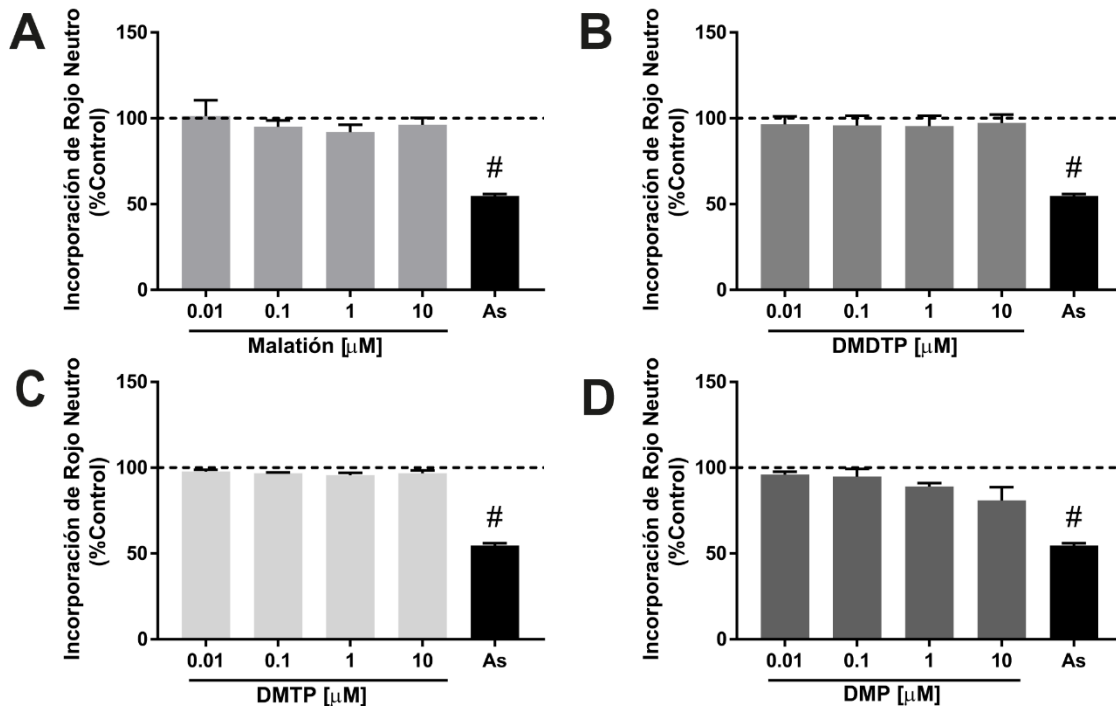


Figura 6. Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos OP en macrófagos murinos RAW264.7. Las células fueron tratadas con malatión (A), DMDTP (B), DMTP (C) y DMP (D) por 48 h y evaluadas por el ensayo de incorporación de RN. Los datos representan el promedio del % respecto al control negativo (DMSO) \pm D.E. (promedio de tres experimentos independientes). No se encontraron diferencias significativas tomando una $*p < 0.05$, ANOVA de una vía *post hoc* Bonferroni, vehículo vs. tratamiento ; # $p < 0.05$ t-Student vehículo vs. As (NaSO_2 20 μM).

3.2 Polimerización de Actina

Con el fin de evaluar la capacidad de los compuestos OP de interferir con el proceso de polimerización de la actina, se utilizó un ensayo *in vitro* de polimerización de actina marcada con un fluoróforo (Figura 7). Durante la primera fase del ensayo (3-20 min), los monómeros de G-actina estuvieron en contacto con los compuestos OP a concentraciones de 0.01 y 1 μM y no se observó un efecto. En el minuto 20 se incorporó el estímulo de polimerización al agregar una solución amortiguadora que contenía. En esta segunda etapa, los resultados mostraron una curva sigmoideal representando la fase de alargamiento hasta alcanzar un estado de equilibrio aproximadamente a los 70 min. Con los datos de estas curvas se calcularon los valores de la velocidad de polimerización, la cantidad máxima de polimerización y el tiempo medio de polimerización que se obtuvo en cada tratamiento (Figura 8), de acuerdo con lo previamente reportado por Doolittle y colaboradores (2013). En estos parámetros se observó que, tanto el malatión como sus metabolitos disminuyeron la tasa de polimerización de la actina a la concentración de 0.1 μM (Figura 8A), mientras que, a la concentración de 1 μM , únicamente el DMTP y DMP tuvieron este efecto. Los DAP también disminuyeron la cantidad máxima de actina polimerizada, que se determinó como la intensidad máxima de fluorescencia (Figura 8B), a la concentración de 0.01 μM . Al incrementar la concentración a 1 μM , únicamente el malatión y sus metabolitos DMDTP y DMP mantuvieron esta disminución. La disminución de la tasa de polimerización y la cantidad de actina polimerizada por parte de los DAP sugieren una posible interferencia de los compuestos OP con los monómeros de actina disponibles, sin afectar los procesos de nucleación e inicio de la polimerización, mientras que, el malatión fue el único compuesto que además de afectar la velocidad de polimerización y la intensidad máxima de polimerización, retrasó el inicio de la polimerización de la actina (Figura 8C), lo que indica un nivel más complejo de interacción con la actina por parte del malatión respecto a los DAP.

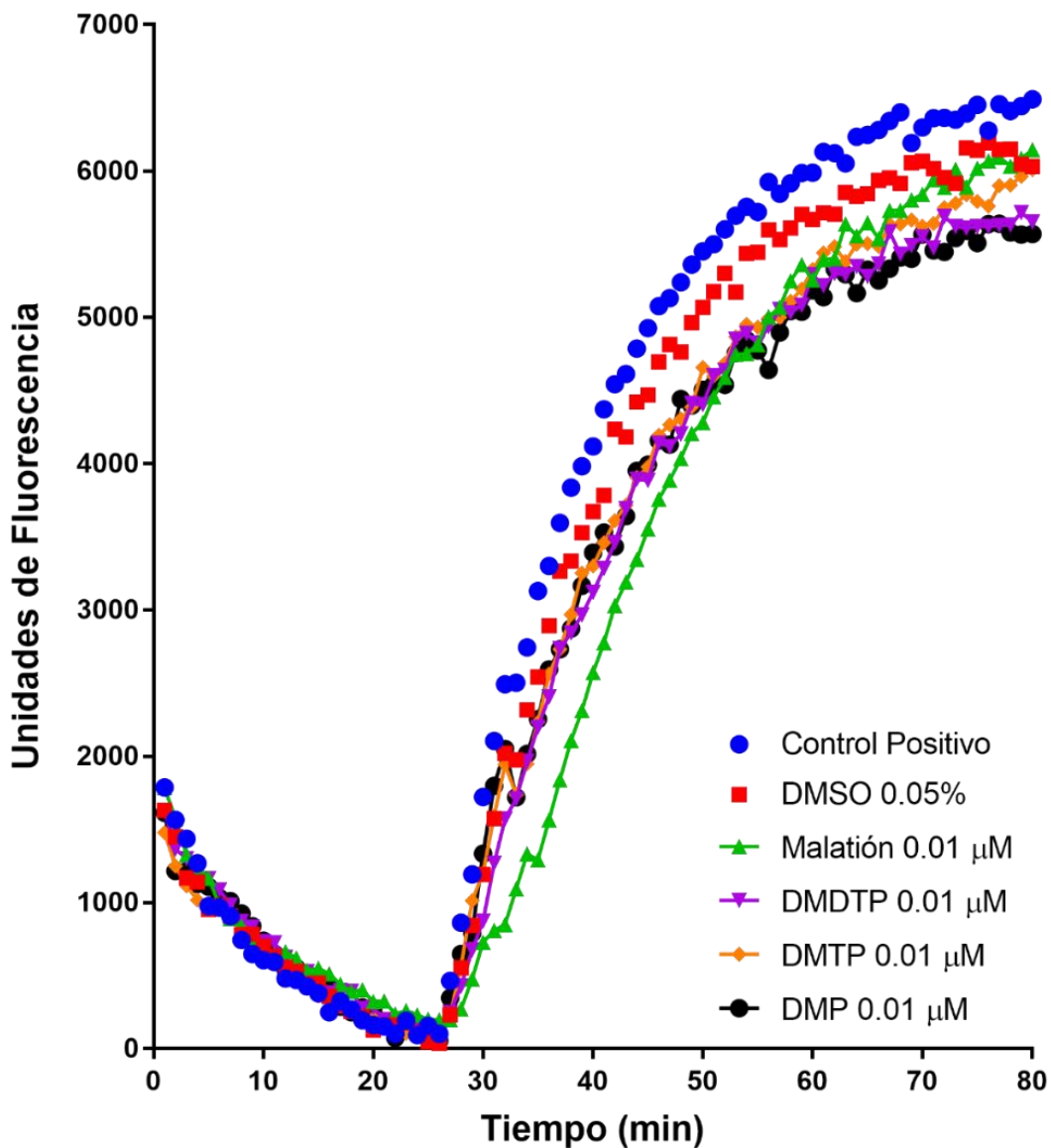


Figura 7. Curva representativa del efecto de los compuestos OP sobre la polimerización de actina *in vitro* utilizando un ensayo basado en fluorescencia. Las curvas representan el alargamiento de los filamentos de actina (para formar actina F), por la adición de los monómeros de G-actina (0.15 mg/ml) en presencia de los compuestos OP a una concentración de 0.01 µM y estimulados con una solución amortiguadora de polimerización de actina (50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM carbonato de guanidina y 1 mM ATP). El control positivo solo incluye la solución polimerizadora.

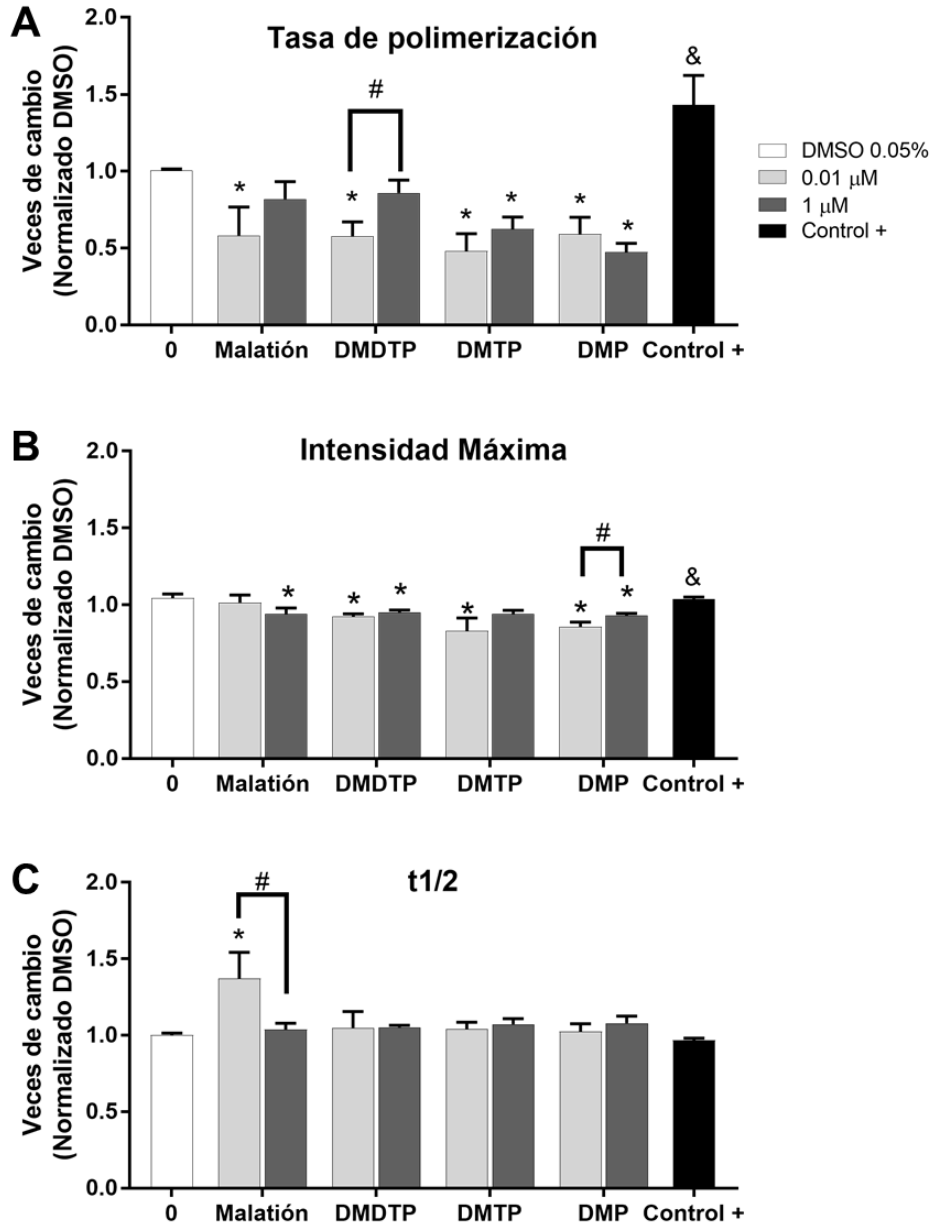


Figura 8. Efecto de los DAP y el malatión (0.01 y 1 μ M) sobre la tasa de polimerización (A), la cantidad máxima de polimerización (B) y el tiempo medio de polimerización (C) de los filamentos de actina en ensayos de polimerización *in vitro*. Los datos fueron calculados a partir de la porción lineal de las curvas obtenidas y los datos fueron normalizados respecto al vehículo (0.05% DMSO) \pm D.E. (promedio de tres experimentos independientes), * $p < 0.05$ ANOVA de una vía post hoc Bonferroni, vehículo (0) vs. tratamiento; # $p < 0.05$ tratamiento 0.01 μ M vs. tratamiento 1 μ M; & $p < 0.05$ t-Student vehículo (0) vs. Control + (solución de polimerización).

3.3 Polimerización de tubulina

De manera similar, evaluamos el efecto del malatión y los DAP (0.01 y 1 μM) sobre la polimerización de la tubulina mediante reporteros fluorescentes, permitiéndonos identificar los procesos de nucleación, elongación y equilibrio (Figura 9). En este caso, ninguno de los compuestos fue capaz de inducir la polimerización por sí mismos, y mostraron un comportamiento similar al tratamiento con el DMSO durante la fase de nucleación (0 a 12 min). Sin embargo, el malatión y sus metabolitos DMDTP y DMTP fueron capaces de retrasar el inicio de la polimerización a concentraciones de 1 μM (Figura 10C), sugiriendo que dichos compuestos posiblemente interfieren con el proceso de nucleación de la tubulina. El malatión, el DMDTP y el DMTP indujeron una disminución en la velocidad de polimerización de la tubulina, tanto a 0.01 como a 1 μM (Figura 10A). A pesar de retrasar y disminuir la velocidad de polimerización de los MT de tubulina, ninguno de los tratamientos afectó la cantidad máxima de tubulina en el polímero de MT polimerizado (Figura 10B). Por su parte el DMP no presentó algún efecto significativo sobre la polimerización de tubulina en MT.

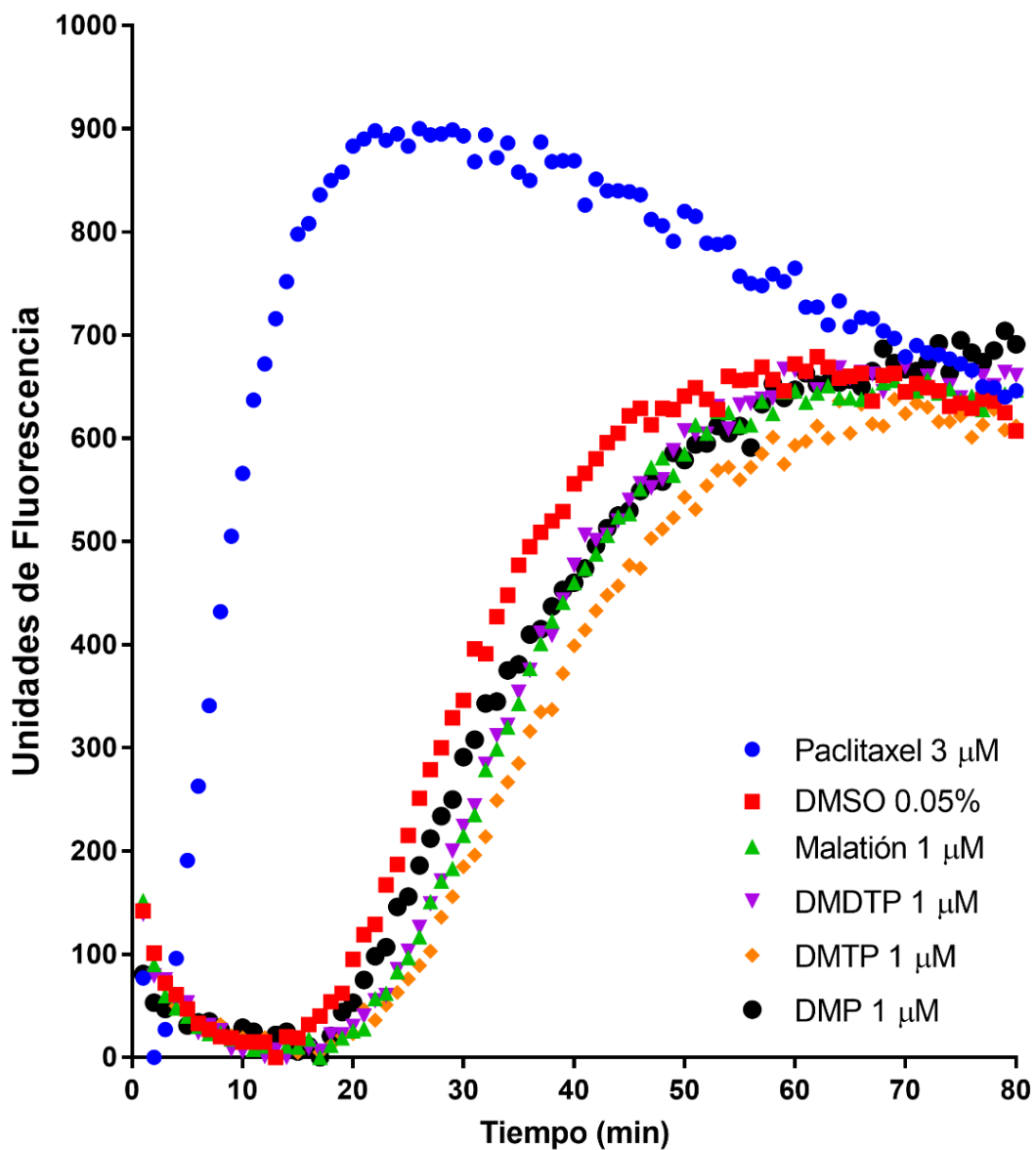


Figura 9. Curva representativa del efecto de los compuestos OP sobre la polimerización de tubulina *in vitro* utilizando un ensayo basado en fluorescencia. Las curvas representan la polimerización de los heterodímeros de tubulina (2 mg/ml) tratados con los compuestos OP a una concentración de 1 μM o paclitaxel (3 μM) como control positivo de polimerización.

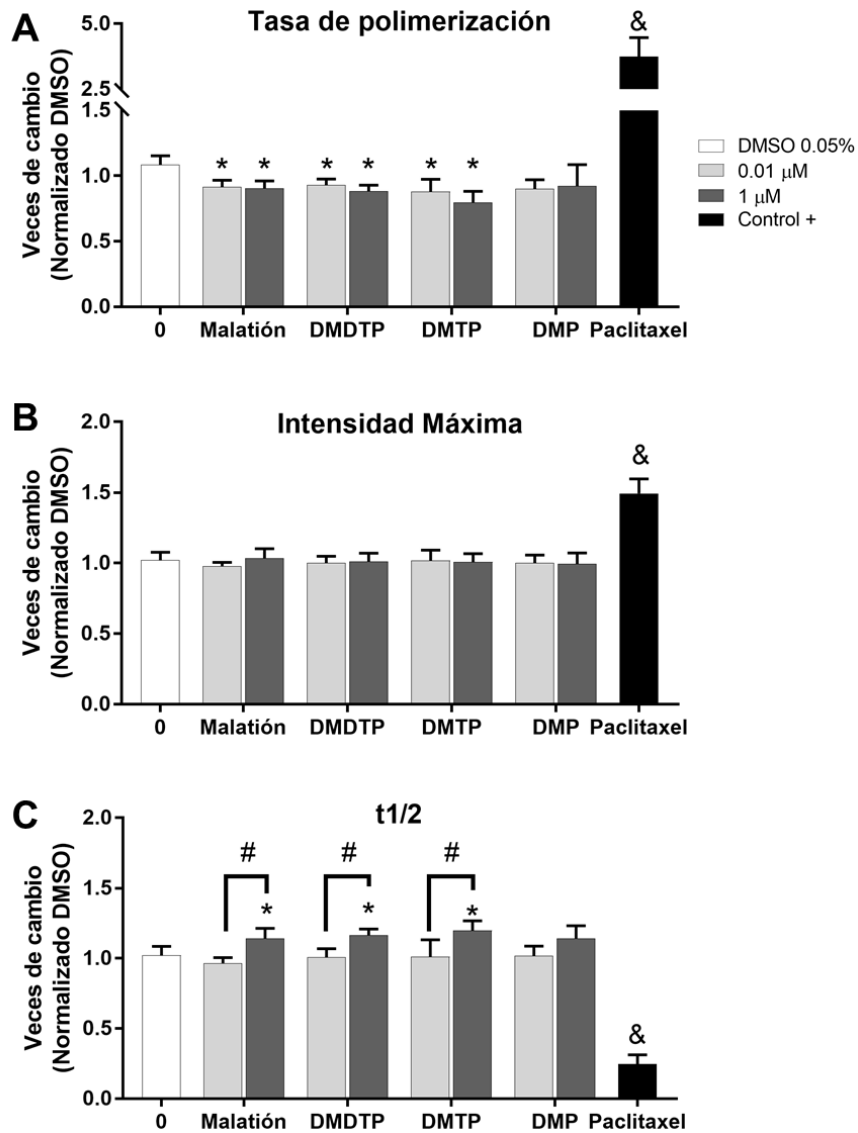


Figura 10. Efecto de los DAP y el malatión (0.01 y 1 μM) sobre la tasa de polimerización (A), la cantidad máxima de polimerización (B) y el tiempo medio de polimerización (C) MT de tubulina durante el ensayo de polimerización *in vitro*. Los datos fueron calculados a partir de la porción lineal de las curvas obtenidas y los datos fueron normalizados respecto al vehículo (0.05% DMSO) \pm D.E. (promedio de tres experimentos independientes), * $p < 0.05$ ANOVA de una vía post hoc Bonferroni, vehículo (0) vs. tratamiento; # $p < 0.05$ tratamiento 0.01 μM vs. tratamiento 1 μM ; & $p < 0.05$ t-Student vehículo (0) vs. paclitaxel (3 μM).

3.4 Organización del Citoesqueleto

Debido a que los ensayos acelulares indicaron que los compuestos OP que utilizamos son capaces de interferir con la polimerización microfilamentos de actina

y MT de tubulina, decidimos evaluar el efecto de la exposición a los compuestos OP en la organización del citoesqueleto en un cultivo celular.

Las células murinas RAW264.7 se caracterizan por tener una morfología redonda, ligeramente ahusada en cultivo. Cuando estas células se expusieron por 2 h a los compuestos de interés, se pudo observar que la exposición causó cambios en la morfología de las células, induciendo filopodios alrededor del cuerpo de la célula, principalmente en los polos, mientras que los MT se encontraban organizados desde el MTOC, que se encontraba cercano al núcleo, y se dirigieron hacia los extremos de las células ahusadas (Figura 11). Las células tratadas con el vehículo mantuvieron su morfología redondeada (62.6%), y algunas ligeramente ahusadas (30.9%) (Tabla 3), con el citoesqueleto de tubulina organizado desde el MTOC hacia la periferia y la presencia de escasos filopodios o estructuras de actina.

Con el tratamiento con PMA 50 nM, un inductor de la proteína cinasa C (PKC) y activador de las GTPasas, observamos diversas morfologías caracterizadas por la formación de protrusiones digitiformes de gran tamaño, conformadas por el citoesqueleto de actina y sin modificar la distribución del citoesqueleto de tubulina (Figura 12 y 13); se observó una disminución en la proporción de células redondas (31.1%) e incrementando la proporción de células ahusadas (58%) o con formas tetragonales, triangulares o irregulares con prolongaciones (11%) (Tabla 3).

El tratamiento con malatión o sus metabolitos a la concentración de 0.01 μM por 2 h produjo un incremento en la cantidad de células con morfología ahusada, pasando de 30.9% observada en el control negativo hasta un 56.2% y una disminución de la proporción de células redondeadas hasta un 33.5% (Tabla 3). Sin embargo, cuando las células se trataron con la concentración de 1 μM de los compuestos, observamos una menor inducción de células con morfologías ahusadas, pasando de 30.9% (control negativo) a un 37% en el caso del malatión y a 41% con el DMTP y el DMP. Además, observamos una disminución ligera en la proporción de células con otras morfologías (triangulares, tetragonales, etc.), predominando las células redondeadas (Tabla 3). La concentración de 0.01 μM de todos los compuestos evaluados fue la que indujo mayores cambios en la morfología de las células.

En cuanto a la organización del citoesqueleto, después del tratamiento por 2 h con malatión 0.01 μM , se pudieron observar células redondeadas con la presencia de filopodios, así como células ahusadas de mayor tamaño, con la formación de pseudópodos extensos y angostos con la presencia de filopodios, y en algunos casos con la presencia de urópodos de corta extensión. Además, se pudo observar un cambio en la organización del MTOC, localizándose frente al núcleo en dirección al pseudópodo hacia donde se observaron una mayor cantidad de MT, sugiriendo que el malatión indujo la polarización de la célula (Figura 12).

En el caso del tratamiento con DMDTP 0.01 μM se observaron células redondeadas, algunas de ellas generando prolongaciones angostas hacia ambos lados de las células. También se observaron estructuras de actina con la presencia de filopodios (Figura 12). El MTOC, en todos los casos, se mantuvo en la periferia del núcleo.

Tras la exposición a DMTP 0.01 μM , las células con morfologías redondas, y en algunos casos ovaladas, presentaron la formación de prolongaciones de actina en uno de sus polos. Así mismo, algunas células ahusadas presentaron filopodios de

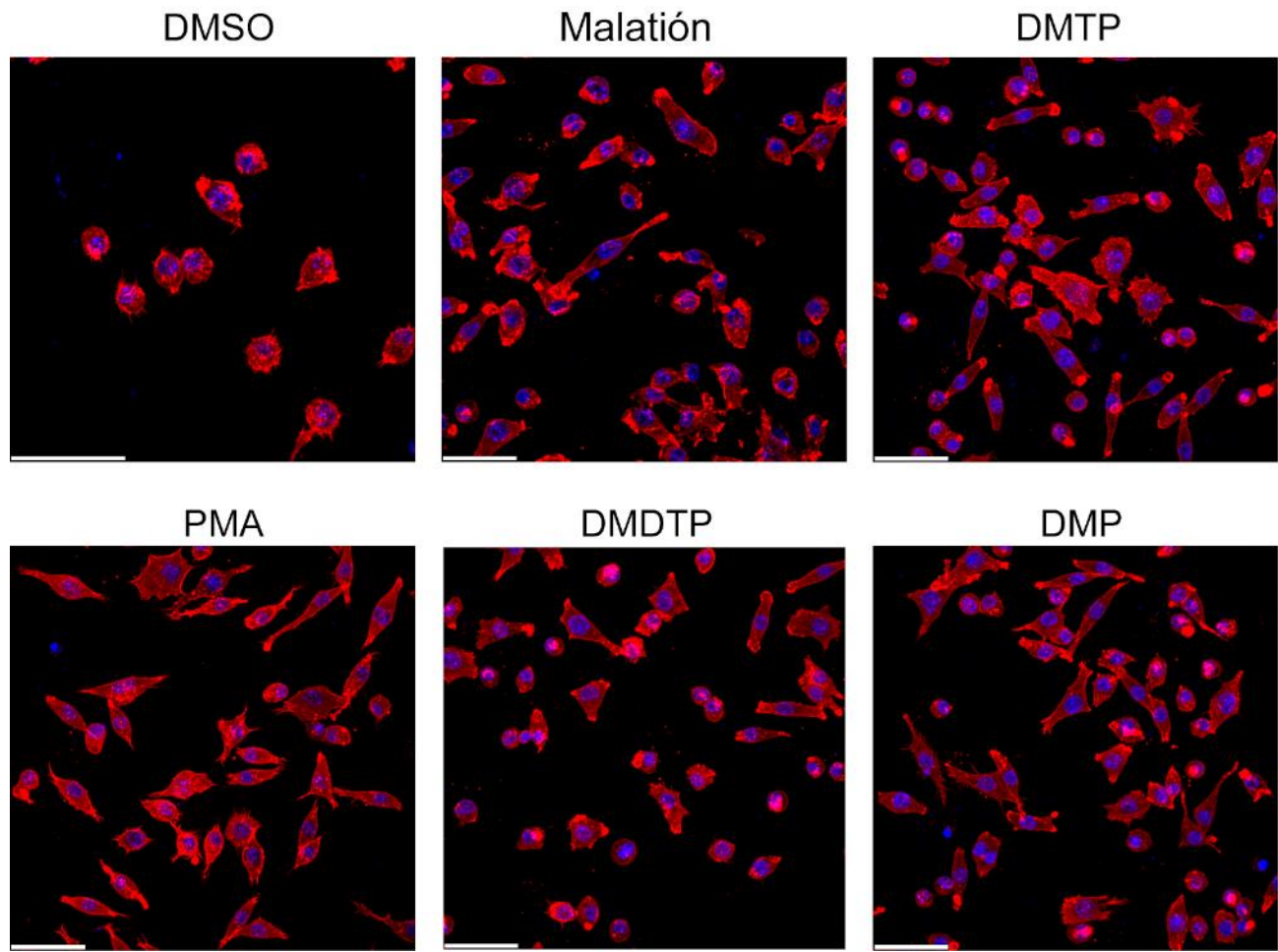


Figura 11. Efectos sobre la morfología celular tras la exposición a OP. Micrografías de la organización del citoesqueleto de F-actina en las células RAW264.7 tratadas con malatión, DMDTP, DMTP o DMP 0.01 μM , DMSO (0.05%) como control negativo y PMA (50 nM) como control positivo, por 2 h. Rojo: F-actina; azul: núcleos Escala 50 μm .

Tabla 3. Clasificación de la morfología celular después de la exposición a OP.

Tratamiento	[μ M]	Morfología (%)				
		Redonda	Ahusadas	Tetragonal	Triangular	Otro
Vehículo	0.05%	63.9 \pm 3.9	29.1 \pm 4.9	2.5 \pm 1.7	1.7 \pm 1.2	2.7 \pm 1.3
Malatión	0.01	39.3 \pm 3.8 ^a	54.9 \pm 3.8 ^a	2.7 \pm 1.2	1.9 \pm 0.6	1.1 \pm 0.9
DMDTP	0.01	44.8 \pm 9.3 ^a	45.3 \pm 8.9 ^a	4.2 \pm 1.2	4.4 \pm 1.8	1.3 \pm 1.2
DMTP	0.01	32.9 \pm 3.3 ^a	58.9 \pm 4.1 ^a	2.6 \pm 0.4	3.2 \pm 1.8	2.4 \pm 0.9
DMP	0.01	31.9 \pm 5.5 ^a	59.4 \pm 6.2 ^a	2.8 \pm 0.9	2.8 \pm 1.3	3.0 \pm 1.0
Malatión	1	59.0 \pm 2.4 ^b	37.5 \pm 1.3 ^b	1.5 \pm 0.8	0.9 \pm 0.7	1.0 \pm 1.2
DMDTP	1	55.1 \pm 4.4	41.8 \pm 4.2	1.1 \pm 0.3	1.1 \pm 0.5	0.9 \pm 0.3
DMTP	1	59.5 \pm 2.5 ^b	36.5 \pm 1.7 ^b	2.1 \pm 0.7	1.1 \pm 0.6	0.8 \pm 0.5
DMP	1	56.7 \pm 4.5 ^b	41.1 \pm 3.9 ^b	1.0 \pm 0.5	0.9 \pm 0.5	0.3 \pm 0.1
PMA	0.05	31.1 \pm 6.9 ^a	57.9 \pm 1.8 ^a	6.2 \pm 3.1	1.9 \pm 0.4	2.9 \pm 2.5

^ap<0.05, ANOVA de dos vías *post-hoc* Bonferroni vehículo vs. tratamiento.

^bp<0.05, ANOVA de dos vías *post-hoc* Bonferroni 0.01 μ M vs. 1 μ M.

* Se clasificaron las células presentes en al menos 10 campos por muestra (promedio de tres experimentos independientes). Los resultados se muestran como el porcentaje \pm D.E.

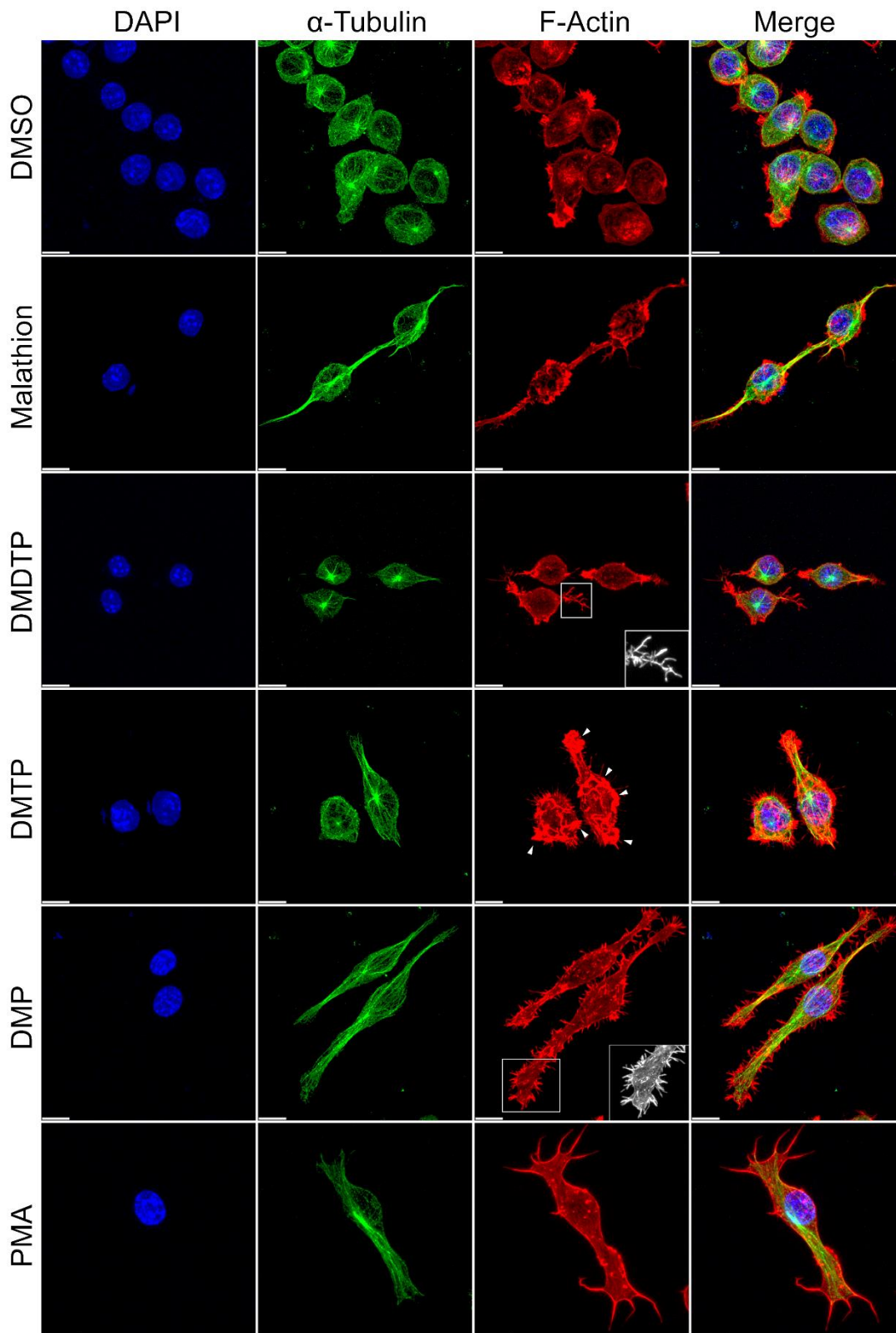


Figura 12. Efecto de la reorganización del citoesqueleto de actina y tubulina de las células RAW264.7 tratadas con los compuestos OP malatión, DMDTP, DMTP y DMP (0.01 μ M) durante 2 h. Rojo: F-actina; verde: α -tubulina; azul: núcleos. Escala 10 μ m.

mayor tamaño y desarreglos del citoesqueleto de actina por todo el cuerpo celular. Al igual que en el caso del malatión, se observaron células ahusadas con un pseudópodo definido pero angosto, y al igual que con el malatión, el MTOC se encontraba dirigido hacia el pseudópodo (Figura 12).

El tratamiento con DMP 0.01 μM indujo células con morfologías variadas, por una parte, se observaron células ovaladas con la presencia de prolongaciones de actina. En el caso de las células ahusadas se observaron pseudópodos de mayor tamaño rodeados de una gran cantidad de filopodios, y al igual que en el caso del DMTP, el MTOC se identificó orientado hacia uno de los pseudópodos (Figura 12).

Aunque en todas las condiciones se observó la presencia de filopodios, fueron los tratamientos con DMDTP, DMP y PMA los que presentaron un incremento significativo en el número de estas estructuras de actina (Figura 13A). A pesar de esto, no se observó un incremento en el largo de estas proyecciones (Figura 13B).

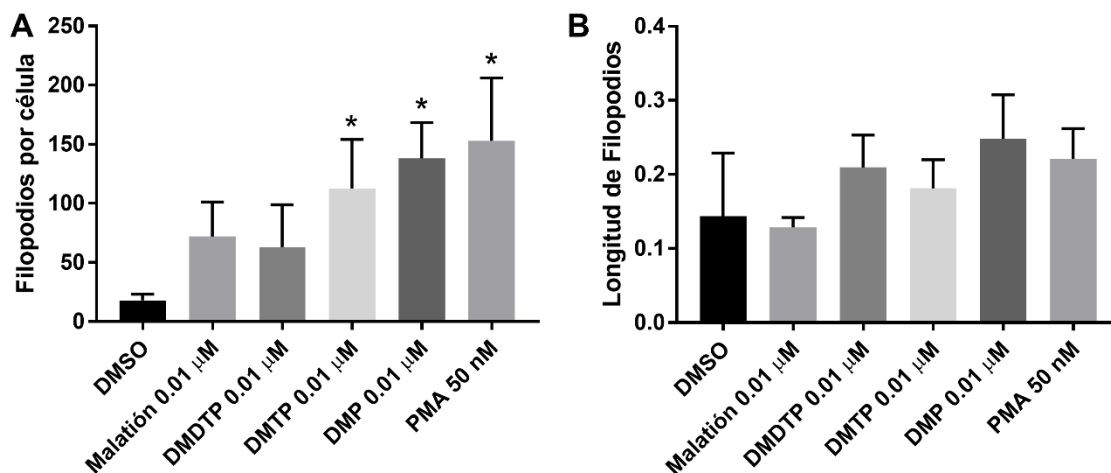


Figura 13. Efecto de los compuestos OP sobre el número de filopodios por célula (A) y longitud de filopodios (B) formados en células RAW264.7 tratadas con malatión y sus metabolitos (0.01 μM) por 2 h. Los resultados se muestran como el porcentaje \pm D.E. (promedio de tres experimentos independientes). * $p < 0.05$ prueba t-Student vehículo vs. tratamiento. No existen diferencias significativas en la longitud de los filopodios.

Entre las estructuras que normalmente se describen en el citoesqueleto de actina, encontramos las fibras de estrés. Estas estructuras son relevantes en la formación de sitios de adhesión, el mantenimiento de la morfología y la generación de fuerzas contráctiles, principalmente, en células epiteliales (Tojkander *et al.*, 2012). Sin embargo, en células con alta motilidad como los macrófagos RAW264.7, las fibras de estrés no se observan como las estructuras largas y bien organizadas ensambladas a adhesiones focales tal y como ocurre en células epiteliales como los fibroblastos (Pixley *et al.*, 2023; Pixley *et al.*, 2005). Por lo que para evaluar el afecto del malatión y los DAP sobre las fibras de estrés, se realizó la tinción del esqueleto de fibroblastos humanos GM03440. En estas células fue posible identificar principalmente fibras de estrés en células tratadas con el vehículo. Cuando estas células se trataron con PMA 50 nM, las células tuvieron un re-ordenamiento del citoesqueleto de actina, mostrando desarreglos y disminución en el número de fibras de estrés. Cuando las células se trataron con malatión a 0.01 μ M por 2 h no se observaron cambios importantes en la morfología o arreglo de actina en ellas. De manera similar, el tratamiento con DMP no modificó la morfología o la presencia de fibras de estrés de manera importante, pero se pudo identificar la inducción de filopodios a lo largo del cuerpo celular de manera similar a lo observado en los macrófagos RAW264.7 (Figura 14).

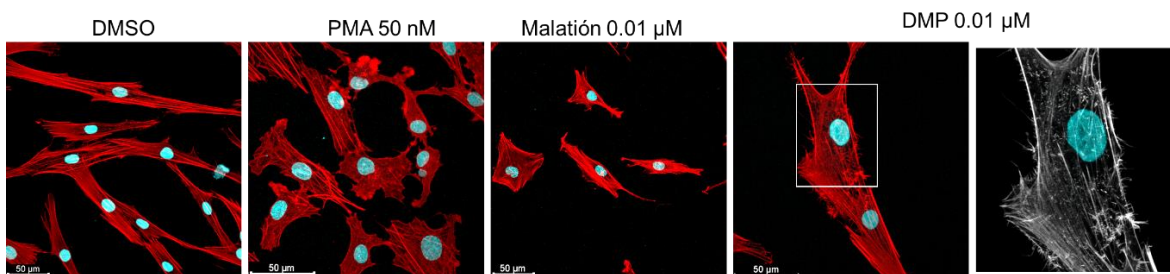


Figura 14. Organización del citoesqueleto de actina (rojo) de fibroblastos humanos GM03440 tratados con DMSO (0.05%; vehículo), PMA (50 nM; control positivo), malatión 0.01 μ M, o DMP 0.01 μ M, por 2 h. Barra de escala 50 μ m.

3.5 Ensayo de Cierre de Herida

Con la finalidad de determinar si estos cambios en la organización del citoesqueleto tenían una implicación fisiológica en el funcionamiento de este,

evaluamos la migración de los macrófagos como parámetro funcional. La exposición de las células RAW 264.7 a los DAP por 48 h indujo un aumento en la migración celular durante el ensayo de cierre de herida; el DMDTP indujo un aumento significativo únicamente a la concentración de 1 μM (Figura 15B), mientras que el DMTP y el DMP indujeron aumentos significativos respecto al vehículo a concentraciones desde 0.01 μM , observándose la mayor inducción de la migración celular con la concentración más baja utilizada de los compuestos OP (0.01 μM) (Figura 15C y 15D).

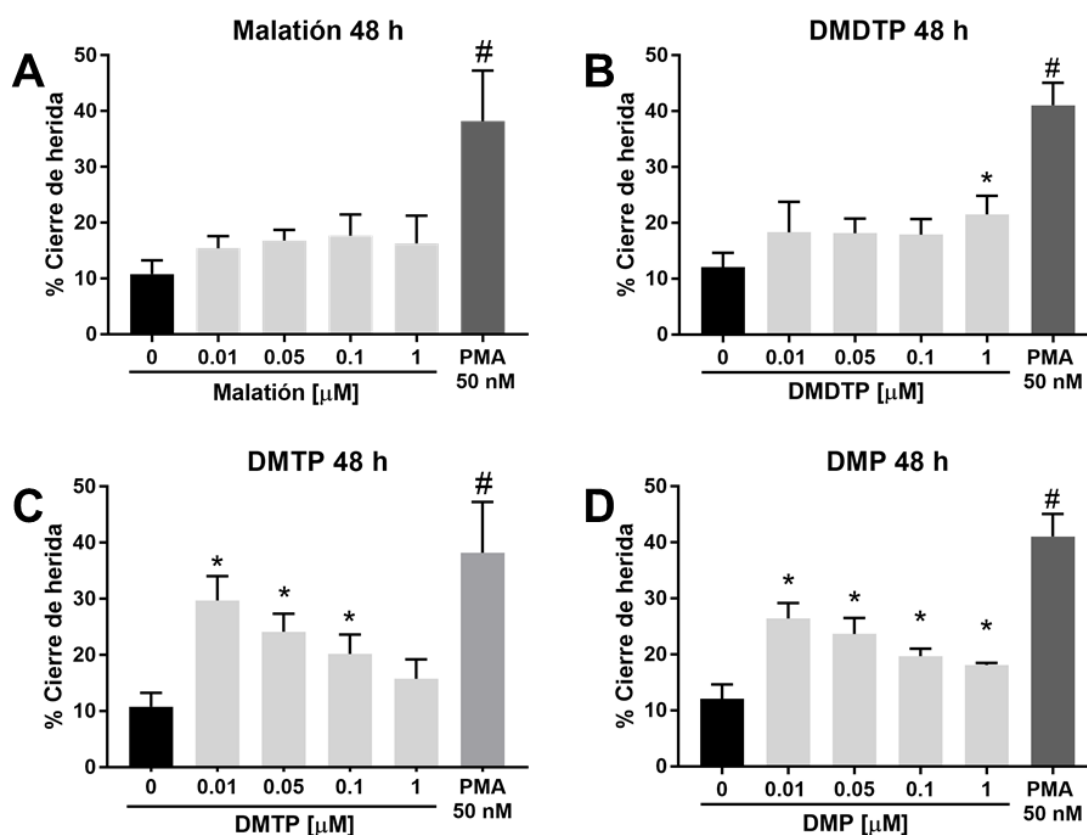


Figura 15. Efecto de la exposición a los compuestos organofosforados malatión (A), DMDTP (B) DMTP (C) y DMP (D) por 48 h sobre la migración celular de macrófagos RAW264.7 evaluada por el ensayo de cierre de herida. Los datos representan el porcentaje de cierre de la herida respecto al tiempo 0 de cada tratamiento \pm D.E. (promedio de tres experimentos independientes), * $p < 0.05$ ANOVA de una vía *post hoc* Bonferroni, vehículo (0) vs. tratamiento; # $p < 0.05$ t-Student vehículo (0) vs. Control positivo (PMA 50 nM).

Por su parte, el malatión no mostró efecto sobre la migración celular a ninguna de las concentraciones que se utilizaron (Figura 15A). Estos resultados sugieren que el cambio que inducen los compuestos OP sobre la organización del citoesqueleto tiene consecuencias sobre la función de este, al menos en cuanto a la motilidad de las células.

3.6 Efecto de los OP sobre la Actividad de las GTPasas de la Familia Rho

Entre las proteínas que participan en la regulación del citoesqueleto se encuentran las GTPasas de la familia Rho, las cuales tienen un papel importante en la formación de estructuras de actina. Para conocer si los efectos sobre el citoesqueleto de actina y la migración podrían deberse a cambios en la actividad de estas GTPasas, evaluamos su actividad en células RAW264.7 tratadas con malatión y sus DAP a concentraciones de 0.01 μM por 5 min. Únicamente los tratamientos con malatión y DMP disminuyeron la actividad de esta GTPasa en un 25 y 28%, respectivamente (Figura 16A). En el caso de la actividad de la GTPasa Rac1, los tratamientos con DMDTP, DMTP y DMP incrementaron su actividad respecto al vehículo en 31, 44 y 40%, respectivamente (Figura 16B). Por otro lado, cuando evaluamos el efecto de los compuestos OP sobre Cdc42, únicamente se observó un incremento en su actividad con los tratamientos de DMTP y DMP en 20 y 10%, respectivamente (Figura 16C).

Al observar que los efectos del DMP 0.01 μM sobre la morfología celular, la organización del citoesqueleto de actina y la migración celular fueron los más drásticos (Figuras 12, 15; Tabla 3) en comparación a los efectos de los otros metabolitos y al compuesto padre, decidimos evaluar el efecto del DMP sobre la actividad de las GTPasas a través del tiempo. El DMP mostró ser capaz de inhibir la actividad de RhoA aproximadamente 25% desde los 5 min de exposición, manteniendo dicho efecto por al menos 2 h (Figura 16D). Por su parte, la inducción de Rac1 se mantiene entre 30 y 40% desde los 5 min hasta las 2 h (Figura 16E). Por último, cuando evaluamos el efecto del DMP sobre Cdc42 se observó una pequeña inducción del 10% en su actividad a los 5 min,

que incrementó hasta aproximadamente 60% a los 60 min, siendo mayor la inducción en la actividad de Cdc42 en comparación con la actividad que se indujo en Rac1. A pesar de estos cambios, la inducción de la actividad de estas proteínas disminuyó con el paso del tiempo (Figura 16F), alcanzando niveles similares al control después de 2 h de exposición. Estos datos nos sugieren que el efecto de los OP sobre las GTPasas es transitorio y, después de iniciar un estímulo en las células, este podría revertirse.

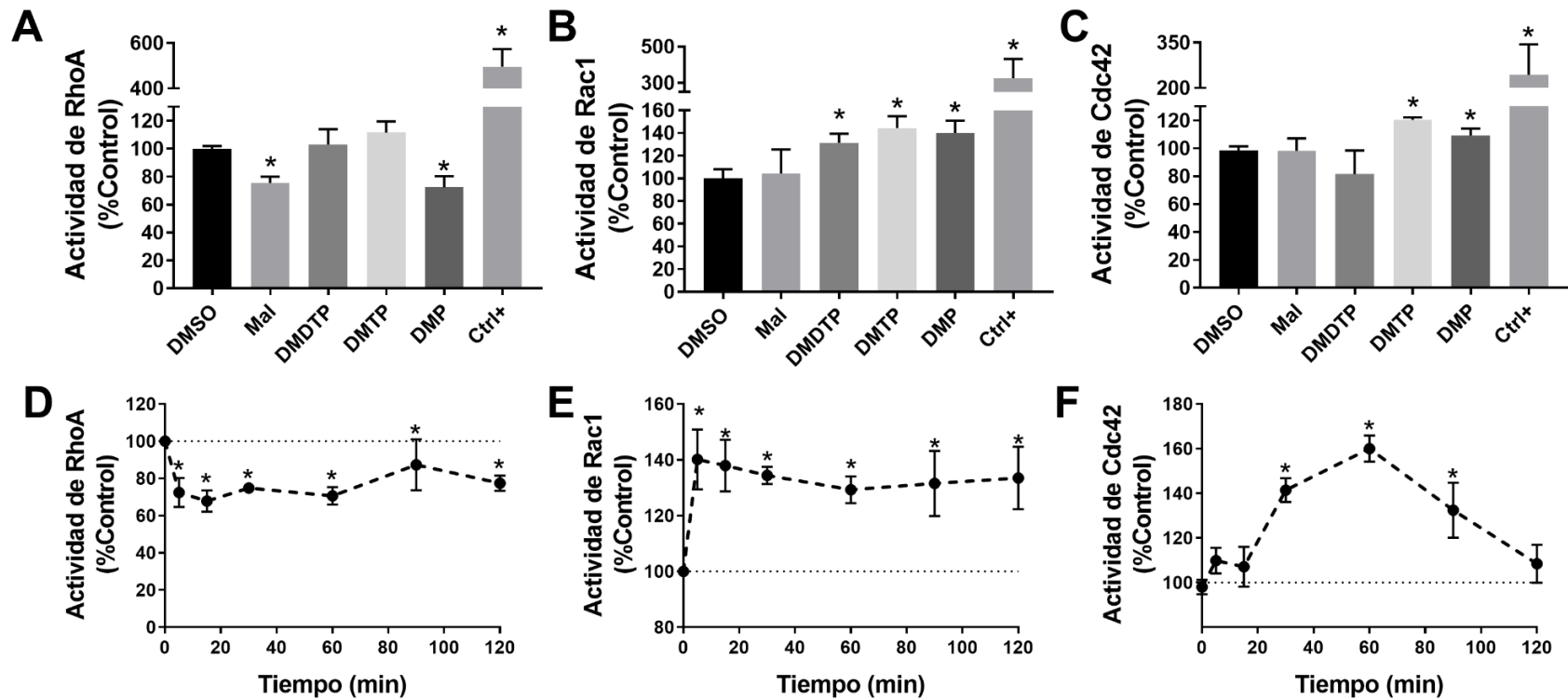


Figura 16. Efecto de los DAP sobre la actividad de las GTPasas de la familia Rho (A-C). La actividad de RhoA (A), Rac1 (B) y Cdc42 (C) fue determinada a partir de células tratadas con el vehículo (DMSO 0.05%), malatión o los DAP (0.01 μ M) por 5 min. Se utilizó una proteína modificada constitutivamente activa como control positivo. Los datos fueron normalizados respecto al vehículo (DMSO) y se presentan como el promedio \pm D.E. (promedio de tres experimentos independientes), * $p < 0.05$ ANOVA de una vía *post hoc* Bonferroni, vehículo (0) vs. tratamiento; $^{\&}p < 0.05$ t-Student vehículo (0) vs. Control Positivo (Proteína constitutivamente activa). Efecto del DMP (0.01 μ M) (D-F) sobre la actividad de RhoA (D), Rac1 (E) y Cdc42 (F) después de 5, 15, 30, 90 y 120 min. Los datos fueron normalizados respecto al tiempo (0) y se presentan como el promedio \pm D.E. (n=3), * $p < 0.05$ ANOVA de una vía *post hoc* Bonferroni, (0) vs. tratamiento.

3.7 Inhibición de las GTPasas Rac1 y Cdc42

Para explorar si los efectos sobre el citoesqueleto y la migración celular se debían directamente a la inducción en la actividad de Rac1 y Cdc42 procedimos a realizar la inhibición química de estas GTPasas con pretratamientos con NSC23766 (inhibidor de Rac1) y ML-141 (inhibidor de Cdc42), los cuales bloquean la activación mediada por factores intercambiadores de guanina (Gao *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2013).

3.7.1 Morfología

Se evaluó la morfología de las células pre-tratadas por 2 h con los inhibidores de Rac1 y Cdc42, los cuales modificaron la distribución de la morfología celular, disminuyendo la proporción de células redondas, pasando de 62 a 45 y 52%, respectivamente (Tabla 4). Al realizar el pretratamiento con el inhibidor de Rac1 (NSC23766) y el tratamiento con DMP por 2 h, se observó una disminución de la inducción de las células ahusadas solamente. Por su parte, la inhibición de Cdc42 causada por ML-141 tuvo mayor impacto sobre los cambios morfológicos inducidos por el DMP, pues disminuyó la proporción de células ahusadas de 62 a 37%. Además, observamos que la inhibición conjunta de Rac1 y Cdc42 evitó los cambios en la morfología celular provocados por la exposición a DMP (Tabla 4). Se observó una disminución en los desarreglos de actina inducidos por el DMP al inhibir a Rac1, mientras que la inhibición de Cdc42 redujo la formación de filopodios o pseudópodos largos que se inducían con el tratamiento de DMP (Figura 17).

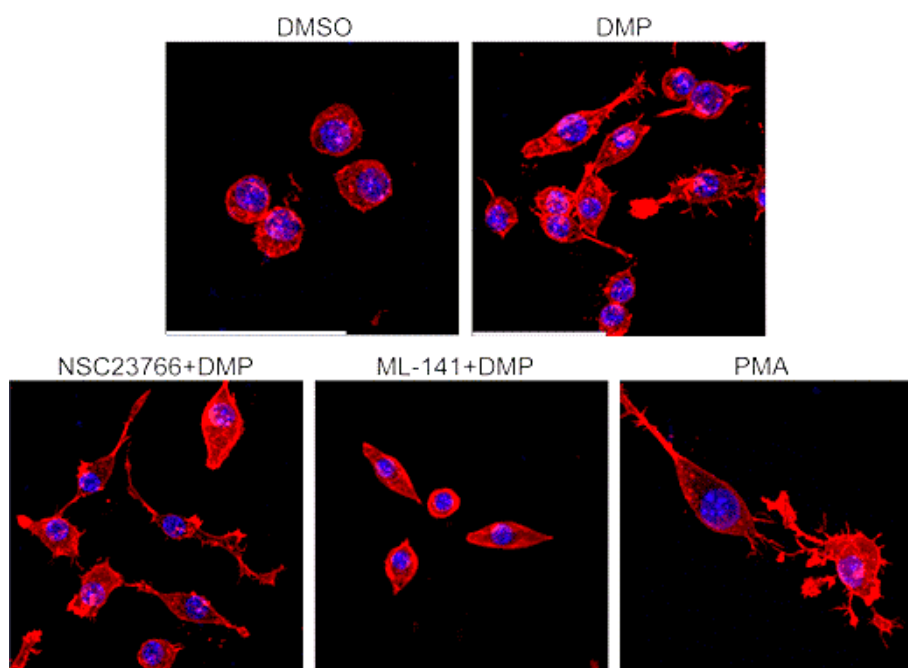


Figura 17. La inhibición de Rac1 y Cdc42 previno los cambios morfológicos inducidos por el DMP. Organización del citoesqueleto de actina (rojo) de células RAW264.7 después del pre-tratamiento con los inhibidores de Rac1 (NSC23766, 25 μ M) o Cdc42 (ML-141, 10 μ M) y el tratamiento con DMP (0.01 μ M) o el vehículo (DMSO 0.05%) por 2 h. Barra de escala 50 μ m.

Tabla 4. Clasificación de la morfología celular después de la inhibición de Rac1 y/o Cdc42.

Tratamiento	Morfología (%)				
	Redonda	Ahusadas	Tetragonal	Triangular	Otro
Vehículo	63.9 \pm 3.9	29.1 \pm 4.9	2.5 \pm 1.7	1.7 \pm 1.2	2.7 \pm 1.3
DMP	31.9 \pm 5.5 ^a	59.4 \pm 6.2 ^a	2.8 \pm 0.9	2.8 \pm 1.3	3.0 \pm 1.0
NSC23766	45.0 \pm 4.7 ^{ab}	38.3 \pm 1.7 ^b	3.8 \pm 1.6	4.6 \pm 1.1	8.3 \pm 3.1
ML-141	52.8 \pm 3.4 ^b	32.2 \pm 3.2 ^b	3.9 \pm 0.8	5.0 \pm 0.7	6.0 \pm 2.3
NSC23766+ DMP	32.2 \pm 0.9 ^a	50.5 \pm 6.7 ^a	4.8 \pm 3.1	4.2 \pm 0.5	4.7 \pm 3.0
ML-141+DMP	48.8 \pm 5.3 ^{ab}	37.7 \pm 3.7 ^b	3.3 \pm 0.7	4.7 \pm 2.9	5.2 \pm 1.8
NSC23766+ ML-141+DMP	53.2 \pm 2.1 ^b	33.0 \pm 3.5 ^b	4.0 \pm 1.1	3.2 \pm 0.7	6.5 \pm 2.5

^ap<0.05, ANOVA de dos vías *post-hoc* Bonferroni vehículo vs. tratamiento.

^bp<0.05, ANOVA de dos vías *post-hoc* Bonferroni 0.01 μ M vs. 1 μ M.

* Las células fueron clasificadas a partir de al menos 10 campos por muestra (n=3). Los resultados se muestran como el porcentaje \pm D.E.

3.7.2 Migración Celular

Al evaluar el efecto de la inhibición de Rac1 y Cdc42 sobre la migración celular observamos que, por sí solos, la inhibición de Rac1 o Cdc42 no afectó la migración celular, sin embargo, la inhibición de ambos de manera simultánea si generó una disminución significativa de la migración celular respecto al vehículo. Por su parte, la inhibición de Rac1 2 h previas al tratamiento con DMP 0.01 μM , también indujo un incremento significativo de la migración celular respecto al tratamiento con el vehículo, pero esta inducción fue menor a la observada únicamente con el tratamiento de DMP. Por otro lado, la inhibición de Cdc42 evitó completamente el efecto del DMP sobre la migración celular. Así mismo, la inhibición conjunta de Rac1 y Cdc42 previas al tratamiento con DMP, disminuyó la migración celular respecto al vehículo (Figura 18).

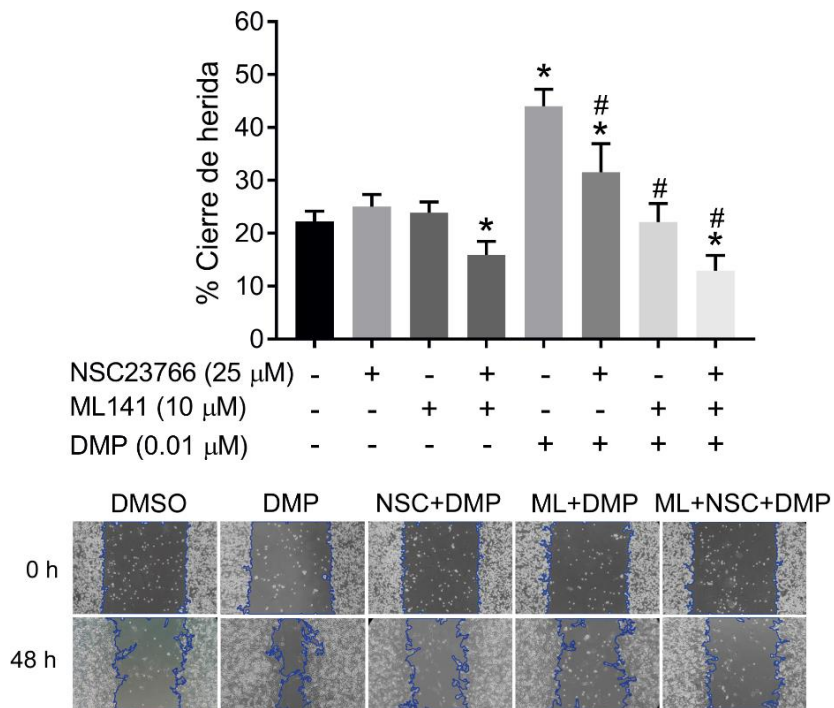


Figura 18. Efecto de la inhibición de Rac1 y Cdc42 en la migración celular inducida por DMP. La migración se determinó durante el ensayo de cierre de herida con células RAW264.7 pretratadas con el inhibidor de Rac1 (NSC23766, 25 μM) y/o el inhibidor de Cdc42 (ML-141, 10 μM) durante 2 h y tratamientos con el vehículo o DMP (0.01 μM) por 48 h. Los resultados se muestran como el porcentaje \pm D.E. (promedio de tres experimentos independientes) * $p < 0.050$, prueba t-Student vehículo vs. tratamiento; # $p < 0.05$ DMP 0.01 μM vs. tratamiento.

3.8 Fagocitosis

Debido a que encontramos efectos importantes en la funcionalidad del citoesqueleto relacionada con la movilidad celular, decidimos evaluar otra función de los macrófagos que también depende del citoesqueleto, la fagocitosis, que es relevante en el procesamiento y presentación de antígenos. Al evaluar el efecto de la exposición a los compuestos OP sobre la fagocitosis, observamos que los tratamientos con malatión y sus tres metabolitos DAP, a concentraciones de $0.01 \mu\text{M}$ por 2 h, disminuyeron el número de células capaces de fagocitar partículas de zimosán en aproximadamente 10% (Figura 19A). Sin embargo, en las células que mantuvieron su capacidad fagocítica, no se observaron cambios en la cantidad de partículas fagocitadas (Figura 19B), indicando que el efecto de los compuestos OP sobre este parámetro es mínimo y probablemente de poca relevancia biológica.

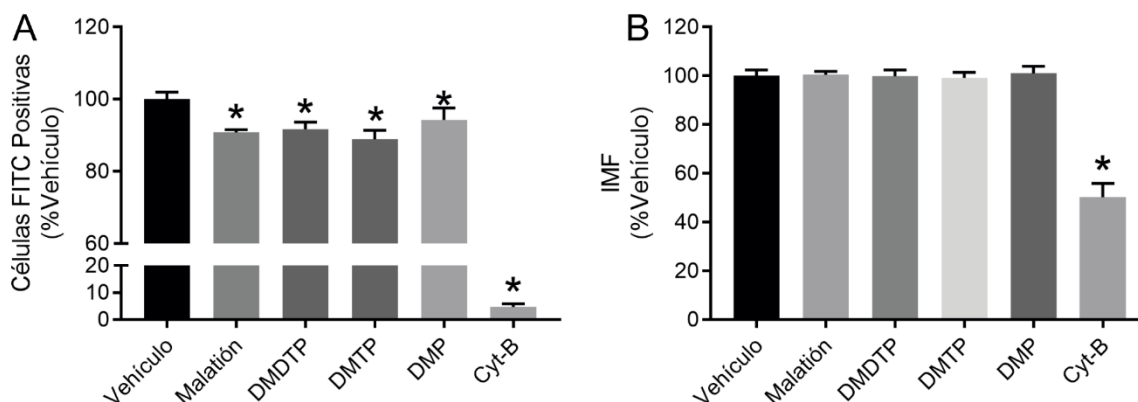


Figura 19. Efecto de los DAP en la fagocitosis. (A) Porcentaje de células positivas a zimosán marcado con FITC y (B) la intensidad media de fluorescencia (IMF) de células RAW264.7 tratadas con malatión o sus DAP ($0.01 \mu\text{M}$) por 2 h o citocalasina B (Cyt-B, $5 \mu\text{g/ml}$) por 1 h como control negativo. Los resultados se muestran como el porcentaje \pm D.E. (promedio de tres experimentos independientes) * $p < 0.050$, prueba t-Student vehículo vs. tratamiento.

Por otro lado, al evaluar el efecto del DMP a la concentración de $1 \mu\text{M}$, observamos un ligero incremento en el número de células fagocíticas ($\sim 10\%$) (Figura 20), que probablemente también tenga poca relevancia biológica en el proceso de iniciar una respuesta de antígenos en los macrófagos por sí solo.

Sin embargo, el co-tratamiento de DMP y PMA 50 nM, disminuyó de manera significativa la población de células que fagocitaron en alrededor de 50%, pero presentó una diferencia estadísticamente significativa respecto al tratamiento de PMA solo.

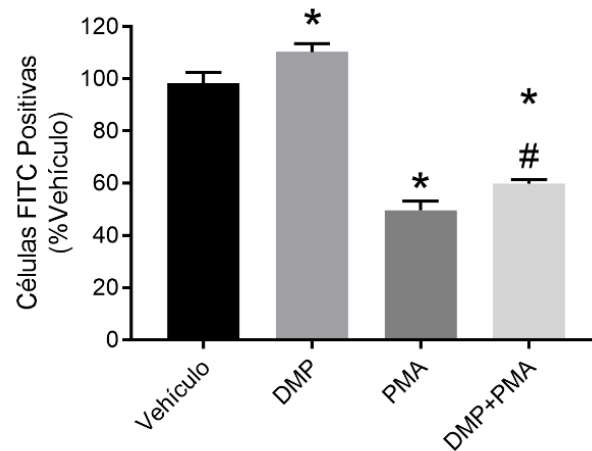


Figura 20. Porcentaje de células positivas a zimosán marcado con FITC de células RAW264.7 tratadas con DMP (1 μ M) y/o PMA (50 nM) por 2 h. Los resultados se muestran como el porcentaje \pm D.E. (promedio de tres experimentos independientes) * p <0.050, prueba t-Student vehículo vs. Tratamiento; # p <0.050, prueba t-Student PMA vs. DMP+PMA.

Tabla 5. Resumen de efectos del malatión y sus DAP sobre el citoesqueleto

Modelo	Parámetro	Compuesto OP			
		Malatión	DMDTP	DMTP	DMP
<i>In vitro</i>	Polimerización de Actina	↑ 33% Tiempo ½ de Polimerización ↓ 44% Tasa de Polimerización	↓ 44% Tasa de Polimerización ↓ 8% F-actina	↓ 53% Tasa de Polimerización ↓ 19% F-actina	↓ 42% Tasa de Polimerización ↓ 18% F-actina
	Polimerización de Tubulina	↓ 17% Tasa de Polimerización ↑ 10% Tiempo ½ de Polimerización	↓ 20% Tasa de Polimerización ↑ 12% Tiempo ½ de Polimerización	↓ 27 % Tasa de Polimerización ↑ 16% Tiempo ½ de Polimerización	Sin cambio
RAW264.7	Morfología	↑ 25% ahusada	↑ 16% ahusada	↑ 30% ahusada	↑ 30 % ahusada
	Citoesqueleto actina	↑ Pseudópodos	↑ Pseudópodos	↑ Pseudópodos ↑ Filopodios Desarreglo de actina	↑ Pseudópodos ↑ Filopodios Desarreglo de actina
	Migración	Sin cambio	↑ 82% (1 µM)	↑ 151% (0.01-0.1 µM)	↑ 125% (0.01-1 µM)
	Fagocitosis	↓ 9% (0.01 µM)	↓ 8% (0.01 µM)	↓ 11% (0.01 µM)	↓ 6% (0.01 µM)
	GTPasas	↓ 25% RhoA	↑ 31 % Rac1	↑ 44% Rac1 ↑ 20% Cdc42	↓ 28% RhoA ↑ 40% Rac1 ↑ 10% Cdc42

% de cambios respecto al vehículo

4. DISCUSIÓN

La exposición a compuestos OP se asocia a una gran cantidad de efectos tóxicos, de los cuáles, los efectos neurotóxicos son los más descritos. Sin embargo, diversos estudios han identificado diferentes blancos moleculares de estos compuestos que podrían explicar el desarrollo de enfermedades que se asocian con la exposición a los compuestos OP que no son de índole neurotóxica. Reportes previos sugieren la acción de los compuestos OP sobre los elementos del citoesqueleto, entre los que encontramos a la actina, tubulina, queratina y proteínas asociadas como la kinesina o la cofilina (Terry, 2012).

En este estudio, encontramos que el plaguicida metilado malatión y sus metabolitos DAP interfieren con la dinámica de polimerización de la actina. Sin embargo, los efectos no son iguales entre los cuatro compuestos. El malatión (0.01 μM) es capaz de retrasar el inicio de la polimerización y de disminuir la velocidad de polimerización de actina, lo que sugiere que el malatión es capaz de alterar el proceso de nucleación de actina al interactuar con los monómeros de actina sin afectar la disponibilidad de monómeros polimerizables en el medio de reacción. Estudios previos han mostrado que el malatión es capaz de formar aductos en proteínas como la albúmina y la AChE, en residuos de lisina y serina, respectivamente (Kalashnikova y Rubin, 2023; Yamagishi *et al.*, 2021). La formación de estos aductos parece estar mediada por la transformación del malatión a su metabolito oxidado, el malaoxon, permitiendo la unión del grupo fosfato a los residuos de aminoácidos. La falta de enzimas que pudieran catalizar esta conversión en el estudio *in vitro* explicaría que el malatión no interactúe covalentemente con los monómeros de actina, permitiendo la formación total de los microfilamentos de actina.

Por otro lado, los DAP, DMDTP, DMTP y DMP podrían tener alguna interacción con los monómeros de actina disminuyendo la cantidad de actina libre polimerizable, lo que explicaría la disminución en la velocidad de polimerización y de la cantidad de microfilamentos formados. Reportes previos

muestran que los compuestos OP pueden generar aductos en distintos residuos de aminoácidos de la actina, como los residuos de lisina, serina y tirosina (Bui-Nguyen *et al.*, 2014; Grigoryan *et al.*, 2009; Schopfer *et al.*, 2010). Estos residuos son de importancia pues son sitios en los que se realizan modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, la acetilación, la sumoilación y la ubiquitinación, entre otras, las cuales permiten estabilizar los microfilamentos de actina, así como la unión de proteínas específicas que regulan el citoesqueleto de actina (Varland *et al.*, 2019).

Se ha reportado también que la modificación química en residuos específicos de los monómeros de actina puede interferir con su proceso de polimerización. Por ejemplo, la modificación del residuo de tirosina 53 inhibe el proceso de polimerización (Bender *et al.*, 1976), debido a que este residuo se encuentra en el subdominio 2 en el asa de la DNAsa I, una región que está implicada en las interacciones entre monómeros de actina, por lo tanto, es un aminoácido que únicamente se encuentra expuesto en la forma de G-actina, afectando únicamente a los monómeros libres en el medio de reacción. Este residuo en particular ha sido identificado como un sitio de formación de aductos en los estudios con compuestos OP que incluyen al compuesto DFP, a los pesticidas clorpirifos y diclorvos; el metabolito CPO; y a los agentes de guerra sarín y somán (Schopfer *et al.*, 2010), lo que podría explicar los efectos observados con los tratamientos de los DAP. La formación de estos aductos, también llamada organofosforilación, ocurre por reacciones de sustitución nucleofílica entre grupos hidroxilos o aminos y el átomo de fósforo central de los OP (Gearhart *et al.*, 2007; Grigoryan, *et al.*, 2009a; 2009b). Además, la presencia de grupos electronegativos en el grupo saliente de los compuestos OP parece incrementar su reactividad y la capacidad de generar aductos (Bedford y Robinson, 1972), por lo que, los DAP, al carecer de grupos electronegativos, podrían tener una menor afinidad por estos sitios. A pesar de esto, se ha reportado que la presencia de aminoácidos con cargas positivas, como lisina, argininas o histidina cerca de aminoácidos hidroxilados como la tirosina, puede favorecer la deprotonación del grupo hidroxilo incrementando la reactividad de

estos sitios (Schopfer *et al.*, 2010), lo que podría favorecer las interacciones con moléculas menos reactivas como los DAP, explicando los efectos sobre la polimerización de la actina.

Al igual que con la actina, los DAP también son capaces de modificar la polimerización de la tubulina. Tanto el malatión como sus metabolitos DMDTP y DMTP (1 μM) son capaces de retrasar y disminuir la velocidad de polimerización de la tubulina, lo que sugiere una interferencia durante los procesos de nucleación. Algunos reportes han identificado que los compuestos OP son capaces de formar aductos en más de 20 residuos de los heterodímeros de tubulina, siendo los residuos Y83 y Y281 los más reportados (Grigoryan *et al.*, 2009a; Onder *et al.*, 2018). Estos residuos solo se encuentran disponibles en la forma libre de la tubulina, ya que la mayoría se encuentran en sitios de interacción con otros monómeros, por lo que se vuelven inaccesibles en un microtúbulo ya formado (Grigoryan *et al.*, 2009b). Es posible que tanto el malatión como el DMDTP y el DMTP pudieran interactuar con estos residuos de los heterodímeros durante su estado libre, alterando la nucleación y retardando el proceso de polimerización de la tubulina. El metabolito DMP en cambio, no mostró tener efectos significativos sobre la tubulina a diferencia del resto de DAP. La diferencia podría deberse a la ausencia de átomos de azufre en la molécula que podría ser importante para la interacción entre el DMDTP o DMTP y la tubulina.

Aunque la cantidad máxima de tubulina polimerizada no se vio afectada, es posible que la exposición a los compuestos OP pudiera resultar en MT defectuosos o poco estables. Un reporte previo mostró que la exposición al metabolito OP clorpirifos oxon (CPO) era capaz de afectar el ancho y el largo de los MT, estos defectos provocaron que el CPO generara colapsos de los MT a altas concentraciones (100 μM). Este estudio además mostró que incluso a bajas concentraciones (5 μM) se producían defectos en los MT disminuyendo su ancho o largo, pero sin colapsar sus estructuras (Grigoryan y Lockridge, 2009). Las diferencias en el ancho de los MT podrían deberse a cambios en el

número de protofilamentos presentes en los MT, como resultado de alteraciones durante la fase de nucleación (Rai *et al.*, 2021). Se requeriría de la evaluación de la estructura de los MT para evaluar esta posibilidad. Además, esta alteración en los MT podría impactar en otras funciones celulares dependientes de la restructuración del citoesqueleto de tubulina, como el proceso de división celular. Un estudio previo mostró que la exposición a concentraciones más altas de DMTP (25 μ M) fue capaz de inducir la formación de micronúcleos en células hepáticas sin incrementar marcadores de daño directo al ADN, lo cual sugirió que la inducción de micronúcleos pudo deberse a una mala segregación cromosómica a consecuencia de alteraciones en la maquinaria mitótica (Hernández-Toledano *et al.*, 2020), de la cual los MT son parte esencial.

A pesar de observar este efecto sobre la polimerización de la actina y la tubulina, no observamos colapsos en las estructuras del citoesqueleto como los reportados previamente en la literatura, en donde observó una reorganización completa de la actina, cambios morfológicos importantes y el colapso de la estructura celular en células de cáncer de mama MCF-7 y células de neuroblastoma SH-SY5Y expuestas a malatión (96-775 μ M, 2 días) o metil paratión (1 mM, 12-24 h), respectivamente (Cabello *et al.*, 2003; Carlson y Ehrich, 2001). Estas diferencias podrían deberse a las altas concentraciones y mayores tiempos de exposición utilizados en estos estudios. Por otro lado, en nuestro estudio de polimerización de actina *in vitro*, únicamente se consideraron los monómeros de actina, dejando de lado proteínas reguladoras que pudieran incrementar su estabilidad, o bien, proteger los sitios de unión a los OP (Hohmann y Dehghani, 2019).

A pesar de la ausencia de colapsos en la morfología celular causada por los compuestos OP, la presencia de distintas morfologías y arreglos en el citoesqueleto de actina tras la exposición a los OP sugiere un efecto sobre las proteínas reguladoras del citoesqueleto, como las GTPasas, ya que observamos la formación de lamelipodios (regulados por la GTPasa Rac1); un

incremento en la formación de filopodios, así como la reorientación del MTOC (regulado por Cdc42). La formación de urópodos en las células alargadas (regulado por RhoA) característicos de células en proceso de migración, se observaron con los tratamientos con DMTP y DMP. Al mismo tiempo, el incremento en la actividad de las GTPasas puede significar un aumento en algunas funciones celulares, como la migración celular, tal como ha sido reportado con otros compuestos como la doxorrubicina (Liu *et al.*, 2019).

Al evaluar los efectos que tienen los compuestos OP sobre las GTPasas, observamos que Rac1 y Cdc42 presentaron un incremento significativo después de los tratamientos con DMTP y DMP, mientras que RhoA se vio inhibida con DMP y el malatión. En el caso de Rac1, el DMP indujo su actividad rápidamente y de forma sostenida al menos durante 2 h. Mientras que, la inducción en la actividad de Cdc42 tomó hasta 1 h en alcanzar su nivel máximo y disminuyó con el tiempo. Distintos procesos de regulación negativa podrían explicar esta caída en la activación de Cdc42. Por ejemplo, el DMP podría catalizar la transición de su forma activa a su forma inactiva unida a GDP (Bishop y Hall, 2000). Mientras que, en el caso de Rac1, esto podría llevar más tiempo. A pesar de la caída que se observó en la actividad de Cdc42, los cambios dependientes de su activación (la formación de filopodios y la polarización celular) aún son observables después de las 2 h.

De la misma manera que la inducción de estructuras de actina, el efecto del DMTP y DMP sobre la migración celular disminuyó al incrementar la concentración de estos DAP. Este efecto puede estar relacionado al rol dual de Rac1. Por un lado, la activación de Rac1 induce la formación protrusiones de actina, tales como lamelipodios, que favorecen la migración celular; así mismo, Rac1 también se encarga de reclutar proteínas de andamio tales como la proteína IQGAP1. Esta proteína activadora de GTPasas está asociada con el complejo β -catenina – E-cadherina, bloqueando sus interacciones con el citoesqueleto de actina. Sin embargo, el reclutamiento de IQGAP1 por Rac1, permite la interacción de actina con estas proteínas, incrementando las

interacciones célula-célula y limitando la migración celular (Marei & Malliri, 2017). De esta forma, el incremento en la concentración de los DAP podría ocasionar una activación mayor de Rac1 y el reclutamiento de IQGAP1, favoreciendo las uniones intercelulares. Al mismo tiempo, la interacción con IQGAP1, estabiliza la forma activa de Rac1, lo que explicaría la activación sostenida observada con el DMP.

La regulación de la actividad de RhoA también es importante para el arreglo del citoesqueleto y la migración celular. Nuestros resultados muestran que el DMTP no modifica la actividad de RhoA, mientras que el DMP la inhibe significativamente. Aunque estos datos podrían sugerir que RhoA no es esencial para mediar los efectos del DMTP y el DMP sobre la migración celular, en la literatura se ha descrito que la delección de RhoA es capaz de incrementar la migración celular de macrófagos murinos en ensayos de quimiotaxis bidimensional, sin afectar la direccionalidad, aunque el tamaño de la célula se incrementa debido a la incapacidad de retraer la parte trasera del cuerpo celular durante la migración (Königs *et al.*, 2014). La falta de retracción del urópodo podría explicar el alargamiento de las células tratadas con malatión y DMP; al mismo tiempo este fenómeno podría haber contribuido en la inducción de la migración celular en conjunto a la inducción de pseudópodos y filopodios mediados por Rac1 y Cdc42 por parte de DMP. Mientras que la falta de inducción de migración por parte del malatión podría deberse a la falta de activación de Rac1 o Cdc42.

Además de la migración celular, la fagocitosis también es un proceso dinámico que requiere de la coordinación de la actividad de las GTPasas, Rac1 y Cdc42 que se encuentran activas durante el proceso de la formación de la copa fagocítica y que después deben disminuir su actividad, favoreciendo la activación de RhoA para internalizar el fagosoma (Kim *et al.*, 2017). La activación de Rac1 provocada por los DAP (DMTP, DMTP y DMP) podría obstaculizar la formación y el cierre del fagosoma, causando una internalización deficiente, tal como lo observado en fibroblastos que expresan

una forma constitutivamente activa de Rac1 (Nakaya *et al.*, 2008). En el caso del malatión, la inhibición de RhoA podría alterar el cierre del fagosoma resultando en una disminución de la fagocitosis tal como la reportada en macrófagos doble negativos de RhoA (Kim *et al.*, 2012), y similar a lo reportado en neutrófilos expuestos a malatión (Zabrodskii, 2018).

Con la finalidad de verificar que los efectos debidos a los tratamientos con DMTP y DMP estuvieran mediados por la activación de Rac1 y Cdc42, inhibimos químicamente su activación mediada por los factores intercambiadores de guanina (GEFs). La inhibición de Rac1 y/o Cdc42 resultó en la disminución de los efectos sobre la morfología y la migración inducidos por el DMP, siendo la inhibición de Cdc42 la que tuvo una mayor protección contra el DMP. Se ha descrito en la literatura que Rac1 es indispensable en los procesos de migración celular, especialmente por la formación de las protrusiones del citoesqueleto de actina que permiten el avance del cuerpo celular en células epiteliales, como las células HeLa, HEK293, AT2 o Hepa 1-6 durante ensayos de migración celular (Desai-*et al.*, 2008; Katoh *et al.*, 2006; Ridley, 2015; Zhou *et al.*, 2021). Sin embargo, en este caso observamos que, inclusive en condiciones normales, la inhibición de Rac1 no disminuyó la capacidad de migración celular.

Reportes previos han mostrado que la delección de Rac1 y Rac2 en macrófagos murinos derivados de médula ósea puede impactar en la morfología celular, especialmente en la formación de estructuras de F-actina que contribuyen a la migración celular, tales como podosomas, sin embargo, estos cambios no tuvieron un impacto significativo en la migración celular (Wells *et al.*, 2004; Wheeler *et al.*, 2006). Lo anterior podría deberse en parte a mecanismos compensatorios activados por Cdc42, la cual es capaz de activar efectores de Rac1, como el complejo Arp2/3 a través de la activación de WASp, implicados en la polimerización de la actina y la consecuente formación de lamelipodios. Este mecanismo podría explicar por qué la inhibición de Rac1 no fue suficiente para revertir los efectos del DMP y, además, por qué la inhibición de ambas

GTPasas sí causa una disminución en la capacidad de migración celular, aun sin el tratamiento con DMP, mostrando, además, que Cdc42 resulta importante en el control de la morfología y migración celular en los macrófagos RAW264.7, como previamente se ha establecido (Johnson, 1999; O'Neill *et al.*, 2016). De manera similar se ha reportado que la inhibición de Cdc42 es capaz de reducir la velocidad de migración en células epiteliales (Wojciak-Stothard y Ridley, 2003), lo que podría deberse a su implicación en el proceso de polarización celular, y no solo en la polimerización de actina.

Debido a que el bloqueo de la interacción entre las GTPasas y sus GEFs previno los efectos del DMP, es probable que el blanco molecular se encuentre río arriba. Reportes previos sugieren que algunos plaguicidas OP, incluyendo al malatión, tienen la capacidad de activar a PKC, tanto de manera directa como de manera indirecta, a través de la vía de la fosfolipasa C gamma (PLC- γ) y la acumulación de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) (Esquivel-Sentíes *et al.*, 2010; Nijima *et al.*, 1999). La activación de PKC resulta en la inducción de la migración en otros tipos celulares a través de la activación de la GTPasa Rac1, esto tras la activación de otras tirosina cinasas como Src/CrK/Cas (Nomura *et al.*, 2007).

Por lo anterior, cabe la posibilidad de que el incremento en la migración de los macrófagos pueda deberse a que el DMTP y el DMP activen a PKC o alguna de sus vías río abajo, resultando en la activación de tirosinas cinasas responsables de la activación de los GEFs y consecuentemente de Rac1 y Cdc42. La similitud de los DAP con los grupos fosfatos podría ser responsable de la interacción con proteínas como las cinasas, mientras que la acción del malatión podría estar mediada por la presencia de su grupo saliente lipofílico, permitiéndole actuar con proteínas cercanas a las membranas tales como la fosfolipasa C.

Nuestros resultados muestran que el malatión y cada uno de los DAP poseen diferentes mecanismos de acción sobre la dinámica, la organización y la función del citoesqueleto, mediados por la activación de las GTPasas Rac1 y

Cdc42. En este caso, los metabolitos DMTP y DMP tienen los efectos más notorios sobre el citoesqueleto (Tabla 5). Estos metabolitos son los compuestos más oxidados (producto de la desulfuración oxidativa) y los DAP metilados más abundantes que se encuentran en muestras de seres humanos (Krieger y Dinoff, 2000; Michalakis *et al.*, 2014; Ock *et al.*, 2020).

El DMTP es el metabolito más abundante (aprox. 50%) que se encuentra en seres humanos después de una exposición a plaguicidas como el malatión (Krieger y Dinoff, 2000). Sin embargo, el metabolismo no es la única fuente de los DAP en el organismo, ya que también pueden encontrarse DAP en alimentos contaminados, como en algunas frutas, por lo que se pueden ingerir directamente, representando una fuente importante de exposición, dado que pueden absorberse casi en su totalidad. Una vez en el organismo, el DMTP puede originar DMP, incrementando la presencia de este último metabolito (Chen *et al.*, 2013; Krieger *et al.*, 2012).

Aunque las concentraciones de los compuestos OP que se utilizaron en este estudio son bajas en comparación con las de otros estudios *in vitro*, estas concentraciones son más cercanas a las encontradas en la orina en la población general (0.02 - 60 μM), mientras que, las concentraciones en muestras de sangre de poblaciones expuestas ocupacionalmente a los compuestos OP pueden encontrarse en un rango de 0.53 a 0.73 μM (Michalakis *et al.*, 2014). Por lo tanto, los efectos que encontramos en este trabajo podrían estar presentes en las poblaciones humanas con exposición crónica a compuestos OP, la cual tiene asociación con el desarrollo de distintas enfermedades. Por ejemplo, se ha reportado que un incremento en la migración celular está relacionada con el desarrollo de cáncer y de algunas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Tsai *et al.*, 2017), que además están asociadas con la exposición a compuestos OP (Meyer *et al.*, 2017).

Además de las modificaciones encontradas en la migración celular, es importante considerar que la modificación en la activación de las proteínas

como las GTPasas después de la exposición a los DAP, podría significar la identificación de potenciales nuevas rutas de señalización blanco de los OP. Esto a su vez, puede ser de ayuda para entender los efectos no colinérgicos y la modificación de funciones celulares reportadas por la exposición a plaguicidas OPs y sus DAP, y al mismo tiempo ser de utilidad para la determinación de la contribución de los DAP en la toxicidad de los compuestos OP.

5. CONCLUSIONES

- El malatión y sus DAP interfieren directamente con la polimerización de actina y tubulina, causando una disminución en la formación de F-actina y retrasando la formación de MT en un sistema *in vitro*.
- Los DAP, especialmente el DMTP y DMP, indujeron la formación de pseudópodos y filopodios, además de la polarización de las células RAW264.7 a través de la activación de las GTPasas pequeñas Rac1 y Cdc42.
- Los metabolitos DMTP y DMP indujeron un aumento en la migración celular a bajas concentraciones (0.01 a 0.1 μM) y la inducción provocada por el DMP es dependiente de la activación de Cdc42 y Rac1.
- La exposición a compuestos OP modifica el citoesqueleto a través de diferentes mecanismos moleculares que implican la vía de las GTPasas, siendo los metabolitos más oxidados y abundantes los que poseen mayores efectos sobre el citoesqueleto.

6. PERSPECTIVAS

- Identificar si los DAP son capaces de formar aductos de manera directa con las moléculas de actina y tubulina a través de espectrometría de masas.
- Identificar los posibles blancos moleculares de los DAP río arriba de las GTPasas a través de la identificación de la activación de proteínas como GEFs, tirosina cinasas, como aquellas de la familia Src o receptores membranales, como RTK o GPCR.
- Evaluar si los efectos sobre el citoesqueleto y la activación de las GTPasas pueden modificar otras actividades de los macrófagos, como el procesamiento de antígenos y la presentación antigénica, a través de ensayos de activación de células T.
- Determinar si los efectos sobre microfilamentos y las GTPasas ocurre en otros tipos celulares y células humanas.
- Evaluar el efecto de la exposición crónica a DAP sobre el estado de las GTPasas y la actividad de los macrófagos.
- Evaluar el efecto de las mezclas de DAP sobre la regulación de las GTPasas y el citoesqueleto y la función de los macrófagos en sistemas *in vitro*.

7. REFERENCIAS

- Abram, Clare, L. (2008). The diverse functions of Src family kinases in macrophages. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 13). <https://doi.org/10.2741/3015>
- Al-Dawood, A. N., Al-Ghazal, R. A., Al-Jaser, M. H., & Khalil, G. M. (2009). Effect of chlorpyrifos on healing of cutaneous leishmaniasis lesions after treatment with Pentostam®. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 16(1), 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2009.07.005>
- Ascione, F., Caserta, S., & Guido, S. (2017). The wound healing assay revisited: A transport phenomena approach. *Chemical Engineering Science*, 160, 200–209. <https://doi.org/10.1016/J.CES.2016.11.014>
- Band, P. R., Abanto, Z., Bert, J., Lang, B., Fang, R., Gallagher, R. P., & Le, N. D. (2011). Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia Farmers. *The Prostate*, 71(2), 168–183. <https://doi.org/10.1002/pros.21232>
- Bates, N., & Campbell, A. (2008). Organophosphate Insecticides. *Handbook of Poisoning in Dogs and Cats*, 199–204. <https://doi.org/10.1002/9780470699010.ch50>
- Bedford, C. T., & Robinson, J. (1972). The alkylating properties of organophosphates. *Xenobiotica*, 2(4), 307–337. <https://doi.org/10.3109/00498257209111060>
- Bender, N., Fasold, H., Kenmoku, A., Middelhoff, G., & Volk, K.-E. (1976). The Selective Blocking of the Polymerization Reaction of Striated Muscle Actin Leading to a Derivative Suitable for Crystallization. Modification of Tyr-53 by 5-Diazonium-(1H)tetrazole. *European Journal of Biochemistry*, 64(1), 215–218. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10290.x>
- Berton, G., Mócsai, A., & Lowell, C. A. (2005). Src and Syk kinases: Key regulators of phagocytic cell activation. *Trends in Immunology*, 26(4), 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.002>
- Biro, M., Munoz, M. A., & Weninger, W. (2014). Targeting Rho-GTPases in immune cell migration and inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 171(24), 5491–5506. <https://doi.org/10.1111/bph.12658>
- Bishop, A. L., & Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochemical Journal*, 348(2), 241–255. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3480241>
- Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24(2–3), 119–124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3)
- Bowdish, D. (2016). *Propagation & Culturing of Raw 264.7 Cells*. Retrieved from <http://www.bowdish.ca/lab/wp-content/uploads/2016/05/Culturing-RAW264.7-Cells.pdf>
- Bui-Nguyen, T. M., Dennis, W. E., Jackson, D. A., Stallings, J. D., & Lewis, J. A. (2014). Detection of Dichlorvos Adducts in a Hepatocyte Cell Line. *Journal of Proteome Research*, 13(8), 3583–3595. <https://doi.org/10.1021/pr5000076>
- Buratti, F. M., Leoni, C., & Testai, E. (2007). The Human Metabolism of

- Organophosphorothionate Pesticides: Consequences for Toxicological Risk Assessment F. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 2(1 SUPPL.), 37–44. <https://doi.org/10.1007/s00003-006-0109-z>
- Cabello, G., Galaz, S., Botella, L., Calaf, G., Pacheco, M., Stockert, J., ... Juarranz, A. (2003). The pesticide malathion induces alterations in actin cytoskeleton and in cell adhesion of cultured breast carcinoma cells. *Int J Oncol*, 23(3), 697–704. <https://doi.org/10.3892/ijo.23.3.697>
- Carlson, K., & Ehrich, M. (2001). Organophosphorus compounds alter intracellular f-actin content in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *NeuroToxicology*, 22(6), 819–827. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(01\)00073-0](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(01)00073-0)
- Chen, L., Zhao, T., Pan, C., Ross, J., Ginevan, M., Vega, H., & Krieger, R. (2013). Absorption and excretion of organophosphorous insecticide biomarkers of malathion in the rat: Implications for overestimation bias and exposure misclassification from environmental biomonitoring. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65(3), 287–293. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2012.12.010>
- Cibrian, C., Villaseñor, L., Medina-Buelvas, D. M., & Vega, L. (2016). *Efecto de los metabolitos etilados de plaguicidas organofosforados sobre la actividad citolítica de las células NK*. Ciudad de México.
- Collard, J. G. (1996). Signaling pathways regulated by Rho-like proteins: A possible role in tumor formation and metastasis (Review). *International Journal of Oncology*, 8(1), 131–138.
- Corsini, E., Sokooti, M., Galli, C. L. L., Moretto, A., & Colosio, C. (2013). Pesticide induced immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology*, 307, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.10.009>
- Cruse, J. M., Lewis, R. E., Wang, H., Schreuder, G. M. T., Marsh, S. G. E., & Kennedy, L. J. (2004). Immunology Guidebook. In *Immunology Guidebook*. <https://doi.org/10.1016/B978-012198382-6/50039-X>
- Desai, L. P., Chapman, K. E., & Waters, C. M. (2008). Mechanical stretch decreases migration of alveolar epithelial cells through mechanisms involving Rac1 and Tiam1. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(5), 958–965. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90218.2008>
- Doolittle, L. K., Rosen, M. K., & Padrick, S. B. (2013). Measurement and analysis of in vitro actin polymerization. *Methods in Molecular Biology*, 1046, 273–293. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-538-5_16
- Duggan, A., Charnley, G., Chen, W., Chukwudebe, A., Hawk, R., Krieger, R. I., ... Yarborough, C. (2003). Di-alkyl phosphate biomonitoring data: Assessing cumulative exposure to organophosphate pesticides. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37(3), 382–395. [https://doi.org/10.1016/S0273-2300\(03\)00031-X](https://doi.org/10.1016/S0273-2300(03)00031-X)
- Eleršek, T., & Filipi, M. (2011). Organophosphorus Pesticides - Mechanisms of Their Toxicity. In *Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure* (pp. 243–260). <https://doi.org/10.5772/14020>

- Eriksson, M., Hardell, L., Carlberg, M., & Akerman, M. (2008). Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. *International Journal of Cancer*, *123*(7), 1657–1663. <https://doi.org/10.1002/ijc.23589>
- Esquivel-Sentíes, 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. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *248*(2), 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.07.017>
- Ettinger, A., & Wittmann, T. (2014). Fluorescence live cell imaging. *Methods in Cell Biology*, *123*, 77–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00005-7>
- Galloway, T., & Handy, R. (2003). Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides. *Ecotoxicology*, *12*(1/4), 345–363. <https://doi.org/10.1023/A:1022579416322>
- Gao, J., Naughton, S. X., Beck, W. D., Hernandez, C. M., Wu, G., Wei, Z., ... Terry, A. V. (2017). Chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon impair the transport of membrane bound organelles in rat cortical axons. *NeuroToxicology*, *62*, 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.06.003>
- Gao, J., Naughton, S. X., Wulff, H., Singh, V., Beck, W. D., Magrane, J., ... Terry, A. V. (2016). Diisopropylfluorophosphate Impairs the Transport of Membrane-Bound Organelles in Rat Cortical Axons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *356*(3), 645–655. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.230839>
- Gao, Y., Dickerson, J. B., Guo, F., Zheng, J., & Zheng, Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(20), 7618–7623. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307512101>
- Gearhart, D. A., Sickles, D. W., Buccafusco, J. J., Prendergast, M. A., & Terry, A. V. (2007). Chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon, and diisopropylfluorophosphate inhibit kinesin-dependent microtubule motility. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *218*(1), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.10.008>
- Grigoryan, H., Li, B., Anderson, E. K., Xue, W., Nachon, F., Lockridge, O., & Schopfer, L. M. (2009). Covalent binding of the organophosphorus agent FP-biotin to tyrosine in eight proteins that have no active site serine. *Chemico-Biological Interactions*, *180*(3), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.03.018>
- Grigoryan, H., Li, B., Xue, W., Grigoryan, M., Schopfer, L. M., & Lockridge, O. (2009). Mass spectral characterization of organophosphate-labeled lysine in peptides. *Analytical Biochemistry*, *394*(1), 92–100. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2009.07.008>
- Grigoryan, H., & Lockridge, O. (2009). Nanoimages show disruption of tubulin polymerization by chlorpyrifos oxon: Implications for neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *240*(2), 143–148.

- <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.015>
- Grigoryan, H., Schopfer, L. M., Peeples, E. S., Duysen, E. G., Grigoryan, M., Thompson, C. M., & Lockridge, O. (2009). Mass spectrometry identifies multiple organophosphorylated sites on tubulin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(2), 149–158. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2009.07.020>
- Grigoryan, H., Schopfer, L. M., Thompson, C. M., Terry, A. V., Masson, P., & Lockridge, O. (2008). Mass spectrometry identifies covalent binding of soman, sarin, chlorpyrifos oxon, diisopropyl fluorophosphate, and FP-biotin to tyrosines on tubulin: A potential mechanism of long term toxicity by organophosphorus agents. *Chemico-Biological Interactions*, 175(1–3), 180–186. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2008.04.013>
- Harley, K. G., Huen, K., Schall, R. A., Holland, N. T., Bradman, A., Barr, D. B., & Eskenazi, B. (2011). Association of organophosphate pesticide exposure and paraoxonase with birth outcome in mexican-american women. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023923>
- Herberich, G., Wurflinger, T., Sechi, A., Windoffer, R., Leube, R., & Aach, T. (2010). Fluorescence microscopic imaging and image analysis of the cytoskeleton. *2010 Conference Record of the Forty Fourth Asilomar Conference on Signals, Systems and Computers*, 1359–1363. <https://doi.org/10.1109/ACSSC.2010.5757755>
- Herbert, L. T., Castro, J. M., Bianchi, V. A., Cossi, P. F., Luquet, C. M., & Kristoff, G. (2018). Effects of azinphos-methyl on enzymatic activity and cellular immune response in the hemolymph of the freshwater snail *Chilina gibbosa*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 150(April), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.07.005>
- Hermanowicz, A., & Kossman, S. (1984). Neutrophil function and infectious disease in workers occupationally exposed to phosphoorganic pesticides: Role of mononuclear-derived chemotactic factor for neutrophils. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 33(1), 13–22. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(84\)90288-5](https://doi.org/10.1016/0090-1229(84)90288-5)
- Hernández-Toledano, D. S., Estrada-Muñiz, E., & Vega, L. (2020). Genotoxicity of the organophosphate pesticide malathion and its metabolite dimethylthiophosphate in human cells in vitro. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 856–857(July), 503233. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503233>
- Hohmann, T., & Dehghani, F. (2019). The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 8(4), 362. <https://doi.org/10.3390/cells8040362>
- Hong, L., Kenney, S. R., Phillips, G. K., Simpson, D., Schroeder, C. E., Nöth, J., ... Wandinger-Ness, A. (2013). Characterization of a Cdc42 protein inhibitor and its use as a molecular probe. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), 8531–8543. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.435941>
- Jacquemet, G., Paatero, I., Carisey, A. F., Padzik, A., Orange, J. S., Hamidi, H., & Ivaska, J. (2017). FiloQuant reveals increased filopodia density during breast cancer progression. *Journal of Cell Biology*, 216(10), 3387–3403. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704045>

- Johnson, D. (1999). Cdc42: An Essential Rho-Type GTPase Controlling Eukaryotic Cell Polarity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 54–105. <https://doi.org/10.1128/mnbr.63.1.54-105.1999>
- Kalashnikova, A. A., & Rubin, A. L. B. T.-R. M. in B. S. (2023). Malathion. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00450-4>
- Kassa, J., Kročová, Z., Ševelová, L., Sheshko, V., Kasalová, I., & Neubauerová, V. (2004). The Influence of Single or Repeated Low-Level Sarin Exposure on Immune Functions of Inbred BALB/c Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 94(3), 139–143. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2004.pto940307.x>
- Katoh, H., Hiramoto, K., & Negishi, M. (2006). Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *Journal of Cell Science*, 119(1), 56–65. <https://doi.org/10.1242/jcs.02720>
- Kim, J. G., Moon, M. Y., Kim, H. J., Li, Y., Song, D. K., Kim, J. S., ... Park, J. B. (2012). Ras-related GTPases Rap1 and RhoA collectively induce the phagocytosis of serum-opsonized zymosan particles in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 5145–5155. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257634>
- Kim, S. Y., Kim, S., Bae, D. J., Park, S. Y., Lee, G. Y., Park, G. M., & Kim, I. S. (2017). Coordinated balance of Rac1 and RhoA plays key roles in determining phagocytic appetite. *PLoS ONE*, 12(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174603>
- Königs, V., Jennings, R., Vogl, T., Horsthemke, M., Bachg, A. C., Xu, Y., ... Hanley, P. J. (2014). Mouse Macrophages completely lacking Rho subfamily GTPases (RhoA, RhoB, and RhoC) have severe lamellipodial retraction defects, but robust chemotactic navigation and altered motility. *Journal of Biological Chemistry*, 289(44), 30772–30784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.563270>
- Krieger, R. I., Chen, L., Ginevan, M., Watkins, D., Cochran, R. C., Driver, J. H., & Ross, J. H. (2012). Implications of estimates of residential organophosphate exposure from dialkylphosphates (DAP) and their relevance to risk. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 64(2), 263–266. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.08.012>
- Krieger, R. I., & 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(4), 546–553. <https://doi.org/10.1007/s002449910071>
- Leenen, P. J. M., Jansen, A. M. A. C., & van Ewijk, W. (1986). Murine macrophage cell lines can be ordered in a linear differentiation sequence. *Differentiation*, 32(2), 157–164. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1986.tb00568.x>
- Lerro, C. C., Koutros, S., Andreotti, G., Friesen, M. C., Alavanja, M. C., Blair, A., ... 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(10), 736 LP – 744. <https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102798>

- Li, B., Schopfer, L. M., Grigoryan, H., Thompson, C. M., Hinrichs, S. H., Masson, P., & Lockridge, O. (2009). Tyrosines of Human and Mouse Transferrin Covalently Labeled by Organophosphorus Agents: A New Motif for Binding to Proteins that Have No Active Site Serine. *Toxicological Sciences*, *107*(1), 144–155. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn211>
- Li, B., Schopfer, L. M., Hinrichs, S. H., Masson, P., & Lockridge, O. (2007). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry assay for organophosphorus toxicants bound to human albumin at Tyr411. *Analytical Biochemistry*, *361*(2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2006.11.018>
- Li, Q., Hirata, Y., Piao, S., & Minami, M. (2000). The by-products generated during sarin synthesis in the Tokyo sarin disaster induced inhibition of natural killer and cytotoxic T lymphocyte activity. *Toxicology*, *146*(2–3), 209–220. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00174-8)
- Li, Q., & Kawada, T. (2006). The Mechanism of Organophosphorus Pesticide-Induced Inhibition of Cytolytic Activity of Killer Cells. *Cellular & Molecular Immunology*, *3*(3), 171–178. Retrieved from <http://www.cmi.ustc.edu.cn/3/3/171.pdf>
- Li, Q., Nagahara, N., Takahashi, H., Takeda, K., Okumura, K., & Minami, M. (2002). Organophosphorus pesticides markedly inhibit the activities of natural killer, cytotoxic T lymphocyte and lymphokine-activated killer: a proposed inhibiting mechanism via granzyme inhibition. *Toxicology*, *172*(3), 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00004-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00004-5)
- Lin, W., & Wang, X. (2017). *Regulating DCs in Innate Immune Response and Infection by Cytoskeletal Proteins*. <https://doi.org/10.4172/2476-1966.1000124>
- Liu, C.-L., Chen, M.-J., Lin, J.-C., Lin, C.-H., Huang, W.-C., Cheng, S.-P., ... Chang, Y.-C. (2019). Doxorubicin Promotes Migration and Invasion of Breast Cancer Cells through the Upregulation of the RhoA/MLC Pathway. *Journal of Breast Cancer*, *22*(2), 185–195. <https://doi.org/10.4048/jbc.2019.22.e22>
- Lockridge, O., & Schopfer, L. M. (2010). Review of tyrosine and lysine as new motifs for organophosphate binding to proteins that have no active site serine. *Chemico-Biological Interactions*, *187*(1–3), 344–348. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.002>
- Lockridge, O., & Schopfer, L. M. (2023). Review: Organophosphorus toxicants, in addition to inhibiting acetylcholinesterase activity, make covalent adducts on multiple proteins and promote protein crosslinking into high molecular weight aggregates. *Chemico-Biological Interactions*, *376*, 110460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110460>
- 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*(8), 1205–1209. <https://doi.org/10.1289/ehp.8911>
- Mak, T., Saunders, M., & Jett, B. (2014). *Primer to Immune Response*.
- Mammoto, A., Huang, S., Moore, K., Oh, P., & Ingber, D. E. (2004). *Role of RhoA, mDia, and ROCK in Cell Shape-dependent Control of the Skp2-p27*

- kip1 Pathway and the G 1 /S Transition**.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M402725200>
- Marei, H., & Malliri, A. (2017). GEFs: Dual regulation of Rac1 signaling. *Small GTPases*, 8(2), 90–99. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1202635>
- Medina-Buelvas, D., Estrada-Muñiz, E., Flores-Valadez, M., & Vega, L. (2019). Genotoxic and immunotoxic effects of the organophosphate metabolite diethyldithiophosphate (DEDTP) in Vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 366, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.023>
- Medina-Buelvas, D. M. (2019). *El efecto inmunomodulador de la exposición a dietilditiofosfoato (DEDTP) incrementa la carga parasitaria y el daño fibrótico por la infección con Trypanosoma cruzi Ninoa en un model animal*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.
- Medina-Buelvas, D. M., Estrada-Muñiz, E., Rodríguez-Sosa, M., Shibayama, M., & Vega, L. (2019). Increased heart fibrosis and acute infection in a murine Chagas disease model associated with organophosphorus pesticide metabolite exposure. *Scientific Reports*, 9(1), 17539. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54218-7>
- Meyer, A., Sandler, D. P., Beane Freeman, L. E., Hofmann, J. N., & Parks, C. G. (2017). Pesticide Exposure and Risk of Rheumatoid Arthritis among Licensed Male Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives*, 125(7), 077010. <https://doi.org/10.1289/EHP1013>
- Michalakis, M., Tzatzarakis, M. N., Kovatsi, L., Alegakis, A. K., Tsakalof, A. K., Heretis, I., & Tsatsakis, A. (2014). Hypospadias in offspring is associated with chronic exposure of parents to organophosphate and organochlorine pesticides. *Toxicology Letters*, 230(2), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.015>
- Mostowy, S., & Shenoy, A. R. (2015). The cytoskeleton in cell-autonomous immunity: Structural determinants of host defence. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 559–573. <https://doi.org/10.1038/nri3877>
- Nain, S., Bour, A., Chalmers, C., & Smits, J. E. G. (2011). Immunotoxicity and disease resistance in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) exposed to malathion. *Ecotoxicology*, 20(4), 892–900. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0657-6>
- Nakaya, M., Kitano, M., Matsuda, M., & Nagata, S. (2008). Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27), 9198–9203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803677105>
- Niiijima, H., Nagao, M., Nakajima, M., Takatori, T., Matsuda, Y., Iwase, H., & Kobayashi, M. (1999). Sarin-like and Soman-like Organophosphorous Agents Activate PLC γ in Rat Brains. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156(1), 64–69. <https://doi.org/10.1006/TAAP.1998.8628>
- Nomura, N., Nomura, M., Sugiyama, K., & Hamada, J. I. (2007). Src regulates phorbol 12-myristate 13-acetate-activated PKC-induced migration via Cas/Crk/Rac1 signaling pathway in glioblastoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 20(4), 511–519. <https://doi.org/10.3892/ijmm.20.4.511>

- O'Neill, P. R., Kalyanaraman, V., & Gautam, N. (2016). Subcellular optogenetic activation of Cdc42 controls local and distal signaling to drive immune cell migration. *Molecular Biology of the Cell*, 27(9), 1442–1450. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-12-0832>
- Ock, J., Kim, J., & Choi, Y.-H. (2020). Organophosphate insecticide exposure and telomere length in U.S. adults. *Science of The Total Environment*, 709, 135990. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.135990>
- Ogasawara, N., Matsushima, M., Kawamura, N., Atsumi, K., Yamaguchi, T., Ochi, H., ... Kawabe, T. (2017). Modulation of immunological activity on macrophages induced by diazinon. *Toxicology*, 379, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.01.014>
- Ohashi, K., Fujiwara, S., & Mizuno, K. (2017). Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction. *Journal of Biochemistry*, 161(3), mvw082. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw082>
- Onder, S., Schopfer, L. M., Tacal, O., Blake, T. A., Johnson, R. C., & Lockridge, O. (2018). Mass Spectral Detection of Diethoxyphospho-Tyrosine Adducts on Proteins from HEK293 Cells Using Monoclonal Antibody depY for Enrichment. *Chemical Research in Toxicology*, 31(6), 520–530. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00083>
- Oshima, R. G. (2007). Intermediate filaments: A historical perspective. *Experimental Cell Research*, 313(10), 1981–1994. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2007.04.007>
- Pixley, F. J., Lee, P. S. W., Condeelis, J. S., & Stanley, E. R. (2023). Protein Tyrosine Phosphatase ϕ Regulates Paxillin Tyrosine Phosphorylation and Mediates Colony-Stimulating Factor 1-Induced Morphological Changes in Macrophages. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1795-1809.2001>, 21(5), 1795–1809. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1795-1809.2001>
- Pixley, F. J., Xiong, Y., Yu, R. Y. L., Sahai, E. A., Stanley, E. R., & Ye, B. H. (2005). BCL6 suppresses RhoA activity to alter macrophage morphology and motility. *Journal of Cell Science*, 118(9), 1873–1883. <https://doi.org/10.1242/JCS.02314>
- Rai, A., Liu, T., Katrukha, E. A., Estevez-Gallego, J., Paterson, I., Diaz, F., ... Akhmanova, A. (2021). Lattice defects induced by microtubule-stabilizing agents exert a long-range effect on microtubule growth by promoting catastrophes. *BioRxiv*, 2021.02.11.430743. <https://doi.org/10.1073/pnas.2112261118/-/DCSupplemental>. Published
- Ramaekers, F. C. S., & Bosman, F. T. (2004). The cytoskeleton and disease. *Journal of Pathology*, 204(4), 351–354. <https://doi.org/10.1002/path.1665>
- Ridley, A. J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.005>
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., ... Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651), 1704–1709. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=14657486&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1126/science.1092053>

- Sánchez-Peña, L. C., Reyes, B. E., López-Carrillo, L., Recio, R., Morán-Martínez, J., Cebrián, M. E., & Quintanilla-Vega, B. (2004). Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *196*(1), 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.023>
- Schäfer, M., Koppe, F., Stenger, B., Brochhausen, C., Schmidt, A., Steinritz, D., ... Pohl, C. (2013). Influence of organophosphate poisoning on human dendritic cells. *Chemico-Biological Interactions*, *206*(3), 472–478. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.08.011>
- Schopfer, L. M., Champion, M. M., Tamblyn, N., Thompson, C. M., & Lockridge, O. (2005). Characteristic mass spectral fragments of the organophosphorus agent FP-biotin and FP-biotinylated peptides from trypsin and bovine albumin (Tyr410). *Analytical Biochemistry*, *345*(1), 122–132. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2005.07.016>
- Schopfer, L. M., Grigoryan, H., Li, B., Nachon, F., Masson, P., & Lockridge, O. (2010). Mass spectral characterization of organophosphate-labeled, tyrosine-containing peptides: Characteristic mass fragments and a new binding motif for organophosphates. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *878*(17–18), 1297–1311. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.07.026>
- Schopfer, L. M., & Lockridge, O. (2018). Chlorpyrifos oxon promotes tubulin aggregation via isopeptide cross-linking between diethoxyphospho-Lys and Glu or ASP: Implications for neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(35), 13566–13577. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004172>
- Simon, S., & Hilbi, H. (2015). Subversion of cell-autonomous immunity and cell migration by *Legionella pneumophila* effectors. *Frontiers in Immunology*, *6*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00447>
- Sogorb, M. A., & Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, *128*(1–3), 215–228. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00543-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00543-4)
- Soltaninejad, K., & 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*(3), RA75-A90.
- Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., ... Król, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198943>
- Terry, A. V. V. (2012). Functional consequences of repeated organophosphate exposure: Potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacology and Therapeutics*, *134*(3), 355–365. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.001>
- Tojkander, S., Gateva, G., & Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *Journal of Cell Science*, *125*(8), 1855–1864. <https://doi.org/10.1242/jcs.098087>

- Tsai, C.-H., Liu, S.-C., Wang, Y.-H., Su, C.-M., Huang, C.-C., Hsu, C.-J., & Tang, C.-H. (2017). Osteopontin inhibition of miR-129-3p enhances IL-17 expression and monocyte migration in rheumatoid arthritis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(2), 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2016.11.015>
- Tsatsakis, A. M., Tzatzarakis, M. N., Koutroulakis, D., Toutoudaki, M., & 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(5), 364–373. <https://doi.org/10.1080/00498250902745090>
- Ueta, M., Takaoka, K., Yamamura, M., Maeda, H., Tamaoka, J., Nakano, Y., ... Kishimoto, H. (2019). Effects of TGF- β 1 on the migration and morphology of RAW264.7 cells in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 20(5), 4331–4339. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10662>
- Varland, S., Vandekerckhove, J., & Drazic, A. (2019). Actin Post-translational Modifications: The Cinderella of Cytoskeletal Control. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(6), 502–516. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2018.11.010>
- Vicente-Manzanares, M., & Sánchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature Reviews Immunology*, 4(2), 110–122. <https://doi.org/10.1038/nri1268>
- Wells, C. M., Walmsley, M., Ooi, S., Tybulewicz, V., & Ridley, A. J. (2004). Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *Journal of Cell Science*, 117(7), 1259–1268. <https://doi.org/10.1242/jcs.00997>
- Wen, Y., Mu, L., & Shi, Y. (2016). Immunoregulatory functions of immune complexes in vaccine and therapy. *EMBO Molecular Medicine*, 8(10), 1120–1133. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606593>
- Wheeler, A. P., Wells, C. M., Smith, S. D., Vega, F. M., Henderson, R. B., Tybulewicz, V. L., & Ridley, A. J. (2006). Rac1 and Rac2 regulate macrophage morphology but are not essential for migration. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 13), 2749–2757. <https://doi.org/10.1242/jcs.03024>
- Wojciak-Stothard, B., & Ridley, A. J. (2003). Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases. *Journal of Cell Biology*, 161(2), 429–439. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210135>
- Yamagishi, Y., Iwase, H., & Ogra, Y. (2021). Effects of human serum albumin on post-mortem changes of malathion. *Scientific Reports*, 11(1), 11573. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91145-y>
- Ye, M., Beach, J., Martin, J. W., & Senthilselvan, A. (2013). Occupational pesticide exposures and respiratory health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6442–6471. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126442>
- Zabrodskij, P. F. (2018). The effect of chronic intoxication by organophosphate insecticides on the parameters of innate and adaptive immunity and realization of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 6(6), 1–0.

<https://doi.org/10.15406/PPIJ.2018.6.00211>

Zhou, H. C., Liu, C. X., Pan, W. D., Shang, L. R., Zheng, J. L., Huang, B. Y., ... Zhuang, S. M. (2021). Dual and opposing roles of the androgen receptor in VETC-dependent and invasion-dependent metastasis of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 75(4), 900–911. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.04.053>

8. ANEXOS

8.1 Hojas de Seguridad

8.1.1 Malatión

SIGMA-ALDRICH

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

sigmaaldrich.com

Revisión: 1.3
Fecha de revisión: 12/29/2015
Fecha de impresión: 09/06/2017

1. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO Y DE LA COMPAÑÍA

- 1.1 Identificadores del producto**
Nombre del producto: Malatión
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 desaconejados**
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 8 Norte No. 107
52000 TOLUCA, MEXICO
Teléfono: +52 (0)1-800-007-5300
Fax: +52 (0)1-800-712-9920

1.4 Teléfono de emergencia

- Teléfono de Urgencia:

P202 No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.
P281 Evitar respirar el polvo o el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.
P273 Evitar liberar el producto al medio ambiente.
P303 + P361 + P533 En caso de liberación al medio ambiente: Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.
P308 + P313 En caso de ingestión: Llamarse 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 abundante.
P333 + P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P303 + P361 + P533 En caso de liberación al medio ambiente: Llevar los recipientes contaminados antes de volver a usarlos.
P501 Eliminar el contenido del recipiente en una planta de eliminación de residuos autorizada.

2.3 Peligros no clasificados de otra materia - ninguno(a)

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

- Clasificación SGA de acuerdo con 28 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 10.

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

- Picturegram:
- Pelotero de advertencia: Peligro
Indicador(es) de peligro: H302, H317, H350, H400, H410
Declaración(es) de prudencia: P201. Pedir instrucciones especiales antes del uso.

Sigma-Aldrich - 36143

Página 1 de 10

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

3.1 Sustancias

- Formula: C₁₀H₁₆O₃P₂S₂
Peso molecular: 330.36 g/mol
No. CAS: 121-75-5
No. CE: 296-697-7
No. Índice: 015-041-00-X

Componentes peligrosos

Componente	Clasificación	Concentración
Malatión	Acute Tox. 4, Sen. Sana. 1, Carc. (B, Acuto), Acute 1, Aquat. Crónico 1, H302, H317, H350, H410	≤ 100 %

Para el texto íntegro de las Declaraciones-H mencionadas en esta sección, véase la Sección 10.

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. Retirar 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
Lavar 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.

Sigma-Aldrich - 36143

Página 2 de 10

- 4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados
Los síntomas y efectos más importantes conocidos se describen en la etiqueta (ver sección 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
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
Usar 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
Evitar nuevos escapes o derrames si puede hacerse sin riesgo. 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
Empacar 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 la eliminación de desechos ver sección 13.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

- 7.1 Precauciones para una manipulación segura
Evitar 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 almacenamiento 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 |
|------------|-------------|-------------------------------------|--|------|
| Malatión | 121-75-5 | TWA: 0.00020 mg/m ³ | Límite de exposición recomendarde de NIOSH, EE.UU. | |
| | Observación | Potencial para la absorción cutánea | | |

Sigma-Aldrich - 36143

Página 3 de 10

	TWA	15.00000 mg/m ³	Límite de Exposición Ocupacional (OSHA) EE.UU. - Tabla Z-1 Límites para los contaminantes del aire
Designación de la piel			
TWA	15.00000 mg/m ³		Límite de Exposición Ocupacional (OSHA) EE.UU. - Tabla Z-1 Límites para los contaminantes del aire
Designación de la piel			
Sueldos catagoría, para más información véase el documento OSHA 1910.1009			
TWA	1.00000 mg/m ³		Valores límite (TLV) de la ACGIH-USA
inhalación de la colinaesterasa			
Las sustancias para las que existe un Fichas de Exposición Biológica o Físicas (véase la sección BEI-8), consulte BEI-8 para el parámetro indicador de serotoninaesterasa			
No clasificados como carcinógenos en humanos			
Riesgo de absorción cutánea			

8.2 Controles de la exposición

- Controles técnicos aprobados**
Manipular con las precauciones de higiene industrial adecuadas, y respetar las prácticas de seguridad. Lavarse las manos antes de los desechos y después de terminar la jornada laboral.
Protección personal
Protección de los ojos/ la cara
Gafas de protección y gafas de seguridad. Usar equipo de protección para los ojos protegido y aprobado según las normas gubernamentales correspondientes, tales como NIOSH (EE.UU.) o EN 185 (UE).
Protección de la piel
Manipular con guantes. Los guantes deben ser inspeccionados antes de su uso. Utilice la técnica correcta de quitar los guantes (en la parte superior exterior del guante) para evitar el contacto de la piel con este producto. Deséchelos 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
Darle el mantenimiento de riesgo mientras que los respiradores autorizados de aire son separados, usar un respirador que cubra toda la cara con combinación multi-propósito (EELU) o tipo ABCX (EN 14587) respiradores de cartucho de reemplazo para controles de emergencia. Si el respirador es la única protección, usar un respirador sumergido que cubra toda la cara. Usar respiradores y componentes testados y aprobados bajo los estándares gubernamentales aprobados como NIOSH (EE.UU.) o CEN (UE).
Control de exposición ambiental
Evitar nuevos escapes o derrames si puede hacerse sin riesgo. 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 líquida
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

Sigma-Aldrich - 36143

Página 4 de 10

f)	Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición	166 - 167 °C (313 - 316 °F) a 1 00 HPa (0,75 mmHg)
g)	Punto de inflamación	Sin datos disponibles
h)	Tasa de evaporación	Sin datos disponibles
i)	Inflamabilidad (edición, g98)	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	1,205 g/cm ³
n)	Solubilidad en agua	Ignorantemente 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, Corrosivos metálicos

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

LD₅₀ Oral - Humanos - hembra - 240 mg/kg
Observaciones: Vasculares. Disminución de la TA no caracterizada en la sección autonómica Pulmones, torax o Respiración. Edema pulmonar crónico. El contacto prolongado con la piel puede producir irritación de la piel y dermatitis.

Sigma-Aldrich - 36142

Página 5 de 10

LD₅₀ Oral - Humano - macho - 471 mg/kg
Observaciones: Consulta: Cornea Vasculares. Disminución de la TA no caracterizada en la sección autonómica Pulmones, torax o Respiración. Diarrea.
DL₅₀ Oral - Rata - 1,000 - 1,350 mg/kg
DL₅₀ Oral - Pájaro (savage) - 400 mg/kg
Inhalación: Sin datos disponibles
DL₅₀ Cutáneo - Conejo - 8,750 mg/kg
Sin datos disponibles

Corrosión o irritación cutáneas

Sin datos disponibles

Lesiones o irritación ocular graves

Ops - Conejo
Resultado: No irrita los ojos

Sensibilización respiratoria o cutánea

Sin datos disponibles

Mutagenicidad en células germinales

Humanos
leucocitos
análisis citogenéticos

Humanos
linfocitos
análisis citogenéticos

Humanos
linfocitos
irradiación de ADN

Humanos
fibroblastos
otros sistemas de ensayos de mutación

Humanos
leucocitos
intercambio de cromátidas

Humanos
fibroblastos
intercambio de cromátidas

Hamster
ovario
análisis citogenéticos

Hamster
linfocitos
análisis citogenéticos

Hamster
linfocitos
irradiación de ADN

Humanos
fibroblastos
otros sistemas de ensayos de mutación

Humanos
leucocitos
intercambio de cromátidas

Humanos
fibroblastos
intercambio de cromátidas

Hamster
ovario
análisis citogenéticos

Hamster
linfocitos
análisis citogenéticos

Hamster
linfocitos
irradiación de ADN

Humanos
fibroblastos
otros sistemas de ensayos de mutación

Humanos
leucocitos
intercambio de cromátidas

Humanos
fibroblastos
intercambio de cromátidas

Hamster
ovario
análisis citogenéticos

Hamster
linfocitos
análisis citogenéticos

Hamster
linfocitos
irradiación de ADN

Humanos
fibroblastos
otros sistemas de ensayos de mutación

Humanos
leucocitos
intercambio de cromátidas

Humanos
linfocitos
irradiación de ADN

Humanos
linfocitos
irradiación de ADN

síntesis no prevista de ADN

Sigma-Aldrich - 36142

Página 6 de 10

Humanos
linfocitos
test de micronúcleos

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 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 0,1% como agente carcinógeno conocido o anticipado por el (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: Índices 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 Reproductor: Espermatozoos (recuento material genético, morfología, movilidad y recuento de los espermatozoos), Efectos sobre el Aparato Reproductor: Testículos, epidídimo y espermiócitos

Sin datos disponibles

Toxicidad para el desarrollo - Rata - Oral
Anomalías Esqueléticas 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

RTCS: W16800000

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

Sigma-Aldrich - 36142

Página 7 de 10

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

12.1 Toxicidad

Toxicidad para los peces mortalidad LOEC - Lepomis macrochirus - 0,079 mg/l - 7,0 d

mortalidad NOEC - Plectochilus lucius - 1,66 mg/l - 32 h

CL50 - Lepomis macrochirus - 0,046 mg/l - 96,0 h

Toxicidad para las cefalópodos y otros invertebrados acuáticos
CE50 - Daiphnia magna (Pulga de mar grande) - 0,002 mg/l - 48 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

Toxicidad para las algas
CE50 - Pseudokirchnerella subcapitata (alga verde) - 4,06 mg/l - 72 h

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

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. Diríjase a 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.

16. 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.

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

SARA 311(i)(2) Peligros

Peligro Agudo para la Salud. Peligro para la Salud Crónico

Massachusetts Right To Know Componentes

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

Pennsylvania Right To Know Componentes

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

New Jersey Right To Know Componentes

Valenthion	No. CAS	Fecha de revisión
	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.

Información suministrada por

Corporación Sigma-Aldrich
Product Safety – Americas Region
1-800-521-6555

Versión:	Fecha de revisión:	Fecha de impresión:
5.3	12/29/2015	06/09/2017

18. 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	Perigoso 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: 0

Infamabilidad: 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 limitado de copias para uso exclusivamente interno.

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

8.1.2 DMDTP

SC-498464 - O,O-Dimethyl Dithiophosphate		Fecha de revisión: 17-sep-2016
Méritos de lenguaje	Cubrir los derrames de líquido con arena, tierra u otro material absorbente no combustible. Cubrir los derrames de polvo con una lámina de plástico o una toalla para minimizar su expansión. Recoger y transferir a contenedores etiquetados de forma apropiada.	
7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO		
Recomendaciones para una manipulación sin peligro	Evitar el contacto con la piel, los ojos o la ropa. Utilizar el equipo de protección individual obligatorio. Lavar las prendas contaminadas antes de volver a usarlas. No rociar el producto húmedo gaseoso ni vaporizarse. No comer, beber ni fumar durante su utilización.	
Condiciones de almacenamiento	Mantener el contenedor perfectamente cerrado y en un lugar seco y bien ventilado. Manténgase fuera del alcance de los niños. Proteger de la humedad.	
8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN/PROTECCIÓN INDIVIDUAL		
Controles de la exposición	Duchas Estaciones de lavado de ojos Sistemas de ventilación	
Equipo de protección personal (PPE por sus siglas en inglés)	Cascos de seguridad bien ajustados. Llaves guantes y ropa protectora. Asegurar una ventilación adecuada, especialmente en áreas confinadas. Manipular respetando las buenas prácticas de higiene individual y seguridad.	
9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS		
Estado físico	Líquido	
Apariencia	No hay información disponible	
Olor	No hay información disponible	
Propiedades	Valores	
pH	No hay información disponible	
Punto de fusión/punto de congelación	No hay información disponible	
Punto de ebullición	No hay información disponible	
Punto de inflamación	No hay información disponible	
Densidad	No hay información disponible	
Tasa de evaporación	No hay información disponible	
Límites de inflamabilidad superiores	No hay información disponible	
Límite inferior de inflamabilidad	No hay información disponible	
Peso del vapor	No hay información disponible	
Densidad del vapor	No hay información disponible	
Densidad relativa	No hay información disponible	
Solubilidad en el agua	No hay información disponible	
Solubilidad en otros disolventes	No hay información disponible	
Coefficiente de partición	No hay información disponible	
Temperatura de autoignición	No hay información disponible	
Temperatura de descomposición	No hay información disponible	
Viscosidad dinámica	No hay información disponible	
Propiedades explosivas	No hay información disponible	
Propiedades corrosivas	No hay información disponible	
10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD		
Página 3 / 8		

SC-498464 - O,O-Dimethyl Dithiophosphate		Fecha de revisión: 17-sep-2016
3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES		
Nombre del producto	O,O-Dimethyl Dithiophosphate	
Peso molecular	158.16	
Fórmula	C ₄ H ₆ O ₂ S ₂	
4. PRIMEROS AUXILIOS		
Consejo general	Si persisten los síntomas, llamar a un médico. No respirar el vapor ni permitir que gaseos irritables vapores ni aerosoles. Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. Lavar inmediatamente con abundante agua. Después del lavado inicial, quitar las lentes de contacto si las hubiera y volver a lavar durante al menos 15 minutos. Mantener el ojo bien abierto durante el lavado. Si persisten los síntomas, llamar a un médico.	
Contacto con los ojos	Consultar a un médico si fuera necesario. Lavar inmediatamente con jabón y abundante agua y quitarse la ropa y el calzado contaminados.	
Contacto con la piel	Tampoco a la víctima al exterior. Llamar a un médico. Si la respiración es anormal o no hay respiración, administrar respiración artificial. Evitar el contacto directo con la piel. Utilizar medios de barrera para practicar la reanimación boca a boca.	
Inhalación	Españar la boca. Bobos abundante agua. Si persisten los síntomas, llamar a un médico. NO provocar el vómito. Tratar los síntomas.	
Ingestión	Nota para el personal médico: Utilizar el equipo de protección individual obligatorio. Equipo de protección para el personal de primeros auxilios.	
5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS		
Medios de extinción apropiados	Medios de extinción apropiados: Productos químicos secos, CO ₂ , agua pulverizada o espuma resistente al alcohol.	
Peligros específicos que presenta el producto químico	No se ha determinado.	
Procesos inflamables	No hay información disponible.	
Punto de inflamación °C	No hay información disponible.	
Productos de combustión peligrosos	Sulfuro de hidrógeno. Óxidos de carbono.	
Fecha de explosión	No hay información disponible.	
Sensibilidad a impactos mecánicos	No hay información disponible.	
Sensibilidad a descargas estáticas	No hay información disponible.	
Equipo de protección y medidas de precaución para el personal de lucha contra incendios	Como en cualquier incendio, llevar un aparato de respiración autónomo de presión a demanda MÓVIANOS® (aprobado o equivalente) y todo el equipo de protección necesario.	
6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL		
Precauciones individuales	Asegurar una ventilación adecuada, especialmente en áreas confinadas.	
Precauciones relativas al medio ambiente	Impedir su introducción en cursos de agua, alcantarillas, sótanos o zonas confinadas. No arrojarse a las aguas superficiales ni al sistema de alcantarillado. Para obtener más información ecológica, ver el apartado 12.	
Métodos de contención	Prevenir más fugas o vertidos si se puede hacer de forma segura.	
Página 2 / 8		

		FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD Santa Cruz Biotechnology, Inc. Fecha de revisión: 17-sep-2016 Versión: 1.1
1. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO Y DE LA EMPRESA		
Nombre del producto	O,O-Dimethyl Dithiophosphate	
Código del producto	SC-498464	
Uso recomendado	Solo para investigación. No destinado para diagnóstico o uso terapéutico.	
Empresa	Santa Cruz Biotechnology, Inc. 18410 Finney Street Dallas, TX 75220 817 457 3800 800 457 3801 sales@scbt.com	
Teléfono de emergencia	Chimicos 1.800.424.2000 (Within USA) +1.703.527.3887 (Outside USA)	
2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS		
Resumen Para Emergencias	El producto no contiene sustancias que, en la concentración en la que se presentan, se consideren peligrosas para la salud.	
Estatus normativo según la OSHA	Este material se considera peligroso según la norma sobre comunicación de riesgos de la OSHA (29 CFR 1910.1200)	
Posibles efectos sobre la salud	Vías de exposición principales: Inhalación, Contacto con la piel, Contacto con los ojos. Efectos: Puede ser nocivo en contacto con la piel. Puede ser nocivo en caso de inhalación. Nocivo en caso de ingestión. Ningún efecto conocido.	
Peligros no clasificados de otra manera (HNOC)	Peligros no clasificados de otra manera (HNOC) No es aplicable.	
Peligros para el medio ambiente	Ver la Sección 12: INFORMACIÓN ECOLÓGICA.	
NFPA	Polímero para la salud - Inflamabilidad - Estabilidad - Propiedades físicas y químicas -	
HMS	Polímero para la salud - Inflamabilidad - Peligros físicos - Protección individual -	
Página 1 / 6		

SC-498464 - O,O-Dimethyl Dithiophosphate		Fecha de revisión: 17-sep-2016
11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA		
Toxicidad aguda	Información del producto: El producto no presenta riesgo de toxicidad aguda según la información conocida o suministrada.	
Toxicidad crónica	Efectos en órganos diana: Ninguno conocido.	
12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA		
Eco toxicidad	No se ha investigado completamente el impacto medioambiental de este producto.	
Persistencia y degradabilidad	No hay información disponible.	
Bioacumulación	No hay información disponible.	
13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN		
Consideraciones relativas a la eliminación	La eliminación debe realizarse conforme a las leyes y normativas regionales, nacionales y locales aplicables. No reutilizar el recipiente. D002	
Número de residuos de la EPA (EPA ID)	D002	
14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE		
DOT	NF (DANG) UN295 Clase de peligro 8 Grupo de embalaje II Designación oficial de transporte: Líquido corrosivo, ácido, orgánico, n.e.p. Descripción: UN295, Líquido corrosivo, ácido, orgánico, n.e.p., 8, II Número de la Guía de respuestas de emergencia: 152	
IATA	NF (DANG) UN295 Clase de peligro 8 Grupo de embalaje II Designación oficial de transporte: Líquido corrosivo, ácido, orgánico, n.e.p. Descripción: UN295, Líquido corrosivo, ácido, orgánico, n.e.p., 8, II Deposiciones particulares: A3, A65	
Página 4 / 6		

**INDO**

Nº ID OCMU	UN205
Clase de peligro	5
Grupo de embalaje	II
Designación oficial de transporte	Líquido corrosivo, ácido, orgánico, n.e.p.
Descripción	UN205, Líquido corrosivo, ácido, orgánico, n.e.p., II
Nº EMS	F-A, S-B

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA**Inventarios internacionales.**

Todos los componentes de producto se encuentran en los siguientes inventarios: TSCA (E' datos Unidos) Canadá (POLUNRES), Europe (ENCS/ELINC/NALP) China (ECS/C) ENCS (Japan).

X - INVENTARIO

TSCA - Ley de control de sustancias tóxicas ("Toxic Substances Control Act") actualizándose, apartado (B); (Inventarios)
 DELANDRE - Libro de sustancias alimenticias/elementos de Canadá
 ENCS/ELINC - Inventario Europeo de Sustancias Químicas Peligrosas ("Inventario" / libro europeo de sustancias químicas peligrosas)
 ENCS - Sustancias químicas peligrosas y normas de Japón
 ENCS - Inventario de sustancias químicas peligrosas de China
 ACCL - Sustancias químicas peligrosas e inventario de Corea
 PICCS - Inventario de productos químicos y sustancias químicas de Filipinas

Normativas federales de EE.UU.**SARA 315**

Sección 315 del título III de la Ley de ordenanza y actualización del superfondo de 1990 (SARA). Este producto no contiene ninguna sustancia química sujeta a los requisitos de creación de informes de la ley y del título 40 del Código de regulaciones federales, parte 372.

Categorías de riesgos SARA 311/312

Peligro agudo para la salud	Si
Peligro crónico para la salud	No
Peligro de incendio	No
Peligro de liberación a causa de presión	No
Peligro de reacción	No

CWA (Ley del agua limpia, Clean Water Act)

Este producto no contiene ninguna sustancia regulada como contaminantes según la Ley de Agua Limpia (40 CFR 122.21 y 40 CFR 122.47).

Normativas estatales de EE.UU.**Proposición 65 de California**

Este producto no contiene ninguna sustancia química de la Proposición 65.

Normativas estatales de derecho a la información de los EE.UU.

Este producto no contiene ninguna sustancia regulada por las normativas estatales de derecho a la información.

México - INFORMACIÓN REGLAMENTARIA.**CANADÁ - INFORMACIÓN REGLAMENTARIA.**

Este producto se ha clasificado de acuerdo con los criterios de riesgo del Reglamento de productos controlados (CPR) y la FDS contiene toda la información que requiere el CPR.

Clase de peligro WHMS No controlado

**16. OTRA INFORMACIÓN****Fecha de revisión**

17-ago-2015

Nota de revisión

No hay información disponible.

Descargo de responsabilidad

La información suministrada en esta ficha de datos de seguridad es correcta según los conocimientos, datos y opiniones de que disponemos a día de esta publicación. La información suministrada está diseñada solo como guía de manipulación, uso, promoción, almacenamiento, transporte, eliminación y liberación seguros y no debe considerarse como una garantía o especificación de calidad. La información solo hace referencia al material específico designado y puede no ser válida para dicho material cuando se usa en combinación con cualquier otro material o proceso, a menos que el texto lo especifique.
 Fin de la ficha de datos de seguridad.

8.1.3 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 Q, O-Dimethyl thiophosphate

Identificación adicional O, O-Dimethyl hydrogen phosphorothioate

Nº 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 etiquetado actual 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 único

Compañía BIOSYNTH AG
Rietstrasse 4
CH-9422 STRAAD

Teléfono +41 (0)71 858 20 20
Correo welcome@biosynth.ch

Número de emergencia +41 (0)71 858 20 20 horario de oficina

2 Etiquetado 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 ingredientes

Información relacionada con la sustancia
Nombre de la sustancia O, O-Dimethyl thiophosphate
Sinónimos O, O-Dimethyl hydrogen phosphorothioate
Nº CAS [1112-35-5]
Fórmula C₂H₆O₂S

4 Medidas de primeros auxilios



Hoja de Datos de Seguridad Q-201495

página 3 de 4

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 Lavor 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 1,368 g/cm³

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 (CO₂), óxidos de azufre, monóxido de carbono

11 Información toxicológica



Hoja de Datos de Seguridad Q-201495

página 2 de 4

Primeros auxilios: Ojos Lavar los ojos inmediatamente con suficiente agua corriente durante al menos 10 a 15 minutos manteniendo los párpados separados. Consultar a un oftalmólogo.

Primeros auxilios: Piel Lavar inmediatamente con suficiente agua y jabón/durante 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 mantenerla abrigada 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 (CO₂), rocío de agua

Peligros durante la extinción de incendios vapores tóxicos

Equipo protector para combatir incendios Utilizar un aparato respirador autónomo y ropa de protección 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 descargada 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 exposición a 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.



Hoja de Datos de Seguridad Q-201495

página 4 de 4

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 (KfW/ABG).

Consejos para el empaque no disponible

14 Información de transporte

Transporte por carretera (ADR/AGV) no regulado

Transporte por aire (ATA) 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.

BIOSYNTH proporciona esta Hoja de Datos de Seguridad de los Materiales (MSDS) por sus sitios en inglés y francés. No se asume ninguna responsabilidad con respecto a la precisión o contenido de la información en esta Hoja de Datos de Seguridad. El usuario asume la responsabilidad de la precisión y contenido de la información de esta Hoja de Datos de Seguridad para su uso interno. No se asume ninguna responsabilidad o garantía de terceros o terceros. El usuario asume toda la responsabilidad por el cumplimiento de todas las leyes y regulaciones que involucre a los datos de esta Hoja de Datos de Seguridad.

8.1.4 DMP

SIGMA-ALDRICH

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

sigma-aldrich.com

Fecha de revisión 08/28/2014
Fecha de impresión 07/03/2019

1. IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO Y DE LA COMPAÑÍA

1.1 Identificadores del producto
Nombre del producto: dimethyl phosphate

Referencia : CDS014985
Marca : Aldrich
No. CAS : 813-78-5

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

Usos identificados: Reactivos para laboratorio, Fabricación 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 Tuluca 2000
Calle 6 Norte No. 107
55000 TOLUCA
MEXICO

Teléfono : +52 (01)-800-007-6300
Fax : +52 (01)-800-712-8920

1.4 Teléfono de emergencia

Teléfono de Urgencia : 01-800-00-214-00 (SETU)
01(55) 55-59-15-88

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

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

Toxicidad aguda, Oral (Categoría 4), H302
Toxicidad aguda, Cutánea (Categoría 4), H312
Corrosión cutánea (Categoría 1B), H314
Lesiones oculares graves (Categoría 1), H318
Sensibilización cutánea (Categoría 1), H317
Toxicidad aguda acuática (Categoría 3), H402
Toxicidad acuática crónica (Categoría 3), H412

Para el texto íntegro de las Declaraciones H mencionadas en esta sección, véase la Sección 10.

2.2 Elementos de las etiquetas del GSA, incluidos los consejos de prudencia

Pictograma:



Palabra de advertencia	Peligro
Indicaciones de peligro H302 + H312 H314 H317 H412	No tóxico en caso de ingestión o en contacto con la piel. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. No tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos cuantitativos.
Declaración(es) de prudencia P281	Evitar respirar el polvo el humo el gas la niebla/ los vapores/ el aerosol.

AA9843 - CDS014985

Página 1 de 6

En caso de contacto con los ojos

Lávese a fondo con agua abundante durante 15 minutos por lo menos y consulte al médico. Continuar lavando los ojos cuando el transporte al hospital.

Si es tragado

No provocar al vómito. 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
Sin datos disponibles.

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 niebla o el gas. Asegúrese una ventilación apropiada. Evacuar el personal a zonas seguras.
Equipo de protección individual, ver sección 8.

6.2 Precauciones relativas al medio ambiente
Impedir nuevos escapes o derrames si puede hacerse sin riesgo. 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
Evitar 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.

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.
No contiene sustancias con valores límites de exposición profesional.

AA9843 - CDS014985

Página 3 de 6

P204
P272
P273
P301 + P312
P301 + P330 + P331
P303 + P361 + P353
P304 + P340
P305 + P351 + P338
P310
P322
P333 + P313
P363
P405
P501

Levante la piel conscientemente tras la manipulación.
No comer, beber ni fumar durante su utilización.
Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.
Evitar su liberación al medio ambiente.
Lavar cualquier prenda que genere molestias de protección.
EN CASO DE INGESTIÓN: Lamer a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico si la persona se encuentra mal.
EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagarse la boca. NO provocar al vómito.
EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Acariciar la piel con agua o ducharse.
EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar.
EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.
Se necesitan medidas específicas (ver las instrucciones suplementarias de primeros auxilios en esta etiqueta).
En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
Lavar las prendas contaminadas antes de volver a usarlas.
Guardar bajo llave.
Eliminar el contenido del 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 : C₂H₆O₂P
Peso molecular : 120,06 g/mol
No. CAS : 813-78-5
No. CE : 212-389-6

Componentes peligrosos	Clasificación	Concentración
	Acute Tox. 4; Sen. Corr. 1B; Eye Dam. 1; Skin Sens. 1; Aquatic Acute 3; Aquatic Chronic 3; H302 + H312, H314, H317, H412.	90 - 100 %

Para el texto íntegro de las Declaraciones H mencionadas en esta sección, véase la Sección 10.

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. Refiere a la persona de la zona peligrosa.
Si es inhalado
Si se siente mal, 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
Quítense inmediatamente la ropa y zapatos contaminados. Eliminar lavando con jabón y mucha agua. Consultar a un médico.

AAL9843 - CDS014985

Página 2 de 6

8.2 Controles de la exposición

Controles técnicos apropiados

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

Protección personal

Protección de los ojos/ la cara
Gafas de seguridad ajustadas al contorno del rostro. Visera protectora (mínimo 20 cm). Use equipo de protección para los ojos previsto 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 las 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 sustancias peligrosas 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-propósito (EELU) o tipo ABEK (EN 14087) respiradores de cartucho de reemplazo para controles de higiene. 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 (EE.UU.) o CEN (UE).

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

8. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

8.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

a) Aspecto	Forma: líquido
b) Color	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	174 °C (345 °F)
g) Punto de inflamación	Sin datos disponibles
h) Tasa de evaporación	Sin datos disponibles
i) Inflamabilidad (sólido, gas)	Sin datos disponibles
j) Inflamabilidad: supercaliente o líquidos explosivos	Sin datos disponibles
k) Presión de vapor	Sin datos disponibles
l) Densidad de vapor	Sin datos disponibles
m) Densidad relativa	Sin datos disponibles
n) Solubilidad en agua	Sin datos disponibles
o) Coeficiente de reparto	log Pow: 0,101

AA9843 - CDS014985

Página 4 de 6

- n-otanolatiga
- 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
Exposición a la humedad.

10.5 Materiales incompatibles
Agentes oxidantes fuertes, Bases

10.6 Productos de descomposición peligrosos
Otros productos de descomposición peligrosos Sin datos disponibles
= Riesgo de incendio véase sección 5

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

11.1 Información sobre los efectos toxicológicos

Toxicidad aguda
Sin datos disponibles

Inhalación: Sin datos disponibles

Cutáneo: Sin datos disponibles

Sin datos disponibles

Corrosión o irritación cutáneas
Sin datos disponibles

Lesiones o irritación ocular graves
Sin datos disponibles

Sensibilización respiratoria o cutánea
Alergenicidad en células germinales
Sin datos disponibles

Carcinogenicidad

IARC: No component of this product present at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.

ACGIH: No se identifica ningún componente de este producto, que presente niveles mayores que o el igual a 0.1% como carcinógeno o como carcinógeno potencial por la ACGIH.

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

Airion - C05074655

Página 5 de 8

Contenido Reportable (RC):
Contaminante marino: No
Riesgo de intoxicación por inhalación: No

IMDG

Número ONU: 3254 Clase 6 Grupo de embalaje: II EMB-No: F-A, S-B
Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas: CORROSIVE LIQUID; ACIDIC, INORGANIC, N.O.S. ()
Contaminante marino: No

IATA

Número ONU: 3254 Clase 6 Grupo de embalaje: II
Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas: Líquido corrosivo, ácido, inorgánico, n.e.p. ()

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
Este material no contiene ningún componente químico con los conocidos números CAS que exceden el umbral de los niveles reportados (De Mínima) establecidos por SARA Título II, sección 313.

SARA 311 (b) (2) Peligros

Peligro Agudo para la Salud

Massachusetts Right To Know Componentes
No hay componentes sujetos al Acto de Derecho a Saber de Massachusetts.

Pennsylvania Right To Know Componentes

No. CAS	Fecha de revisión
813-78-5	

New Jersey Right To Know Componentes

No. CAS	Fecha de revisión
813-78-5	

Prop. 65 de California Componentes
Este producto no contiene ninguna sustancia química conocida para el 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.

Agudo Tox	Toxicidad aguda
Agudo Acuático	Toxicidad acuática aguda
Agudo Crónico	Toxicidad acuática crónica
Eye Dam	Lesiones oculares graves
H302	No tóxico en caso de ingestión
H302 + H312	No tóxico en caso de ingestión o en contacto con la piel
H312	No tóxico en contacto con la piel.
H314	Puede causar quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

Clasificación H/M/S/NFPA

Peligro para la salud: 3

Peligro Crítico para la Salud:

Inflamabilidad: 0

Peligro físico: 0

Clasificación NFPA

Peligro para la salud: 3

Peligro de incendio: 0

Peligro de Reactividad: 0

Airion - C05074655

Página 7 de 8

Nacional de Toxicología.

OSHA: No se identifica ningún componente de este producto, que presente niveles mayores que o el igual a 0.1% como carcinógeno o como carcinógeno potencial por la (OSHA) Administración de Salud y Seguridad Ocupacional.

Toxicidad para la reproducción
Sin datos disponibles

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: TC2700000

quemación. Tos, sibilancia, lagrimeo, insuficiencia respiratoria, espasmo, inflamación y edema de la faringe, espasmo, inflamación y edema de las bronquias, neumonía, edema pulmonar. El producto causa severa destrucción de los tejidos de las membranas mucosas, el tracto respiratorio superior, los ojos y la piel.

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

12.1 Toxicidad

Toxicidad para los peces: CL50 - Pimephales promelas (Pescado de cabeza gorda): 18 mg/l - 96 h

12.2 Persistencia y degradabilidad
Sin datos disponibles

12.3 Potencial de bioacumulación
Sin datos disponibles

12.4 Movilidad en el suelo
Sin datos disponibles

12.5 Resultados de la valoración PBT y mPBT
La valoración de PBT / mPBT 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 estimar un peligro para el medio ambiente en el caso de una manipulación o eliminación no profesional. Nocivo para los organismos acuáticos.

Sin datos disponibles

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 residuos acrídica. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado. Deshacer o incinerar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador.

Envases contaminados
Eliminar como producto no usado.

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

DOT (US)

Número ONU: 3254 Clase: 6 Grupo de embalaje: II
Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas: Corrosivo líquido, ácido, inorgánico, n.o.s. ()

Airion - C05074655

Página 8 de 8

Otros datos

Copyright 2014 Sigma-Aldrich Co. LLC. Se autoriza la reproducción en número limitado de copias para uso exclusivamente interno. La información indicada arriba es correcta pero no pretende ser exhaustiva y deberá utilizarse únicamente como orientación. La información contenida en este documento está basada en el presente estado de nuestro conocimiento y es aplicable a las producciones 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. Diríjase a 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
1-800-521-8500

Versión: 5.2

Fecha de revisión:
08/29/2014

Fecha de impresión:
07/03/2019

8.2 Productos Derivados del Trabajo de Tesis

8.2.1 Artículos de Investigación

Hernández-Toledano D.S., Vega L., Methylated dialkylphosphate metabolites of the organophosphate pesticide malathion modify actin cytoskeleton arrangement and cell migration via activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42, *Chem. Biol. Interact.* 382 (2023) 110593. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110593>.

8.2.2 Artículos de Revisión

Hernandez-Toledano D, Vega L. The cytoskeleton as a non-cholinergic target of organophosphate compounds. *Chem Biol Interact* 346 (2021) 109578. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109578>

8.2.3 Capítulos de Libro

Hernandez-Toledano D, Vega L. (2022) Genetic and Epigenetic Biomarkers of Organophosphate Compounds, Dialkyl Phosphate Exposure, and Their Relation to Biological Effects. In Sahu S. (Ed.) *Genomic and Epigenomic Biomarkers of Toxicology and Disease* (pp. 363-382). Wiley Professional, Reference & Trade (Wiley K&L). <https://doi.org/10.1002/9781119807704.ch16>

8.2.4 Participación en Congresos

- Hernández-Toledano D.S., Estrada-Muñiz E., Vega L. “Efecto de la exposición a compuestos organofosforados y sus metabolitos dialquilfosfatos sobre la movilidad de macrófagos RAW264.7”. Congreso Internacional “La investigación en el Posgrado” de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, celebrado del 2 al 4 de octubre de 2019, Aguascalientes, Ags. Presentación de Cartel.
- Hernández-Toledano D.S., Estrada-Muñiz E., Vega L. “Efecto de la exposición a malatión y sus dialquilfosfatos sobre la polimerización de actina y el movimiento celular de macrófagos murinos RAW264.7”. Congreso Nacional de Plaguicidas: Ambiente y Salud de la Red Temática de Toxicología de Plaguicidas, celebrado de manera virtual del 12 al 16 de octubre de 2020. Presentación de Cartel.
- Hernández-Toledano D.S., Estrada-Muñiz E., Vega L. “El malatión y sus metabolitos dialquilfosfatos disminuyen la polimerización de actina y modifican la organización del citoesqueleto de actina en macrófagos murinos RAW264.7”. III Congreso de Toxicología de la Sociedad de Toxicología de Chile, celebrado de manera virtual del 16 al 27 de noviembre de 2020. Presentación de Cartel.
- Hernández-Toledano D.S., Estrada-Muñiz E., Vega L. “Cytoskeleton Rearrangement Induced in RAW264.7 Cells by Exposure to Organophosphate Compounds”. Society of Toxicology (SOT) Annual

Meeting & ToxExpo Virtual Event, celebrado del 12 al 26 de marzo de 2021. Presentación de Cartel.

- Hernández-Toledano D.S., Estrada Muñiz E., Vega L. “Methyl dialkylphosphate metabolites of organophosphate compounds induce actin cytoskeleton alterations and cell polarization in exposed RAW264.7 cells” 61st Annual Meeting & ToxExpo, celebrado de manera virtual/presencial del 27 al 31 de marzo del 2022. Presentación de Cartel.
- Hernández-Toledano D.S., Estrada Muñiz E., Vega L. “Dialkylphosphate metabolites induce cytoskeleton re-arrangement and cell migration of murine macrophage by activating Rho GTPases”. XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, celebrado del 16 al 21 de octubre de 2022 en Mérida, Yuc. Presentación de Cartel.



Research paper

Methylated dialkylphosphate metabolites of the organophosphate pesticide malathion modify actin cytoskeleton arrangement and cell migration via activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42

David Sebastián Hernández-Toledano, Libia Vega*

Department of Toxicology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, Gustavo A. Madero, Ciudad de México, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

Organophosphate pesticides
Dialkylphosphate metabolites
Rho GTPases
Actin
Cytoskeleton

ABSTRACT

The non-cholinergic molecular targets of organophosphate (OP) compounds have recently been investigated to explain their role in the generation of non-neurological diseases, such as immunotoxicity and cancer. Here, we evaluated the effects of malathion and its dialkylphosphate (DAP) metabolites on the cytoskeleton components and organization of RAW264.7 murine macrophages as non-cholinergic targets of OP and DAPs toxicity. All OP compounds affected actin and tubulin polymerization. Malathion, dimethyldithiophosphate (DMDTP), dimethylthiophosphate (DMTP), and dimethylphosphate (DMP) induced elongated morphologies and the formation of pseudopods rich in microtubule structures, and increased filopodia formation and general actin disorganization in RAW264.7 cells and slightly reduced stress fibers in the human fibroblasts GM03440, without significantly disrupting the tubulin or vimentin cytoskeleton. Exposure to DMTP and DMP increased cell migration in the wound healing assay but did not affect phagocytosis, indicating a very specific modification in the organization of the cytoskeleton. The induction of actin cytoskeleton rearrangement and cell migration suggested the activation of cytoskeletal regulators such as small GTPases. We found that DMP slightly reduced Ras homolog family member A activity but increased the activities of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) and cell division control protein 42 (Cdc42) from 5 min to 2 h of exposure. Chemical inhibition of Rac1 with NSC23766 reduced cell polarization and treatment with DMP enhanced cell migration, but Cdc42 inhibition by ML-141 completely inhibited the effects of DMP. These results suggest that methylated OP compounds, especially DMP, can modify macrophage cytoskeleton function and configuration via activation of Cdc42, which may represent a potential non-cholinergic molecular target for OP compounds.

1. Introduction

Organophosphate (OP) compounds are synthetic chemical substances widely distributed worldwide, which are used as pesticides to control organisms that can negatively impact agriculture, human health, and the environment. Currently, OP pesticides still represent one of the most used pesticides globally [1] despite their reported toxic effects. Acute exposure to OP compounds results in neurotoxic effects caused by the irreversible inhibition of acetylcholinesterase (AChE) [2]. However, chronic exposure to these compounds is also related to the development of diseases such as cancer [3–5] and respiratory disorders [6,7], as well as adverse effects such as infertility [8,9], embryonic defects [10], and

genotoxicity [11,12], suggesting that these compounds exert toxicity through a variety of mechanisms on different targets, including non-cholinergic molecules.

Recent studies have demonstrated that OP compounds interact with many molecular targets, including cytoskeleton proteins such as actin, tubulin, and keratin [13–16]. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that OP compounds can directly react with these proteins to produce organophosphorylated adducts and crosslinks in cytoskeletal proteins such as tubulin [17–19], which can affect cellular functions related to the cytoskeleton such as mobility, protein transport, and cell division.

Accordingly, different reports have found that some OP compounds can affect actin cytoskeleton reorganization [20,21], decrease the

Abbreviations: Dialkylphosphate, (DAP); Dimethyldithiophosphate, (DMDTP); Dimethylthiophosphate, (DMTP); Dimethylphosphate, (DMP).

* Corresponding author.

E-mail address: lvega@cinvestav.mx (L. Vega).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110593>

Received 18 April 2023; Received in revised form 8 May 2023; Accepted 1 June 2023

Available online 2 June 2023

0009-2797/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

microtubule length [17], induce changes in cell morphology, a loss of specialized structures such as dendrites [22], a reduction of cell adhesion [23], the collapse of mitotic spindles [24], and alterations in vesicular transport [25,26] and reduce the phagocytic capability [27,28]. These findings suggest the important role of cytoskeleton elements in toxicity induced by OP compounds, for example, on the neurotoxicity or immunotoxicity associated with chronic exposure to OP compounds.

Malathion is an OP pesticide considered to have low acute toxicity compared to other OPs. However, the International Agency for Research on Cancer reclassified this compound as a probable carcinogen to humans [29,30], and it was included on the list of highly hazardous pesticides by the Pesticide Action Network because exposure to malathion is associated with dysfunction in the liver, kidneys, pancreas, testis, and brain [31].

The toxic mechanisms of malathion include the inhibition of AChE; generation of oxidative stress; induction of inflammatory responses; and promotion of apoptosis, genotoxicity, and immunomodulation [32]. Some studies have shown that malathion interferes with arrangement of the actin cytoskeleton, cell adhesion [21], and phosphorylation of the microtubule-associated protein tau [33], and induces alterations in cell phagocytosis [34,35], suggesting that the toxic effects of this OP pesticide may include cytoskeleton disruption. In addition, similar to many other OP compounds, malathion can modify the phosphorylation status of several proteins including protein kinase C (PKC), a serine/threonine kinase related to cytoskeleton modulation, via activation of the small Ras homolog (Rho) family of GTPases [36–38]. Rho GTPases, such as RhoA, Rac1, and Cdc42, are molecular switches involved in actin and tubulin cytoskeleton remodeling, which are required for the formation of cellular structures, cell polarization, cell division, and vesicular trafficking [39].

Malathion, similar to many other methylated OP pesticides, is quickly metabolized by cytochrome P450 (CYP450) enzymes to its oxon form; to its specific metabolites (mono- and di-acid malathion); and to dialkyl phosphates (DAPs) such as dimethyl dithiophosphate (DMDTP), dimethyl thiophosphate (DMTP), and dimethyl phosphate (DMP) (Fig. 1), where DAPs represent the most abundant metabolites detected in human samples of exposed individuals or the general population, at concentrations from 0.02 to 60 μM [40–42]. All three methylated DAP metabolites (DMDTP, DMTP and DMP) have a longer half-life than their parent compounds [43], suggesting that DAPs can contribute to the general toxicity of OP compounds, thus inducing immunomodulatory effects and genotoxicity in both *in vitro* and *in vivo* models [44–48].

Because the disruption of cell functions by OP compounds and their metabolites could be associated with cytoskeleton alterations, we

evaluated the effects of malathion and its DAP metabolites on the actin, tubulin, and vimentin cytoskeleton and related proteins including small Rho GTPases of highly dynamic cells such as macrophages and in human fibroblasts (less dynamic cells with fewer functions than macrophages), and their effects on cytoskeleton-dependent activities such as cell migration and phagocytosis.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents

We obtained dimethyl sulfoxide (DMSO) (100% purity, 78.13 g/mol; Cat. D2650), malathion (98.7% purity, 330.63 g/mol; Cat. 36143), NSC23766 trihydrochloride ($\geq 97\%$ purity, 530.96 g/mol; Cat. SML0952), and ML-141 ($\geq 98\%$ purity, 407.49 g/mol; Cat. SML0407) from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). DMTP (purity 98%, 142.11 g/mol; Cat. 1112-38-5) and DMDTP (98% purity; 158.17 g/mol; Cat. 756-80-9) were purchased from BOC Sciences (Shirley, NY, USA). DMP (purity $>95\%$, 126.05 g/mol; Cat. 098585) was obtained from Matrix Scientific (Columbia, SC, USA). The remaining reagents were obtained from J.T. Baker (Deventer, Holland) as indicated.

2.2. Cell lines

We used RAW264.7 cells, a murine monocyte/macrophage-like semi-adherent cell type originating from Abelson leukemia virus transformed cells from a male BALB/c mouse. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-Glutamine (200 mM), and 1% antibiotic-antimycotic (penicillin 10,000 U/mL, streptomycin 10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, amphotericin B 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in a humidified chamber at 37 °C and 5% CO_2 and cultured up to 80% confluence. To subculture cells, EDTA solution (5 mM) was added and incubated for 5 min. We detached the cells by gently pipetting; the cell suspension was collected in supplemented medium and centrifuged at 420 $\times g$ for 5 min. Cells were resuspended in fresh medium and the cell density was adjusted as required. Additionally, we used GM03440 cells, human non transformed fibroblast cells obtained from skin biopsy of a healthy male donor. Cells were cultured in Minimum Essential Medium (MEM) Alpha Medium supplemented with 15% not inactivated FBS and 1% non-essential amino acids (10 mM) in a humidified chamber at 37 °C and 5% CO_2 and culture up to 90% confluence. To subculture the cells, trypsin-EDTA solution (0.25 mg/mL) was added for 2 min to detach the cells. Trypsin was inactivated by adding fresh culture medium. Cells were collected and centrifuged

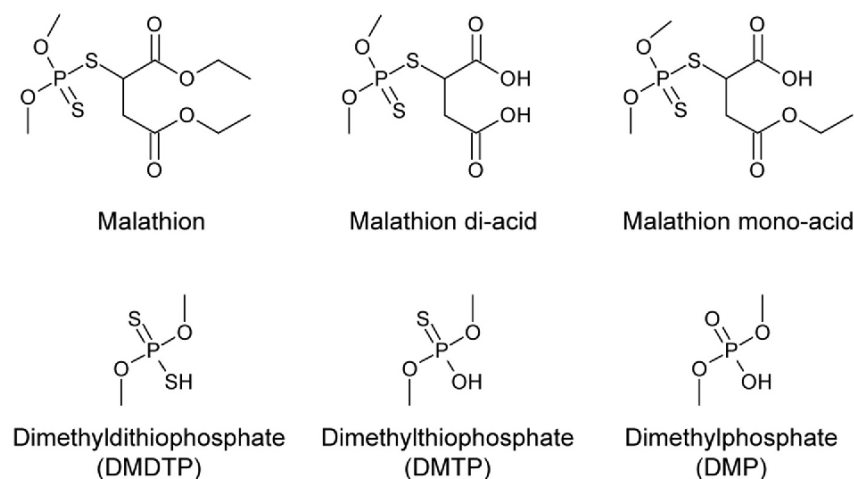


Fig. 1. Chemical structures of malathion and its metabolites.

at 420×g for 5 min. Cells were resuspended in fresh medium and the cell density was adjusted as required.

2.3. Treatments

Treatments were prepared from concentrated stocks (0.2 M) of OP compounds: malathion, DMDTP, DMTP and DMP, in DMSO and dissolved in DMEM as required. We treated the cells with the OP metabolites DMDTP, DMTP, and DMP; the parental compound malathion (0.01, 0.1, 1, or 10 μM); or DMSO 0.05% as the vehicle control. For Rac1 and Cdc42 inhibition, NSC23766 trihydrochloride (94 mM) and ML-141 (122 mM) stock solutions were prepared in DMSO. The stock solutions were dissolved in DMEM to obtain 25 μM NSC23766 trihydrochloride or 10 μM ML-141 treatment solutions.

2.4. Actin polymerization assays

We assessed the effects of OP compounds on actin polymerization using an actin polymerization kit (BK003) from Cytoskeleton, Inc. (Denver, CO, USA) based on the tracking of a fluorescence-based pyrene-conjugated G-actin polymerization into pyrene F-actin. The *in vitro* assay was done as specified by the manufacturer. In brief, we prepared a pyrene-conjugated G-actin solution (0.15 mg/mL) in a G-Buffer (5 mM Tris HCl pH 8.0, 0.2 mM CaCl_2 and 0.02 mM ATP), and incubated the G-actin solution with malathion, DMDTP, DMTP, DMP (0.01, 1 or 4 μM), vehicle (DMSO 0.05%), or no treatment (positive control). We registered the emitted fluorescence every minute with the fluorescence plate reader TECAN Infinite 200 at an excitation wavelength of 350 nm and an emission wavelength of 407 nm. After 20 min, we induced actin polymerization by adding 3.5 μL per well of actin polymerization buffer (500 mM KCl, 200 mM MgCl_2 , 0.05 M guanidine carbonate and 10 mM ATP) and monitored the fluorescence for the next 90 min. Maximum fluorescence intensity, polymerization rate, and $t_{1/2}$ polymerization were estimated from the linear portion of the obtained curved as previously described [49]. The calculated parameters were normalized and compared with respect to the vehicle control (DMSO).

2.5. Tubulin polymerization assays

For the tubulin polymerization assays, we employed a tubulin polymerization kit (BK011P) from Cytoskeleton Inc., which uses a purified porcine brain tubulin conjugated to a fluorescence reporter. The *in vitro* assay was performed as specified by the manufacturer's instructions for standard conditions. Briefly, we prepared a tubulin solution (2 mg/mL) in a buffer solution (80 mM Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid] sequisodium salt, 2.0 mM magnesium chloride, 0.5 mM ethylene glycol-bis(b-amino-ethyl ether) N,N,N',N'-tetra-acetic acid, 15% v/v glycerol, pH 6.9, 10 μM fluorescent reporter, and 1 mM GTP). The compound solutions of malathion, DMDTP, DMTP, DMP (0.01, 1 or 18 μM), vehicle (DMSO 0.05%), paclitaxel (3 μM , positive polymerization control) or colchicine (3 μM , negative polymerization control) were incubated at 37 °C for 1 min, followed by the addition of tubulin solution. We registered the emitted fluorescence every minute with the fluorescence plate reader TECAN Infinite 200 at an excitation wavelength of 350 nm and an emission wavelength of 407 nm for the next 90 min. Maximum fluorescence intensity, polymerization rate, and $t_{1/2}$ polymerization were estimated from the linear portion of the obtained curved as described for the actin polymerization assays. The calculated parameters were normalized and compared with respect to the vehicle control (DMSO).

2.6. Cytoskeleton immunofluorescence

To analyze the impact of OP treatments on the cytoskeleton arrangement, we seeded the RAW264.7 cells (2×10^4 cells/cm²) or the GM03440 cells (2×10^3 cells/cm²) on round cover glasses and treated

the cell cultures with the OP compounds (0.01 μM), the vehicle control (DMSO 0.05%), or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 nM) as a nonspecific inducer of actin cytoskeleton rearrangement for 2 h. Then we fixed the cells in 4% paraformaldehyde (PFA) at 37 °C for 20 min. Next, we permeabilized the cells with 1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM Na_2HPO_4 and 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) before blocking in 5% bovine serum albumin. We incubated the samples with mouse anti- α -tubulin (1:100, sc-5286; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) for 1 h at room temperature. After incubation with primary antibody, we incubated the cells with Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-mouse (1:500, ab150105; Abcam, Cambridge, MA, USA) and phalloidin-conjugated tetramethylrhodamine (1:250, P1951; Sigma-Aldrich). We mounted the samples with Vectashield mounting medium with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cat. H-1200; Vector Laboratories, Newark, CA, USA) onto clean microscope slides and examined them using the TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Cell morphology classification was determined with the Olympus BX51 fluorescence microscope (Tokyo, Japan), using the count/size and sorting tools of Image Pro Plus Software version 5.0 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA). The proportion of cell morphology distribution was compared to vehicle (DMSO) treatment.

2.7. GTPase activity assays

Evaluation of the activity of Rho GTPases RhoA, Cdc42, and Rac1 was performed using the G-LISA Activation Assay (BK124, BK127, and BK128 kits, respectively, from Cytoskeleton Inc.) according to the manufacturer's instructions. Briefly, RAW264.7 cells (7×10^4 cells/cm²) were seeded onto p60 plates and starved for 24 h with DMEM supplemented with 0.5% FBS, 1% L-Glutamine, and 1% antibiotic-antimycotic 100X. Cells were treated with DMSO at 0.05% (as vehicle control), DAPs, or malathion at 0.01 μM for 5 min and then immediately washed and lysed with ice-cold lysis buffer. The samples were snap frozen and stored at -70 °C. The protein concentration was adjusted to 0.5 mg/mL for RhoA and Rac1 activity assays and 0.2 mg/mL for the Cdc42 activity assay and then mixed with binding buffer solution. Constitutive active G proteins were used as positive controls. The samples were incubated for 30 min at 4 °C in G-LISA plates containing a Rho GTP-binding protein linked to the wells. Then plates were washed and incubated with an antigen presenting buffer for 2 min. Samples were incubated with primary antibody for 45 min and then washed three times, followed by incubation with secondary antibody for 45 min. Next, the samples were incubated with horse radish peroxidase detection reagent at 37 °C for 15 min, and the signal was quantified at 490 nm using the Multiskan™ FC microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The data were normalized with respect to the vehicle control (DMSO).

2.8. Wound-healing assay

To evaluate cell migration, we performed the wound healing assay. Briefly, we seeded the RAW 264.7 cells (4×10^4 cells/cm²) in a 24 well-plate for 24 h. Then we treated the cells with mitomycin C (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 h to stop cell division and eliminate its contribution to the wound closure. Next, we scratched the bottom of each well once with a micropipette tip to make a wound in the cell monolayer. We discarded the culture medium and replaced it with supplemented DMEM and the respective OP treatments (malathion, DMDTP, DMTP, or DMP). We also tested DMSO 0.05% (as vehicle control) and PMA (50 nM) as a migration inducer (positive control). We photographed the cell cultures twice for each well at 0 and 48 h after the scratch using the Olympus CK41 inverted microscope at 10x magnification. We analyzed the pictures with ImageJ software to determine the area of wound closure considering the difference between wound areas t_{48} and t_0 . The data were normalized as 100% with respect to the vehicle control.

2.9. Phagocytosis assay

To evaluate the phagocytosis capability of RAW264.7 cells, we performed the zymosan-FITC phagocytosis assay. Briefly, we seeded the RAW264.7 cells (5.4×10^4 cells/cm²) on a 12-well plate. After 4 h of serum starvation with DMEM supplemented with 0.5% FBS, 1% L-Glutamine, and 1% antibiotic-antimycotic, we treated the cells for 2 h with malathion or its DAPs (0.01 μ M), DMSO 0.05% (vehicle control) or for 1 h with cytochalasin-B (5 μ g/mL, Cat C6762; Sigma-Aldrich) as the negative control. Then the cells were incubated with serum opsonized zymosan-FITC particles (Cat. Z-2841; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) for 1 h at a 1:10 ratio (cell:particles). Cells were washed with PBS and fixed in 4% PFA and 0.02% sodium azide. We quantified the FITC-positive cells and mean fluorescence intensity (MFI) (10,000 events) using the LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Both FITC-positive cells and MFI data were normalized with respect to the vehicle control condition.

2.10. Statistical analysis

The data are presented as the mean and standard deviation of at least three independent experiments. A p value < 0.05 was considered statistically significant as determined by one-way analysis of variance post-hoc Bonferroni or Student's t-test, as indicated.

3. Results

Because the cytoskeleton is an important target of OP compound toxicity, we first determined the effects of DAPs on the polymerization dynamics of actin and tubulin in acellular polymerization assays to determine if these compounds can interact directly with the major cytoskeleton components. We used equimolar concentrations of OP and actin or tubulin protein (4 and 18 μ M, respectively). Also, we used low OP concentrations (0.01 and 1 μ M), close to those reported in biological samples from chronic and acute OP-exposed populations [42,50]. During the first stage (23 min) with actin monomers and OP compounds, neither malathion nor its DAP metabolites promoted actin polymerization (Fig. 2a). However, when actin polymerization was induced, both malathion and its metabolites reduced actin polymerization rates at 0.01 μ M, while DMDTP, DMTP and DMP maintained this decrease when the concentration was increased to 4 μ M (Fig. 2b) during the elongation phase (25–60 min). The reduction of actin polymerization rate was accompanied by a decrease in the quantity of polymerized actin only with DMDTP, DMTP, and DMP (Fig. 2c) observed at the equilibrium stage. Any of the compounds showed capability to delay actin polymerization (Fig. 2d), indicating that malathion and its DAPs are capable of interfering with actin monomers, reducing their ability to polymerize. However, OP compounds only affected the polymerization process and did not modify actin depolymerization (Supplementary Fig. 1), suggesting that OPs act through available sites of free actin monomers.

In the case of tubulin, malathion and its DAP metabolites did not enhance tubulin polymerization (Fig. 3a) during the first 20 min. However, malathion, DMDTP, and DMTP reduced the tubulin

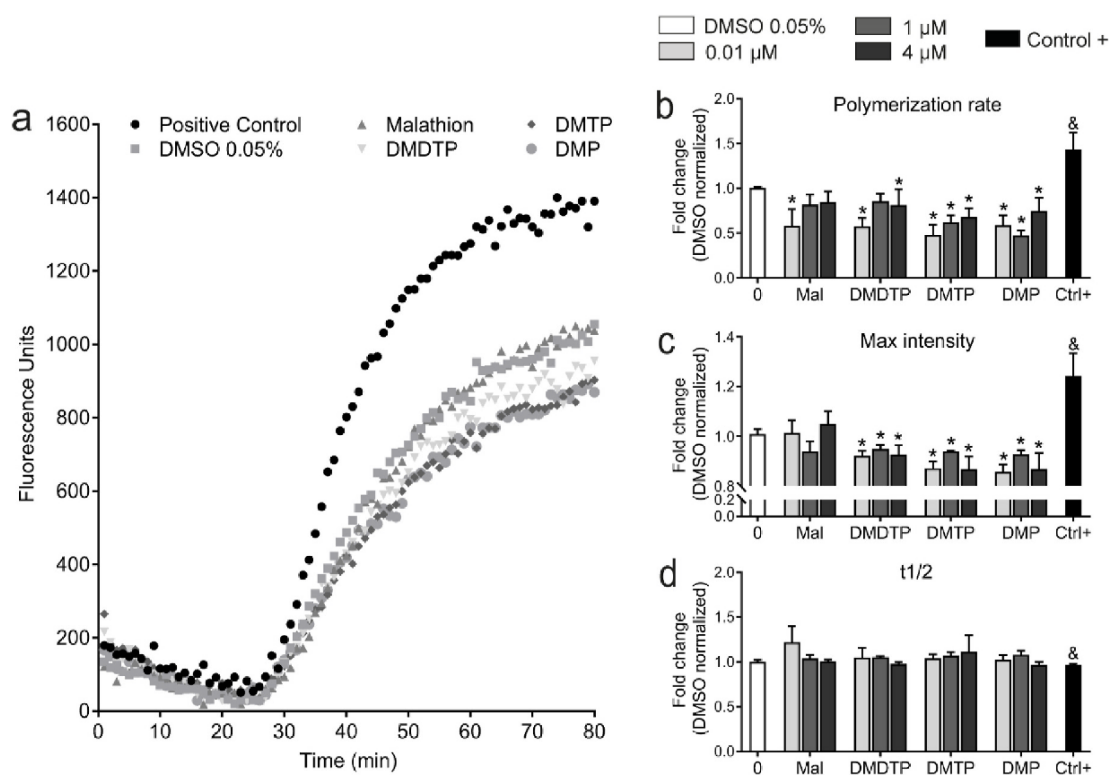


Fig. 2. Effect of OP compounds in actin polymerization using a fluorescence-based assay. Representative curve of G-actin (0.15 mg/mL) polymerization into F-actin (fluorescent) treated with equimolar concentrations of OP compounds (4 μ M) and stimulated by the addition of actin polymerization buffer (50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM guanidine carbonate, and 1 mM ATP) only polymerization buffer as positive control (Ctrl+) (a). Actin polymerization rate (b), max polymerized actin (c) and actin polymerization half-time (d) were calculated from G-actin monomers treated with 0.01, 1 or 4 μ M of OP. Data represent mean \pm standard deviation (S. D.) (n = 3), one-way ANOVA post-hoc Bonferroni *p < 0.05 vehicle vs. treatment; [#]p < 0.05 0.01 μ M vs. 1 μ M; [&]p < 0.05 Student's t-test vehicle (0) vs. control + (polymerization buffer).

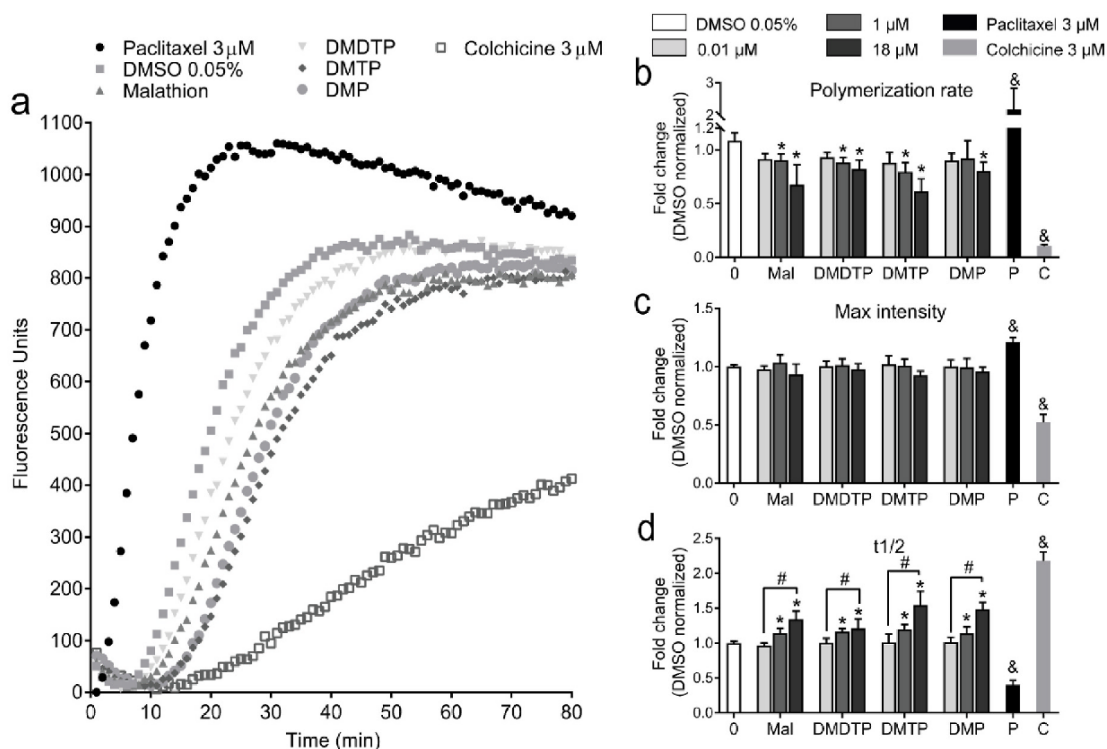


Fig. 3. Effect of OP compounds on tubulin polymerization using a fluorescence-based assay. Representative curve of tubulin (2 mg/mL) polymerization into microtubules (fluorescent) treated with equimolar concentrations of OP compounds (18 μ M) (a). Tubulin polymerization rate (b), max polymerized tubulin (c) and tubulin polymerization half-time (d) were calculated from tubulin heterodimers treated with 0.01, 1 or 18 μ M of malathion (Mal) or its metabolites DMDTP, DMTP, or DMP. Data represent mean \pm standard deviation (S.D.) (n = 3), one-way ANOVA post-hoc Bonferroni *p < 0.05 vehicle vs. treatment; #p < 0.05 0.01 μ M vs. 1 μ M; &p < 0.05 Student's *t*-test vehicle (0) vs. P (paclitaxel 3 μ M) or C (colchicine 3 μ M).

polymerization rate (1 and 18 μ M), while DMP only reduced tubulin polymerization at equimolar concentrations (Fig. 3b). Also, malathion and its metabolites delayed its polymerization at 1 and 18 μ M (Fig. 3c) but did not affect the total amount of polymerized tubulin at any concentration (Fig. 3d). The reduction of tubulin polymerization and its delay suggest that these OPs act during the tubulin nucleation phase, and similar to actin, tubulin is only susceptible to OPs in an unpolymerized state.

Because malathion and its DAPs affected actin and tubulin polymerization, we determined whether these compounds could alter the actin and tubulin cytoskeleton in the RAW264.7 murine macrophages. To assess whether exposure to OP compounds may affect the cytoskeleton, we evaluated the morphology of RAW264.7 exposed to malathion and its DAPs (Figs. 4 and 5) at non-cytotoxic concentrations as previously determined by the Neutral Red Uptake assay (Supplementary Fig. 2). The DMSO-treated RAW264.7 cells (negative control) predominantly had a rounded morphology (63.9%) followed by a proportion of spindle-like cells (29.1%). However, treatment with 50 nM PMA for 2 h (positive control) increased spindle cell morphologies (57.9%, $p = 0.0007$) and reduced the proportion of rounded cells. We tested different concentrations from 0.001 μ M up to 10 μ M, observing changes in cell morphology and mainly actin cytoskeletal re-arrangements (Supplementary Figs. 3–6). These changes were more evident from the concentration of 0.01 μ M. However, to evaluate changes induced by concentrations observed typically in exposed populations, we continue to evaluate concentrations of 0.01 and 1 μ M.

Similar to PMA, malathion, DMTP, and DMP at 0.01 μ M significantly increased spindle-like cells up to 54.9%, 59.8%, and 59.4%, respectively ($p = 0.0008$, $p = 0.0013$, and $p = 0.0028$, respectively). Interestingly, with the treatment of 1 μ M, these changes in morphology

were only significant with malathion and DMP ($p = 0.046$ and $p = 0.029$, respectively; Table 1).

The morphological changes of the cells were more evident with 0.01 μ M treatment; thus, we evaluated the actin, tubulin, and vimentin cytoskeleton of RAW264.7 cells treated with this concentration (Fig. 5). Spindle cells induced by malathion treatment showed thin pseudopods with a large presence of microtubules; no disruption of the tubulin cytoskeleton was observed. However, the actin cytoskeleton presented a small actin disarrangement around the cell body, with the presence of thin actin projections, which remain present at higher concentrations (Supplementary Fig. 3). DMDTP treatment induced spindle cells with small pseudopods with rearrangement of the actin cytoskeleton in the cell poles with branched actin projections (Fig. 5), however, the increase in DMDTP concentration resulted in larger pseudopods with similar branched actin projections (Supplementary Fig. 4). Interestingly, both DMTP and DMP induced actin disarrangement, principally with DMTP, and filopodia around the cell body. DMTP- and DMP-treated cells also possessed pseudopods, but wider than the ones observed with malathion treatment (Fig. 5). The increase in DMTP concentration resulted in larger filopodia (Supplementary Fig. 5), also the increase in DMP up to 0.1 μ M resulted in larger filopodia with actin disarrangement more evident at 1 μ M (Supplementary Fig. 6). Additionally, no effect on the tubulin cytoskeleton, but microtubule-organizing center polarization was observed with DMDTP, DMTP, and DMP treatments, suggesting that DAPs interfere only with actin cytoskeleton arrangement as we observed actin rearrangement, pseudopods, and filopodia induction. Also, the vimentin filaments reorganized in these induced spindle cells, decreasing their perinuclear localization and increasing in the pseudopod structures (Supplementary Fig. 7). However, this redistribution of vimentin may be related to its reported interaction with actin and

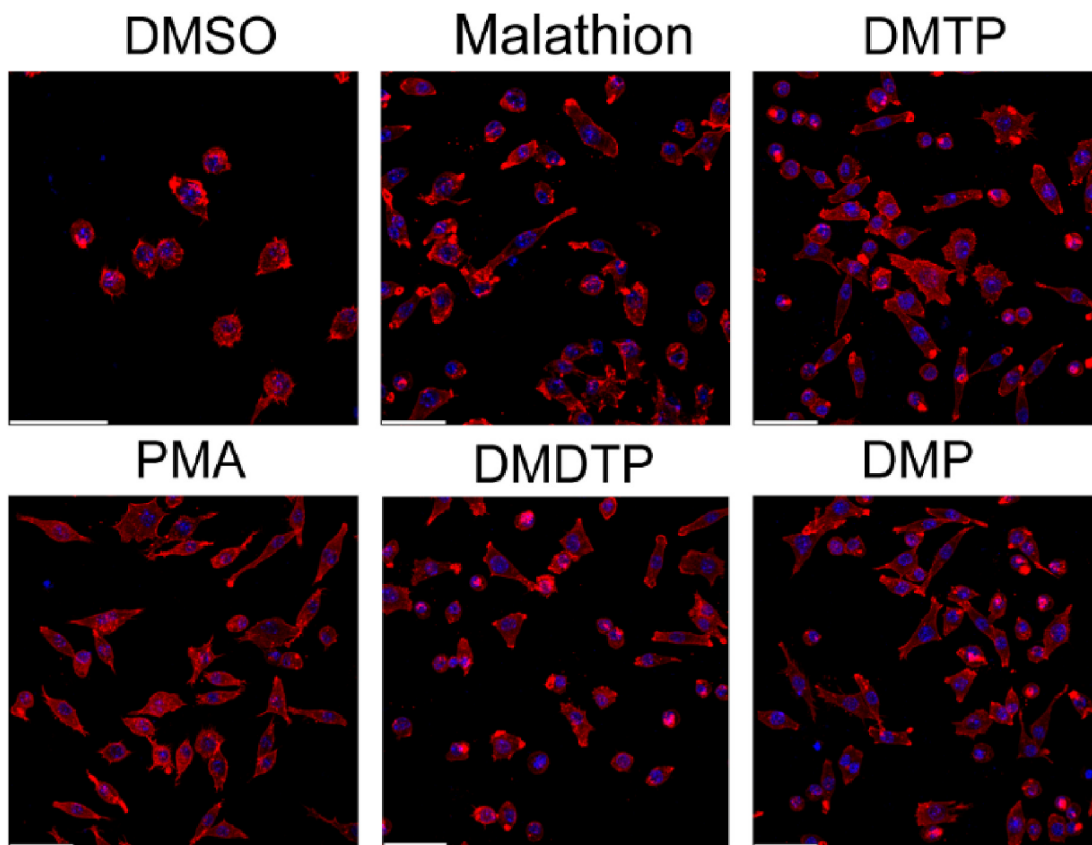


Fig. 4. Cell morphology after OP exposure. Fluorescence micrographs of the F-actin (red) cytoskeleton organization in RAW264.7 cells treated with malathion, DMDTP, DMTP, or DMP at 0.01 μM , for 2 h. Scale bar 50 μm .

tubulin structures to aid cell spreading [51–53], rather than as a particular target of OP compounds.

In addition to pseudopods and filopodia, stress fibers are other actin-specialized structures, however, these structures were not evident in the RAW264.7 cells. To evaluate the effect of OP treatments in these structures, we used the human fibroblasts GM03440 cells. These cells normally showed spindle morphology with evident stress fibers. The treatment with PMA resulted in modifications of the morphology with changes in the distribution or the reduction of stress fibers. Also, these cells presented actin disarrangements similar to RAW264.7 cells. Malathion nor DMDTP did not show morphology changes or affectation in stress fibers of human fibroblasts. However, DMTP- and DMP-treated cells (0.01–1 μM) showed filopodia or branched actin projections with slightly reduction in stress fibers at 1 μM (Fig. 6).

Besides morphology, we evaluated cell migration and phagocytosis as indicators of the possible effects of the cell functions due to cytoskeletal modifications after OP exposure. Despite the clear modification of the cytoskeleton arrangement in the exposed cells, malathion exposure from 0.01 to 1 μM did not affect cell migration (Fig. 7a). The OP metabolite DMDTP, however, increased cell migration only at 1 μM (Fig. 7b). The macrophages exposed to DMTP also showed a significant increase in cell migration from 0.01 up to 1 μM . This induction seemed to decrease while the concentration increased (Fig. 7c). Similarly, DMP also induced cell migration from 0.1 up to 1 μM , showing a slight decrease when the concentration increased (Fig. 7d), indicating that the disarrangement observed in the cytoskeleton could modify the cell migration of RAW264.7 cells. Interestingly, regardless of the changes in cell migration activity of the cells, the effects of OP compounds exposure on a different function of these cells were slightly altered. The proportion of phagocytic cells after 2 h of exposure to malathion or DAPs was

barely reduced by approximately 10%, with all treatments (Fig. 8a). However, the phagocytic cells showed no effect on the number of phagocytized particles (Fig. 8b), indicating that the exposure to OP compounds did not modify this activity in RAW264.7 cells, regardless of the modifications in their cytoskeleton arrangement.

Because DAPs induced cell morphology changes accompanied by actin cytoskeleton rearrangement and an enhanced cell migration, we hypothesized that DAPs may be implicated in the activation of the cytoskeleton regulator proteins such as the Rho GTPase family. To determine whether malathion and its DAPs affect the activation status of Rho GTPases, we evaluated the activities of RhoA, Rac1, and Cdc42 from RAW264.7 cells treated with malathion or its DAPs (0.01 μM) for 5 min. We observed that malathion and its DMP metabolite decreased RhoA activity by about 20% (Fig. 9a), whereas the metabolites DMDTP, DMTP, and DMP significantly increased Rac1 activity by 31%, 44%, and 40%, respectively (Fig. 9b). Additionally, DMTP and DMP also increased Cdc42 activity by 20% and 10%, respectively (Fig. 9c). The activation of Rac1 and Cdc42 pathways may explain the cytoskeleton changes and the enhanced cell migration observed principally with DMTP and DMP metabolites. DMP was the only metabolite to modify the activity of the three GTPases, and thus, we evaluated its effect through time. Interestingly, DMP steadily decreased RhoA activity (Fig. 9d) and increased Rac1 activity (Fig. 9e) from 5 to 120 min of exposure. In the case of Cdc42, DMP reached maximum activity after 60 min and decreased up to 120 min after exposure (Fig. 9f).

To evaluate if the changes in cell morphology, actin rearrangements, and cell migration observed with DMP were a result of the induction of Rac1 and Cdc42 activity, we chemically inhibited these GTPases with the Rac1 inhibitor NSC23766 and Cdc42 inhibitor ML-141 before treatment with DMP. Both inhibitors block the GTPases activation by

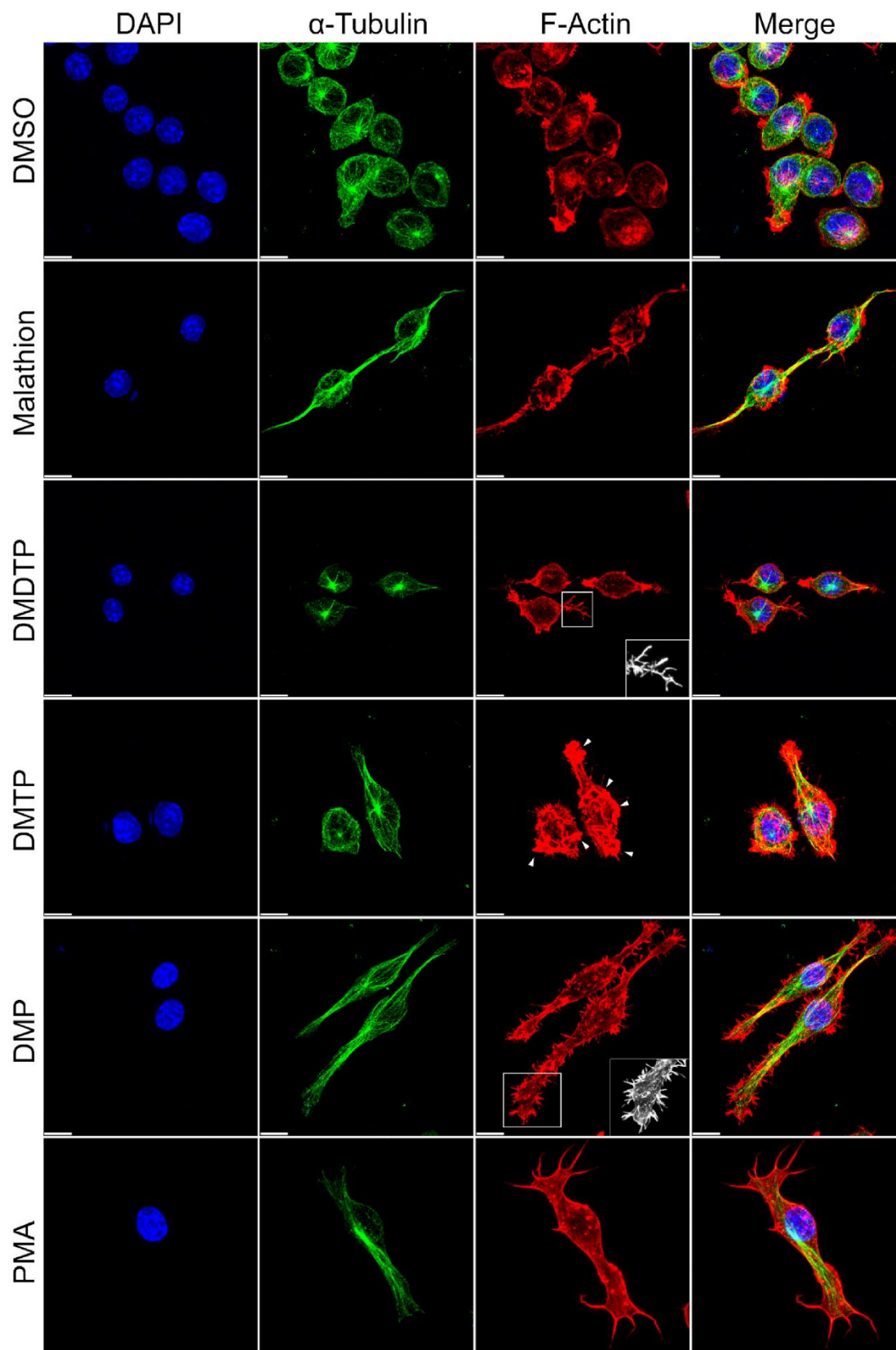


Fig. 5. Fluorescence micrographs of the actin (red) and tubulin (green) cytoskeleton organization in RAW264.7 cells treated with vehicle (DMSO 0.05%), PMA 50 nM, malathion, DMDTP, DMTP or DMP at 0.01 μ M, for 2 h. Arrow heads shows actin disorganization. Scale Bar 10 μ M.

Table 1
Cell morphology classification of RAW264.7 cells after OP exposure.

Treatment	[μ M]	Morphology (%)				
		Rounded	Spindle	Tetragonal	Triangular	Other
Vehicle	0.05%	63.9 \pm 3.9	29.1 \pm 4.9	2.5 \pm 1.7	1.7 \pm 1.2	2.7 \pm 1.3
Malathion	0.01	39.3 \pm 3.8 ^a	54.9 \pm 3.8 ^a	2.7 \pm 1.2	1.9 \pm 0.6	1.1 \pm 0.9
DMDTP	0.01	44.8 \pm 9.3 ^a	45.3 \pm 8.9 ^a	4.2 \pm 1.2	4.4 \pm 1.8	1.3 \pm 1.2
DMTP	0.01	32.9 \pm 3.3 ^a	58.9 \pm 4.1 ^a	2.6 \pm 0.4	3.2 \pm 1.8	2.4 \pm 0.9
DMP	0.01	31.9 \pm 5.5 ^a	59.4 \pm 6.2 ^a	2.8 \pm 0.9	2.8 \pm 1.3	3.0 \pm 1.0
Malathion	1	59.0 \pm 2.4 ^b	37.5 \pm 1.3 ^b	1.5 \pm 0.8	0.9 \pm 0.7	1.0 \pm 1.2
DMDTP	1	55.1 \pm 4.4	41.8 \pm 4.2	1.1 \pm 0.3	1.1 \pm 0.5	0.9 \pm 0.3
DMTP	1	59.5 \pm 2.5 ^b	36.5 \pm 1.7 ^b	2.1 \pm 0.7	1.1 \pm 0.6	0.8 \pm 0.5
DMP	1	56.7 \pm 4.5 ^b	41.1 \pm 3.9 ^b	1.0 \pm 0.5	0.9 \pm 0.5	0.3 \pm 0.1
PMA	0.05	31.1 \pm 6.9 ^a	57.9 \pm 1.8 ^a	6.2 \pm 3.1	1.9 \pm 0.4	2.9 \pm 2.5

^ap < 0.05, two-way ANOVA *post-hoc* Bonferroni vehicle vs. treatment.

^bp < 0.05, two-way ANOVA *post-hoc* Bonferroni 0.01 μ M vs. 1 μ M.

*The cells were classified from at least 10 fields per sample from immunostaining preparations (n = 3). The results are shown as the percentage \pm S.D.

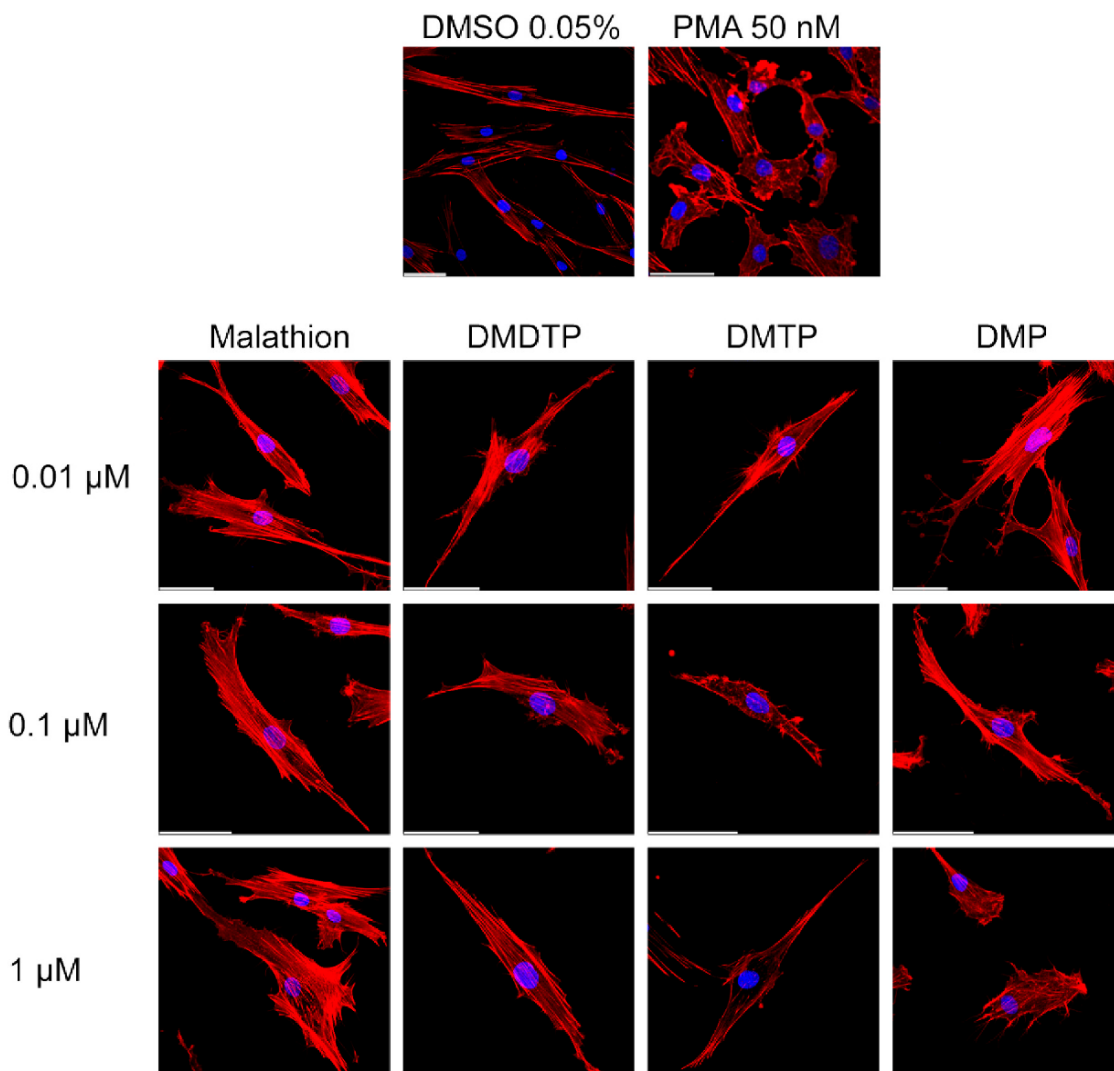


Fig. 6. Fluorescence micrographs of the actin cytoskeleton organization in GM03440 cells treated with vehicle (DMSO 0.05%), PMA 50 nM, malathion, DMDTP, DMTP or DMP (0.01–1 μ M) for 2 h. Scale Bar 50 μ M.

their guanine exchange factors, which catalyze the exchange of GDP to GTP [54,55]. Rac1 inhibition did not significantly reduce the spindle morphology induction (p = 0.17; Table 2), but prevented actin

cytoskeleton rearrangement filopodia formation (Fig. 10a). The inhibition of Cdc42 stopped DMP-induced morphology changes (p = 0.006; Table 2) and prevent pseudopods and filopodia formation (Fig. 10a).

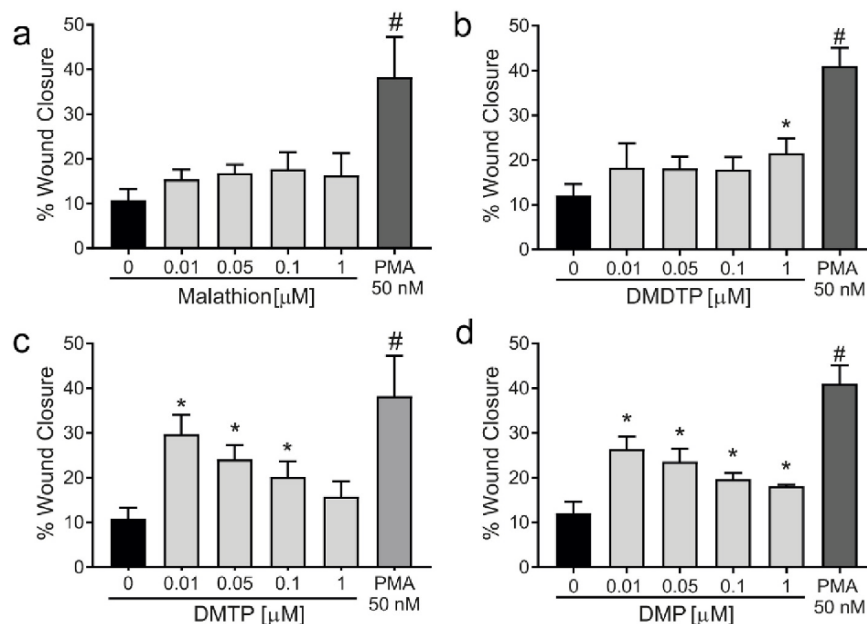


Fig. 7. Effect of DAPs in macrophage migration. Wound closure assay in RAW264.7 cell line treated with vehicle or malathion (a), DMDTP (b), DMTP (c) or DMP (d) (0.01–1 μ M) and PMA 50 nM as positive control for 48 h. Data represent mean \pm S.D. (n = 3), one-way ANOVA post-hoc Bonferroni *p < 0.05 vehicle vs. treatment and Student's *t*-test #p < 0.05 vehicle vs. PMA.

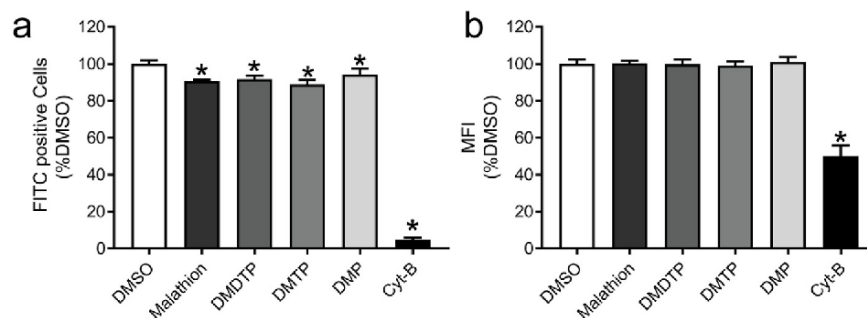


Fig. 8. Effect of DAPs in zymosan-FITC particles phagocytosis. Percentage of FITC positive cells (a) and mean fluorescence intensity (MFI) (b) of RAW264.7 cells treated with malathion or its DAPs (0.01 μ M) or DMSO (0.05%) as vehicle, for 2 h, or Cytochalasin B (Cyt-B, 5 μ g/mL) for 1 h as negative control, prior incubation with zymosan-FITC particles. Data represent mean \pm S.D. (n = 3), *p < 0.050, Student's *t*-test vehicle vs. treatment.

Similarly, Rac1 inhibition just reduced the increase in DMP mediated cell migration, whereas Cdc42 prevented the increase in cell migration (Fig. 10b). These results indicate that DAPs such as DMTP and DMP can modify cell activities, including cytoskeleton arrangement through the activation of Rac1 and Cdc42 pathways.

4. Discussion

OP compound toxicity is usually associated with the neurotoxic effects resulting from AChE inhibition. However, recent reports suggest that OPs such as pesticides, warfare agents, and OP-designed probes possess several molecular targets including cytoskeletal proteins such as actin, tubulin, and keratin, causing alterations in their polymerization [16,56]. Although these effects are significantly observed with parental and oxidized forms, these compounds are rapidly metabolized while their final metabolites are maintained in circulation for a longer time.

Here, we found that DAPs also affect actin and tubulin polymerization as well as its parental compound malathion does. However, the mechanisms of effect of these compounds are not equal. For example, malathion does not alter actin polymerization, whereas DAPs block the

interaction between actin monomers, decreasing the free G-actin concentration and reducing the polymerization rate and total F-actin formation. Some reports have found that different OP compounds can form adducts in amino acid residues of the actin protein such as lysines, serines, and tyrosines [15,57,58]. These amino acid residues play an important role in actin polymerization as they participate in post-translational modifications such as phosphorylation, acetylation, SUMOylation, and ubiquitination, which allow the stabilizing of actin microfilaments and the union of actin-binding proteins inside the cells [59]. However, modifications on specific tyrosine residues such as tyrosine 53 can block the capability of G-actin to polymerize [60]. This residue has been identified as a target for the alkylating properties of OP compounds [58], which could explain the observed effects on actin polymerization with the DAP treatments. Interestingly, this residue is only available when actin is unpolymerized, which explains why OP compounds did not affect actin depolymerization (Fig. S1).

Similarly, malathion and its DAPs delayed tubulin polymerization. This delay may be due to an abnormal nucleation phase, resulting from the OP interaction with tubulin heterodimers. Recent reports showed that tubulin could be more affected than actin after OP exposure because

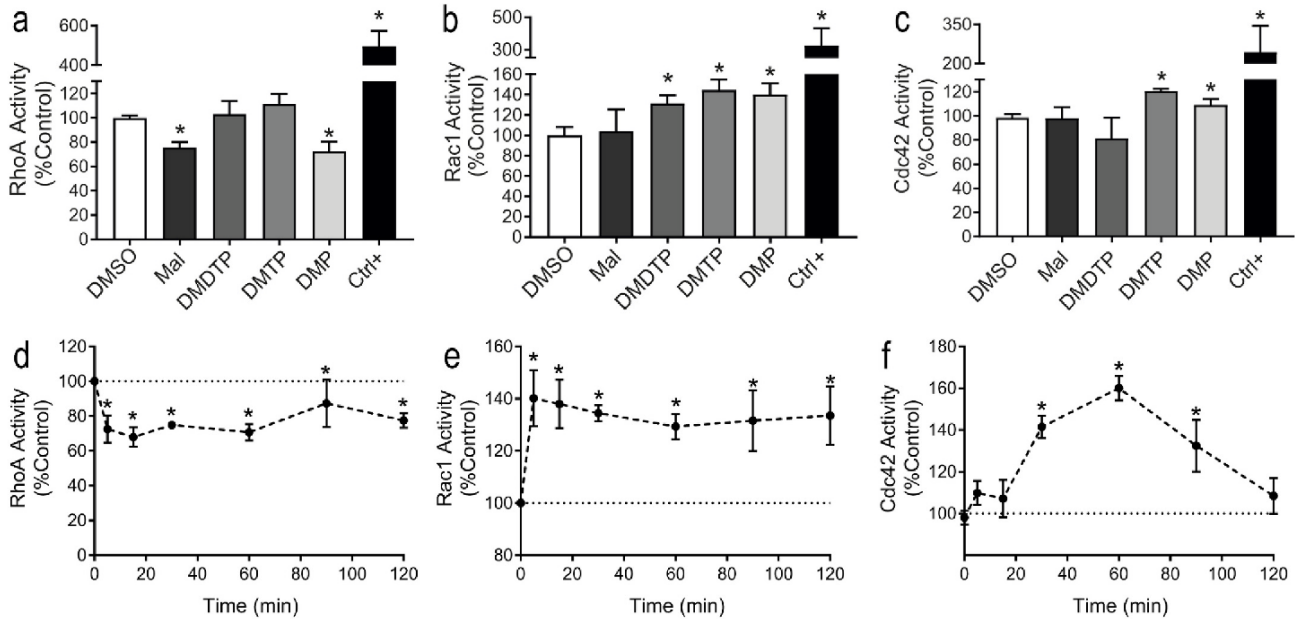


Fig. 9. Effect of OP compounds on Rho GTPases. GTPase activities of RhoA (a), Rac1 (b) and Cdc42 (c) were determined in RAW264.7 cell cultures treated with OP compounds (0.01 μM) for 5 min (n = 3). Effect of DMP (0.01 μM) on RhoA (d), Rac1 (e) and Cdc42 (f) activities at 0, 5, 15, 30, 90, and 120 min (n = 3). Data represent mean ± standard deviation (S.D.), one-way ANOVA post-hoc Bonferroni *p < 0.05 vehicle vs. treatment; ^{ab}p < 0.05 Student's *t*-test vehicle (0) vs. positive control (constitutive active protein).

Table 2

Cell morphology classification of RAW264.7 cells after Rac1 and/or Cdc42 inhibition.

Treatment	Morphology (%)				
	Rounded	Spindle	Tetragonal	Triangular	Other
Vehicle	63.9 ± 3.9	29.1 ± 4.9	2.5 ± 1.7	1.7 ± 1.2	2.7 ± 1.3
DMP	31.9 ± 5.5 ^a	59.4 ± 6.2 ^a	2.8 ± 0.9	2.8 ± 1.3	3.0 ± 1.0
NSC23766	45.0 ± 4.7 ^{ab}	38.3 ± 1.7 ^b	3.8 ± 1.6	4.6 ± 1.1	8.3 ± 3.1
ML-141	52.8 ± 3.4 ^b	32.2 ± 3.2 ^b	3.9 ± 0.8	5.0 ± 0.7	6.0 ± 2.3
NSC23766+DMP	32.2 ± 0.9 ^a	50.5 ± 6.7 ^a	4.8 ± 3.1	4.2 ± 0.5	4.7 ± 3.0
ML-141+DMP	48.8 ± 5.3 ^{ab}	37.7 ± 3.7 ^b	3.3 ± 0.7	4.7 ± 2.9	5.2 ± 1.8
NSC23766+ML-141+DMP	53.2 ± 2.1 ^b	33.0 ± 3.5 ^b	4.0 ± 1.1	3.2 ± 0.7	6.5 ± 2.5

^ap < 0.05, two-way ANOVA *post-hoc* Bonferroni vehicle vs. treatment.

^bp < 0.05, two-way ANOVA *post-hoc* Bonferroni DMP vs. treatment.

*The cells were classified from at least 10 fields per sample from immunostaining preparations (n = 3). The results are shown as the percentage ± S.D.

the tubulin heterodimer possess several target amino acid residues that participate in both lateral contacts and GTP interactions [57]. Also, Lockridge and Grygoryan (2009) [61] reported that chlorpyrifos oxon exposure altered microtubule formation by decreasing the width of polymerized microtubules *in vitro*, which was suggested to be a consequence of a reduction in the number of protofilaments of each microtubule. This defect has been reported as a consequence of altered nucleation phase [62]. Since the greatest effects in both actin or tubulin polymerization occurred with equimolar concentrations of malathion or DAPs, it is possible that greater concentrations may enhance this polymerization disruption by interacting with other sites on actin or tubulin molecules. However, those concentrations may not be reached in human exposures.

Although malathion and its DAPs altered actin and tubulin polymerization *in vitro*, they did not collapse the cell morphology as previously described with exposure to parental compounds such as methylparathion, chlorpyrifos, and malathion in different cell lines [20–22]. The differences could be due to the higher concentrations and longer times of exposure to OP compounds used in previous studies. By contrast, we observed the induction of spindle-like morphologies accompanied by increased actin structures such as filopodia in mice macrophage cells with short time exposure to OP compounds. Interestingly, these structures also appeared to be induced in human fibroblast accompanied with a slightly reduction in actin fiber stress, suggesting possible same mechanisms independently of the cell type and even cell specie. Because these compounds did not induce actin or tubulin polymerization, these changes could be due to the activation of signaling pathways that include cytoskeletal remodeling.

Here, we observed that DAPs can induce the GTPase activity of Rac1 and Cdc42. This activation can be the result of upstream pathway activation as the inhibition of its interaction with its respective guanine nucleotide exchange factors (GEFs) preventing the cytoskeletal changes induced by DAPs. DAPs change the activation status of diverse proteins such as suppressor of cytokine signaling 3, extracellular signal regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase, p38, and nuclear factor of activated T-cells of human lymphocytes [45], suggesting that DAPs modulate the response of different signaling pathways that can include the response of tyrosine kinase receptors, G protein-coupled receptors or integrin receptors, which are associated with GTPase activation and cytoskeletal remodeling. Also, some reports have suggested that OP compounds, such as malathion, interact with cell membranes, activating diverse signal pathways including the activation of phospholipase C [63], which in turn can trigger the activation of PKC and therefore the activation of GEFs.

Particularly, in the case of DMTP and DMP, the induction of actin rearrangement and cell migration is mainly regulated by Cdc42. Some reports have found that RhoA, Rac1, and Cdc42 participate in cell migration, but they may not be indispensable. For example, the deletion of RhoA in macrophages enhances cell migration but alters cell

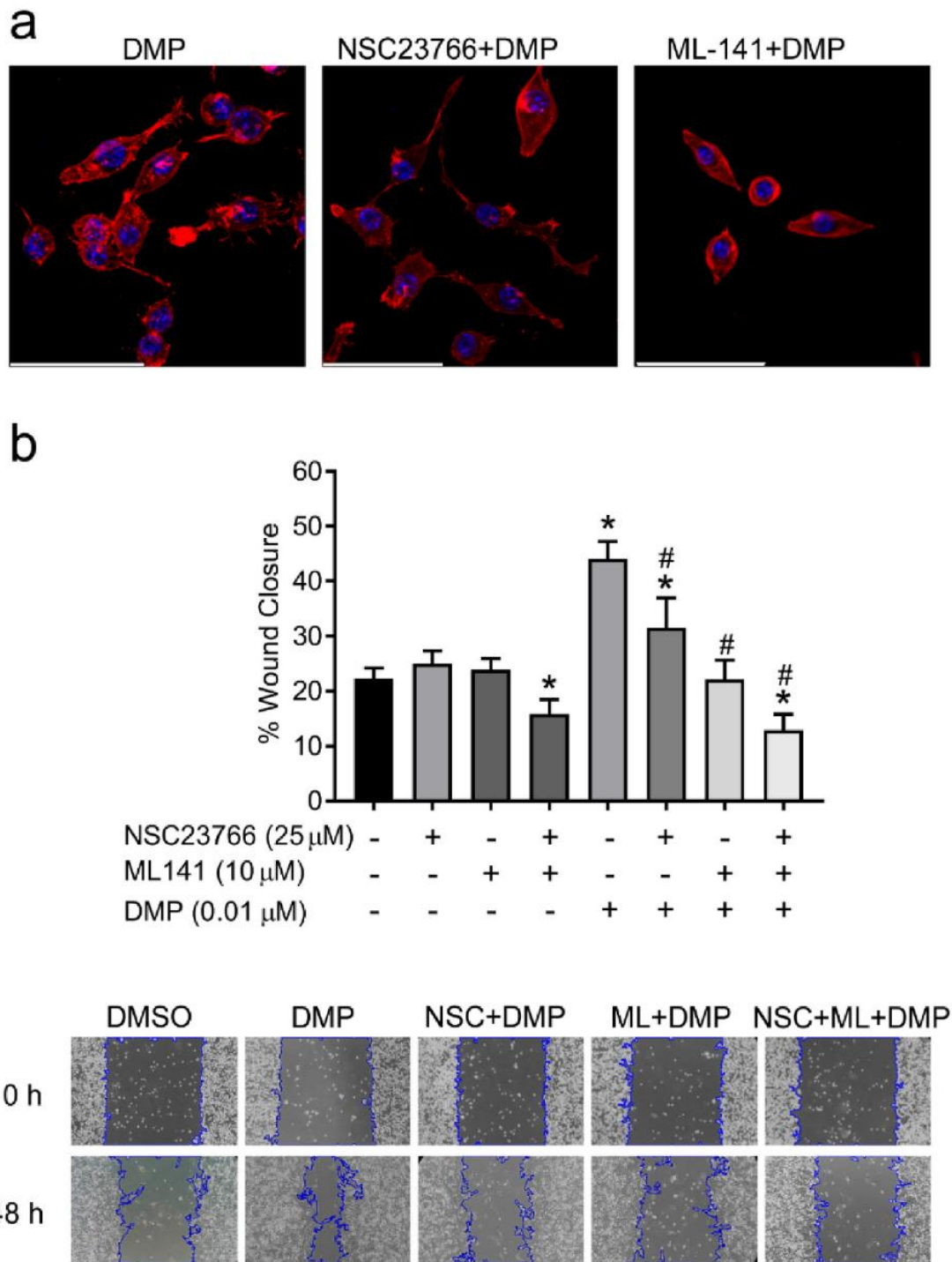


Fig. 10. Inhibition of Rac1 or Cdc42 prevents DMP cell morphology changes. Fluorescence micrographs show F-actin (red) cytoskeleton organization of RAW264.7 cells after Rac1 or Cdc42 inhibition with Rac1 inhibitor NSC23766 (25 μM) or Cdc42 inhibitor ML-141 (10 μM) for 2 h and DMP treatment (a). Scale Bar 50 μm. Effect of the inhibition of Rac1 and Cdc42 in the cell migration induced by DMP (b). Cell migration was determined by wound closure assay of RAW264.7 cell line pre-treated with Rac1 inhibitor NSC23766 (25 μM) or Cdc42 inhibitor ML-141 (10 μM) and vehicle or DMP (0.01 μM) for 48 h. Data represent mean ± S.D. (n = 3), *p < 0.050, Student's *t*-test vehicle vs. treatment; #p < 0.05 DMP 0.01 μM vs. treatment.

morphology because the cell rear cannot be retracted [64]. Rac1 is also important in cell migration due to its role in the formation of actin protrusions that lead to migration [65]. However, some studies have demonstrated that inhibition of Rac1 does not affect macrophage migration [66,67]. Rac1 can be activated due to Cdc42 activation

because its effector proteins may induce this activation. Additionally, Rac1 and Cdc42 can share the same GEF [68] and effector proteins [39, 69] as targets. In this context, is possible that DMTP and DMP can activate Cdc42 pathways that result in Rac1 activation [70] promoting actin protrusions and the spindle morphologies that enhance cell

migration.

Interestingly, cell migration was reduced when the cells were exposed to increasing concentrations of DAPs. This may be related to the dual role of Rac1 in cell migration; Rac1 activation induces cell protrusions such as lamellipodia that favor cell migration but Rac1 activation also can recruit scaffold proteins such as IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1 (IQGAP1). IQGAP1 is a GTPase-activating protein usually associated with the beta catenin E-cadherin complex, blocking its interaction with the actin cytoskeleton. However, its recruitment to Rac1 can increase the interaction of these contact complexes with the actin cytoskeleton, making stronger cell-cell interactions that in turn reduce cell migration [71]. Thus, the increase in DAP concentration may also increase Rac1 activation and cell adherence, reducing cell migration. Additionally, IQGAP1 can stabilize the Rac1-activated status because it possesses a non-functional GTPase-activating domain. This would explain the maintained activation status of Rac1 up to 120 min observed in DMP-treated cells.

In addition to the pseudopods, stress fibers are described to be essential for the generation of membrane protrusions, since it helps to provide the mechanical force required to cell migration [72]. However, RAW264 cells didn't show evident fiber stress formation even during the pseudopod induction. Instead, human fibroblast normally possesses stress fibers for maintain its morphology. Stress fibers are regulated by several kinases activated by RhoA GTPase [73]. The lack of induction of RhoA GTPase activity can explain the absence of stress fibers in macrophages, while the increase of Rac1 activity, which negatively regulate RhoA [74], may explain the slightly reduction of stress fibers and morphological changes of the human fibroblast with 1 μ M DMTP and DMP treatments.

Similarly, the induction of Rac1 and Cdc42 may explain the slight reduction in the proportion of phagocytic cells, as these two GTPases are involved in formation of the phagocytic cup, and its internalization is regulated by RhoA [75]. The increased activation status of Rac1 or inactive RhoA leads to deficient phagosome internalization [76,77], which results in altered phagocytosis. However, DAPs do not interfere with phagocytosis as with cell migration, probably because DAPs may not interfere with upstream molecular targets responsible for triggering phagocytosis.

The effect of DAPs on cytoskeleton regulation would also explain previous reported observations. Recently, we reported that DMTP can induce micronucleus, probably by aneuploidogenic effects [47]. Cdc42 also participates in the regulation of mitosis, including spindle bipolarity and chromosome attaching. During chromosome segregation, this GTPase needs to be negatively regulated to favor the correct segregation of chromosomes, and the overactivation of Cdc42 and Rac1 may alter the mitotic machinery.

Altogether, our results suggest that malathion and each of its DAP metabolites have different mechanisms of action on the cytoskeleton dynamics, its organization, and function. However, DMTP and DMP present the more notorious effects on the cytoskeleton. These metabolites are the most oxidized compounds and the most frequent and abundant methylated DAPs found in human samples [50,78]. In the case of DMTP, it is the major produced metabolite (approximately 50%) in humans [41] after exposure to methylated OP pesticides, such as malathion. However, OP metabolism is not the only source of DAPs as they are also present in contaminated food, such as fruits, so they can be orally ingested, which represents an important exposure source. Once absorbed, DMTP can lead to DMP formation [79,80], increasing the source of this last metabolite.

The concentrations of OP compounds used in this study were quite low compared to previous reports on the *in vitro* effects of OP pesticides. However, these concentrations were closer to those found in the urine samples of occupational exposed and general populations (0.02–60 μ M), while in blood samples of chronic OP exposed populations, the DAP concentrations can range between 0.53 and 0.73 μ M [50]. It is important to consider the OP compound range of concentrations evaluated because

the effects reported here could be present in chronic OP exposed individuals and could be related to the development of diverse diseases. For example, increased cell migration is related to cancer development and some immune disorders such as rheumatoid arthritis [81], which are associated with OP exposure [82].

Also considering the reported genotoxic and immunomodulatory effects, DAP exposure may need to be recognized and regulated. Particularly since the general population can be constantly exposed to these metabolites, not only through pesticides but also through diet, because these metabolites can be formed due to environmental conditions in diverse types of crops on which pesticides were applied [79,83,84] and because some of these compounds are used in other industries as additives. Further studies are needed to determine safe exposure levels as even lower concentrations of these DAPs may exert adverse outcomes.

Statements and declarations

The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.

Author contributions

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by David Sebastián Hernández-Toledano. The first draft of the manuscript was written by David Sebastián Hernández-Toledano and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors thank M. Sc. Elizabet Estrada-Muñiz from CINVESTAV for her technical assistance and Dr. Bulmaro Cisneros from CINVESTAV for providing the human fibroblast GM03440 cells, and the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT, Research Grant 153468 and scholarship 780423) for providing funding support to this investigation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110593>.

References

- [1] H. Fu, P. Tan, R. Wang, S. Li, H. Liu, Y. Yang, Z. Wu, Advances in organophosphorus pesticides pollution: current status and challenges in ecotoxicological, sustainable agriculture, and degradation strategies, *J. Hazard Mater.* 424 (2022), 127494, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127494>.
- [2] Y.H. Tsai, P.J. Lein, Mechanisms of organophosphate neurotoxicity, *Curr. Opin. Toxicol.* 26 (2021) 49–60, <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.04.002>.
- [3] P.R. Band, Z. Abanto, J. Bert, B. Lang, R. Fang, R.P. Gallagher, N.D. Le, Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia Farmers, *Prostate* 71 (2011) 168–183, <https://doi.org/10.1002/pros.21232>.
- [4] C.C. Lerro, S. Koutros, G. Andreotti, M.C. Friesen, M.C. Alavanja, A. Blair, J. A. Hopkin, D.P. Sandler, J.H. Lubin, X. Ma, Y. Zhang, L.E. Beane Freeman, Organophosphate insecticide use and cancer incidence among spouses of pesticide applicators in the Agricultural Health Study, *Occup. Environ. Med.* 72 (2015) 736, <https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102798>. LP – 744.

- [5] R. Mahajan, M.R. Bonner, J.A. Hoppin, M.C.R. Alavanja, Phorate exposure and incidence of cancer in the agricultural health study, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 1205–1209, <https://doi.org/10.1289/ehp.8911>.
- [6] J.P. Gutiérrez-Jara, F.D. Córdova-Lepe, M.T. Muñoz-Quezada, G. Chowell, Susceptibility to organophosphates pesticides and the development of infectious-contagious respiratory diseases, *J. Theor. Biol.* 488 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.110133>.
- [7] F.C. Shaffo, A.C. Grodzki, A.D. Fryer, P.J. Lein, Mechanisms of organophosphorus pesticide toxicity in the context of airway hyperreactivity and asthma, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 315 (2018) L485, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00211.2018>. –L501.
- [8] L.C. Sánchez-Peña, B.E. Reyes, L. López-Carrillo, R. Recio, J. Morán-Martínez, M. E. Cebrían, B. Quintanilla-Vega, Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196 (2004) 108–113, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.023>.
- [9] X. Geng, H. Shao, Z. Zhang, J.C. Ng, C. Peng, Malathion-induced testicular toxicity is associated with spermatogenic apoptosis and alterations in testicular enzymes and hormone levels in male Wistar rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39 (2015) 659–667, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.01.010>.
- [10] L. Etemad, M. Moshiri, S.A. Moallem, Chronic toxicity of organophosphorus compounds, in: *Basic Clin. Toxicol. Organophosphorus Compd.*, Springer London, London, 2014, pp. 79–118, https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5625-3_4.
- [11] J. Błasiak, P. Jajoszyński, A. Trzeciak, K. Szyfter, In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues, *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 445 (1999) 275–283, [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00132-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00132-1).
- [12] C. Bolognesi, Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* 543 (2003) 251–272, [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2).
- [13] H. Grigoryan, L.M. Schöpfer, C.M. Thompson, A.V. Terry, P. Masson, O. Lockridge, Mass spectrometry identifies covalent binding of soman, sarin, chlorpyrifos oxon, diisopropyl fluorophosphate, and FP-biotin to tyrosines on tubulin: a potential mechanism of long term toxicity by organophosphorus agents, *Chem. Biol. Interact.* 175 (2008) 180–186, <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2008.04.013>.
- [14] A.V.V. Terry, Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms, *Pharmacol. Ther.* 134 (2012) 355–365, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.001>.
- [15] T.M. Bui-Nguyen, W.E. Dennis, D.A. Jackson, J.D. Stallings, J.A. Lewis, Detection of dichlorvos adducts in a hepatocyte cell line, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 3583–3595, <https://doi.org/10.1021/pr5000076>.
- [16] D. Hernández-Toledano, L. Vega, The cytoskeleton as a non-cholinergic target of organophosphate compounds, *Chem. Biol. Interact.* 346 (2021), 109578, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109578>.
- [17] W. Jiang, E.G. Duysen, H. Hansen, L. Shlyakhtenko, L.M. Schöpfer, O. Lockridge, 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, *Toxicol. Sci.* 115 (2010) 183–193, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kiq032>.
- [18] L.M. Schöpfer, O. Lockridge, Chlorpyrifos oxon promotes tubulin aggregation via isopeptide cross-linking between diethoxyphospho-Lys and Glu or Asp: implications for neurotoxicity, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 13566–13577, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004172>.
- [19] L.M. Schöpfer, S. Onder, O. Lockridge, Organophosphorus pesticides promote protein cross-linking, *Chem. Res. Toxicol.* (2022), <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRES.2C00194>, ASSET/IMAGES/LARGE/2C00194_0008.JPG.
- [20] K. Carlson, M. Ehrlich, Organophosphorus compounds alter intracellular α -tubulin content in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, *Neurotoxicology* 22 (2001) 819–827, [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(01\)00073-0](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(01)00073-0).
- [21] G. Cabello, S. Galaz, L. Botella, G. Calaf, M. Pacheco, J. Stoekert, C. A. Villanueva, M. Cañete, A. Juarraz, The pesticide malathion induces alterations in actin cytoskeleton and in cell adhesion of cultured breast carcinoma cells, *Int. J. Oncol.* 23 (2003) 697–704, <https://doi.org/10.3892/ijo.23.3.697>.
- [22] M. Schäfer, F. Koppe, B. Stenger, C. Brochhausen, A. Schmidt, D. Steinritz, H. Thiermann, C.J. Kirkpatrick, C. Pohl, Influence of organophosphate poisoning on human dendritic cells, *Chem. Biol. Interact.* 206 (2013) 472–478, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.08.011>.
- [23] A. Hermanowicz, S. Kossman, Neutrophil function and infectious disease in workers occupationally exposed to phosphoorganic pesticides: role of mononuclear-derived chemotactic factor for neutrophils, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 33 (1984) 13–22, [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(84\)90288-5](https://doi.org/10.1016/0090-1229(84)90288-5).
- [24] M. Fiore, M. Mattiuzzo, G. Mancuso, P. Totta, F. Degrassi, The pesticide dichlorvos disrupts mitotic division by delocalizing the kinesin Kif2a from centrosomes, *Environ. Mol. Mutagen.* 54 (2013) 250–260, <https://doi.org/10.1002/em.21769>.
- [25] J. Gao, S.X. Naughton, W.D. Beck, C.M. Hernandez, G. Wu, Z. Wei, X. Yang, M. G. Bartlett, A.V. Terry, Chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon impair the transport of membrane bound organelles in rat cortical axons, *Neurotoxicology* 62 (2017) 111–123, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.06.003>.
- [26] J. Gao, S.X. Naughton, H. Wulff, V. Singh, W.D. Beck, J. Magrane, B. Thomas, N. A. Kaidery, C.M. Hernandez, A. V. Terry, Diisopropyl fluorophosphate impairs the transport of membrane-bound organelles in rat cortical axons, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 356 (2016) 645–655, <https://doi.org/10.1124/jpet.115.230839>.
- [27] P.F. Zabrodskii, V.A. Grishin, V.K. Borodavko, Mechanism of suppression of phagocytic and metabolic activity of neutrophils and production of proinflammatory cytokines during chronic poisoning with organophosphorus compounds, *Bull. Exp. Biol. Med.* 155 (2013) 464–466, <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2179-0>.
- [28] L.T. Herbert, J.M. Castro, V.A. Bianchi, P.F. Cossi, C.M. Luquet, G. Kristoff, Effects of azinphos-methyl on enzymatic activity and cellular immune response in the hemolymph of the freshwater snail *Chilina gibbosa*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 150 (2018) 71–77, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.07.005>.
- [29] K.Z. Guyton, D. Loomis, Y. Grosse, F. Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Scoccianti, H. Mattock, K. Straif, A. Blair, L. Fritschi, J. McLaughlin, C.M. Sergi, G.M. Calaf, F. Le Curieux, I. Baldi, F. Forastiere, H. Kromhout, A. t. Manette, T. Rodriguez, P. Egeghy, G.D. Jahnke, C.W. Jameson, M.T. Martin, M.K. Ross, I. Rusyn, L. Zeise, International agency for Research on cancer monograph working group, IARC, Lyon, France, carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate, *Lancet Oncol.* 16 (2015) 490–491, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8).
- [30] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Organophosphate Insecticides and Herbicides, IARC, Lyon, 2017, <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Evaluation-Of-Carcinogenic-Risks-To-Humans/Some-Organophosphate-Insecticides-And-Herbicides-2017>. (Accessed 17 July 2018).
- [31] Pesticide Action Network International (PAN), PAN international list of highly hazardous pesticides, *Pestic. Action Netw. Int.* (2018) 1–37, <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2004.07.004>.
- [32] A.M. Badr, Organophosphate toxicity: updates of malathion potential toxic effects in mammals and potential treatments, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2020) 1–22, <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08937-4>.
- [33] L. Mohammadzadeh, K. Abnous, B.M. Razavi, H. Hosseinzadeh, Crocin-protected malathion-induced spatial memory deficits by inhibiting TAU protein hyperphosphorylation and antiapoptotic effects, *Nutr. Neurosci.* 23 (2021) 221–236, <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1492772>.
- [34] P.F. Zabrodskii, The effect of chronic intoxication by organophosphate insecticides on the parameters of innate and adaptive immunity and realization of the cholinergic anti-inflammatory pathway, *Pharm. Pharmacol. Int. J.* 6 (2018) 1, <https://doi.org/10.15406/PPIJ.2018.6.00211>.
- [35] D. Flipo, J. Bernier, D. Girard, K. Krzyżystyniak, M. Fournier, Combined effects of selected insecticides on humoral immune response in mice, *Int. J. Immunopharmacol.* 14 (1992) 747–752, [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(92\)90071-R](https://doi.org/10.1016/0192-0561(92)90071-R).
- [36] F. Tatin, C. Varon, E. Génot, V. Moreau, A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 769–781, <https://doi.org/10.1242/jcs.02787>.
- [37] Y. Pilpel, M. Segal, Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms, *Eur. J. Neurosci.* 19 (2004) 3151–3164, <https://doi.org/10.1111/J.0953-816X.2004.03380.X>.
- [38] M. Cooke, M.J. Baker, M.G. Kazanietz, V. Casado-Medrano, PKC ζ Regulates Rho GTPases and Actin Cytoskeleton Reorganization in Non-small Cell Lung Cancer Cells, 2019, <https://doi.org/10.1080/21541248.2019.1684785>.
- [39] L. Van Aelst, C. D'Souza-Schorey, Rho GTPases and signaling networks, *Genes Dev.* 11 (1997) 2295–2322, <https://doi.org/10.1101/gad.11.18.2295>.
- [40] F.M. Buratti, A. D'Aniello, M. Volpe, A. Meneguz, E. Testai, Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome P450 isoforms, *Drug Metab. Dispos.* 33 (2005) 295–302, <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001693>.
- [41] R.I. Krieger, T.M. Dinoff, Malathion deposition, metabolite clearance, and cholinesterase status of date dusters and harvesters in California, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38 (2000) 546–553, <https://doi.org/10.1007/s002449910071>.
- [42] M.P. Kavvalakis, A.M. Tsatsakis, The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides^a exposure, *Forensic Sci. Int.* 218 (2012) 111–122, <https://doi.org/10.1016/j.foresint.2011.10.019>.
- [43] Ž. Vasilic, B. Štengl, V. Drevenkar, Dimethylphosphorus metabolites in serum and urine of persons poisoned by malathion or thiomethon, *Chem. Biol. Interact.* 119–120 (1999) 479–487, [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(99\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(99)00061-7).
- [44] D. Medina-Buevas, E. Estrada-Muñiz, M. Flores-Valadez, L. Vega, Genotoxic and immunotoxic effects of the organophosphate metabolite diethylthiophosphate (DEDTP) in Vivo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 366 (2019) 96–103, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.023>.
- [45] M.S. Esquivel-Senties, I. Barrera, A. Ortega, L. Vega, Organophosphorus 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 (2010) 122–133, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.07.017>.
- [46] L. Vega, M. Valverde, G. Elizondo, J.F. Leyva, E. Rojas, Diethylthiophosphate and diethylthiophosphate induce genotoxicity in hepatic cell lines when activated by further biotransformation via Cytochrome P450, *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 679 (2009) 39–43, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.07.009>.
- [47] D.S. Hernández-Toledano, E. Estrada-Muñiz, L. Vega, Genotoxicity of the organophosphate pesticide malathion and its metabolite dimethylthiophosphate in human cells in vitro, *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 856–857 (2020), 503233, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503233>.
- [48] A. Lima, L. Vega, Methyl-parathion and organophosphorus pesticide metabolites modify the activation status and interleukin-2 secretion of human peripheral blood mononuclear cells, *Toxicol. Lett.* 158 (2005) 30–38, <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2005.02.010>.

- [49] L.K. Doolittle, M.K. Rosen, S.B. Padrick, Measurement and analysis of in vitro actin polymerization, *Methods Mol. Biol.* 1046 (2013) 273–293, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-538-5_16.
- [50] M. Michalakis, M.N. Tzatzarakis, L. Kovatsi, A.K. Alegakis, A.K. Tsakalof, I. Heretis, A. Tsatsakis, Hypospadias in offspring is associated with chronic exposure of parents to organophosphate and organochlorine pesticides, *Toxicol. Lett.* 230 (2014) 139–145, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.015>.
- [51] H. Cain, R. Krauspe, B. Kraus, The cytoskeleton in activated and in functionally disordered cells of the macrophage system, *Pathol. Res. Pract.* 175 (1982) 162–179, [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(82\)80106-4](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(82)80106-4).
- [52] I. Correia, D. Chu, Y. Chou, R.D. Goldman, P. Matsudaira, formation of fimbrin – vimentin complexes in macrophages, *Cell* 146 (1999) 831–842.
- [53] S. Usman, N.H. Waseem, T.K.N. Nguyen, S. Mohsin, A. Jamal, M.T. Teh, A. Waseem, Vimentin is at the heart of epithelial mesenchymal transition (Emt) mediated metastasis, *Cancers* 13 (2021) 1–26, <https://doi.org/10.3390/cancers13194985>.
- [54] Y. Gao, J.B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng, Y. Zheng, Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 7618–7623, <https://doi.org/10.1073/pnas.0307512101>.
- [55] L. Hong, S.R. Kenney, G.K. Phillips, D. Simpson, C.E. Schroeder, J. Nöth, E. Romero, S. Swanson, A. Waller, J.J. Strouse, M. Carter, A. Chigaev, O. Ursu, T. Oprea, B. Hjelle, J.E. Golden, J. Aubé, L.G. Hudson, T. Buranda, L.A. Sklar, A. Wandinger-Ness, Characterization of a Cdc42 protein inhibitor and its use as a molecular probe, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 8531–8543, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.435941>.
- [56] D.S. Hernández-Toledano, L. Vega, Genetic and epigenetic biomarkers of organophosphate compounds, dialkyl phosphate exposure, and their relation to biological effects, in: S. Sahu (Ed.), *Genomic Epigenomic Biomarkers Toxicol. Dis.*, John Wiley & Sons Ltd, 2022, pp. 363–381, <https://doi.org/10.1002/9781119807704.ch16>.
- [57] H. Grigoryan, L.M. Schöpfer, E.S. Peeples, E.G. Duysen, M. Grigoryan, C. M. Thompson, O. Lockridge, Mass spectrometry identifies multiple organophosphorylated sites on tubulin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240 (2009) 149–158, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.020>.
- [58] L.M. Schöpfer, H. Grigoryan, B. Li, F. Nachon, P. Masson, O. Lockridge, Mass spectral characterization of organophosphate-labeled, tyrosine-containing peptides: characteristic mass fragments and a new binding motif for organophosphates, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 1297–1311, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.07.026>.
- [59] S. Varland, J. Vandekerckhove, A. Dražić, Actin post-translational modifications: the cinderella of cytoskeletal control, *Trends Biochem. Sci.* 44 (2019) 502–516, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.11.010>.
- [60] N. Bender, H. Pasold, A. Kenmoku, G. Middelhoff, K.-E. Volk, The selective blocking of the polymerization reaction of striated muscle actin leading to a derivative suitable for crystallization. Modification of tyr-53 by 5-diazonium-(1H) tetrazole, *Eur. J. Biochem.* 64 (1976) 215–218, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10290.x>.
- [61] H. Grigoryan, O. Lockridge, Nanoimages show disruption of tubulin polymerization by chlorpyrifos oxon: implications for neurotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240 (2009) 143–148, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.015>.
- [62] A. Rai, T. Liu, E.A. Katrukha, J. Esteve-Gallego, I. Paterson, F. Diaz, L.C. Kapitein, C.A. Moores, A. Akhmanova, Lattice defects induced by microtubule-stabilizing agents exert a long-range effect on microtubule growth by promoting catastrophes, *bioRxiv* (2021), <https://doi.org/10.1073/pnas.2112261118/-/DCSupplemental>. Published, 2021.02.11.430743.
- [63] S.S. Hsu, C.R. Jan, W.Z. Liang, Uncovering malathion (an organophosphate insecticide) action on Ca²⁺ signal transduction and investigating the effects of BAPTA-AM (a cell-permeant Ca²⁺ chelator) on protective responses in glial cells, *Pestic. Biochem. Physiol.* 157 (2019) 152–160, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.015>.
- [64] V. Königs, R. Jennings, T. Vogl, M. Horsthemke, A.C. Bachg, Y. Xu, K. Grobe, C. Brakebusch, A. Schwab, M. Bähler, U.G. Knaus, P.J. Hanley, Mouse Macrophages completely lacking Rho subfamily GTPases (RhoA, RhoB, and RhoC) have severe lamellipodial retraction defects, but robust chemotactic navigation and altered motility, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 30772–30784, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.563270>.
- [65] A.J. Ridley, Rho GTPase signalling in cell migration, *Curr. Opin. Cell Biol.* 36 (2015) 103–112, <https://doi.org/10.1016/j.cob.2015.08.005>.
- [66] C.M. Wells, M. Walmsley, S. Ooi, V. Tybulewicz, A.J. Ridley, Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 1259–1268, <https://doi.org/10.1242/jcs.00997>.
- [67] A.P. Wheeler, C.M. Wells, S.D. Smith, F.M. Vega, R.B. Henderson, V.L. Tybulewicz, A.J. Ridley, Rac1 and Rac2 regulate macrophage morphology but are not essential for migration, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 2749–2757, <https://doi.org/10.1242/jcs.03024>.
- [68] Y. Miyamoto, J. Yamauchi, A. Sanbe, A. Tanoue, Dock6, a Dock-C subfamily guanine nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth, *Exp. Cell Res.* 313 (2007) 791–804, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.11.017>.
- [69] S. Wang, T. Watanabe, J. Noritake, M. Fukuta, T. Yoshimura, N. Itoh, T. Harada, M. Nakagawa, Y. Matsuura, N. Arimura, K. Kaibuchi, IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth, *J. Cell Sci.* 120 (2007) 567–577, <https://doi.org/10.1242/JCS.03356>.
- [70] P.R. O'Neill, V. Kalyanaraman, N. Gautam, Subcellular optogenetic activation of Cdc42 controls local and distal signaling to drive immune cell migration, *Mol. Biol. Cell* 27 (2016) 1442–1450, <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-12-0832>.
- [71] H. Marei, A. Malliri, GEFs: dual regulation of Rac1 signaling, *Small GTPases* 8 (2017) 90–99, <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1202635>.
- [72] S. Tojkander, G. Gateva, P. Lappalainen, Actin stress fibers - assembly, dynamics and biological roles, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 1855–1864, <https://doi.org/10.1242/jcs.098087>.
- [73] K. Katoh, Y. Kano, M. Amano, K. Kaibuchi, K. Fujiwara, Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280 (2001) 1669–1679, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.6.c1669>.
- [74] L.K. Nguyen, B.N. Kholodenko, A. von Kriegsheim, Rac1 and RhoA: networks, loops and bistability, *Small GTPases* 9 (2018) 316–321, <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1224399>.
- [75] S.Y. Kim, S. Kim, D.J. Bae, S.Y. Park, G.Y. Lee, G.M. Park, I.S. Kim, Coordinated balance of Rac1 and RhoA plays key roles in determining phagocytic appetite, *PLoS One* 12 (2017) 1–19, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174603>.
- [76] M. Nakaya, M. Kitano, M. Matsuda, S. Nagata, Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 9198–9203, <https://doi.org/10.1073/pnas.0803677105>.
- [77] J.G. Kim, M.Y. Moon, H.J. Kim, Y. Li, D.K. Song, J.S. Kim, J.Y. Lee, J. Kim, S. C. Kim, J.B. Park, Ras-related GTPases Rap1 and RhoA collectively induce the phagocytosis of serum-opsonized zymosan particles in macrophages, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 5145–5155, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257634>.
- [78] J. Ock, J. Kim, Y.-H. Choi, Organophosphate insecticide exposure and telomere length in U.S. adults, *Sci. Total Environ.* 709 (2020), 135990, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135990>.
- [79] L. Chen, T. Zhao, C. Pan, J. Ross, M. Ginevan, H. Vega, R. Krieger, Absorption and excretion of organophosphorous insecticide biomarkers of malathion in the rat: implications for overestimation bias and exposure misclassification from environmental biomonitoring, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 65 (2013) 287–293, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.12.010>.
- [80] R.I. Krieger, L. Chen, M. Ginevan, D. Watkins, R.C. Cochran, J.H. Driver, J.H. Ross, Implications of estimates of residential organophosphate exposure from dialkylphosphates (DAPs) and their relevance to risk, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 64 (2012) 263–266, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.08.012>.
- [81] C.-H. Tsai, S.-C. Liu, Y.-H. Wang, C.-M. Su, C.-C. Huang, C.-J. Hsu, C.-H. Tang, Osteopontin inhibition of miR-129-3p enhances IL-17 expression and monocyte migration in rheumatoid arthritis, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1861 (2017) 15–22, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.015>.
- [82] A. Meyer, D.P. Sandler, L.E. Beane Freeman, J.N. Hofmann, C.G. Parks, Pesticide exposure and risk of rheumatoid arthritis among licensed male pesticide applicators in the agricultural health study, *Environ. Health Perspect.* 125 (2017), 077010, <https://doi.org/10.1289/EHP1013>.
- [83] T. Tsuchiyama, Y. Ito, N. Oya, K. Nomasa, H. Sato, K. Minato, K. Kitamori, S. Oshima, A. Minematsu, K. Niwa, M. Katsuhara, K. Fukatsu, H. Miyazaki, T. Ebara, M. Kamijima, Quantitative analysis of organophosphate pesticides and dialkyl phosphates in duplicate diet samples to identify potential sources of measured urinary dialkyl phosphates in Japanese women, *Environ. Pollut.* 298 (2022), 118799, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118799>.
- [84] A. Wongta, N. Sawang, P. Tongjai, M. Jatiket, S. Hongsihsong, The assessment of organophosphate pesticide exposure among school children in four regions of Thailand: analysis of dialkyl phosphate metabolites in students' urine and organophosphate pesticide residues in vegetables for school lunch, *Toxics* 10 (2022), <https://doi.org/10.3390/toxics10080434>.