

Efecto del diazinón sobre el cultivo de linfocitos de sangre periférica de humano

Diazinon effect on cultivated lymphocytes from human peripheral blood

YUREN CASTILLO-SOSA¹, ANÍBAL SIERRA-FONSECA¹, ALEJANDRO MARTÍNEZ-MARTÍNEZ¹ Y FERNANDO PLENGE-TELLECHEA^{1,2}

Recibido: Mayo 13, 2009

Aceptado: Julio 17, 2009

Resumen

Se evaluó el efecto del plaguicida organofosforado diazinón sobre el cultivo de linfocitos de sangre periférica humana. Este plaguicida se utiliza para el control de plagas de insectos y como acaricida. Las aplicaciones se hicieron con dos presentaciones distintas: una comercial de uso común, denominado Knox Out® y otra presentación de grado analítico de estándar. Para la obtención de células se empleó el método de sedimentación de eritrocitos. Los linfocitos aislados se incubaron en medio de cultivo por 24, 48 y 72 h, y fueron expuestos a diferentes concentraciones de diazinón (μM -mM). Los diferentes tratamientos se realizaron en ausencia o presencia del mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Se realizó un primer set de barridos de diazinón sin PHA utilizando un amplio margen de concentraciones de 0.1 a 1 mM y un segundo set de experimentos con concentraciones de 5 μM hasta un máximo de 50 μM , en ausencia y presencia de PHA. Los resultados del primer set no mostraron efectos totalmente letales sobre los linfocitos visiblemente expuestos al microscopio. Las concentraciones del set de entre 5 y 50 μM fueron las que presentaron un mayor efecto sobre los linfocitos, disminuyendo el número de células viables o estimulando la proliferación sobre el control. Este resultado no se observó con diazinón comercial y PHA, donde sólo disminuyó el número de células viables. Se visualizaron, de forma ocasional, células con indicios de necrosis y apoptosis en los cultivos expuestos al diazinón.

Palabras Clave: Plaguicida organofosforado, linfocitos, sangre, cultivos.

Abstract

The effect of diazinon, an organophosphate pesticide used to control pests such as acarine and insects, was evaluated in cultured human peripheral blood lymphocytes. Two diazinon presentations were used: commercially available diazinon (Knox Out®, Mexico) and an analytical grade standard. The lymphocytes cellular pellet was obtained by the erythrocyte sedimentation method to obtain the mononuclear cells suspended in plasma. The lymphocytes were incubated in culture medium for 24, 48 and 72 h, in absence and presence of different diazinon concentrations (μM -mM). These treatments were in absence and presence of mitogen phytohemagglutinin (PHA). An initial study was carried out with a broad range of diazinon concentrations (0.1-1 mM) without PHA and since high concentration showed no effect, a second set of experiments was repeated using concentrations ranging from 5 until 50 μM of both pure and commercial diazinon, in the absence or presence of PHA. No significant effects were detected for the concentrations between 0.1 and 1 mM. Concentrations of 5 to 50 μM drastically caused reduction of cell viability or stimulated lymphocyte proliferation over control. Nevertheless, this effect was not observed in the presence of diazinon and PHA, only a decrease the quantity of viable cells was observed. Additionally, necrotic and apoptotic cells were visualized in cultures exposed to diazinon.

Keywords: Organophosphate pesticide, lymphocyte, cell culture.

¹ Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Henry Dunant 4016, Zona Pronaf. Cd. Juárez, Chih. México, C. P. 32310.

² Dirección electrónica del autor de correspondencia: fplenge@uacj.mx

Introducción

Los organofosforados son plaguicidas sintéticos formados por un átomo de fósforo unido a cuatro de oxígeno, y en algunos casos a tres de oxígeno y uno de azufre, es decir, los organofosforados son ésteres orgánicos del ácido fosfórico y estos actúan inhibiendo enzimas de tipo esterasas.

Esto es debido a que una de las uniones fosfato-oxígeno es de tipo inestable, lo que favorece la unión con estas últimas, logrando que la hidrólisis de los neurotransmisores, específicamente la acetilcolina y la butirilcolina, sea interrumpida. El principal blanco de los organofosforados son las colinesterasas (acetilcolinesterasas), dañando así el sistema nervioso y el hepático haciendo que el sustrato de estas enzimas se acumule y produzca diferentes síntomas al individuo expuesto. Es por esto que son utilizados como plaguicidas agrícolas, por ser altamente efectivos contra los insectos que atacan los cultivos en todo el mundo.

El diazinón o *Tiofosfato de o,o-dietilo y de o-2-isopropil-6-metilpirimidin-4-ilo*, es de textura oleosa, incolora e inodora y es uno de los organofosforados más usados en la actualidad. En 1983, el uso del diazinón en Estados Unidos era aproximadamente 1,180 t (Howard, 1991), en 1990, se utilizaron 4,670 (Larkin y Tjeerdema, 2000), casi un 400 % de aumento de consumo del producto. En la actualidad existen varios reportes sobre los efectos del diazinón sobre el sistema nervioso, al unirse con la acetilcolinesterasa (Korsak y Sato, 1977; Singh y Drewes, 1987; Sultatos, 1994; Stephens *et al.*, 1995; Prendergast *et al.*, 1997; Socko *et al.*, 1999), sin embargo, existe poca información que reporten los efectos genotóxicos del diazinón.

En 1988, la Organización Mundial de la Salud (OMS), reportó al diazinón como «sin evidencia de potencial mutagénico». En contraparte, Bianchi-Santamaría (1997) encontró que la exposición al diazinón favorece la formación de micronúcleos en células sanguíneas de humano, así como un aumento en el intercambio de cromátidas hermanas

(López y Carrascal, 1987; Sobti *et al.*, 1982). De acuerdo con Roldán y Sánchez (2004) el envenenamiento por plaguicidas inhibidores de colinesterasas, como organofosforados y carbamatos, es muy común entre los agricultores, sobre todo en países en vías de desarrollo. El uso del diazinón no solo se encuentra limitado como insecticida en cultivos, sino también para desparasitar ganado (principalmente bovino) y para evitar que el ganado sea mordido por ácaros e insectos dañinos, los cuales son vectores de enfermedades (Wester *et al.*, 1993; Maldonado *et al.*, 2003).

Los estudios hechos con diazinón como inhibidor de enzimas del sistema nervioso, específicamente la acetilcolinesterasa, demuestran que presenta un riesgo para la salud debido a su inhibición irreversible, pudiendo causar incluso la muerte de personas expuestas (Davies y Holub, 1980; Gallo y Lawryk, 1991). Existe evidencia de que el diazinón no solo ejerce efectos anticolinérgicos, sino también sobre otros blancos como la síntesis de proteínas (Marinovich *et al.*, 1996).

Se ha sugerido que puede afectar la síntesis de ADN en células gliales y neuronas en cultivos celulares (Qiao *et al.*, 2001). Flaskos *et al.* (2006) demostraron que el diazinón tiene blancos específicos en el desarrollo de las neuritas en células gliales y neuronas. Este efecto se ve asociado a la disrupción de proteínas citoesqueléticas de axones. Por tanto, la acción de diazinón no solo es sobre la actividad colinesterasa. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto nocivo de diazinón en un sistema *in vitro* de linfocitos en cultivo, y observar los efectos causados sobre la viabilidad de las células.

Materiales y métodos

Las células mononucleadas se aislaron de sangre periférica de hombres adultos, aparentemente saludables, entre 22 y 24 años de edad. Los sujetos no fumaban y no consumían a menudo bebidas alcohólicas. La sangre se obtuvo por medio de venopunción con tubos BD Vacutainer® de 6 ml heparinizados (NJ, USA), extrayendo un total de 12 ml de sangre de la parte interior del codo de cada donador. Las células nucleadas se aislaron mediante la metodología descrita por Verma y Babu (1995), en la cual las células se separan por medio de sedimentación durante un tiempo aproximado de 40 min a una inclinación de 45° para facilitar la separación. El plasma rico en linfocitos que corresponde a la fase superior (aproximadamente 3 ml) se transfirió a tubos tipo Falcón de 15 ml estériles donde se lavaron por centrifugación a 5,000 rpm con otra parte igual de solución amortiguadora de fosfatos PBS (Na₂HPO₄ 4.3 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM y KH₂PO₄ 1.4 mM a un pH de 7.4 en agua inyectable) con el fin de eliminar los componentes plasmáticos.

Los cultivos se realizaron resuspendiendo las células aisladas en 1 ml de medio Mc Coy 5A modificado, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (In Vitro, S.A., México) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina), determinando la viabilidad por medio de la cámara de Neubauer o Hemocitómetro, usando el método de exclusión del azul tripano (Kaltenbach, 1958). Para ello se mezclaron 50 µl de la solución de células con 50 µl del colorante azul tripano (0.4 % (p/v) y NaCl al 0.85 % (p/v)). Los linfocitos no se dividen bajo condiciones normales de cultivo, requiere la presencia de un mitógeno en el medio para lograr la proliferación celular. La fitohemaglutinina (PHA) es una lectina obtenida del frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*) que estimula la proliferación de linfocitos T. En este caso, se llevó a cabo un set de experimentos sin PHA y otro con PHA en control y con plaguicida. Se agregó al medio a una

concentración final de 5 µg/ml. Por último, los tubos se inocularon a una densidad celular de 1X10⁶ células viables/ml (equivalente 1.0e+6 base e). Los tubos se agitaron suavemente con la mano durante 2 s para mezclar bien los componentes; se incubaron y monitorearon cada 24, 48 y 72 h a 37 °C en una incubadora de CO₂ (Fisher Scientific) con ambiente de 30 % de humedad y contenido de 5 a 6 % de CO₂. Los tubos se colocaron en posición inclinada en la incubadora, esto con el fin de mejorar el intercambio gaseoso y proveer las condiciones óptimas para el crecimiento celular. Los linfocitos únicamente se dividen un par de veces tras la estimulación con PHA, por lo que estas células no se subcultivaron.

El número de células viables, células totales y porcentaje de viabilidad, se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula descrita por Freshney (2000):

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células viables/ml} = \text{N}^{\circ} \text{ de células vivas contadas} \times 10,000 \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células totales/ml} = (\text{N}^{\circ} \text{ de células vivas contadas} + \text{N}^{\circ} \text{ de células muertas contadas}) \times 10,000 \times \text{factor de dilución}$$

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{N}^{\circ} \text{ de células viables} / \text{N}^{\circ} \text{ de células totales}) \times 100$$

Donde el número de células se multiplica por 10,000 dado que el volumen que corresponde a la región contada en el hemocitómetro corresponde a 0.1 cm³. La visualización se realizó utilizando un microscopio de contraste de fases (Leica modelo DME, USA) y objetivo 40X. Sólo se utilizó el objetivo de 100X para fotografías de células con indicios de necrosis u apoptosis. Estas fueron tomadas utilizando una cámara digital (Olympus Sp 510 UZ, 7.1 mp).

Posteriormente, el efecto del plaguicida se evaluó de dos formas: plaguicida comercial de nombre KnoxOut® 2FM (México) a una concentración de 2 lb/galón (p/v), siendo

el diazinón el ingrediente activo (23 %) y en forma de diazinón grado analítico al 99 % de pureza (Sigma, USA) y disuelto en agua desionizada. Además se monitorearon los efectos del diazinón en medio de cultivo en presencia del mitógeno fitohematoglutina (PHA) (Sigma, USA). Con el fin de conocer en general los efectos de las dos formas de diazinón utilizadas, se realizaron cultivos independientes teniendo intervalos de concentración entre 0.1 y 1 mM. De acuerdo a estos resultados preliminares, se seleccionó para el resto de experimentos el intervalo de entre 5 y 50 μ M en ausencia o presencia de PHA.

Los resultados obtenidos de al menos tres repeticiones de cultivos diferentes se analizaron y graficaron en el programa Sigma Plot® 8.0. Se obtuvieron las medias de cada tratamiento, la desviación estándar y se determinó el error estándar.

Resultados

La exposición de ambas presentaciones del diazinón puro o comercial sobre células mononucleadas causó efectos diferentes sobre la viabilidad celular a través del tiempo de incubación, es decir, sobre el grado de resistencia a la muerte durante el tiempo y por la exposición al diazinón. Estos efectos observados en diferentes concentraciones del diazinón consistieron básicamente en tres aspectos sobre la viabilidad celular: una permanencia de células viables, la proliferación de viables en cultivo y otro donde el número de viables, disminuye por su muerte. Como experimento inicial del trabajo sometimos a las células al diazinón comercial Knox Out en un margen de concentración del plaguicida de entre 0.1 a 1 mM con el fin de observar su efecto de forma general (Figura 1). Respecto a los tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 h) a las 24 y 48 h, el número de células viables disminuyó en la mayoría de las diferentes concentraciones de plaguicida utilizadas, sin

alcanzar completamente la letalidad, exceptuando las concentraciones de 0.5 (∇) y 0.750 (\blacksquare) mM que no produjeron ningún cambio de importancia sobre la viabilidad a las 24 h de incubación. Las concentraciones de 0.1 (\circ) y 0.250 (\blacktriangledown) mM disminuyeron la viabilidad de forma moderada a intermedia con valores cercanos a 50 % respecto de su control proliferativo, es decir, aproximadamente entre 8.0×10^5 y 6.0×10^5 células/ml. La concentración de 1 mM (\square) es la que produjo una disminución considerable sobre la viabilidad, situándose entre 6.0×10^5 y 4.0×10^5 células viables/ml en ambas incubaciones de 24 y 48 h. Los cultivos de 72 h, indistintamente de la concentración del plaguicida, fueron más afectados en la viabilidad de los linfocitos incluyendo a su control (\bullet), observándose una mayor disminución de células viables respecto del inóculo inicial del cultivo (1.0×10^6 células/ml), prácticamente en más de 50 %, situado entre valores de 6.0×10^5 y 2.0×10^5 células viables/ml. Cabe señalar que las concentraciones entre 0.250 a 0.750 mM del plaguicida mantuvieron una viabilidad mayor que su control.

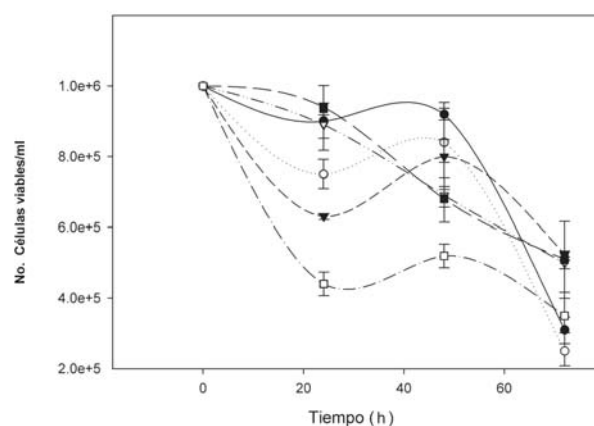


Figura 1. Barrido del diazinón comercial Knox Out de 0-1 mM sobre linfocitos en cultivo frente al tiempo en h con el objetivo de identificar las concentraciones de mayor afección de los linfocitos, donde (\bullet) representa el control, (\circ) 0.100, (\blacktriangledown) 0.250, (∇) 0.500, (\blacksquare) 0.750 y (\square) 1 mM. El número de células viables/ml se expresa en base e.

De acuerdo con los datos de la gráfica anterior, en la mayoría de tratamientos se pueden apreciar disminuciones en el número de células respecto de su control en diferentes tiempos de incubación; se llevó a cabo un segundo set de experimentos, utilizando concentraciones de margen mucho menor, entre 5 y 30 μM de diazinón Knox Out, basados en la disminución de la viabilidad de células a las concentraciones más bajas, de 0.1 y 0.250 mM, con el objetivo de encontrar con mayor detalle efectos distintos sobre la viabilidad de las células expuestas al plaguicida en tiempo y concentración. Los resultados se muestran en la Figura 2. A las 24 h de incubación, 5 μM de Knox Out (\circ) causaron que la viabilidad celular se mantuviera muy por encima de su control (6.0×10^5 células/ml), pero por debajo del inóculo inicial, sin embargo, a las 48 h se mantuvo muy poco por encima de su control, incluso las barras de error se sobrepone.

El resto de las concentraciones ensayadas a este tiempo sí mostraron disminuciones en su viabilidad, entre 6.0×10^5 hasta 2.0×10^5 , como es el caso de 30 μM (\blacksquare), que disminuyó su viabilidad a este último valor de 2.0×10^5 . Los tiempos de incubación de 48 y 72 h, mostraron una tendencia a la disminución progresiva conforme al aumento del tiempo y del plaguicida. El número de células viables/ml descendió por debajo de sus controles y del inóculo inicial, sobre todo a las 72 h, donde prácticamente todas las concentraciones de plaguicida se situaron alrededor o por debajo de 2.0×10^5 células viables/ml, excepto los controles sin plaguicida que se situaron por encima de 4.0×10^5 células/ml.

Estas mismas condiciones se repitieron en presencia del mitógeno fitohematoglutina (PHA). Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencias importantes con respecto a la evaluación con Knox Out sin PHA, excepto por el hecho de que el número de células con 5 μM de plaguicida no fue mayor al número de células de los cultivos control (datos no mostrados).

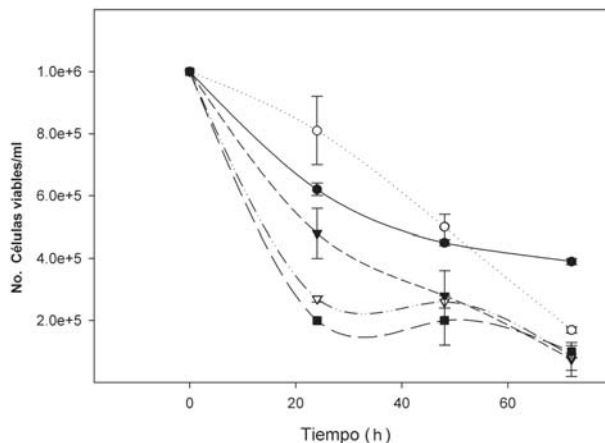


Figura 2. Cultivos de linfocitos en barrido de diazinón comercial Knox Out a concentraciones más bajas (5-30 μM) respecto de las utilizadas en la Figura 1 sobre linfocitos en cultivo frente al tiempo en h. Donde (\bullet) es el control, (\circ) 5, (\blacktriangledown) 10, (\blacktriangledown) 15, y (\blacksquare) 30 μM del plaguicida. En el eje de las abscisas se expresa en número de células viables/ml.

La Figura 3 muestra la evaluación del efecto del diazinón grado analítico de estándar a una concentración de 5-50 μM . Se observó que al tiempo de incubación de 24 h, las concentraciones de 10, 15 y 30 μM sí presentaron valores de viabilidad alrededor del inóculo inicial (1.0×10^6 células/ml), sin embargo, las concentraciones de 5 (\circ) y 50 μM (\square) produjeron una disminución del número de células viables/ml respecto a su control, que se sitúa en aproximadamente 8.0×10^5 células/ml, principalmente 50 μM con alrededor de 6.0×10^5 células/ml. A las 48 y 72 h las células sin plaguicida tendieron a disminuir, pero se mantuvieron en valores cercanos a 6.0×10^5 células/ml. A las 48 h de incubación 5 y 10 μM de diazinón mantuvieron valores de viabilidad cercanos a su control, el resto de concentraciones tuvieron valores de disminución del número de células viables/ml entre 6.0×10^5 y 4.0×10^5 células/ml, sobre todo 50 μM de diazinón que rebasó estos límites. A las 72 h de incubación prácticamente se observó una disminución generalizada de la

viabilidad celular, excepto 5 y 15 μM , que se mantuvieron alrededor del control. Los valores de viabilidad mayor a menor se situaron entre $6.0\text{e}+5$ y $2.0\text{e}+5$ células viables/ml.

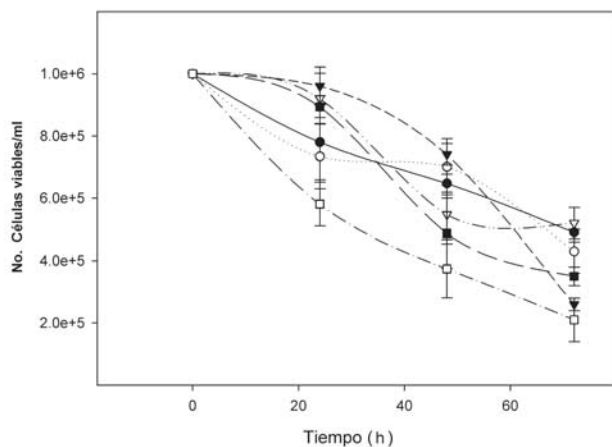


Figura 3. Exposición de diazinón puro en grado estándar en barrido sobre los cultivos de linfocitos a las concentraciones de entre 5-50 μM , donde (●) es el control, (○) 5, (▼) 10, (▽) 15, (■) 30 y (□) 50 μM del plaguicida.

En el siguiente experimento se repitieron las anteriores condiciones con diazinón puro incluyendo de PHA en los medios (Figura 4). Los controles proliferativos de los tiempos de 24, 48 y 72 h (●) se situaron en niveles más elevados de células/ml que en experimentos anteriores debido a la estimulación causada por el mitógeno PHA. Los dos primeros tiempos tuvieron valores de $1.5\text{e}+6$ células/ml, mientras que a las 72 h se obtuvo un valor más elevado de alrededor de $1.7\text{e}+6$ células/ml. A las 24 h las células tratadas con diferentes concentraciones de diazinón tuvieron un aumento de la proliferación, sobre todo la concentración de 5 μM (○) alcanzando un umbral que sobrepasó las $2.0\text{e}+6$ células viables/ml. Sólo la concentración de 15 μM (▽) se situó ligeramente por debajo del control (●). Esta tendencia comenzó a disminuir a las 48 h, y a situarse por debajo del control de 72 h. Dentro del análisis microscópico de las células en cultivo, se pudo apreciar que algunas de ellas

tenían indicios de muerte por necrosis y apoptosis (Figura 5).

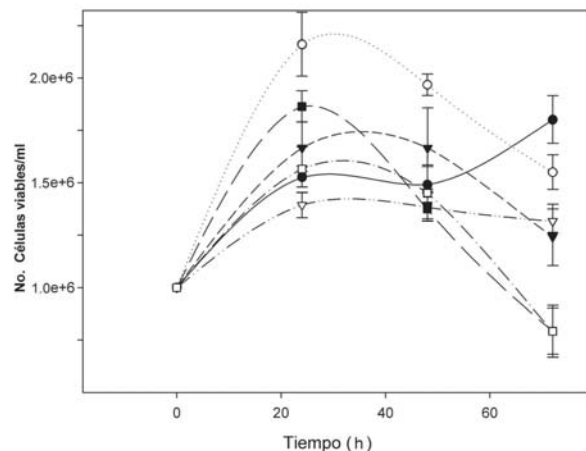


Figura 4. Efecto del diazinón grado analítico de estándar en barrido y el agente mitógeno PHA sobre la viabilidad de linfocitos de sangre periférica de humano frente al tiempo en h, donde (●) es el control, (○) 5, (▼) 10, (▽) 15, (■) 30 y (□) 50 μM del plaguicida.

La distribución y aparición de estas células no fue regular, encontrándose principalmente en cultivos expuestos con diazinón Knox Out y con diazinón puro en presencia de PHA. Este tipo de daños no fue muy frecuente, por ello, no se reportó un número significativo dentro de los conteos.

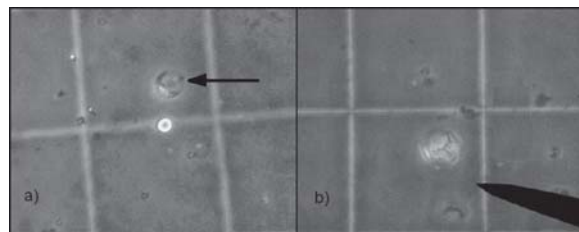


Figura 5. Fotografía de la imagen de linfocitos tratados con diazinón puro en grado estándar durante 24 h, vistos con el objetivo 100X, en un microscopio óptico de contraste de fases (Leica, USA), donde a) muestra una célula con rasgos típicos de muerte por necrosis y b) célula con rasgos de muerte por apoptosis.

Discusiones

Los resultados de los experimentos obtenidos con las presentaciones de diazinón puro y comercial Knox Out, mostraron un comportamiento distinto respecto a sus controles. En el caso de las células tratadas con ambas presentaciones de diazinón de forma individual como en presencia de PHA, mostraron con el paso del tiempo un comportamiento natural, ya que a las 72 h disminuyó el número total de células. Sin embargo, las tendencias observadas en las curvas obtenidas del número de células fueron diferentes a las obtenidas en los controles, aumentando o disminuyendo su viabilidad.

El efecto obtenido entre el diazinón puro y el comercial Knox Out fue distinto a pesar de que el compuesto activo es el mismo, esto debido tal vez a que los disolventes del diazinón comercial son los que afectaron en cierta medida las células tratadas. El disolvente utilizado para el Knox Out es desconocido por motivo de patente del producto, no obstante conocemos que su concentración es 23 %. Las estimulaciones de la división celular inducidas por el diazinón puro en presencia de PHA (Figura 4), así como en el caso de la concentración de 5 μM de Knox Out (Figura 2) donde se encontraron el mayor número de células respecto de sus controles (no del inóculo inicial), no han sido previamente reportadas. Cabe destacar en este segundo caso, que dada la ausencia de PHA, se trate de una resistencia a la muerte más que de una proliferación, ya que la concentración de 5 μM no supera en número de células al inóculo inicial (Figura 2).

Por lo anterior, se puede pensar que la interacción del plaguicida se da en dos formas distintas: a) que las células a esta concentración se ven protegidas por algún mecanismo aún desconocido, b) el diazinón estimula la división celular a esta concentración, y por ello se encuentra una mayor cantidad de células con respecto a los controles, es decir, que esté actuando como un agente mitógeno. Los efectos del diazinón sobre la proliferación

celular solo han sido determinados en un trabajo, el cual fue realizado por Paraoanu *et al.* (2005) en el que determinaron que el diazinón disminuye el crecimiento celular en células retinales de gallina, siendo la concentración de 80 μM la más dañina para las células. Se ha demostrado que los organofosforados tienen efectos sobre la viabilidad y la proliferación en células gliales cuando se han manejado concentraciones micromolares (Guizzetti *et al.*, 2005; Caughlan *et al.*, 2004; Qiao *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 1999). Estudios *in vivo* apoyan el hecho de que los organofosforados disminuyen el número de células. El trabajo de García *et al.* (2002) demostró que la exposición a diferentes dosis de clorpirifos disminuyó la expresión de marcadores de proteínas en astrocitos. Roy *et al.* (2004) determinaron una disminución en las células gliales cuando fueron expuestas al clorpirifos.

Otros trabajos demuestran que el diazinón interactúa no solo en la inhibición de las acetilcolinesterasas, sino posiblemente sobre otras proteínas que participan en el desarrollo (Flaskos *et al.*, 2006; Axelrad *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 1999). Con respecto a los resultados obtenidos, el diazinón puede tener efectos sobre proteínas específicas, sobre todo las involucradas en los procesos celulares de división e incluso proteínas involucradas en procesos de muerte celular. Asimismo, los organofosforados, incluyendo al diazinón, pueden inducir la apoptosis y necrosis celular en linfocitos de sangre periférica de humano y tejidos linfáticos (Das *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2002) así como en tejidos neurales humanos (Abou-Donia, 2003; Kim *et al.*, 1999) al igual que necrosis en células embrionarias de la retina del pez *Oryzias latipes* (Hamm *et al.*, 1998) en células de la retina de gallina (Paraoanu *et al.*, 2005) y en neuronas corticales primarias de rata (Caughlan *et al.*, 2004). Sin embargo, la aparición de células muertas por necrosis y apoptosis no puede ser directamente atribuida a la presencia del diazinón, ya que como lo describen Song *et al.* (2002), la

presencia de eritrocitos en los cultivos de linfocitos inducen la expresión del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α por sus siglas en inglés). De igual forma, ellos mencionan que las células mononucleadas de sangre periférica de humano, estimuladas con el mitógeno PHA presentan niveles más altos de INF-gamma y TNF- α . Es importante mencionar que en los controles manejados en presencia y ausencia de PHA, no se encontraron células con necrosis o apoptosis, aunque esto no significa que no hubiese células con estas características, sin embargo, estas morfologías solo fueron encontradas en presencia del plaguicida.

En este trabajo las células muertas por apoptosis y necrosis se encontraron principalmente en los cultivos expuestos al Knox Out, en cultivos en presencia de Knox Out/PHA y en menor cantidad en los cultivos con diazinón puro no comercial. Por tanto, los efectos necróticos en cultivos se pudieran atribuir a compuestos en los que se encuentra disuelto el diazinón en el plaguicida comercial Knox Out, la presencia de PHA, tal como ha sido propuesto por Song *et al.* (2002) y en menor medida al diazinón de la muestra compuesta. Pese al hecho de no encontrar con frecuencia células con necrosis u apoptosis en el análisis microscópico realizado sobre los cultivos expuestos al diazinón grado analítico de estándar, no se descarta la posibilidad de que el diazinón cause necrosis u apoptosis, ya que se encontraron indicios en ambas presentaciones. El estudio realizado por Das *et al.* (2006) sobre linfocitos humanos usando cuatro organofosforados distintos (Monocotrofos, profenofos, clorpirifos y acefato) demostró que estos inducen tanto necrosis como apoptosis, por lo que no se debe descartar que las células encontradas con indicios de apoptosis y necrosis en la observación microscópica, en realidad haya sido por efecto del diazinón.

Conclusiones

Las concentraciones de diazinón comercial en el intervalo de 0.1 a 1 mM, evidenciaron que en su mayoría causaron la disminución del número de células viables/ml con respecto a los controles manejados, principalmente a las 48 y 72 h de incubación.

Cinco μ M de diazinón comercial produjeron un aumento de la viabilidad celular a las 24 h de incubación, pero por debajo del inóculo inicial y la viabilidad se mantuvo similar al control de 48 h. El resto de concentraciones de diazinón utilizadas en los diferentes tiempos de incubación, causaron la disminución del número de células viables.

El diazinón de grado analítico de estándar produjo un aumento de la viabilidad con varias concentraciones ensayadas, principalmente a las 24 h de incubación, en comparación con la versión comercial del plaguicida. El perfil de las curvas de viabilidad a las diferentes concentraciones y tiempos de incubación fue distinto a los tratados con la presentación comercial.

Los cultivos con diazinón de grado analítico de estándar con PHA, presentaron un aumento considerable sobre el número de células viables, principalmente a las concentraciones menores, rebasando considerablemente al inóculo inicial.

Ambas presentaciones de diazinón, grado comercial y grado analítico de estándar, produjeron efectos sobre la viabilidad celular, ya sea aumentando o disminuyendo el número de células mononucleadas en cultivo. El tiempo de exposición y la concentración fueron un factor determinante en los efectos observados, exceptuando el daño por necrosis u apoptosis.

Agradecimientos

Al Departamento de Ciencias Básicas del Instituto de Ciencias Biomédicas por las aportaciones en especie y en equipo para la realización de este proyecto. Al profesor de genética, Guillermo Bojórquez Rangel, del

Programa de Biología del mismo, por su valiosa contribución. A la Dra. Laura De la Rosa y a los árbitros por su valiosa crítica. Parte de este trabajo fue financiado por los fondos del proyecto CONACyT FOMIX CHIH-2006-CO1-57268 y Fondo para Consolidación de Cuerpos Académicos del Promep (DGPDI).

Literatura citada

- ABOU-DONIA, M. B. 2003. Organophosphorous-ester-induced chronic neurotoxicity, *Arch. Environ. Health* 58: 484-497.
- AXELRAD, J. C., Howard, C. V. and McLean, W. G. 2003. The effects of acute pesticide exposure on neuroblastoma cells chronically exposed to diazinon. *Toxicology*. 14: (1-2): 67-78.
- BIANCHI-SANTAMARIA. 1997. Human lymphocyte micronucleus genotoxicity test with mixtures of phytochemicals in environmental concentrations. *Mut. Res.* 388: 27-32.
- CAO, C. J., R. J. Mioduszewski., D. E. Menking., J. J. Valdes., E. J. Katz., Eldefrawi, M. E. and A. T. Eldefrawi. (1999). Cytotoxicity of organophosphate anticholinesterases. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35(9):493-500.
- CAUGHLAN, A., K. Newhouse., U. Namgung and Z. Xia. 2004. Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases. *Toxicol Sci.* 78:125-134.
- DAS, T., A. Bardossy, and E. Zehe. 2006. Influence of spatial variability of precipitation in a distributed rainfall-runoff model. *IAHS-AISH Publ.* 303:195-203.
- DAVIES, D. B. and B. J. Holub. 1980. Toxicological evaluation of dietary diazinon in the rat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* (9): 637-650.
- FLASKOS, J., W. Harris., M. Sachana., D. Muñoz., J. Tack and A. J. Hargreaves. 2006. The effects of diazinon and cypermethrin on the differentiation of neuronal and glial cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 219(2-3):172-180
- FRESHNEY, R. I. 2000. Culture of cells. A manual of basic technique. 4th. Edition. Wiley-Liss Inc. USA. 486 p.
- GALLO, M. A. and N. J. Lawryk. 1991. Organic phosphorus pesticides. En: Hayes WJ, Laws ER, editores. Handbook of pesticide toxicology. *San Diego: Academic Press* 917: 1-123.
- GARCIA, S. J., F. J. Seidler, D. Qiao and T. A. Slotkin. 2002. Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein. *Brain Res Dev Brain Res.*133(2):151-161.
- GUIZZETTI, M., S. Pathak and G. Giordano. 2005. Effect of organophosphorus insecticides and their metabolites on astroglial cell proliferation. *Toxicology*: 215(3):182-190.
- HAMM, J. T., B. W. Wilson and D. E. Hinton. 1998: Organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition and embryonic retinal cell necrosis in vivo in the teleost (*Oryzias latipes*). *Neurotoxicology* 19: 853-870
- HOWARD, P. H. 1991. Pesticides, En vol. 3 of Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals: Chelsea, Mich., Lewis Publishers. 684 p.
- JOHN A. R. 2003. Introduction to Animal Cell Culture Technical Bulletin. Corning Incorporated Printed in USA 8/03 KP 5M CLS-AN-042.
- KALTENBACH, J. P. 1958. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp. Cell Res.* (15): 12-17.
- KIM, J. S., S. C. Koh., S. K. Lee, and T. S. Chon. 1999. Regulation of acetylcholine esterase and neurotransmitters in *Oryzias latipes* by diazinon, *Kor. J. Environ. Toxicol.* 14: 81-85.
- KORSACK, R. J. and M. M. Sato. 1977. Effects of chronic organophosphate pesticide exposure on the central nervous system. *Clinical Toxicol.* (11): 83-95.
- LARKIN, D. J. and R. S. Tjeerdema. 2000. Fate and effects of Diazinon. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* (166): 49.
- LOPEZ, D. E. and E. Carrascal. 1987. Sensitivity of human lymphocyte chromosome to diazinon at different times during cell culture. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (38):125-130.
- MALDONADO, S., E. J. Cadena, H. Sumano, A. Martinez and L. Bermudez. 2003. Evaluation of Diazinon and ivermectin efficacy for the control of horn-fly (*Haematobia irritans*) on grazing cattle in Tuxpan, Veracruz, Mexico. *Vet. Mex.* 34: 3.
- MARINOVICH, M., F. Ghilardi and C. Galli. 1996. Effect of pesticide mixtures on in vitro nervous cells: Comparison with single pesticides. *Toxicology* (108): 201-206.
- PARAONU, L. E., M. Becker-Roeck., E. Christ and P. G. Layer. 2005. Expression patterns of neurexin-1 and neuroligins in brain and retina of the chick embryo: Neuroligin-3 is absent in retina. *Neurosci. Lett.* 395 (2):114-117.
- PRENDERGAST, M. A., A. V. Terry and J. J. Buccafuso. 1997. Chronic, low-level exposure to diisopropylfluorophosphate causes protracted impairment of spatial navigation learning. *Psychopharmacology* 129:183-191
- QIAO, D., F. J. Seidler and T. A. Slotkin. 2001. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled in vitro: comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells. *Environ. Health Perspect.* 10: 909-913.
- RICHARDS, P., M. Johnson., D. E. Ray and C. Walker. 1999. Novel targets for organophosphorous compounds. *Chem. Biol. Interact.* 119-120: 503-511.
- ROLDÁN, L. and F. Sánchez. 2004. Santed Neuropsychological sequelae of acute poisoning by pesticides containing cholinesterase inhibitors. *Rev. Neurol.* 38 (6): 591-597.
- ROY, P., H. Salminen., P. Koskimies., J. Simola., A. Smeds., P. Saukko and I. T. Huhtaniemi. 2004 Screening of some anti-androgenic endocrine disruptors using a recombinant cell-based in vitro bioassay. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 88:157-166.
- SINGH, A. K. and L. R. Drewes. 1987. Neurotoxic effects of low-level chronic acephate exposure in rats. *Environ. Res.* 43(2):342-349.
- SOBTI, R. C., A. Krishan and C. D. Pfaffenberger. 1982. Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells in vitro: organophosphates. *Mut. Res.* 102:89-102.
- SOCKO, R., S. Gralewicz and R. Górny. 1999. Long-term behavioural effects of a repeated exposure to chlorphenvinphos in rats. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 12(2):105-17.
- SONG, Y. F., S. Jing., S. Fleischmann and B. M. Wilke. 2002. Comparative study of extraction methods for determination of PAHs from contaminated soils and sediments. *Chemosphere* 4: 993-1001.
- STEPHENS, R., A. Spurgeon., I. A. Calvert., J. Beach., L. S. Levy., H. Berry. 1995. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. *Lancet* 315: 1135-1139.

SULTATOS, L. G. 1994. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health* 43(3): 271-289.

VERMA, R. S. and A. Babu. 1995. Human Chromosomes Principles and Techniques. 2d Edition. McGraw-Hill. USA, Inc., New York. 419 p.

WESTER, R. C., L. Sedik., J. Melendres., F. Logan., H. I. Maibach, and I. Russell. 1993 Percutaneous absorption of diazinon in humans. *Food Chem.Toxicol.* (8):569-572.

Yu, C., P. P. B. Eggermont, and S. Terebey. 1999. Cross Burg entropy maximization and its application to ringing suppression in image reconstruction. *Lage Processing, IEEE Transactions on Volume 8, Issue 2: 286-292.* 

Este artículo es citado así:

Castillo-Sosa Y., A. Sierra-Fonseca, A. Martinez-Martínez y F. Plenge-Tellechea. 2009: *Efecto del diazinón sobre el cultivo de linfocitos de sangre periférica de humano. TECNOCENCIA Chihuahua* 3(2): 97-106.

Resúmenes curriculares de autor y coautores

YURÉN ARMANDO CASTILLO SOSA. En 2007 obtuvo la Licenciatura en Biología en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. El Biólogo Yurén Armando laboró durante dos años en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la UACJ (2003-2004), ha asistido a diversos congresos nacionales e internacionales en el ramo de medio ambiente, bioquímica y salud, entre ellos, el de Fronteras de la Biomedicina en Monterrey, NL., en 2007; de Bioenergética y Biomembranas (SMB) en Pátzcuaro, Mich., en 2003, donde ha expuesto temas relacionados a plaguicidas. Ha participado en cursos de formación continua durante su formación académica. Realizó su tesis en la misma institución y actualmente se encuentra trabajando para una compañía minera canadiense en Mineral de Ocampo, Chih., en estudios de impacto ambiental.

JORGE ANÍBAL SIERRA FONSECA. Se graduó del programa de Licenciatura en Biología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ) en el año 2007. Posteriormente inició sus estudios de maestría en Ciencias Biológicas en la Universidad de Texas en El Paso, Tx, donde después de seis meses fue transferido al programa de doctorado directo en Ciencias Biológicas/Patobiología. Actualmente cursa su segundo año en el programa de doctorado, donde además de desarrollar su proyecto de investigación, también funge como instructor asistente en diversos cursos de licenciatura. Ha asistido a diversos congresos locales, regionales, nacionales e internacionales, donde ha presentado los resultados de diversos proyectos. Actualmente se encuentra estudiando la organización del citoesqueleto y su regulación por proteínas G heterotriméricas en diversos modelos celulares, y sus intereses incluyen las neurociencias, señalización celular y cáncer.

ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ. Tiene una amplia trayectoria en bioquímica y neurociencias. En 1991 obtuvo la licenciatura en Biología en la Universidad de Guadalajara (UDG). Obtuvo el grado de Maestría en Neuroquímica en el Departamento de Química de la UNAM, en 1994. En 1997 culminó sus estudios de Doctorado en Biología en la Universidad de Murcia, España. Realizó varias estancias académicas de posgrado, entre las que destacan su postdoctorado en la Universidad de California en San Diego, con una beca de la fundación hispana PEW, culminando en el 2003. El mismo año, ingresó como profesor investigador de tiempo completo a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Cuenta con múltiples publicaciones y capítulos de libro, así como dirección individual de tesis de pregrado y de grado. Imparte cátedra de ingeniería genética en el programa de química y bioinformática en la Maestría en Ciencias con orientación en genómica (PNP).

LUIS FERNANDO PLENGE TELLECHEA. Desde 1990 ingresó como becario interno del laboratorio de reproducción en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California. En 1992 culminó sus estudios de Biología en la misma dependencia. Posteriormente realizó sus estudios de Doctorado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Murcia, culminando en 1998. El Dr. Plenge se ha caracterizado por sus estudios bioquímicos en la rama de proteínas asociadas en membranas. Actualmente labora como profesor investigador de tiempo completo en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Cuenta con múltiples publicaciones y dirección de tesis de pregrado y de grado. Es actual director en jefe de la revista de ciencias, *Ciencia en la Frontera*, e imparte la cátedra de Bioquímica en el programa de Biología y de Estructura y función proteínas en la Maestría en Ciencias con orientación en genómica (PNP).