

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología Marina**

**Estudio de citotoxicidad y genotoxicidad de productos de
reacción de diclorofeno catalizado por lacasa de *Corioloopsis
gallica* en linfocitos humanos**

Tesis

Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro en
Ciencias

Presenta:

Patricia Concepción García Suárez

Ensenada, Baja California, México
2015

Tesis defendida por

Patricia Concepción García Suárez

y aprobada por el siguiente comité:

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes

Dra. María Evarista Arellano García

miembro del comité

Dr. Francisco José Ipinza Fernández - Dávila

miembro del comité

Dr. Marco Antonio De León Nava

miembro del comité

Dr. Alfonso García Weidner

miembro del comité



Dra. Rufina Hernández Martínez

Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara

Director de Estudios de Posgrado

Patricia Concepción García Suárez © 2015

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor

Resumen de la tesis que presenta **Patricia Concepción García Suárez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina

Estudio de citotoxicidad y genotoxicidad de productos de reacción de diclorofeno catalizados por lacasa de *Coriopsis gallica* en linfocitos humanos

Resumen aprobado por:

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes
Director de tesis

La restauración de suelos y efluentes por contaminantes, es una problemática que ha existido en conjunto reportes de daños al medio y a la población en consecuencia al uso de dichos materiales. Estos contaminantes varían de compuestos policíclicos aromáticos, fenoles, organoclorados y organofosforados con aplicaciones en sectores agrónomos, industriales y domésticos y su propiedad de permanecer en el ambiente por largos periodos de tiempo. Este estudio utilizó como modelo al organoclorado diclorofeno, por poseer una amplia gama de características de un compuesto orgánico, ya mencionadas en el punto anterior. En este proyecto se expone el pesticida antes y después del tratamiento de un sistema de biorreactor de lacasa inmovilizada. Se dosificaron a linfocitos periféricos humanos como marcadores de citotoxicidad y daño genotóxico en las concentraciones ambientales por 24 y 48 horas de exposición con la hipótesis de que el tratamiento será menos o no peligroso después de su transformación enzimática.

Los resultados mostraron 35% de descenso en la necrosis celular y un aumento de 30% en la apoptosis de los linfocitos en presencia del pesticida transformado respecto al control sin modificar. El daño genético sigue presente, pero se reduce hasta un 40% en el sistema de diclorofeno transformado con lacasa en comparación con el pesticida sin alterar.

Palabras clave: Bionanotecnología, Biorremediación, Diclorofeno, Lacasa, Toxicidad.

Abstract of the thesis presented by Patricia Concepción García Suárez as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology

Citotoxic and genotoxic study of mixtures of products from dichlorophen catalyzed by laccase of *Coriolopsis gallica* in human lymphocytes

Abstract approved by:

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes
Thesis Director

Restoration of soils and effluents polluting, is a problem that has existed along with the environment and the population damage reports from the use of such materials. These pollutants vary polycyclic aromatic compounds, phenols, organochlorine and organophosphates which have several applications in agronomy, industrial and domestic sectors and the property to remain in the environment for long periods of time. This study was used as a model the organochlorine dichlorophen, by having a wide range of characteristics of an organic compound, as mentioned in the previous point. In this project we expose the pesticide before and after of the treatment of immobilized laccase reactor system on human peripheral lymphocytes as a marker of cytotoxic and genotoxic damage on the environmental concentrations by 24 and 48 hours of exposition and hypothesizing that the treatment will be less or non-dangerous after its enzymatic transformation.

The results shows decreased cell necrosis (35 %) and a 30% of recovery from cell apoptosis in the transformed pesticide compared with the unmodified compound. The genetic damage it is still a deal, but it is minimized up to 40% in the laccase transformation system.

Keywords: Bionanotechnology, Bioremediation, Dichlorophen, Laccase, Toxicity.

Dedicatoria

Dedicado a Norma Alicia y Guillermo Suárez Arce.

Agradecimientos

Al Doctor Sergio Águila por introducirme a este proyecto.

Al financiamiento por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con un UNAM-DGAPA-PAPIIT-IB200613 y CONACyT.

A la Doctora Evarista Arellano por todo su apoyo desde la licenciatura hasta mi tesis de maestría, a Francisco Ipinza por su ayuda y consejos en este proyecto de Tesis, a mis compañeros del laboratorio Bionanotecnología y a cada una de las personas que integran este nuevo departamento.

Tabla de contenido

Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción y motivación	
1.1 Marco Teórico.....	2
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Biorreactor de lacasa de <i>C. gallica</i> y su inmovilización.....	5
2.1.1 Fijación en soportes de espuma de sílice (MSU-F).....	5
2.1.2 Creación del Biorreactor.....	5
2.2 Preparación de cultivos In Vitro/Ex Vivo.....	6
2.2.1 Búsqueda y selección de participantes.....	6
2.2.2 Toma de muestras de sangre	7
2.2.3 Controles sin tratamiento.....	8
2.2.4 Controles de acetonitrilo (ACN).....	8
2.2.5 Dosificación de pesticida sin transformar a linfocitos.....	8
2.2.6 Dosificación de pesticida transformado a linfocitos.....	9
2.3 Microscopía.....	9
2.3.1 Aislamiento de Linfocitos.....	9
2.3.2 Montaje y tinción.....	9
2.3.3 Búsqueda de Marcadores Nucleares.....	10
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Inmovilización de lacasa de <i>C. gallica</i>	12
3.2 Proliferación Celular en Sujetos sanos.....	12
3.3 Controles de acetonitrilo (ACN).....	13
3.3.1 Citotoxicidad del acetonitrilo.....	14
3.3.2 Genotoxicidad del acetonitrilo.....	15
3.4 Citotoxicidad.....	16
3.4.1 Índice de Proliferación Celular.....	16
3.4.2 Apoptosis.....	18
3.4.3 Necrosis.....	19
3.5 Genotoxicidad.....	19
3.5.1 Puentes de Cromatina.....	20
3.5.2 Gemas nucleares.....	21
Capítulo 4. Discusión.....	25
Capítulo 5. Conclusiones.....	29
Capítulo 6. Perspectivas	30

Lista de referencias bibliográficas.....	31
---	-----------

Anexos

A	Hemólisis.....	34
B	Cultivos Microbiológicos.....	35
C	Micronúcleos en células apoptóticas.....	36
D	Imágenes de los tratamientos.....	37
E	Ensayo MTT.....	40

Lista de figura

Figura		Página
1a	Solución fijadora - Metodología.....	9
1b	Centrifugación de células blancas - Metodología.....	9
1c	Centrifugación de células blancas - Metodología.....	9
2	Microscopía de linfocitos humanos.....	12
3	Niveles de proliferación celular en los donadores sanos.....	13
4	Proliferación celular con el control de acetonitrilo al 25% en las células sin tratamiento.....	14
5a	Frecuencia de apoptosis en los cultivos del control de ACN.....	15
5b	Frecuencia de necrosis en los cultivos del control de ACN.....	15
6a	Puentes de cromatina en los cultivos del control de ACN.....	15
6b	Gemas nucleares en los cultivos del control de ACN.....	15
7	Índice mitótico de diclorofeno sin tratamiento y con tratamiento (T).....	17
8	Imagen de células dañadas en la concentración $10 \mu\text{molL}^{-1}$ del pesticida innato.....	18
9	Número de células apoptóticas de diclorofeno sin transformar y transformado (T).....	19
10	Número de células necróticas de diclorofeno sin transformar y transformado (T).....	21
11	Puentes de cromatina de diclorofeno sin transformar y transformado (T).....	22
12	Gemas nucleares de diclorofeno sin transformar y transformado (T).....	23
13	Contraste de citotoxicidad y genotoxicidad entre dosis.....	27
14	Porcentaje hemólisis de diclorofeno sin transformar y transformado (T).....	34

15a	Viales de medio de cultivo celular contaminado (izq.) con pesticida transformado y otro no contaminado (der.) de pesticida nativo.....	35
15b	Imagen de cultivo microbiológico.....	35
16	Microfotografía de bacilo gram positivo (<i>B. subtilis</i>).....	35
17	Micronúcleo en célula binucleada en la concentración $0.1 \mu\text{molL}^{-1}$ del diclorofeno sin el tratamiento enzimático.....	36
18	Micronúcleo en célula binucleada en la concentración $10 \mu\text{molL}^{-1}$ del diclorofeno con el tratamiento enzimático.....	37
19	Imagen de linfocitos expuestos por 24 horas a la concentración mínima ($0.1 \mu\text{molL}^{-1}$) del pesticida nativo.....	37
20	Imagen de linfocitos expuestos por 48 horas a la concentración mínima ($0.1 \mu\text{molL}^{-1}$) del pesticida nativo.....	37
21	Imagen de linfocitos expuestos por 24 horas a la concentración intermedia ($1 \mu\text{molL}^{-1}$) del pesticida nativo.....	38
22	Imagen de linfocitos expuestos por 48 horas a la concentración intermedia ($1 \mu\text{molL}^{-1}$) del pesticida nativo.....	38
23	Imagen de linfocitos expuestos por 24 horas a la concentración máxima ($10 \mu\text{molL}^{-1}$) del pesticida nativo.....	39
24	Imagen de linfocitos expuestos por 48 horas a la concentración máxima ($10 \mu\text{molL}^{-1}$) del pesticida nativo.....	39
25a	Imagen de linfocitos expuestos por 24 horas a la concentración máxima ($10 \mu\text{molL}^{-1}$) del pesticida transformado.....	40
25b	Imagen de linfocitos expuestos por 48 horas a la concentración máxima ($10 \mu\text{molL}^{-1}$) del pesticida transformado.....	40
26	Prueba de viabilidad celular.....	41

Lista de tabla

Tabla		Página
1	Inmovilización de lacasa de <i>C. gallica</i> en soportes MSU-F.....	12
2	Índice de proliferación celular global: Todas las dosis, todos los tiempos de exposición.....	17
3	Apoptosis global: Todas las dosis, todos los tiempos de exposición....	19
4	Necrosis global: Todas las dosis, todos los tiempos de exposición.....	20
5	Puentes de Cromatina: Todas las dosis, todos los tiempos de exposición.....	21
6	Gemas Nucleares: Todas las dosis, todos los tiempos de exposición...	23
7	Hemólisis.....	34

Capítulo 1. Introducción y motivación

El uso de suelos y de pesticidas para prácticas agrícolas se ha incrementado en los últimos 15 años según reporte de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés), los aumentos se estiman en un 13 % para los suelos (447Ha.) y un 1.8 % de pesticida por cada 1 % de suelo tanto en países de alto como de bajo desarrollo (Tschardt et al., 2012). En conjunto a su uso excesivo, los pesticidas pueden causar efectos secundarios mutagénicos en la población humana (Lone, Nazam, Shaikh, & Ahmad, 2013). Estos efectos se clasifican en citotóxicos que es definido como la inhibición de la proliferación celular y efectos genotóxicos que corresponden a la pérdida de material genético y aberraciones cromosómicas (Fenech et al., 2003).

Los pesticidas que han causado un mayor impacto en la salud ambiental son tanto los organofosforados como los organoclorados, ya que estos además de alcanzar su destino en las plantas de producción agrícola, permanecen de manera íntegra en los efluentes de descarga y en suelos por largos periodos de tiempo (Martins, Donato, Prestes, Adaime, & Zanella, 2013). Un organoclorado modelo es el diclorofeno por poseer propiedades antifúngicas, alguicidas, bactericidas y vermícidias (Yamarik *et al.*, 2004), cuyos residuos tienen una permanencia en los suelos y en el ambiente por un tiempo indefinido en estudios con seguimiento de hasta 5 años; esto debido a su propiedad recalcitrante, es decir, no puede ser degradado por factores biológicos y ambientales y su capacidad de acumularse en otros organismos del medio. Según la Red de Acción de Pesticidas de Norteamérica (PANNA, por sus siglas en inglés), afiliada a la Agencia de Protección al Ambiente (EPA), han catalogado al diclorofeno como un agente tóxico y está involucrado en la contaminación de efluentes, la fauna perteneciente a ellos, suelos y en contacto con humanos derivan a una toxicidad existente por reportes de intoxicación (Toxicology Data Network, Reporte 2006). A pesar que no hay registros contundentes, este pesticida es potencialmente carcinogénico (Regulations, Division, & Agency, n.d.) (EPA, 5ta. Edición, 2010) y hasta el año 2012 (registro más actualizado) la agencia de protección al ambiente de Estados Unidos lo considera como una gestión de emergencia.

Los compuestos fenólicos comprenden un grupo de compuestos químicos que van desde su conformación más sencilla, como la estructura del benceno hasta configuraciones más complejas como son los compuestos policíclicos aromáticos sintéticos (PAH's). Estos químicos fomentan el daño celular, dado su estructura aromática y estabilidad, pues son agentes intercalantes del material genético con uniones covalentes al ADN (Pavanello et al., 2013). El uso de biomarcadores en linfocitos humanos ha logrado estandarizar una prueba para verificar la toxicidad de químicos en diversas áreas, tanto para impacto ambiental de agroquímicos (Gentile et al., 2012) como en pruebas de residuos condensados (Kim, Son, Lee, Chung, & Oh, 2012). Los linfocitos humanos, específicamente linfocitos T han sido de gran ayuda en monitorear daños ocupacionales de trabajadores rurales alrededor del globo por impacto y daños a su salud por pesticidas, ya que estos pueden mostrar por microscopía daños a su proliferación y un daño al material genético de las personas. Esta prueba es conocida como el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis (CBMN, por sus siglas en inglés). Los principales marcadores en linfocitos son su índice mitótico que surge a partir de la capacidad de proliferar por medio del estímulo de mitógenos, y la presencia de micronúcleos, puentes de cromatina y gemas nucleares como indicadores de pérdida de material genético a escala macro o a manera de paquetes génicos en las células. Dichas células, al conformar una parte del sistema inmunológico (del 8 al 10% de las células blancas totales) un daño ocasionado a tales puede deteriorar el estado de salud del individuo, ya que tales fungen como mediadores de la inmunidad entre agentes externos del cuerpo y fagocitos.

1.1 Marco Teórico

El diclorofeno es un compuesto organoclorado y bifenólico que a lo largo de los años organizaciones gubernamentales lo han catalogado como agente dañino para el ambiente por su presencia en suelos y efluentes, así como por su escasa o nula degradación ante factores ambientales (Department of the Environment, Australian Government, 1997). Existen registros de que las concentraciones de este pesticida en aguas residuales y suelos son dependientes de las aplicaciones que se manejen en los

cultivos. Es por esto que se ha encontrado concentraciones en efluentes que varían de 10 a 145 ng/L (Escalada et al., 2014). Adicionalmente, existen datos y registros de dermatitis en jornaleros en Estados Unidos y Europa por exposición a pesticidas cuyo principio activo único o principal era el diclorofeno (Toxicology Data Network, NLM). En otro estudio de exposición en personas (n = 465) en Reino Unido cerca de 300 individuos presentaron respuestas de irritación de la piel y sensibilidad solar (Food and Environment Protection Act, 1985). Estudios a principios del año 2004 realizaron pruebas mediante ensayo de mutagenicidad de Ames mediante la exposición en cultivos de *Salmonella*, donde solamente la cepa TA1535 presentó una respuesta positiva a la mutagenicidad (Yamarik et al., 2004). Una década después se realizaron exposiciones de diclorofeno en ratas (*Rattus norvegicus*) aplicándose dosis sub-letales de 66.9 mg, 133.8 mg y 200.7 mg/kg, y se analizaron a través de bloqueo de citocinesis (CBMN) y ruptura de núcleos para analizar la morfología de los cromosomas, cuyos resultados fueron aberraciones cromosómicas y pérdida de material genético, con base en la presencia de micronúcleos, en los eritrocitos y células de la médula ósea de los roedores en las tres dosis (Lone et al., 2013).

En otros ensayos sobre efecto de aguas residuales tratadas en Reino Unido se detectó la presencia de diclorofeno y que este estaba involucrado entre 2 a 19% en la actividad anti-androgénica de peces expuestos y esto evita que continúe la evolución sexual de poblaciones de peces en su entorno (Hill et al., 2010), lo cual concuerda con la propiedad de los organoclorados de unirse a receptores hormonales en células animales e inhibir la actividad endocrina (De Coster & Van Larebeke, 2012).

En los procesos de remediación ambiental, a pesar de obtener una buena tasa de degradación en el tratamiento con mallas de sílice, una porción de pesticida, que va de 5 a 38 %, queda remanente, por lo que algunos trabajos sugieren tratamientos por fotodegradación dirigida y unión a nano esferas de sílice (Escalada et al., 2014).

Una solución para tratar la degradación de diclorofeno es por acción indirecta de la enzima lacasa de *Coriolopsis gallica* (Madhavi & Lele, 2009), una oxidorreductasa la cual los sitios activos están conformados por múltiples átomos de cobre. Esta enzima no puede degradar al diclorofeno ya que su potencial rédox es muy limitado, por lo que se

necesita un mediador que participe en el proceso (Medina et al., n.d.) En el trabajo de Medina se seleccionó como mediador a la siringaldazina ($[\text{HOC}_6\text{H}_2(\text{OCH}_3)_2\text{CH}=\text{N}]_2$), la cual, al ser oxidada por el sitio T1 de la enzima, sus productos de reacción logran una acción degradante sobre el diclorofeno, y a su vez, se desarrolla en un sistema de nanosoportes el cual consiste en mantener a la enzima inmovilizada para formar un sistema de biorreactor fijo, donde el primer sistema a probar son soportes de silica mesoporosa (MSU-F) debido a su capacidad absorbente de materiales contaminantes y el espacio de sus poros para almacenar lacasa. Sin embargo, se considera que la degradación completa de un pesticida o compuestos fenólicos no asegura que se reduce su capacidad tóxica como lo demuestra un estudio de degradación de clorofenoles por *Alcaligenes eutrophus* donde se observó que las exposiciones a corto plazo de la bacteria (de 12 a 24 horas) con los compuestos lograban degradar a tales compuestos *In Vitro*. Pero en exposiciones de más de 1 mes, en el caso del triclorofenol, se lograba observar degradación aunque las cepas ya se consideraban no-cultivables ni presentes en el medio de cultivo (Valenzuela, Bumann, Céspedes, Padilla, & González, 1997). Otro ejemplo de compuestos que incrementan su propiedad citotóxica fue en un estudio donde probaron productos degradados de 4 tipos de tetraciclinas de uso veterinario en bacterias ambientales como *Pseudomonas* y dos especies de *Bacillus*, catalogando dichos productos como altamente tóxicos (Halling-Sørensen, Sengeløv, & Tjørnelund, 2002).

Capítulo 2. Metodología

La metodología que se presenta a continuación contiene tres apartados principales: en el primero se detalla lo relativo al desarrollo del biorreactor de lacasa de *C. gallica* y se explica cómo se efectuó su Inmovilización; en el segundo apartado se dedica para exponer los procedimientos de preparación de cultivos *In Vitro/Ex vivo* y en la última sección se incluyen los detalles de la microscopía.

2.1 Biorreactor de lacasa de *C. gallica* y su Inmovilización

2.1.1 Fijación en soportes de espuma de sílice (MSU-F)

El proceso de degradar diclorofeno con la enzima lacasa y auxiliada con el mediador siringaldazina se inició con la inmovilización de lacasa en nanosopores de espuma mesoestructurada de sílice (SiO₂) (MSU-F) diluidos en buffer de succinato 50mmolL⁻¹ pH4.5 en un tubo de reacción Eppendorf de 1.5mL. Estos se mantuvieron con agitación constante en un plato giratorio durante 24 horas a 4°C.

La colecta de la enzima inmovilizada se realizó centrifugando los viales a 4,000 rpm por 10 minutos, al finalizar la centrifugación se retiró el sobrenadante para subsecuentemente cuantificar la cantidad de enzima inmóvil y el vial se resuspendió en buffer de succinato, el procedimiento se repitió hasta que el buffer quedó de color cristalino al realizar la resuspensión.

2.1.2 Creación del Biorreactor

El sistema de biorreactor tuvo lugar en los tubos eppendorf que contenían la enzima inmovilizada, en el cuál un volumen final de 1mL constó de 90% buffer de succinato, 10% acetónitrilo (ACN), 10µL del mediador (siringaldazina), y 200µmolL⁻¹ de diclorofeno. Los viales se agitaron nuevamente por otras 24 horas a 4°C. Transcurrido ese tiempo se

centrifugaron a 4,000 rpm por 10 minutos y se colectó el sobrenadante en un stock de medio de cultivo y se refrigeró para aplicarlos a los cultivos celulares. Estos procedimientos fueron hechos acorde al proyecto de Tesis “Diseño de un biorreactor multienzimático para la oxidación de colorantes tipo azo” Cruz-Rios (2015).

2.2 Preparación de cultivos *In Vitro/Ex Vivo*

2.2.1 Búsqueda y selección de participantes

Criterios de selección

Los donadores se seleccionaron conforme a lo establecido por Fenech (2002) y Bonassi (2011), los cuáles implican pertenecer al género masculino, de 19 a 38 años de edad, hábitos alimenticios y recreativos saludables, no consumir tabaco y alcohol, no deben estar bajo medicación hormonal o de folatos (complejo B), su biometría hemática (número de células sanguíneas) debe estar dentro de los rangos normales de la población y por último un análisis de bioquímica sanguínea (glucosa, colesterol LDL, HDL, etc.) normal.

Derivado de esto, tres sujetos: uno de 23 años y dos de 22 años de edad fueron entrevistados y sometidos bajo los siguientes puntos:

Encuesta

Cuatro apartados fungieron en la encuesta aplicada a los donadores, las cuáles consistieron en la frecuencia en que consumen alimentos vegetales, frutos, carnes, embutidos, lácteos, bebidas e insumos como hiervas de infusión, té o café; el segundo apartado trata sobre el historial médico o alguna condición congénita o alergia que padezcan, así como el uso de alguna medicación para ello; el tercer y cuarto apartado son de frecuencia de una actividad deportiva y de tener algún contacto con alguna sustancia química o peligrosa que pueda provocar alguna discrepancia en este estudio.

Como resultado los tres sujetos presentan un consumo casi nulo de comida chatarra y bebidas carbonatadas a la semana, un solo sujeto consume de manera limitada (una o ninguna ocasión al mes) de alcohol; los otros dos sujetos presentan alergia (uno a gatos y otro a penicilina) no obstante, ninguno de los dos sujetos toma algún medicamento para ello.

Pruebas Bioquímicas

La prueba rutinaria SMAC 33 (Skeggs, 1957) y conteo de células sanguíneas (AutoAnalyzer) para visualizar que el rango de los sujetos es normal fueron aplicadas en Laboratorio Clínico Diagnóstico Emy, cuyos niveles químicos en la sangre fueron dentro de las cantidades normales.

Firma de consentimiento informado

El formato de consentimiento informado se encuentra bajo los lineamientos de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud, según el artículo 20, 21 y 22 de los Estados Unidos Mexicanos. Como también lo establecido por Declaración de Helsinki de principios básicos para las investigaciones médicas en seres humanos, adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, en Junio de 1964. Este documento fue impreso y firmado de forma individual cada uno de los tres sujetos, esto, en presencia de dos testigos y la realizadora de este proyecto. (Anexo 1).

2.2.2 Toma de muestras de sangre

La sangre se colectó por punción venosa del brazo de los donadores con vacutainer (BD Vacutainer – Flashback, Ref. 301747) y se trasladó en tubos con heparina de sodio (BD, cat. No. 367874), se mezcló la sangre suavemente dentro del tubo para que la heparina se distribuyera de manera uniforme, las muestras se conservaron por un tiempo no mayor a 24 horas a temperatura ambiente y en un sitio oscuro. Todos los cultivos fueron hechos junto con dos réplicas de cada uno.

2.2.3 Controles sin tratamiento

Los cultivos se prepararon bajo campana de flujo laminar, en tubos tipo Falcon estériles de 15 mL con 6.3 mL de medio RPMI 1640(R5886 – Sigma Aldrich), 60µl de L-glutamina (Sigma Aldrich) y 60µl de aminoácidos no-esenciales. Subsecuentemente se añadió 500µl de sangre fresca de los tubos heparinizados y 200 µl de fitohemaglutinina (PHA-L No. Cat. L- 2769 – Sigma Aldrich) dando un volumen final de 7ml. Al terminar de prepararse se incubaron a 37°C y tres tubos no se les agregaron PHA como control negativo (Figura 1.0).

2.2.4 Controles de acetonitrilo

Como el diclorofeno tiene propiedades liposolubles o hidrofóbicas, no puede solubilizarse en el medio de cultivo, por lo que se preparó un liofilizado con RPMI y 25% de acetonitrilo (acn) para su pronta homogenización. Por tanto se crearon cultivos control exponiéndose únicamente a 25% de acn con el fin de ver si es probable alguna discrepancia con este compuesto y el pesticida dando un falso positivo.

2.2.5 Dosificación de pesticida sin transformar en linfocitos

Los cultivos celulares de los donadores se expusieron a concentraciones de 10 µmolL⁻¹, 1 µmolL⁻¹ y 0.1 µmolL⁻¹ a 24 y 48 horas de exposición con tres réplicas de cada donante. Estas concentraciones se seleccionaron contemplando el rango de dosis ambiental mínima a máxima.

2.2.6 Dosificación de pesticida transformado en los cultivos de linfocitos

Los cultivos celulares se realizaron conforme al **apartado 4.4** con la excepción que en lugar de añadir el diclorofeno sin transformar, se agregaron las mezclas de los productos resultantes de la biorreacción (**apartado 3.2**) con las dosis que corresponderían a $0.1\mu\text{molL}^{-1}$, $1\mu\text{molL}^{-1}$ y $10\mu\text{molL}^{-1}$ del pesticida.

2.3 Microscopía

2.3.1 Aislamiento de Linfocitos

Para cosechar los linfocitos de los cultivos después de cada tratamiento, fue necesario efectuar un prefijado de las células con 1ml de solución de metanol y ácido acético con una relación de 3 a 1 (Figura 1 A). Se mezcló uniformemente y se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos con temperatura de $18 - 20^{\circ}\text{C}$ (Figura 1 B). Subsecuentemente se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 5ml de fijador y se realizaron varios ciclos de centrifugación y lavado hasta dejar el precipitado (botón) con tonalidad beige (Figura 1 C).

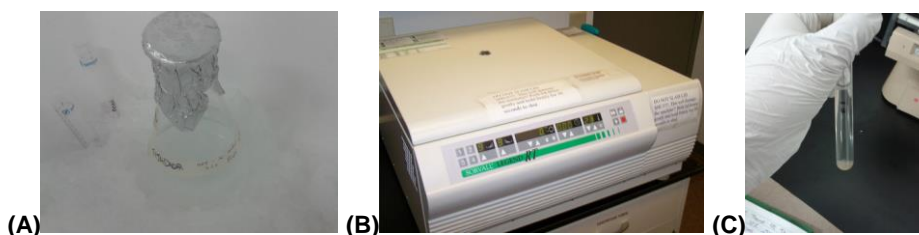


Figura 1. Fijación de linfocitos para microscopía: (A) Fijador de Metanol – Ácido Acético (3:1) donde se aplica el prefijado y fijado del botón celular; (B) en la centrifuga se dieron los ciclos de 1200 rpm por 10 minutos cada uno, todo hasta dejar el botón en el característico botón beige de los linfocitos (C).

2.3.2 Montaje y tinción

Al concluir la cosecha, las células se distribuyeron en portaobjetos esmerilados previamente congelados en agua destilada a 4°C, se mantuvieron durante el proceso en camas de hielo para mantener la temperatura fría Figura 1A. Se dejó evaporar el fijador de las muestras durante toda la noche, cubiertas debidamente en cajas plásticas.

Al día siguiente se humedecieron las laminillas en agua destilada, para luego sumergirse por 15 minutos en Eosina B (sigma) y 5 minutos en Azul de Metileno (sigma). Luego, se enjuagaron en agua destilada para retirar el exceso de colorante y se colaron de manera vertical sobre papel secante.

2.3.3 Búsqueda de Marcadores Nucleares

La observación de las muestras se dio en un microscopio óptico Leica, bajo aumento de 100x con aceite de inmersión. Para la proliferación celular se contaron y clasificaron las células conforme a la cantidad de núcleos que poseían, donde se contaron 500 por cada muestra y sus duplicados, para aplicar la fórmula de Fenech, 2002:

$$\frac{M * 1 + B * 2 + P * 3}{N}$$

Donde N es el número total de células contadas (500), M representa la cantidad de células de un solo núcleo (Mononucleares) (Figura 2, etiqueta M). B representa a las células con cariocinesis (núcleos formados y separados pero unidos por el citoplasma) o presenten dos núcleos (Binucleada) (Figura 2, etiqueta B) y P representa también a células en cariocinesis pero en este caso con múltiples núcleos (Polinucleadas) (Figura 2, etiqueta P).

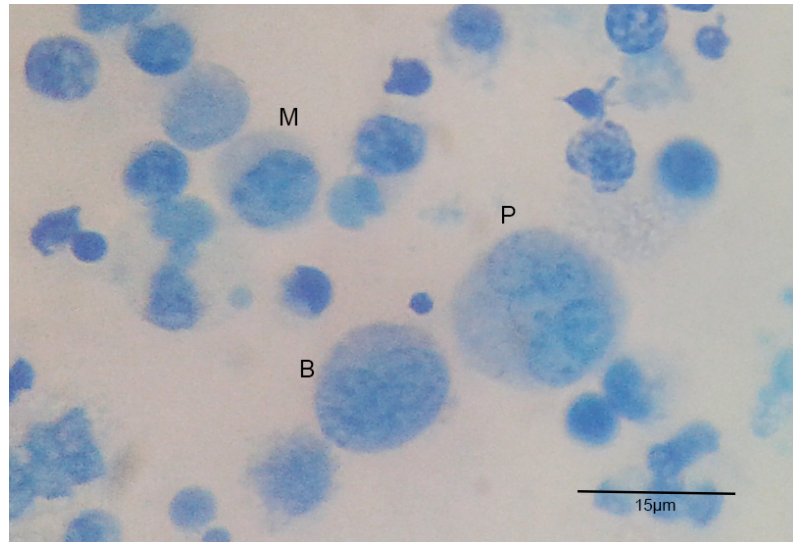


Figura 2. Linfocito de un solo núcleo (M), binucleado (B) y múltiples núcleos (P).

Para el marcaje de daño citotóxico se contabilizaron 500 células, de las cuales se clasificaron en células sanas, apoptosis temprana (cuando la cromatina se condensa y la membrana celular sigue intacta) (Figura 10, B), necrosis temprana y tardía donde las células presentaron un daño mecánico o químico observándose vacuolas digestivas en la fase temprana como la membrana celular destruida en la fase tardía (Figuras 10 A y C).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Inmovilización de lacasa de *C. gallica*

La concentración inicial de enzima fue de 3.44 mmolL⁻¹ y la concentración final inmovilizada en 350 µg de MSU-F fue de 2.76 mmolL⁻¹ según la reacción con azul comassie o la prueba Bradford de proteínas. Los resultados indican que existe alta reproducibilidad en el proceso de inmovilización de lacasa en el soporte (Tabla 1.0).

Tabla 1. Concentración total de lacasa inmovilizada en soportes MSU-F

Concentración Inicial (mmolL ⁻¹)	Concentración Final (Inmovilizada) (mmolL ⁻¹)	Concentración Inicial (µg mol ⁻¹)	Concentración Final (Inmovilizada) (µg mol ⁻¹)
3.44	2.76	11.6	9.3
3.41	2.77	10.4	8.1
3.46	2.76	12.7	10.4
3.45	2.74	11.7	9.5
3.44	2.77	11.6	9.2

Nota: Todos los datos fueron ajustados en la curva de lectura de albúmina de suero bovino (BSA) en la longitud de onda de 595nm.

3.2 Proliferación Celular en Sujetos sanos

Como se observa en la Figura 3, los sujetos mostraron un índice de proliferación dentro del rango saludable (de 1.5 a 2) (Fenech & Bonassi, 2011). Así como un cultivo de cada sujeto sin el mitógeno fitohemaglutinina como control negativo, su promedio se anexo a la figura y marca un nivel menor, tal como se esperaba.

Índice de proliferación celular (MI)

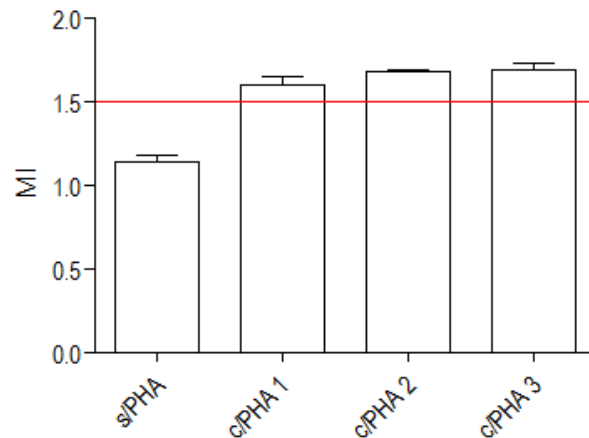


Figura 3. Comparación de la proliferación celular entre sujetos y su control sin PHA, un estimulante de la división celular. Al no tener estímulo por parte del mitógeno, este afecta de manera significativa la proliferación celular.

3.3 Controles de acetonitrilo (ACN)

Un control de acetonitrilo se realizó con el propósito de eliminar cualquier elemento que interfiera con los resultados toxicológicos del pesticida y el sistema del biorreactor como un falso positivo. Esto descartando las cifras que sean equivalentes en los tratamientos.

Se realizaron cultivos con 25% de ACN, por triplicado, en las células de los donadores y se incubaron a 37°C por 48 horas.

Los resultados mostraron que no hay un efecto significativo del ACN en la proliferación celular (ANOVA 1 vía $P < 0.05$) (Figura 4). Por lo tanto se aprobó su uso en la dilución del pesticida utilizando una concentración del 10% en los cultivos.

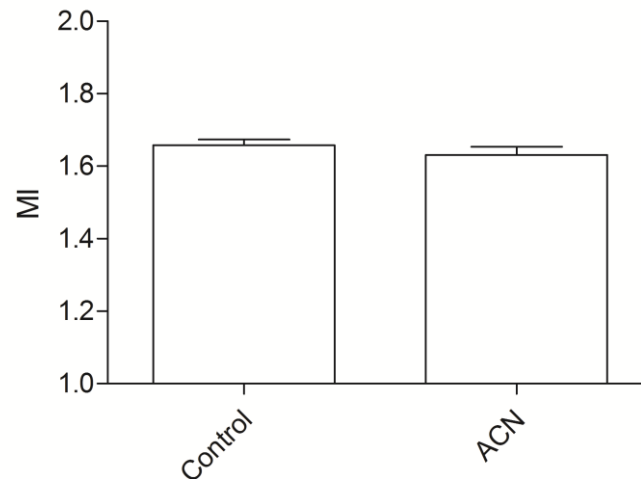
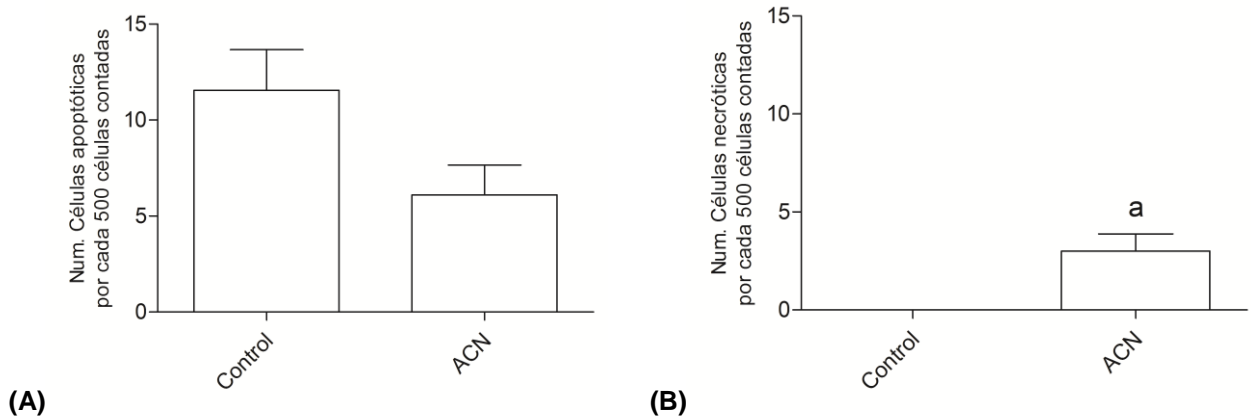


Figura 4. Muestra el índice mitótico de los controles en contraste con ACN, donde este no mostró un valor significativo en la proliferación celular (Bonferroni Post-test, ANOVA de 2 vías).

3.3.1 Citotoxicidad del acetonitrilo

Los marcadores de apoptosis y necrosis se analizaron en conjunto a la proliferación celular. Como muestran la Figura 5A el ACN no provocó un impacto significativo en los cultivos celulares, en cambio la presencia de necrosis se incrementó ligeramente con respecto al control (Figura 5B), pero no con respecto a los tratamientos (Figura 12). A pesar que en el análisis de varianza se indicó un cambio significativo, la respuesta es leve por lo que se restará el resultado de la necrosis presente en los tratamientos.

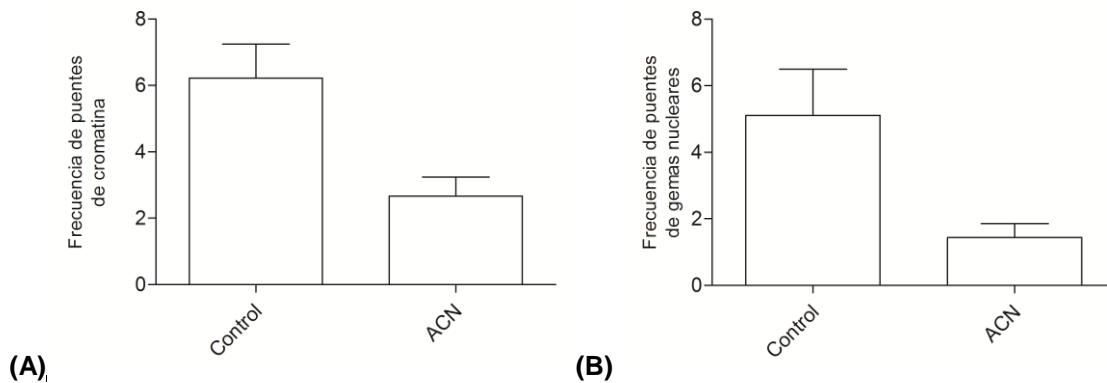


(A) (B)
Figura 5. Células con apoptosis (A) y necrosis (B) por cada 500 células contadas, las células dosificadas con acetonitrilo (ACN) no mostraron un impacto significativo en la muerte celular. Sin embargo mostró una ligera respuesta de necrosis por parte de las células, el impacto fue significativo (*= $P < 0.05$).

3.3.2 Genotoxicidad del acetonitrilo

Los marcadores de genotoxicidad se realizaron conforme a metodología en el apartado 2.4.3.

Las anomalías nucleares cuantificadas en la concentración de ACN no mostraron un impacto significativo en los linfocitos, por lo que no se excluirán de los análisis de los tratamientos (Figuras 6a y 6b).



(A) (B)
Figuras 6. Conteo de marcadores de genotoxicidad como puentes de cromatina (A) y gemas nucleares (B) por cada 1000 células binucleadas (Figura 4, B) en las que mostraron que el acetonitrilo a 25% no mostró un impacto significativo en los cultivos celulares.

3.4 Citotoxicidad

3.4.1 Índice de Proliferación Celular

En el estudio del daño citotóxico, monitoreado por la proliferación celular (Índice mitótico) se observa una mejora significativa en la concentración mínima, tanto a las 24 como a las 48 horas de exposición del pesticida modificado en comparación al pesticida sin tratar (Figura 7). Sin embargo, esta no llega a alcanzar los niveles sanos de proliferación del control de los sujetos.

En la concentración intermedia ($1 \mu\text{molL}^{-1}$) se logra un incremento de la proliferación a las primeras 24 horas con el pesticida transformado en comparación al pesticida sin tratar (Figura 7). No obstante las siguientes 24 horas de exposición no se observa un cambio significativo ni entre los antagonistas, ni contrastándolos con el control sin dosificación.

En la concentración de $10 \mu\text{molL}^{-1}$ siempre mostró un declive del índice mitótico entre las contrapartes, y no hubo una diferencia significativa en las dosis y en el control (Figura 7).

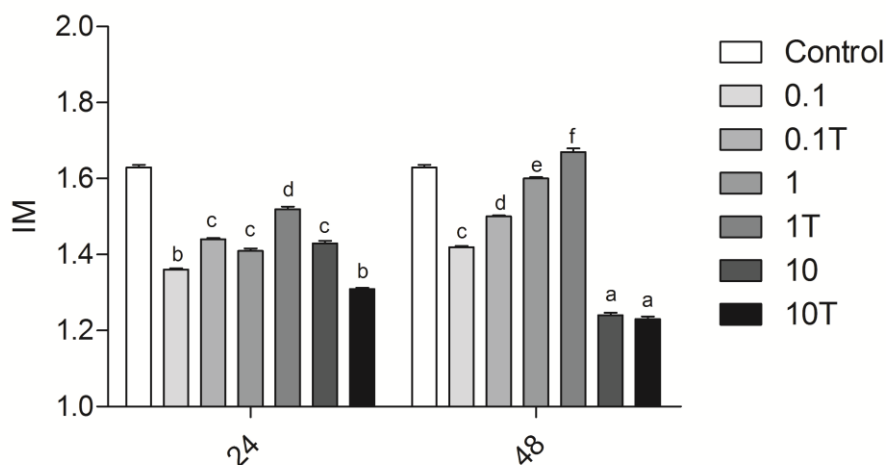


Figura 7. Índice de proliferación celular (IM) de las concentraciones manejadas sin tratamiento enzimático (s/T) y tratados por el biorreactor (T) a 24 y 48 horas. En ambos tiempos se mostró una recuperación significativa ($P < 0.05$) cuando fue dosificado con el pesticida tratado en el biorreactor.

En la Tabla 2.0 se globaliza los resultados de la proliferación celular de los tratamientos contrastados con el control y con sus contrapartes. Como se muestra en algunas concentraciones, los niveles del índice mitótico llegaron a niveles saludables, y en el caso del tratamiento a 48h se alcanzó el nivel normal del cultivo control.

Tabla 2. Índice de Proliferación celular.

	Concentración μmolL^{-1}	Sin tratamiento (s/T)		Con tratamiento (T)	
		24h	48h	24h	48h
Control					
1.63 ± 0.02	0.1	1.36 ± 0.01	1.42 ± 0.01	1.44 ± 0.01	1.50 ± 0.01
	1	1.41 ± 0.02	1.60 ± 0.01	1.52 ± 0.02	1.67 ± 0.03
	10	1.43 ± 0.02	1.24 ± 0.02	1.31 ± 0.01	1.23 ± 0.02

ANOVA 2 Vías Significativo control / Diferencia entre dosis

3.4.2 Apoptosis

La apoptosis de linfocitos se vio incrementada hasta 6 veces mayor que el control en la presencia del diclorofeno puro a $0.1 \mu\text{molL}^{-1}$ en las primeras 24 horas de exposición. Este proceso decayó su frecuencia en las siguientes 24 horas, aun así dio un valor significativo al control (Tabla 3), y el impacto ocasionado por su antítesis tratada por lacasa fue del 50% menor las primeras 24 horas, pero no se mostró una diferencia a largo plazo entre ambos (48 horas de exposición) (Figura 9).

La concentración intermedia ($1 \mu\text{molL}^{-1}$) tuvo un efecto inverso a la concentración mínima, ya que en las primeras 24 horas no existió diferencia entre el compuesto nativo contra el modificado (Figura 8a). Pese a eso, las 48 horas de exposición mostro un mayor incremento de la apoptosis en diclorofeno intacto, y esta decreció hasta 1/3 con el pesticida alterado por lacasa. (Figura 9).

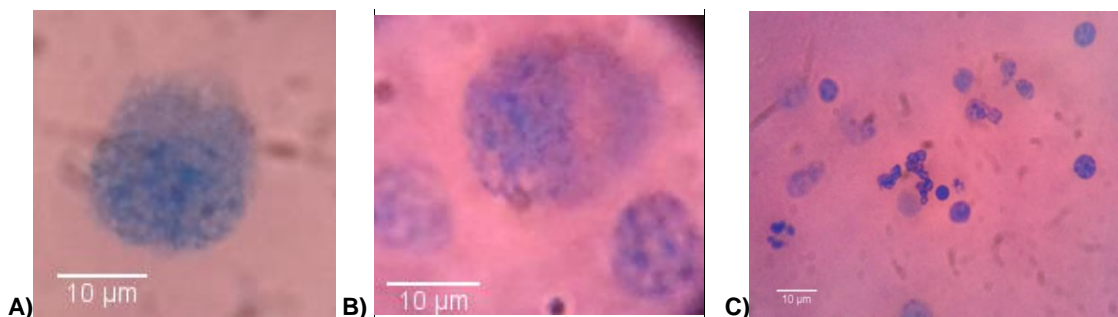


Figura 8. A) Célula binucleada necrosada en dosis de $10\mu\text{molL}^{-1}$ expuesta a 24 horas del pesticida sin tratamiento, B) célula necrótica con una exposición de 44 horas a $10\mu\text{molL}^{-1}$. C) Cúmulo de células destruidas e intactas pero sin avistamiento de proliferación a $10\mu\text{molL}^{-1}$ por 44 horas.

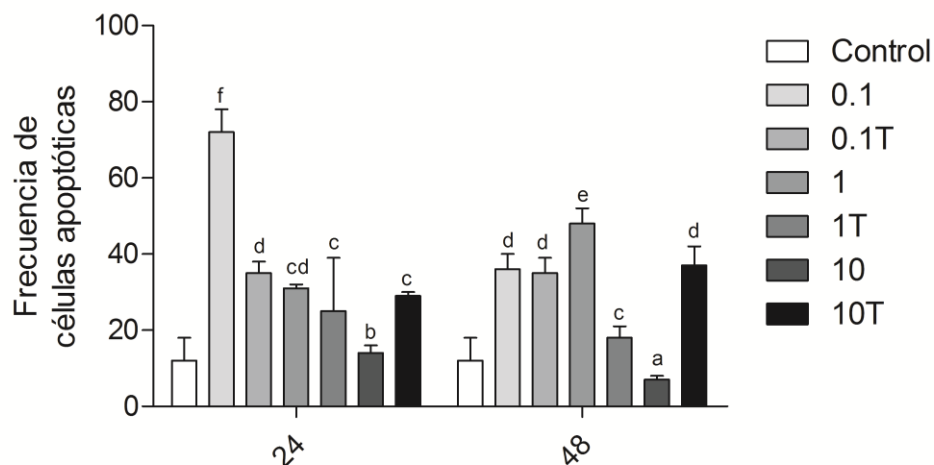


Figura 9. Número de células apoptóticas por conteo de 500 células. Con el tratamiento a 24 y 48 horas de exposición, las concentraciones rotuladas con la letra "T" indican los cultivos expuestos al pesticida ya tratado por el biorreactor.

En la máxima concentración de $10\mu\text{molL}^{-1}$ se contabilizaron más células apoptóticas en el pesticida modificado que al pesticida no-modificado debido a una mayor cantidad de células intactas o no dañadas (necrosis- siguiente bloque) que se contabilizaron con mayor facilidad (Tabla 3).

Tabla 3. Apoptosis

Concentración μmolL^{-1}	Sin tratamiento (s/T)		Con tratamiento (T)	
	24h	48h	24h	48h
Control 12 ± 6	*f	*d	*d	*d
0.1	72 ± 6 */cd	36 ± 4 */e	35 ± 3 */c	35 ± 4 */c
1	31 ± 1 */b	48 ± 4 -/a	25 ± 14 */c	18 ± 3 */d
10	14 ± 2	7 ± 1	29 ± 1	37 ± 5

ANOVA 2 Vías Significativo control / Diferencia entre dosis

3.4.3 Necrosis

La necrosis se comportó de manera dosis – dependiente conforme a las concentraciones y al tiempo de exposición del pesticida no alterado. Es decir, a mayor fuera la concentración y el tiempo de exposición más daño por necrosis se encontró. Contrastando el daño de necrosis con el pesticida transformado (Tabla 4.0), este disminuyó de manera drástica el daño externo y no logró restaurarse al punto de volver a los niveles que muestra el control sin tratamientos. Sin embargo, el daño es muy tenue acercándose al leve daño en los controles de ACN (Figura 10).

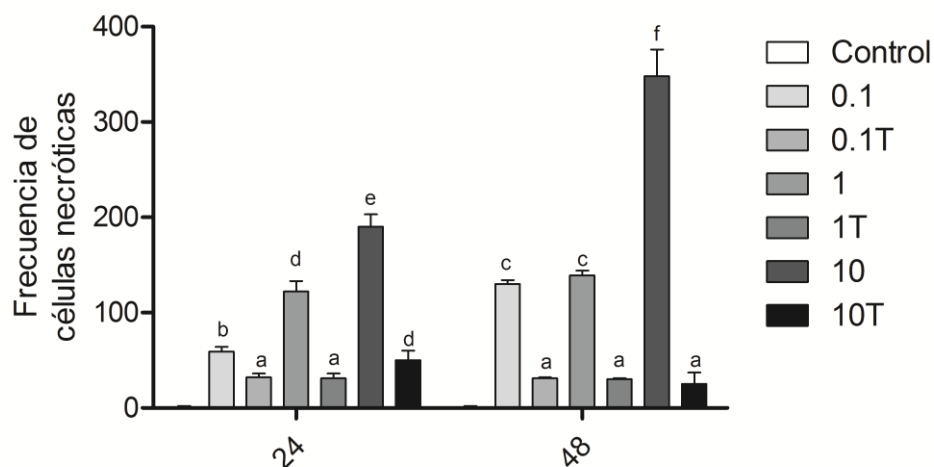


Figura 10. Cantidad de células necróticas por cada 500 células contadas a 24 y 48 horas de exposición de las concentraciones del pesticida sin tratar (s/T) y pasadas por el tratamiento (T).

Tabla 4. Necrosis

Concentración μmolL^{-1}	Sin tratamiento (s/T)		Con tratamiento (T)	
	24h	48h	24h	48h
Control 0 ± 2	*b	*c	*a	*a
0.1	59 ± 5 */d	130 ± 4 */c	32 ± 4 */a	31 ± 1 */a
1	122 ± 11 */f	139 ± 5 */e	31 ± 5 */b	30 ± 1 */a
10	190 ± 13	348 ± 28	50 ± 10	25 ± 12

ANOVA 2 Vías Significativo control / Diferencia entre dosis

3.5 Genotoxicidad

3.5.1 Puentes de Cromatina

En la frecuencia de los puentes de cromatina se contrastaron las concentraciones antagónicas (las nativas y las modificadas), donde se observó una influencia bastante significativa en la concentración mínima. En cambio a las primeras 24 horas de dosificación, la concentración $1 \mu\text{molL}^{-1}$ mostró una diferencia entre diclorofeno sin tratar y el tratado con lacasa (Figura 11). Esto se contrarresta en las siguientes 24 horas, donde hubo una disminución significativa, mientras que en la versión no-transformada se mantuvo en los mismos niveles (Figura 11).

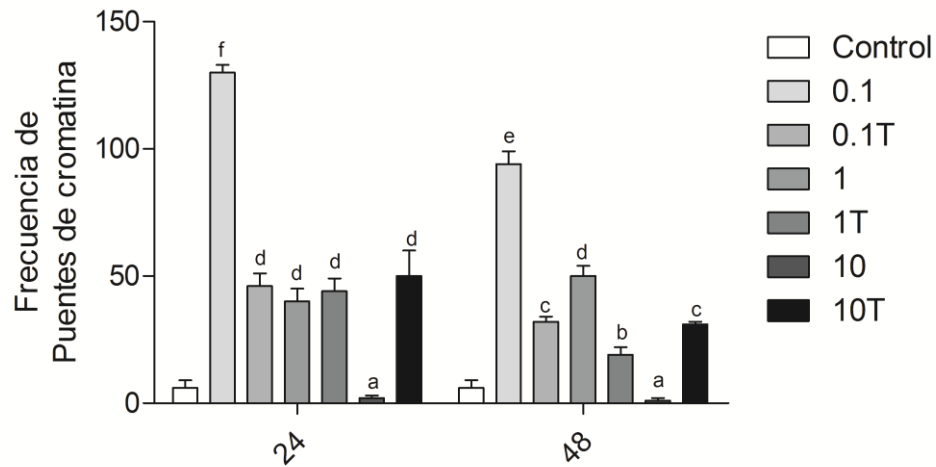


Figura 11. Frecuencia de puentes de cromatina (anomalía nuclear) por cada 1,000 células binucleadas con exposición de 24 (A) y 48 horas (B) de exposición de las concentraciones del pesticida sin tratar y pasadas por el tratamiento (T).

En la concentración máxima aumento la presencia de puentes de cromatina, como lo sucedido en el caso de apoptosis de la misma concentración (Tabla 5.0).

Tabla 5. Puentes de Cromatina

Concentración μmolL^{-1}	Sin tratamiento (w/T)		Con tratamiento (T)	
	24	48	24	48
Control 6 ± 3	<i>*/f</i>	<i>*/e</i>	<i>*/d</i>	<i>*/c</i>
0.1	130 ± 3	94 ± 5	46 ± 5	32 ± 2
1	40 ± 5	50 ± 4	44 ± 5	19 ± 3
10	2 ± 1	1 ± 1	50 ± 10	31 ± 1

ANOVA 2 Vías Significativo control / Diferencia entre dosis

3.5.2 Gemas nucleares

El segundo marcador de genotoxicidad fue más abundante que el otro marcador en las células binucleadas, la concentración de $0.1 \mu\text{molL}^{-1}$ disminuyó hasta un $40\% \pm 0.3$ en ambos tiempos de exposición en la versión del tratamiento enzimático comparado con el que no fue pasado por el tratamiento (Figura 14).

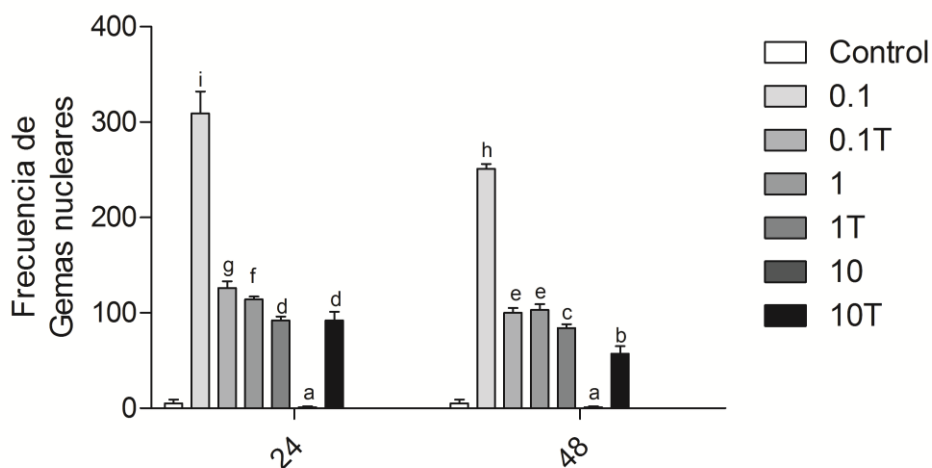


Figura 12. Frecuencia de puentes de gemas nucleares (amplificación de genes) por cada 1,000 células binucleadas con exposición de 24 y 48 horas de exposición de las concentraciones del pesticida sin tratar (sin/T) y pasadas por el tratamiento (T).

La concentración intermedia $1 \mu\text{molL}^{-1}$ también decreció un $20\% \pm 0.66$ en ambos tiempos con el pesticida transformado; sin embargo, se advirtió un enorme incremento en la concentración máxima con el pesticida transformado en comparación al no-transformado (Tabla 6).

Tabla 6. Gemas nucleares

	Concentración μmolL^{-1}	Sin tratamiento (s/T)		Con tratamiento (T)	
		24	48	24	48
Control					
5 ± 4	0.1	309 ± 23 */i	251 ± 5 */h	126 ± 7 */g	100 ± 5 */e
	1	114 ± 3 */f	103 ± 6 */e	92 ± 4 */d	84 ± 4 */c
	10	1 ± 1 -/a	1 ± 1 -/a	92 ± 9 */d	57 ± 8 */b

ANOVA 2 Vías Significativo control / Diferencias entre dosis

Capítulo 4. Discusión

El efecto de transformación enzimática de lacasa en productos aromáticos ha sido de gran utilidad modificando los compuestos recalcitrantes desde hace más de una década (Pickard, Roman, Tinoco, & Vazquez-duhalt, 1999). La creación de biorreactores que proporcionen una efectividad y a su vez avale su seguridad en la modificación de los productos y estos produzcan el mínimo daño al ambiente.

Otras técnicas de inhibición de pesticidas organoclorados como la degradación por metabolitos de organismos o el anexo de grupos funcionales (metilación, carboxilación, etc.) no disminuyen su toxicidad o la incrementan en comparación de su forma innata. Como ejemplo están los casos de metilación de paratión, otro plaguicida, y la formación de metabolitos de clorpirifos y diazinon cuyo efecto tóxico incremento de 10 a 15 veces más que su versión nativa en cultivos de esperma humano. Otro caso con metabolitos de vinclozolin (otro organoclorado), estos conservan los efectos anti androgénicos o interruptores de receptores hormonales en células de mamífero (Mnif et al., 2011).

A diferencia de los casos antes mencionados cuyos procedimientos y técnicas son creados en base a los datos y protocolos encontrados en bibliografía, la nueva generación de sistemas de biorremediación crean sistemas de datos y modelaje molecular con herramientas que proporciona la simulación computacional, y a partir de esta se toman decisiones para elegir la mejor ruta, intermediarios e inclusión o exclusión de los reactivos y la potencial actividad o efectos de sus productos (Arbor, 2003). Resultando en un tratamiento “personalizado” para la sustancia o mezclas a tratar por el sistema, una mejor organización en la toma de decisiones y articulación de los protocolos y equipos a utilizar en comparación de aquellos cuya constitución sea únicamente de recursos bibliográficos.

En este estudio basado en el modelo Relación Estructura - Actividad (SAR) y árbol de decisión (DT) para la selección de mediadores para la enzima lacasa de *C. gallica*, el mediador seleccionado (siringaldazina) para tratar el sustrato en este caso diclorofeno, sus mezclas produjeron un daño citotóxico y genotóxico significativamente menor en las dosis mínima e intermedia. En la concentración intermedia ($1 \mu\text{molL}^{-1}$) la proliferación celular mejoró a corto plazo (24 horas), y la apoptosis a largo plazo (48 horas). El hecho de que la dosis intermedia de diclorofeno no muestre un cambio significativo a largo plazo

en la proliferación puede sugerirse que la dosis degradada ya es procesada por los linfocitos, y estos continúan con su nivel de proliferación normal, en cambio con la dosis innata estos pueden procesarla pero el daño genético que presentan a largo plazo es mayor ($20\% \pm 4$ – gemas nucleares, $38\% \pm 2$ – puentes de cromatina) comparándolo con la concentración tratada en el biorreactor (Tablas 5.0 y 6.0). Esto supone que mientras se encuentren remanentes del pesticida o la concentración del pesticida original, decae en el tratamiento, por lo tanto la porción restante de este plaguicida puede ocasionar un daño genético notorio y que la integridad celular se mantenga. Es decir, en dosis grandes este ocasione un daño celular (necrosis y apoptosis) y mientras vaya disminuyendo la cantidad del plaguicida este cese su efecto citotóxico y vaya manifestándose un daño genotóxico (Figura 13). Este comportamiento ha sido observado en pesticidas sintéticos y orgánicos (Neves, Ramos-perez, & Queiroz, 2013; Rogers, Yedjou, & Tchounwou, 2012; Said, Badr, Nada, & El-Demerdash, 2014; Shi et al., 2013). Esto se contrasta en el pesticida no – modificado de manera comparativa entre los tratamientos (Tablas 4.0, 5.0 y 6.0). Esta conducta se puede observar claramente en la concentración mayor ($10 \mu\text{molL}^{-1}$) cuando es modificada su capacidad citotóxica se ve reducida notablemente (Figuras 9 y 10), mientras que la genotoxicidad sobresale de manera notoria en la concentración del diclorofeno transformado (Figuras 9 y 10). Por lo tanto, se conjetura que debido a una mínima cantidad de pesticida en la mezcla del biorreactor produzca esos resultados elevados de gemas nucleares y puentes de cromatina.

En la concentración mínima ($0.1 \mu\text{molL}^{-1}$) también se observó una mayor frecuencia de los marcadores nucleares antes mencionados en la versión innata de diclorofeno. Además se encontró una mayor cantidad de células apoptóticas que en las demás concentraciones (Tabla 3). La apoptosis, a pesar de ser un evento de índole celular, esta se puede disparar o activar al encontrar un malfuncionamiento en el interior de la célula, entre ellas la mala distribución de cromosomas en las fases finales de apoptosis, una mala replicación, delección, mutación de material genético o la sobreexpresión de sus promotores (Krysko, Vanden Berghe, D'Herde, & Vandenabeele, 2008). Considerando que la probabilidad de que la apoptosis se desate por la cantidad de material genético dañado a esa baja concentración por la mayoría de las células, en ese estadio se encontraban en el proceso de cariocinesis, donde los núcleos de las células hijas ya

estaban formados y listos para forjar su propia membrana, y poseían uno o más micronúcleos (Vea Anexo – Micronúcleos en células apoptóticas).

A pesar de no encontrar micronúcleos en células vivas, se contabilizaron otros daños genéticos como la ruptura de usos mitóticos dando como resultado una delección o pérdida total de paquetes de genes encontrados en los cromosomas (Farmer et al., 2003) y la formación de gemas nucleares, las cuáles se encontraron con mayor frecuencia en el pesticida connatural está ligada la inhibición de los reguladores de daño genético y promotor de apoptosis en células dañadas (p53) (Mansilla, Bataller, & Portugal, 2009), por lo que estas se encontraban íntegras cuando se observaron en microscopía.

Además de las pruebas en linfocitos, se realizó un ensayo de toxicidad en glóbulos rojos (Véase Anexos - Hemólisis) el cual consiste en exponer a los eritrocitos las concentraciones con y sin transformar de diclorofeno por 24 horas en una solución salina (PBS 2X), después se mide la hemoglobina liberada en la solución a 542nm por espectrofotometría, y se calcula el porcentaje de hemólisis, es decir, la cantidad de células rojas destruidas con la presencia de la sustancia o mezclas a probar. La respuesta del ensayo sobre las muestras del pesticida tratado fue favorable, ya que de presentar una destrucción total en el plaguicida primario, los niveles de hemólisis se recobraron al punto de obtener el promedio del control saludable (Figura 20).

La invasión de unos microorganismos en el vial que almacenaba las mezclas del biorreactor conservadas en medio de cultivo celular muestra su crecimiento en dicha mezcla y su ausencia total en el vial de diclorofeno diluido, demuestran que no solo las mezclas redujeron su toxicidad en células de mamíferos, si no en microorganismos como *Bacillus subtilis*. (Véase Anexos – Cultivos microbiológicos). Cabe mencionar que el diclorofeno tiene propiedades bactericidas como antes se mencionó en la introducción, y es necesario hacer más pruebas en otras dosis para corroborar tal hecho después de ser tratado por el bioreactor.

Esto evidencia que el modelo creado para seleccionar la adaptabilidad de mediadores en un reactor enzimático por creación de base de datos y simulación computacional, son herramientas que ayudan a crear un arquetipo experimental con las variables más precisas de los materiales a estudiar, y proyecta de manera concisa la interacción de los

péptidos y compuestos orgánicos en sistemas biológicos. Además crea la oportunidad de crear un sistema rentable y ambientalmente amigable para la restauración de efluentes contaminados por pesticidas, y compuesto aromáticos cuyo impacto no puede ser restaurado o aminorado por acción de la naturaleza, evitando en lo más posible, efectos contraproducentes de otros sistemas de biorremediación.

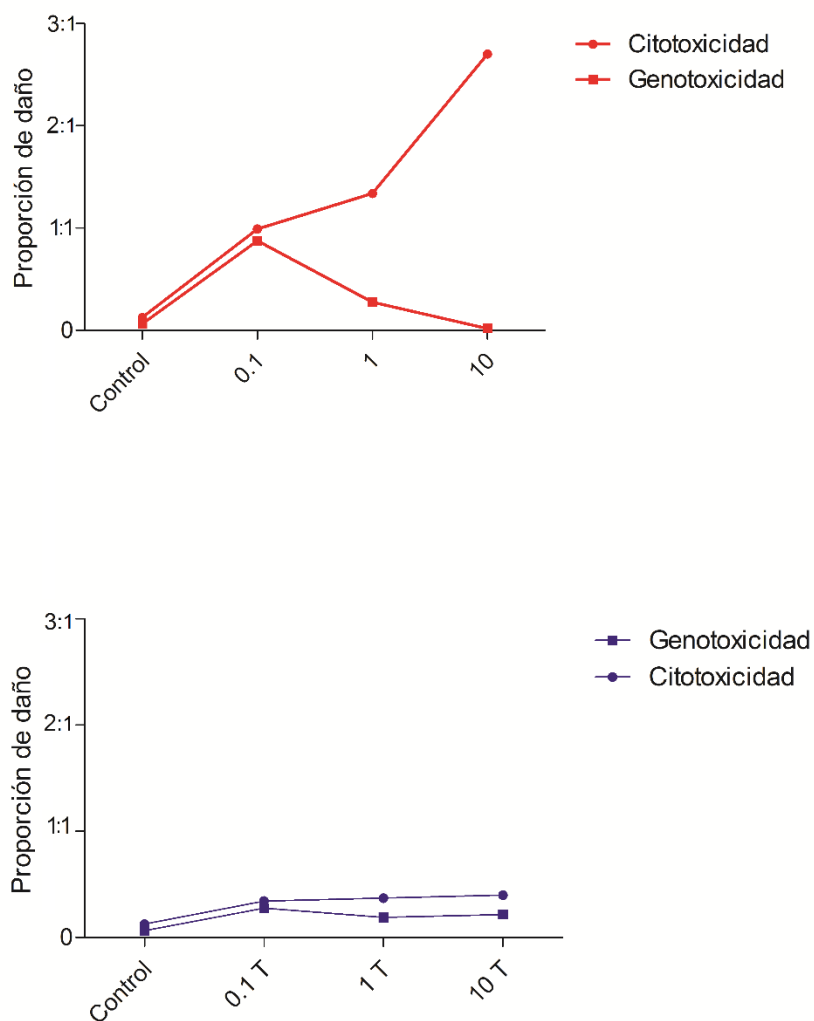


Figura 13. Comparación de daño citotóxico y genotóxico dependiendo de la dosis intacta o transformada de diclorofeno, el porcentaje de daño es la proporción de incremento o decaimiento comparada con el control sin dosis ni tratamientos.

Capítulo 5. Conclusiones

Las pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad contrastaron la hipótesis que su toxicidad se redujo en los cultivos de linfocitos humanos. En las dosis menores de $1 \mu\text{molL}^{-1}$ la genotoxicidad y citotoxicidad se redujo de manera favorable. En el caso de los cultivos con la dosis $10 \mu\text{molL}^{-1}$ se sospecha que los residuos de diclorofeno no transformados por lacasa mantengan su efecto mutagénico, y el daño citotóxico se vio reducido en el daño externo, es decir, necrosis.

La pruebas en cultivos contaminantes de *B. subtilis* y el ensayo de hemólisis demostraron que el efecto tóxico del diclorofeno se anuló al ser tratado por el biorreactor de lacasa de *C. gallica* y su mediador siringaldazina. En el caso del ensayo de viabilidad con MTT, se observa que la viabilidad se recupera en la dosis intermedia de $1 \mu\text{molL}^{-1}$ con el tratamiento enzimático, sin embargo en las demás dosis se necesitan un mayor número de réplicas para determinar el comportamiento extraño de la dosis mínima y máxima.

Capítulo 6. Perspectivas

La aplicación de estudios de toxicidad a nuevas tecnologías de biorremediación se requerirá conforme se necesite un monitoreo y estudios de impacto ambiental en zonas dañadas por desechos agrícolas, así como un estudio completo donde se generen nuevas etapas como aplicación a dichas zonas dañadas y un estudio epidemiológico de los organismos y personas residentes y aledañas de dichas zonas.

Para comprobar que genes o que paquetes de genes se pierden por la presencia del pesticida se requieren estudios moleculares como lo son microarreglos (estudios de mutagénesis) y supervisar la expresión (sea incrementada o reducida) de ARN mensajero con marcadores de daño citotóxico y genotóxico.

Lista de referencias bibliográficas

- Arbor, A. (2003). Admet In Silico Modelling: Towards prediction paradise?. *Nature*, 2 (March), 192–204.
- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., and Fenech, M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: Evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1), 93–100.
- Cruz-Ríos, D. J. (2015). Diseño de un Biorreactor multienzimático para la oxidación de colorantes tipo azo. Tesis de Licenciatura en bioingeniería. Universidad Autónoma de Baja California, 1-26.
- De Coster, S., and Van Larebeke, N. (2012). Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012.
- Escalada, J. P., Arce, V. B., Porcal, G. V., Biasutti, M. A., Criado, S., García, N. a., and Mártire, D. O. (2014). The effect of dichlorophen binding to silica nanoparticles on its photosensitized degradation in water. *Water Research*, 50, 229–236.
- Farmer, P. B., Singh, R., Kaur, B., Sram, R. J., Binkova, B., Kalina, I. and Cebulska-wasilewska, A. (2003). Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage, 544, 397–402.
- Fenech, M. and Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1), 43–49.
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003). HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2), 65–75.
- Gentile, N., Mañas, F., Bosch, B., Peralta, L., Gorla, N. and Aiassa, D. (2012). Micronucleus assay as a biomarker of genotoxicity in the occupational exposure to agrochemicals in rural workers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(6), 816–822.
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G. and Tjørnelund, J. (2002). Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(3), 263–271.
- Hill, E. M., Evans, K. L., Horwood, J., Rostkowski, P., Oladapo, F. O., Gibson, R. and Tyler, C. R. (2010). Profiles and some initial identifications of (anti)androgenic

- compounds in fish exposed to wastewater treatment works effluents. *Environmental Science and Technology*, 44(3), 1137–1143.
- Kim, H. R., Son, B. H., Lee, S. Y., Chung, K. H. and Oh, S. M. (2012). The Role of p53 in Marijuana Smoke Condensates-induced Genotoxicity and Apoptosis. *Environmental Health and Toxicology*, 27. <http://doi.org/10.5620/eht.2012.27.e2012017>
- Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K. and Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205–221. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.12.001>
- Kwiatkowska, M. and Huras, B. (2014). The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro), 109, 34–43. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.01.003>
- Lone, M. I., Nazam, N., Shaikh, S. and Ahmad, W. (2013). Genotoxicity of an organochlorine pesticide dichlorophene by micronucleus and chromosomal aberration assays using bone marrow cells of *Rattus norvegicus*. *Caryologia*, 66(4), 296–303. <http://doi.org/Doi 10.1080/00087114.2013.852344>
- Madhavi, V. and Lele, S. S. (2009). Laccase: Properties and applications. *BioResources*, 4(4), 1694–1717.
- Mansilla, S., Bataller, M. and Portugal, J. (2009). A nuclear budding mechanism in transiently arrested cells generates drug-sensitive and drug-resistant cells. *Biochemical Pharmacology*, 78(2), 123–132.
- Martins, M. L., Donato, F. F., Prestes, O. D., Adaime, M. B. and Zanella, R. (2013). Determination of pesticide residues and related compounds in water and industrial effluent by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(24), 7697–709.
- Medina, F., Aguila, S., Camilla, M., Martorana, A., Basosi, R., Alderete, J. B. and Vazquez-duhalt, R. (n.d.). Author ' s personal copy Enzyme and Microbial Technology Prediction model based on decision tree analysis for laccase mediators.
- Mnif, W., Hassine, A. I. H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O. and Roig, B. (2011). Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(6), 2265–2303.
- Neves, E. G., Ramos-perez, F. M. D. M. and Queiroz, D. (2013). Radioprotective Effect of Sodium Selenite on Developing Teeth, 24, 375–379.
- Pavanello, S., Dioni, L., Hoxha, M., Fedeli, U., Mielzynska-Švach, D. and Baccarelli, A. a. (2013). Mitochondrial DNA Copy Number and Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 22(10), 1722–1729.

- Pickard, M. a, Roman, R., Tinoco, R., & Vazquez-duhalt, R. (1999). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism by White Rot Fungi and Oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 Laccase Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism by White Rot Fungi and Oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 Laccase. *Appl. Envir. Microbiol.*, 65(9), 3805–3809.
- Regulations, W., Division, S. and Agency, U. S. E. P. (n.d.). Click here for DISCLAIMER Document starts on next page EPA Ambient Water Quality Criteria for.
- Rogers, C., Yedjou, C. and Tchounwou, P. (2012). Abstract 3846: Vitamin D3 potentiates the antitumor effects of arsenic trioxide in human leukemia (HL-60) cells. *Cancer Research*, 72(8 Supplement), 3846–3846.
- Said, R. S., Badr, A. M., Nada, A. S. and El-Demerdash, E. (2014). Sodium selenite treatment restores long-lasting ovarian damage induced by irradiation in rats: Impact on oxidative stress and apoptosis. *Reproductive Toxicology*, 43, 85–93.
- Shi, K., Jiang, Q., Li, Z., Shan, L., Li, F., An, J. ad Xu, C. (2013). Sodium selenite alters microtubule assembly and induces apoptosis in vitro and in vivo. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1), 7.
- Tscharntke, T., Clough, Y., Wanger, T. C., Jackson, L., Motzke, I., Perfecto, I. and Whitbread, A. (2012). Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. *Biological Conservation*, 151(1), 53–59.
- Valenzuela, J., Bumann, U., Céspedes, R., Padilla, L. and González, B. (1997). Degradation of chlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4) in bleached kraft mill effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 227–232.

Anexos

A.- Hemólisis

El impacto que ocasionan ciertos pesticidas se observa mediante su efecto tóxico en las células. Específicamente en los glóbulos rojos esta se puede medir por la cantidad de hemoglobina liberada al plasma sanguíneo como resultado de la destrucción de dichas células (Kwiatkowska & Huras, 2014).

En el ensayo se realizó conforme al procedimiento de Kwiatkowska y Huras: Se cultivaron 5% glóbulos rojos en solución hipertónica (PBS 2x) a 37°C por 24 horas, con las concentraciones del pesticida innato y tratado por lacasa. Al término de la exposición se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos, se colectó el sobrenadante de las muestras y se midieron a 542nm en el espectrofotómetro.

Al término de la lectura se tomaron los datos y se realizó el porcentaje según la fórmula:

$$H(\%) = \frac{Abs\ blood\ 542nm}{Abs\ LH2O\ 542nm}$$

Donde H (%) es el porcentaje de hemólisis, Abs blood 542nm es la absorbancia de las muestras en la longitud de onda de 542nm y Abs LH2O 542nm es la hemólisis total después de hacer una ruptura celular (lisis) con agua destilada.

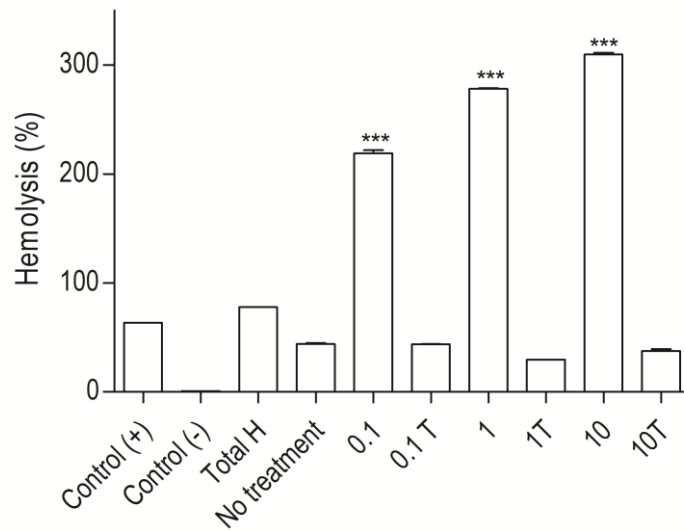


Figura 14. Hemólisis total a las 24 horas de exposición, donde evidentemente se muestra que el pesticida tratado por la lacasa reduce su efecto tóxico en eritrocitos humanos hasta llevarlos a niveles normales del control sin tratamientos.

Tabla 7. Hemólisis total

	Sin tratamiento	Con tratamiento
	% Hemólisis	% Hemólisis
Control	56.5 ± 0.01	
0.1	281.9 ± 0.06 *	56.1 ± 0.006
1	358.1 ± 0.01 *	37.5 ± 0.001 *
10	398.9 ± 0.03 *	48.2 ± 0.04

(*) Significativo $P < 0.001$ ANOVA dos vías

B.- Cultivos Microbiológicos

En las reservas de diclorofeno, se conservaron en medio de cultivo celular RPMI 1640 a 4°C; al crear la reacción del biorreactor, la mezcla también fue conservada en el mismo medio de cultivo a 4°C, aun así con el paso de las semanas, este último fue contaminado por un agente microbiológico. Se determinó en realizar cultivos de medio enriquecido LB y en cultivo bajo en nutrientes M9. Las muestras se incubaron a 37°C por

24 horas y se procedió a realizar tinción de gram para identificar el organismo por microscopía óptica.

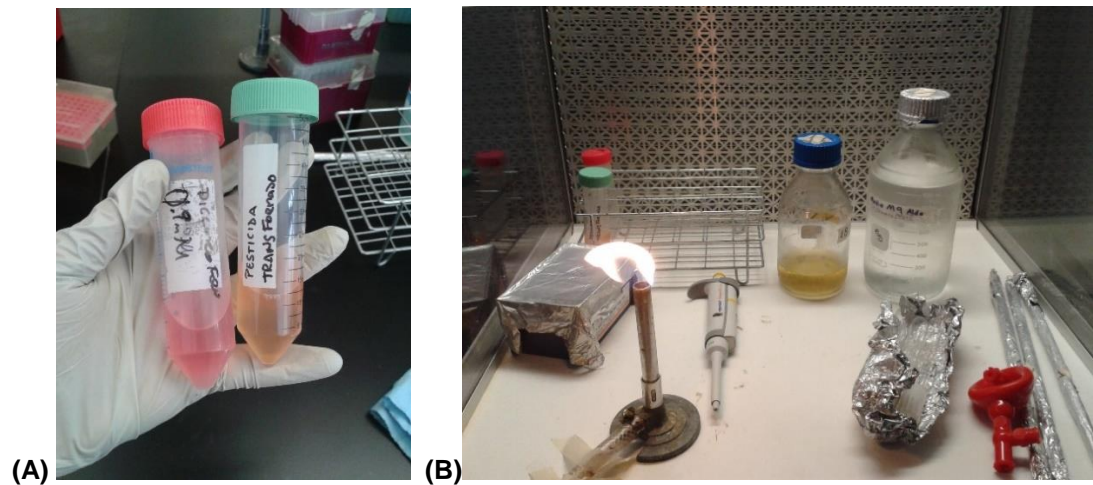


Figura 15. Stock del pesticida (izquierda - A) y de los productos (derecha - A) donde se evidencia una coloración diferente en el medio de cultivo, donde se asume que es contaminación microbiana. En la imagen (B) los cultivos realizados bajo la campana de flujo laminar.

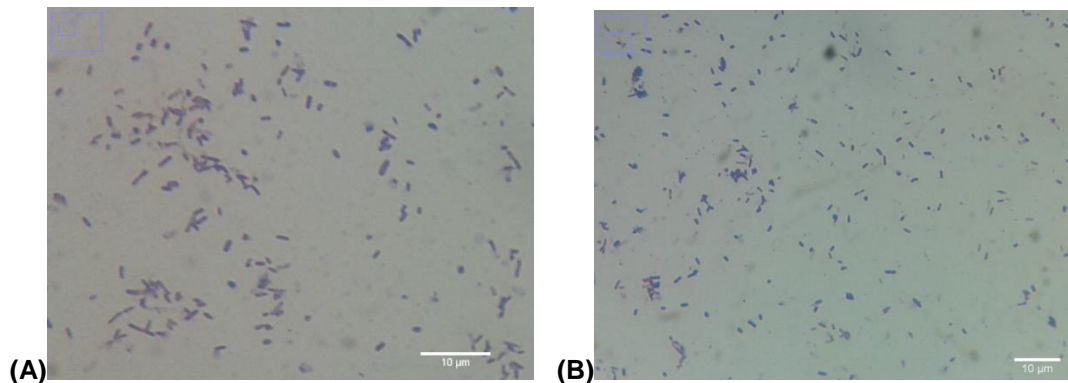


Figura 16. Microscopía del microorganismo en tinción de gram, la cuál detecta que es una bacteria en form de bacilo y es gram+ por lo que probablemente se trate de *B. subtilis* por la morfología y su capacidad de crecer en un medio en las condiciones de 4°C.

C.- Micronúcleos en células apoptóticas

La presencia de micronúcleos es una evidencia infalible de la pérdida de material genético al exponerse a agentes ambientales o al presentarse un padecimiento a la salud que varía desde anemia a cáncer (Bonassi, El-Zein, Bolognesi, & Fenech, 2011).

Durante el estudio se descubrieron varios micronúcleos en células con cariocinesis (separación de dos núcleos dentro de una sola membrana plasmática). Lamentablemente todas ellas estaban en proceso de apoptosis, por lo que no se contabilizaron, pero estas ocurrencias fueron frecuentes en las dosis del pesticida innato $0.1 \mu\text{molL}^{-1}$ y en $10 \mu\text{molL}^{-1}$ del pesticida transformado.

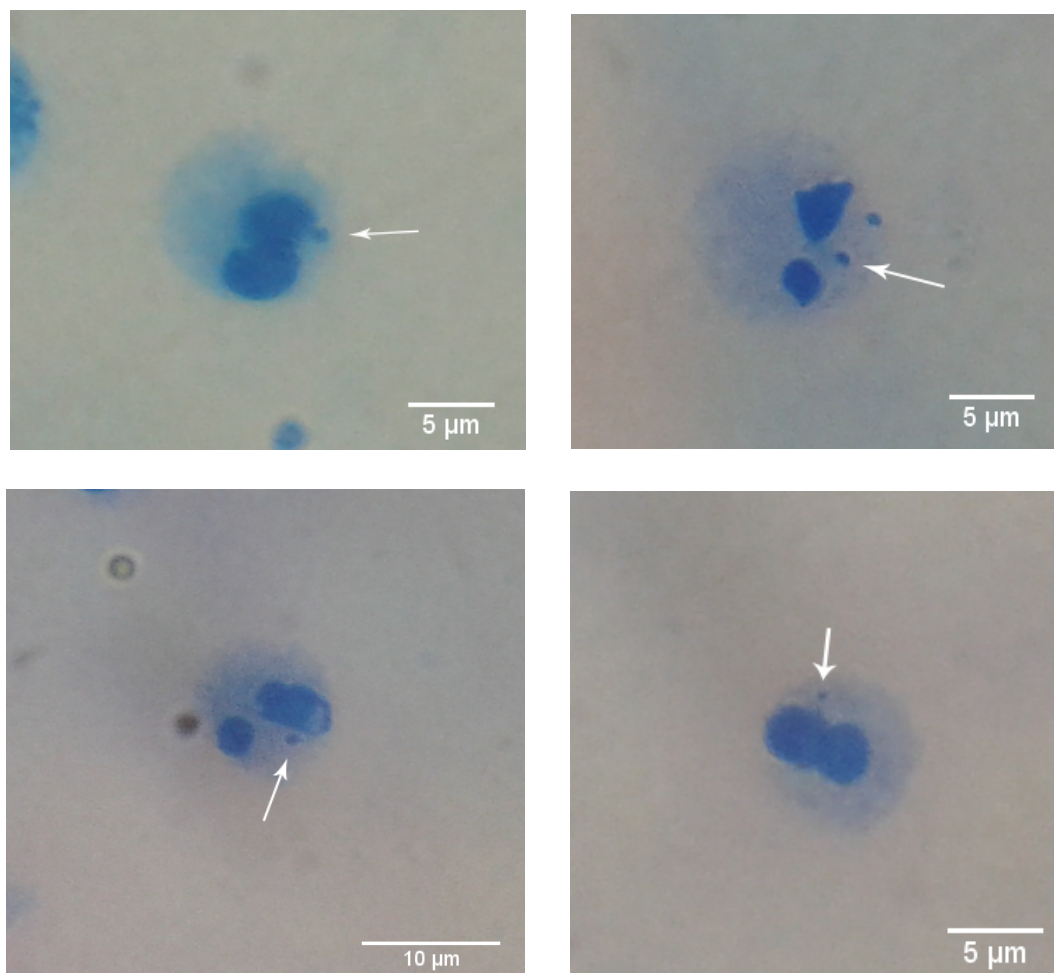


Figura 17. Micronúcleos encontrados en la concentración $0.1 \mu\text{molL}^{-1}$ de diclorofeno sin tratamiento enzimático.



Figuras 18. Micronúcleos encontrados en la dosis de $10 \mu\text{molL}^{-1}$ del pesticida transformado por lacasa.

D.- Imágenes de los tratamientos

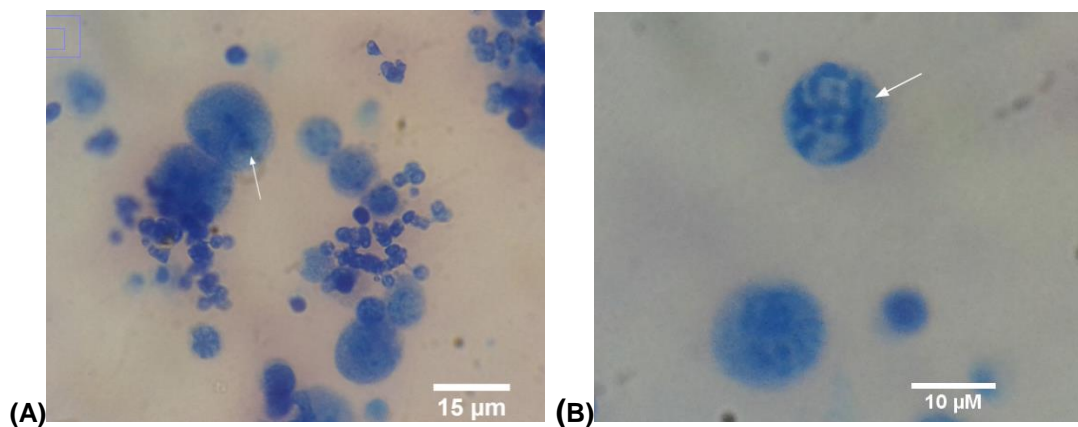


Figura 19. Las primeras 24 horas de exposición de diclorofeno en la concentración mínima. En la imagen (A) se observa una célula de dos núcleos con una anomalía en ambos, precediendo un daño dentro del material genético.

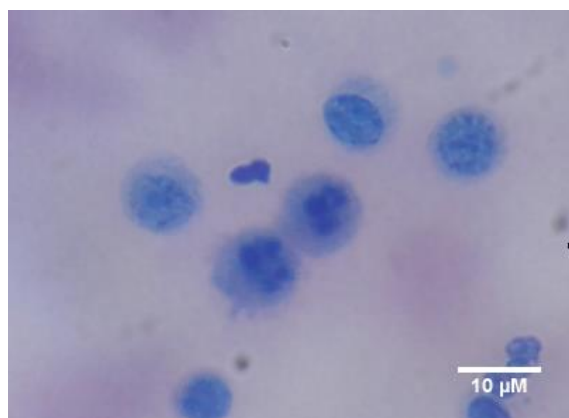


Figura 20. Par de células apoptóticas (centro) de la concentración $0.1 \mu\text{molL}^{-1}$ donde presentaron una mayor frecuencia que en otras concentraciones

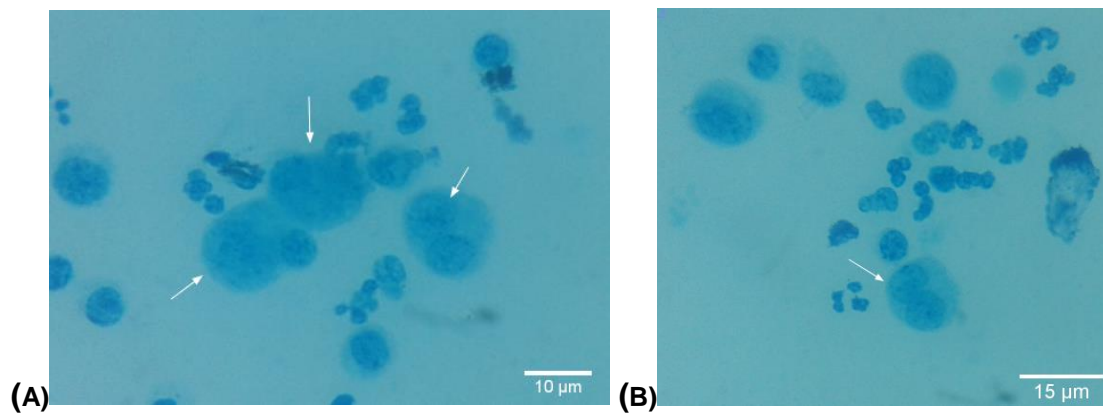


Figura 21. Primeras 24 horas de exposición de la dosis intermedia ($1 \mu\text{molL}^{-1}$) del pesticida sin tratamiento, en la imagen A se observan (flechas de izq. a der.) una gema nuclear, un puente de cromatina y otra gema nuclear. En la imagen B se nota una célula con un nexo altamente marcado entre sus dos núcleos.

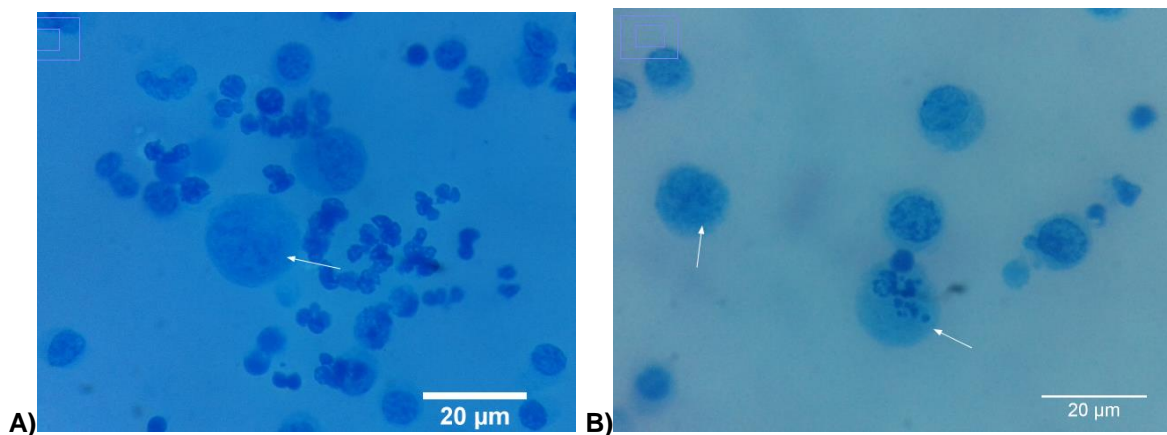
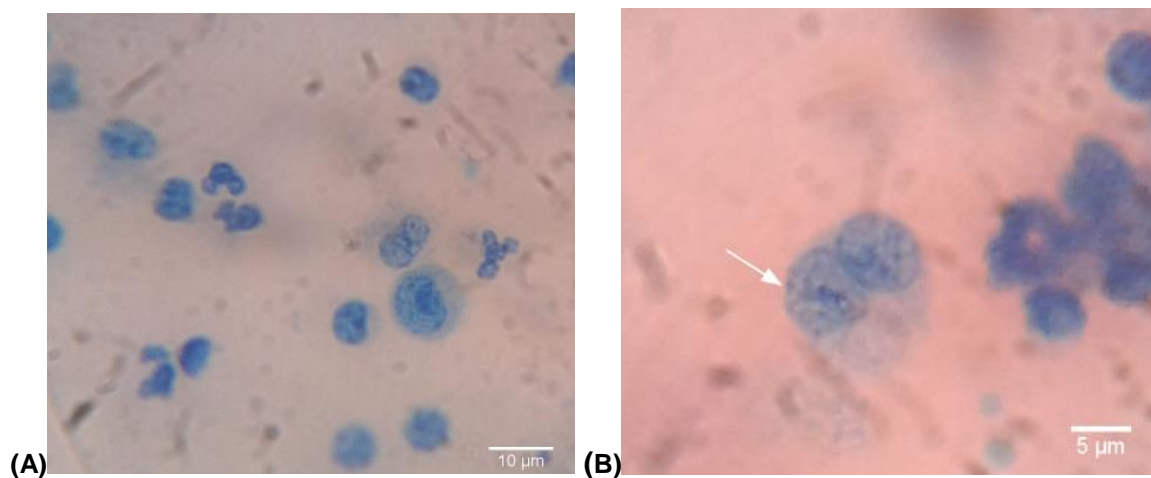


Figura 22. Células expuestas a 48 horas a $1 \mu\text{molL}^{-1}$ donde se encuentran gemas nucleares con una frecuencia semejante a las primeras 24 horas de dosificación (A) y flecha izquierda (B). Flecha derecha de imagen (B) célula en apoptosis tardía.



Figuras 23. Células encontradas a las 24 horas de la dosis máxima del pesticida sin transformar; encontrando en su mayoría células necrosadas y con su contenido sobresaliendo de su membrana plasmática (Flecha imagen B).

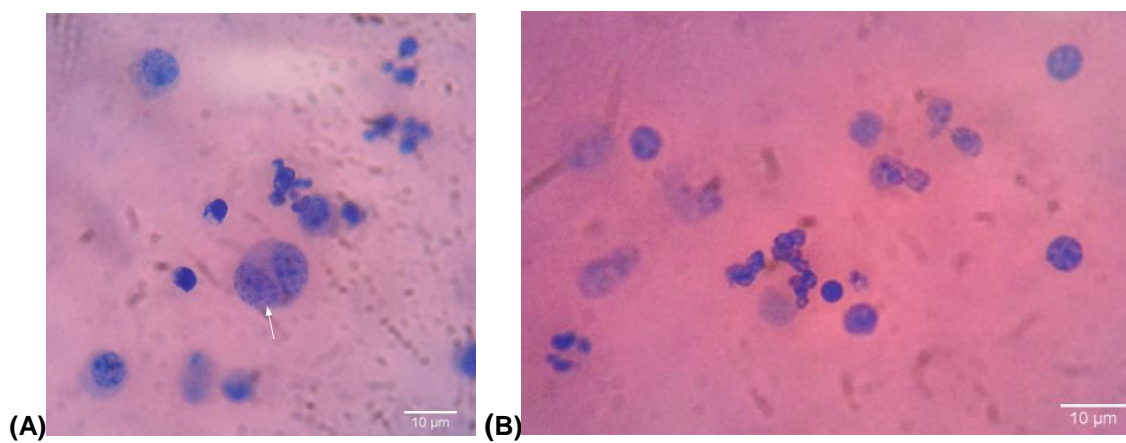


Figura 24. Daño celular encontrado en la dosis de 10 µmolL⁻¹ a 48 horas de haber añadido el pesticida innato. Se muestra una leve frecuencia de daño genético a comparación de las otras dosis (A), pero resalta de las demás concentraciones por su fuerte daño celular (B).

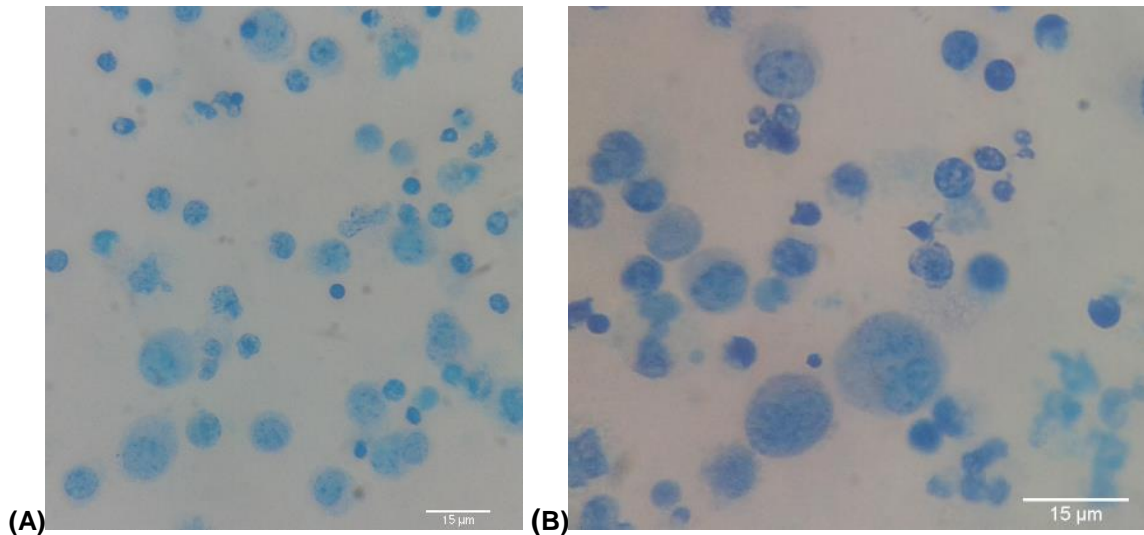


Figura 25. Imágenes de cultivos celulares expuestos a el pesticida transformado en $10\mu\text{molL}^{-1}$ (máxima concentración del estudio), no creo una mayor prferación que su antitesis sin tratamiento, pero se encontro células menos dañadas por efecto de necrosis y apoptosis; a su vez, las anomalías genotóxicas se encontraron con mayor frecuencia, posiblemente por una mayor cantidad de células sin daño físico y una mejor visibilidad de tales.

E.- Viabilidad Celular

En estudios de cultivos celulares, este es un protocolo común y se utiliza para ver la sobrevivencia de las células al concluir la exposición a un tratamiento. En este caso se realizó la prueba de MTT para ver el efecto del diclorofeno y de diclorofeno tratado con la enzima lacasa en esta prueba.

La técnica se realizó cultivando 5×10^4 linfocitos aislados estimulados con $10\mu\text{L}$ de Conavalina A (Con A) en medio RPMI 1640 adicionado con L – glutamina y aminoácidos no esenciales, se dosifico con diclorofeno puro y transformado y se incubaron por 48 horas a 37°C . Los controles fueron estimulación con Con A sin dosis de pesticidas, Control negativo 10% con DMSO y un control sin estimulación de Con A.

Transcurrido el tiempo se lavaron las células con medio de cultivo fresco con suero fetal bovino 10% y se centrifugaron a 1,500rpm por 5 minutos, al término del ciclo se trasladaron a una placa Elisa con $45\mu\text{L}$ de medio de cultivo y $5\mu\text{L}$ del colorante MTT, se mezcla bien y se dejaron incubando 4 horas.

Al concluir las 4 horas de incubación, se disolvieron los cristales de MTT con 50 μ L DMSO por media hora y se pasó a leer la placa en el espectrofotómetro con las longitudes de 570nm y 690nm, reduciendo la lectura de 570nm por la de 690nm que es la longitud del espectro del medio de cultivo. Tomando como 100% de sobrevivientes al control positivo que es la estimulación con Concaivalina A. Como lo representa la fórmula a continuación:

$$\frac{Abs\ 570 - Abs\ 690}{Abs\ 570\ Con(+)- Abs\ 690\ Con (+)} \times 100$$

Los resultados mostraron que no hubo reducción de la toxicidad en las dosis mínima y la mayor; la única en mostrar una respuesta positiva fue la dosis intermedia 1 μ molL⁻¹ y esto lleva a requerirse más réplicas con la sospecha de una pérdida de células durante el proceso de colorimetría.

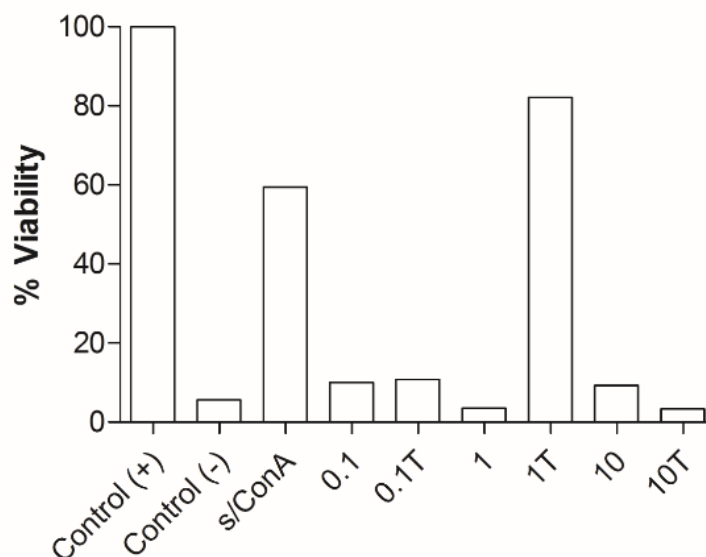


Figura 26. Prueba de MTT, donde la dosis favorecida fue la de 1 μ molL⁻¹ donde hubo un recobro casi totalitario.