

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Trabajo de Fin de Máster

ALTERACIONES TRANSCRIPTÓMICAS INDUCIDAS POR CLORPIRIFÓS EN UN MODELO DE CÉLULA GLIAL HUMANA

Curso académico 2018 – 2019

Autor:

Ariel José Arias Zepeda
Licenciado en Medicina y Cirugía (UNAN – León)

Tutores:

Eugenio Vilanova Gisbert

Catedrático de Toxicología, UMH

Miguel Ángel Sogorb

Catedrático de Toxicología, UMH

Héctor Candela Antón

Profesor Titular de Genética, UMH

Elche, septiembre de 2019

Declaración de los tutores

D. Eugenio Vilanova Gisbert, D. Miguel Angel Sogorb Sanchez, Profesores del Área de Toxicología y D Héctor Candela Antón Profesor del Área de Genética, investigadores del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

Que

D. **Ariel José Arias Zepeda**, estudiante del Máster en Biotecnología y Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado:

Alteraciones transcriptómicas inducidas por clorpirifós en un modelo de célula glial humana,

incluido en la memoria de este Trabajo Fin de Máster. El presente trabajo se ha llevado a cabo en los laboratorios de los profesores tutores del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, expiden y firman la presente certificación,

Fdo.: Prof. Eugenio Vilanova Gisbert
Catedrático de Toxicología

Fdo.: Prof. Miguel Angel Sogorb Sánchez
Catedrático de Toxicología

Fdo.: Prof. Héctor Candela Antón
Profesor Titular de Genética

Elche 2 septiembre 2019

Agradecimientos personales

A mi madre, **María Esperanza Zepeda González** por ser fuente de inspiración y fortaleza, y por enseñarme el primer mandamiento con promesa (*Efesios 6:2-4*).

Al maestro, Profesor Dr. **Eugenio Vilanova Gisbert**, por aportar incalculablemente en mi formación como persona y científico.

“Ve do vas y como vieres así haz” (La Lozana Andaluza 114)

Al maestro Dr. **Edmundo Torrez Godoy** por brindarme su apoyo incondicional y ser ejemplo tangible de bondad y humanidad, aún en momentos donde es difícil discriminar el “bien y el mal”.

Al **Profesor Dr. Miguel Ángel Sogorb**, quien con paciencia, esmero y sabiduría me ha acompañado en esta etapa formativa.

Al **Dr. Hector Candela Antón** cuyo bagaje intelectual y asesoría han hecho posible la elaboración de este trabajo.

A mi compañera, colega y profesora Dra. Encarna Fuster Muñoz, que con su tiempo y conocimientos ha aportado de forma significativa a mi formación.

A los cientos de jóvenes nicaragüenses que perdieron la vida desde abril de 2018, por defender el ideal de una **Nicaragua libre**.

“Viva Nicaragua Libre” y “Que se rinda tu madre” [Amaya Evan Coppens]

[Álvaro Conrado, dot, dot, dot... PRESENTES!!]

Al maestro **Dr. Ramiro Flores**, quien desde los inicios de mi formación médica me enseñó la importancia de practicar la profesión **desde la óptica del paciente**.

Al amigo **Dr. Roberto Ruiz Cruz** por mostrarme la importancia del pluralismo cultural (lección de vida dura pero necesaria)

“....y un día te despiertas, vas en motocicleta, llueve, y pides un cola cao!!...”

“De un médico de campaña para otro” [Relatos para Casandra]

A **Estefanía Moreno Amador**, por darme aliento y fuerzas en la soledad que sólo “Benq” y el extranjero ofrecen

...ahora tengo una mirada desconocida...!!!!

Fuente de financiación y agradecimientos institucionales

El presente Trabajo de Fin de Máster se ha desarrollado dentro del proyecto de investigación titulado: "Hacia un nuevo paradigma en la identificación de peligros y evaluación de la seguridad y el riesgo de neurotoxicidad asociado la exposición a nanomateriales con aplicaciones biotecnológicas" (referencia CIVP18A3939) financiado por la Fundación Ramón Areces en el marco del XVIII Concurso Nacional de Investigación en Ciencias de la Vida y la Materia y cuyo investigador principal es el Profesor Miguel Ángel Sogorb Sánchez.

Mi estancia en la UMH y la formación científica que me ha proporcionado ha sido posible gracias a una ayuda de Cooperación Internacional de la UMH, dentro del convenio de Programa de Cooperación Universitaria al Desarrollo 2017 de la Universidad Miguel Hernández de Elche (2017-2019) (Proyecto Nicaragua) dentro del Convenio de Cooperación 2017 entre la UMH y la Generalitat Valenciana.

Durante mi estancia en la UMH, al mismo tiempo que me formaba científicamente en este Máster, he colaborado en las actividades del proyecto de cooperación arriba citado evaluando la relación entre factores químicos ambientales y calidad de agua con la epidemiología de la enfermedad renal crónica de origen desconocido. Además, he colaborado con los Profs. Vilanova y Sogorb en el diseño de proyectos futuros de cara a esta cooperación.

También me he formado en aspectos relacionados con la Cooperación, participando en el segundo semestre del Máster de Cooperación Internacional al Desarrollo, y para el que he recibido una ayuda beca de fondos de este.

La formación científica y las técnicas aprendidas serán de gran valor en los nuevos planteamientos de la cooperación en temas de salud ambiental en Centroamérica aplicando las avanzadas estrategias de biomarcadores moleculares con aproximaciones genómicas, proteómicas, enzimáticas, inmunoensayo multiparamétricas y técnicas químicas analíticas para análisis masivo de factores ambientales.

Por todo ello, expreso mi profunda gratitud, a la Universidad Miguel Hernández, al Servicio de Cooperación Internacional, al Instituto de Bioingeniería y al Grupo de Investigación UMH de Toxicología y Salud Medioambiental formado por los profesores Eugenio Vilanova Gisbert, Miguel Angel Sogorb Sanchez, Jorge Estevez Domenech, así como a todos los compañeros en el laboratorio, a los compañeros y profesores del Máster de Biotecnología y Bioingeniería y del Máster de Cooperación Internacional.

Expreso un profundo agradecimiento a la Bicentenario casa de estudios Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN – León, donde efectué los estudios de pregrado en Medicina, bajo la dirección de un honorable personal docente. Agradezco particularmente al CISTA UNAN – León por la oportunidad e interés brindado en pro de mi formación en el extranjero, siendo indispensable para tal fin su colectivo investigador, profesores Edmundo Tórrez, Luis Blanco, Aurora Aragón, Edipsia Roque y Teresa Rodríguez.

RESUMEN

El clorpirifós es un plaguicida organofosforotionato (OPT) ampliamente utilizado a nivel mundial como insecticida. Como otros organofosforados (OP), este ha sido vinculado con efectos tóxicos tanto agudos como crónicos en distintos sistemas corporales, especialmente en sistema nervioso e hígado. Los mecanismos moleculares aceptados (p.ej. inhibición de la AChE) explican fundamentalmente la toxicidad aguda. Existen otros mecanismos moleculares (p.ej. inhibición de la NTE) que explican solo parcialmente los efectos retardados y hay deficiencia de explicación de los efectos adversos crónicos. Existe por tanto la necesidad de identificar mecanismos adicionales que expliquen totalmente dichos efectos, tanto a nivel celular como molecular. El objetivo de este estudio fue identificar las alteraciones transcriptómicas en células de origen humano de glioblastoma línea T98G expuestas a CPF. Además, se buscaron productos proteicos capaces de explicar las alteraciones celulares observadas. Mediante un modelo de neuroglia y valiéndose de la tecnología Illumina HiSeq NGS (Next-Generation Sequencing), se identificaron genes expresados diferencialmente entre las células expuestas a CPF y las células control. El análisis ontológico de estos genes evidenció la presencia de una respuesta inflamatoria manifiesta en estas células. Utilizando herramientas bioinformáticas aplicadas al reconocimiento de patrones, bajo el lenguaje de programación R y el IDE RStudio, se recuperó una lista de proteínas cuyas secuencias contenían los patrones analizados, considerándose susceptibles de ser modificadas por CPF, y por tanto capaces de explicar el inicio y/o la continuidad de las alteraciones celulares observadas.

Palabras clave: clorpirifós, organofosforados, organofosforotionato, T98G, glioblastoma, transcriptoma, NGS, Illumina, RNAseq, análisis ontológico, análisis bioinformático.

ABSTRACT

Chlorpyrifos (CPF) is an organophosphorothionate (OPT) compound widely used as a pesticide worldwide as insecticide. As other organophosphorus compounds (OP) it has been associated with both acute and chronic toxicity in different organ systems, including the liver and nervous system. There are some accepted molecular (eg. NTE inhibition) mechanisms that partially explain the delayed neurotoxicity and only minimum explanation of chronic adverse effects. A complete understanding of these and other alternatives mechanisms is lacking, especially at the cellular and molecular level. The aim of this study was to identify the transcriptomic alterations in T98G human glioblastoma cell line after CPF exposure. Additionally, we searched for protein gene products capable of explaining the observed alterations. Using a model of glial cells and the Illumina HiSeq NGS (Next-Generation Sequencing) technology, we found genes differentially expressed between the exposed and control cells. Through an ontological approach we observed that the protein products of the differentially expressed genes were linked with an overt inflammatory response in these cells. Via a bioinformatic strategy of pattern recognition, using R programming language with the IDE RStudio through Bioconductor Packages, we recovered a list of proteins whose sequences contained a pattern susceptible to be modified by CPF, and as such be related in an explanatory way with the found alterations.

Keywords: chlorpyrifos, organophosphorus compounds, organophosphorothionate, T98G, glioblastoma, transcriptome, NGS, Illumina, RNAseq, ontological analysis, bioinformatic analysis.

ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina	MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide
AchE: Acetilcolinoesterasa	NaP: Sodium Pyruvate
ACTI: Área Científica y Técnica de Investigación, Universidad de Murcia.	NEAA: Non-Essential Amino Acids
AOP: Adverse Outcome Pathway	NGS: Next-Generation Sequencing
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	NR: Neutral red test. 3-amino-7dimethyl-2-methylphenazine hydrochloride
ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico	NTE: Neuropathy target esterase /neurotoxic esterase/ Esterasa diana de neuropatía /PNPL6 (gene)
BuChE: Butirilcolinesterasa	OMS: Organización Mundial de la Salud
CAS: Chemical Abstracts Service	OP: Compuestos organofosforados
CAS#: Chemical Abstract Number	OPIDN: OP-induced delayed neuropathy /neuropatía retardada inducida por OP
CE: Carboxilesterasa	OPT: Organophosphorothionate
CPF: Clorpirifós	PBPK: Physiologically-based pharmacokinetic models
CPFO: Clorpirifós oxón	PBS: Phosphate-buffered saline
CYP: Citocromo P450	PC: Partitioning coefficient
DEP: Dietil fosfato	PON: Paraoxónasa
DETP: Dietil tiofosfato	POX: Paraoxón
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium	RNAseq: ARN massively parallel sequencing
DMSO: Dimetil sulfoxide	RIN: RNA integrity number
EDTA: Acido etilendiamino tetraacético	SDS: Sodium dodecyl sulfate /dodecyl sulfato sódico
EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium	SFB: Suero fetal bovino
EPA: Environmental Protection Agency of United States	t_{1/2}: vida media
FDR: False Discovery Rate	TCP: 3,5,6-tricloro-2-piridinol
GSH: Glutati6n	UE: Uni6n Europea
K_{ow}: Coeficiente de reparto octanol-agua (Partition coefficient [<i>n</i> -octanol and water])	
LOAELs: Lowest observed adverse effect levels /Dosis mas baja con efecto adverso observado	
MEM: Minimum Essential Medium Eagle	

TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción y antecedentes	10
1.1. Los compuestos organofosforados – Características químicas	10
1.2. El clorpirifós (CPF).....	11
1.2.1. Características generales del CPF	11
1.2.2. Propiedades toxicocinéticas del CPF	12
1.2.3. Situación legal del clorpirifós en Europa (en agosto 2019).....	16
1.2.4. Perfil toxicológico del CPF	17
2. Objetivos.....	19
2.1. Planteamiento del problema	19
2.2. Objetivo General	19
2.3. Objetivos Específicos	19
3. Materiales y métodos	20
3.1. Reactivos y disoluciones	20
3.1.1. Medio de cultivo	20
3.1.2. Tripsina/EDTA, 0.25% (T/E).....	21
3.1.3. Plaguicidas.....	21
3.2. Cultivos celulares y manejo de las células T98G	22
3.2.1. Línea celular.....	22
3.2.2. Rutina de subcultivo, concentración y congelación de las células	22
3.2.3. Exposición de las células a organofosforados.....	24
3.2.4. Determinación de la viabilidad celular	24
3.2.5. Aislamiento del ARN	25
3.3. Secuenciación de ARN masivamente paralela.....	27
3.4. Procesamiento bioinformático.....	28

3.4.1. Análisis ontológico	29
4. Resultados y discusión	31
4.1. Análisis ontológico	31
4.1.1. Conjuntos de datos utilizados y Categorías funcionales.....	31
4.1.2. Clasificación funcional de los genes expresados en las células control.....	31
4.1.3. Análisis de sobre-representación en las células control.....	32
4.1.4. Genes para el análisis ontológico en células tratadas con CPF.....	35
4.1.5. Análisis de enriquecimiento en células tratadas por CPF	35
4.1.6. Clasificación funcional de genes expresados en células tratadas con CPF.....	35
4.1.7. Sobre-representación en células expuestas a CPF versus REF_00.....	38
4.1.8. Sobre-representación en células expuestas a CPF versus REF_01.....	41
4.1.9. Análisis de rutas intracelulares sobre representadas.....	43
4.2. Búsqueda de dianas para OP.....	46
5. Conclusiones	50
6. Referencias bibliográficas	51
7. Anexos	60

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS – CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

Tras la introducción del paratión en 1944, los compuestos organofosforados (OP) fueron los plaguicidas más utilizados a nivel mundial (Klaassen, 2008). Los insecticidas OP pueden ser considerados como derivados del ácido fosfórico o del ácido fosfónico en los cuales todos los átomos de hidrógeno han sido reemplazados por grupos orgánicos (H. W. Chambers, Meek, & Chambers, 2010). En su estructura química general (figura 1) encontramos un grupo X (también denominado “L”) (“Leaving group”, el más susceptible a la hidrólisis), los grupos R₁ y R₂ (fundamentalmente grupos alcoxi) y un grupo X (oxígeno o azufre) unido mediante un doble enlace a un fósforo central. En muchos OP, uno o más átomos de oxígeno son reemplazados por azufre y/o nitrógeno (figura 2). Sobre la base de sus diferencias químicas podemos clasificar a los OP en fosfatos, fosforotioatos, fosforoamidatos, fosfonatos, entre otros (figura 2). La mayoría de los plaguicidas comerciales son fosforotioatos (P=S) y se biotransforman a sus análogos óxidos (P=O), los cuales están implicados en sus efectos tóxicos (Klaassen, 2008).

Figura 1. Estructura química general de los insecticidas OP.

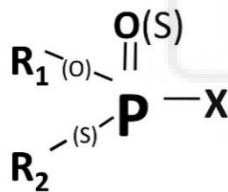
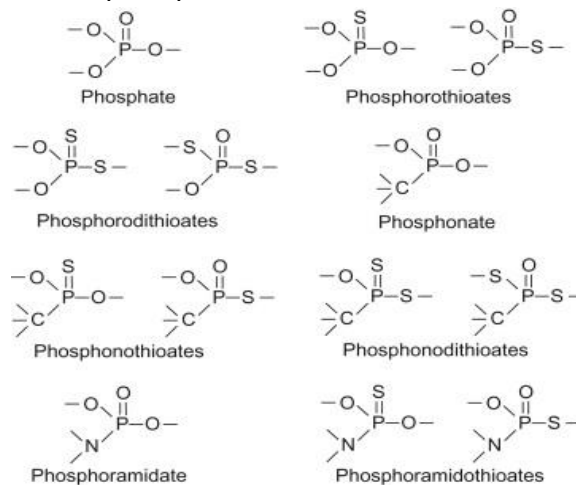


Figura 2. Nomenclatura de las principales subclases de insecticidas OP.



Hayes's Handbook of Pesticide Toxicology, 2010.

1.2. EL CLORPIRIFÓS (CPF)

1.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CPF

El clorpirifós (CPF) es un insecticida organofosforotionato (OPT) que presenta actividad anticolinesterasa no sistémica (a saber, por contacto, gastrointestinal y respiratorio). Ha sido utilizado ampliamente en agricultura, horticultura, viticultura y silvicultura. El clorpirifós tiene usos tanto residenciales como no residenciales (Testai et al., 2010), si bien en la Unión Europea (EU) no está autorizado para su uso como insecticida doméstico, ya que la industria no solicitó su registro en la Directiva de Biocidas.

La Agencia de Protección Ambiental estadounidense (EPA) estima que, en Estados Unidos, antes de 2010, se utilizaban más de 20 millones de libras de CPF por año, siendo la mayoría aplicado en ambientes no agrícolas (EPA, 2002). El uso extendido de este compuesto se debe a su amplio espectro y a su elevado costo – efectividad en relación con productos alternativos. La volatilización medioambiental del CPF es un proceso disipativo significativo y su lixiviación es irrelevante, con lo que el riesgo de persistencia ambiental y de contaminación de aguas subterráneas es insignificante.

Actualmente, el CPF está registrado en más de 100 países, tanto de renta alta como de renta baja, siendo las acciones regulatorias más restrictivas en los primeros, limitando el uso de este compuesto fundamentalmente a actividades agrícolas. Por otro lado, en los países de renta baja existe un uso menos restrictivo del CPF, con lo que en estos lugares se registra una mayor frecuencia de intoxicaciones agudas. Aunque este compuesto se ha considerado seguro desde una perspectiva medioambiental y de salud humana, es poco lo que se sabe respecto a sus efectos tóxicos crónicos (Testai et al., 2010).

El CPF es un sólido cristalino de incoloro a blanco. Es sólo parcialmente soluble en agua, siendo soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos ($K_{ow}=50,000$). Se degrada lentamente en el suelo tanto en condiciones aerobias como anaerobias con una vida media entre 60 y 120 días, degradándose a 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) el cual posteriormente se degrada a compuestos organoclorados y dióxido de carbono. La concentración medioambiental aceptable es de 1 µg/l, incluso ante múltiples aplicaciones (Testai et al., 2010; WHO, 2015). La tabla 1 muestra algunas características fisicoquímicas adicionales del CPF.

Tabla 1. Características fisicoquímicas del CPF

Propiedad	Valor
Número de registro CAS	2921-88-2
Peso molecular	350.6
Presión de vapor	3.35 mPa at 25°C
Punto de fusión	41.5–42.5°C
Punto de ebullición	<300°C
Densidad	1.51 g/ml at 21°C

1.2.2. PROPIEDADES TOXICOCINÉTICAS DEL CPF

Absorción

El CPF se absorbe bien a través de la mucosa gastrointestinal, el epitelio respiratorio y la piel. La absorción oral del CPF es rápida (C_{max} sanguínea de 3 horas para sus tres metabolitos). En humanos se estima una absorción oral aproximada del 70% y 93% para dosis de 0.5 y 1 mg CPF/kg de peso corporal, respectivamente (Testai, Buratti, & Di Consiglio, 2010; Timchalk et al., 2002)

El clorpirifós puede ser absorbido mediante el tracto respiratorio, lo que se demuestra por los efectos agudos observados en animales tras la exposición inhalatoria aguda (Berteau & Deen, 1978; Testai et al., 2010). En humanos, se han reportado porcentajes de inhibición de la BuChE entre el 19% - 32% tras la exposición de trabajadores implicados en la producción del clorpirifós a concentraciones que oscilaban entre 10 y 1100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Brenner, Bond, McLaren, Green, & Cook, 1989).

La absorción percutánea del CPF ha sido demostrada en estudios con animales mediante la inducción de efectos tóxicos posterior a la exposición dérmica. Se ha obtenido un valor del 3% tras la razón de los LOAELs de exposición oral y dérmica (EPA, 2002). En humanos se ha determinado un valor de absorción dérmico entre 1% y 3%, basado en la recuperación urinaria de TCP, aunque algunos estudios sugieren que podría ser mayor (hasta un 10%) (Griffin, Mason, Heywood, & Cocker, 1999; Krieger, 1995; Testai et al., 2010).

Distribución

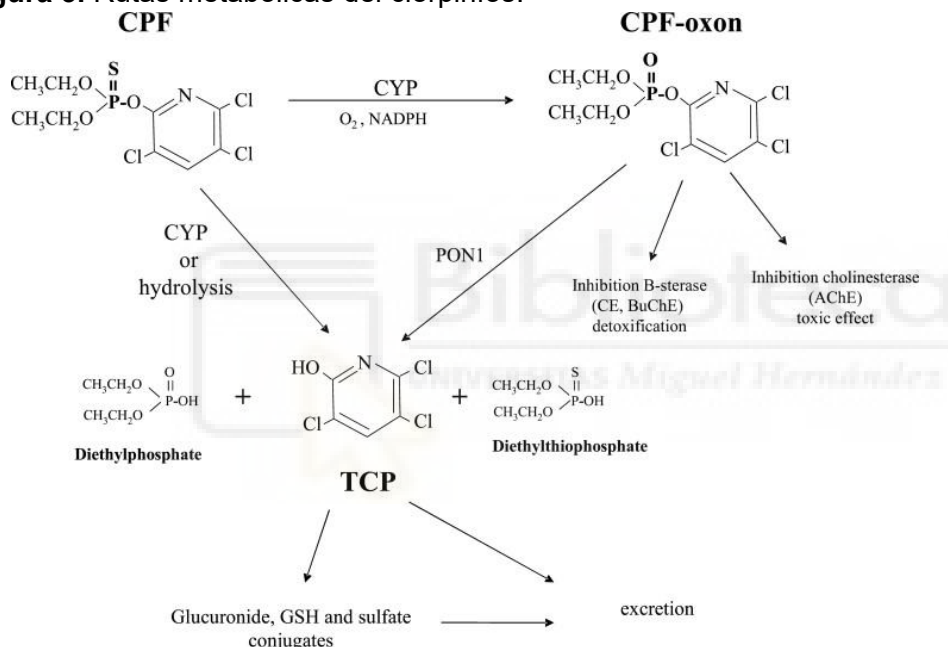
Basándose en los coeficientes de partición octanol:agua y en el contenido de lípidos en distintos tejidos, se ha calculado la distribución de CPF entre distintos tejidos y el plasma, de

esta forma se muestra que la distribución en grasa (435:1) >> cerebro (33:1) > hígado (22:1) > riñón (10:1). Aunque el clorpirifós oxón (CPFO) es menos lipofílico que el CPF, se ha determinado un patrón de distribución similar, por lo que se puede inferir que existe una tendencia de ambos compuestos para acumularse en el tejido adiposo, si bien sus tasas de biotransformación y de excreción impiden en gran medida esta bioacumulación (Testai et al., 2010; Timchalk et al., 2002). Estudios en animales y en humanos sugieren que el CPF y sus metabolitos pueden atravesar la placenta y alcanzar los tejidos fetales (Abdel-Rahman et al., 2002; Whyatt & Barr, 2001).

Metabolismo

La figura 3 muestra las distintas rutas metabólicas del CPF.

Figura 3. Rutas metabólicas del clorpirifós.



Tomado de *Hayes's Handbook of Pesticide Toxicology*, 2010.

Dentro de las principales rutas metabólicas se encuentran:

- Desulfuración oxidativa del grupo P=S a P=O, catalizado por oxidasas dependientes del citocromo P450 (CYP), lo que resulta en la formación del intermediario tóxico clorpirifós oxón (CPFO). Este es un proceso de bioactivación.
- Desarilación catalizada por CYP, lo que resulta en la formación de TCP y dietil tiosfosfato (DETP). Este es un proceso de detoxificación.
- Hidrólisis por A-esterasas (paraoxonasas [PON1]) de los enlaces éster fosfato del CPFO con la formación de dietil fosfato (DEP). Esta es una reacción de detoxificación.
- Unión y/o hidrólisis por B-esterasas como las aliesterasas (carboxilesterasa [CE]) y la BuChE. Estas enzimas actúan como secuestradores moleculares (molecular

scavengers) mediante su unión estequiométrica con el CPFO. Esta es una reacción de detoxificación.

- Conjugación del CPFO con glutatión reducido (GHS), catalizado por enzimas glutatión-S-transferasas (GST). Esta es una reacción de detoxificación.
- Conjugación del TCP con sulfato o con ácido glucurónico, para formar los correspondientes conjugados sulfatos o glucurónidos, que facilitan la eliminación del TCP. Estas reacciones son catalizadas por enzimas sulfotransferasas y glucuronil-transferasas, respectivamente. Representan reacciones de detoxificación.

El CPF es un inhibidor débil de la AChE, si bien puede ser activado (desulfuración oxidativa) mediante enzimas del CYP450 para formar el triéster fosfato CPFO, el cual es un potente inhibidor de la AChE sérica y cerebral (Forsyth & Chambers, 1989; Sultatos, 1994; Sultatos, Minor, & Murphy, 1985). El sitio principal del metabolismo del CPF es el hígado, si bien se ha reportado metabolismo en tejidos extrahepáticos, como el cerebro y el intestino (J. E. Chambers & Chambers, 1989; Poet, Wu, Kousba, & Timchalk, 2003). Al comparar el metabolismo del CPF en cerebro e hígado de ratas, los microsomas hepáticos mostraron mayor actividad (>1000 veces) (J. E. Chambers & Chambers, 1989; Pond, Chambers, & Chambers, 1995).

Las CYPs implicadas en las reacciones de desarilación/desalquilación son CYP1A2, 2B6, 3A4, 3A5, 3A7, 1A1, 2C9, 2C19 y 2D6 (Buratti, Leoni, & Testai, 2006; Buratti, Volpe, Meneguz, Vittozzi, & Testai, 2003; Mutch & Williams, 2006; Sams, Cocker, & Lennard, 2004). El CYP2B6 parece tener la mayor eficiencia catalítica para producir CPFO, mientras que CYP2C19 está involucrado principalmente en la desarilación del CPF (Tang et al., 2001); las otras isoformas producen niveles variables de ambos metabolitos en dependencia de la dosis de CPF.

Algunas de las CYPs activas (2B6, 1A2 y 2C9) son enzimas polimórficas, por tanto, el polimorfismo genético puede ser una causa de la diferente susceptibilidad interindividual ante los efectos tóxicos inducidos por el CPF (Ingelman-Sundberg, 2002).

Junto con las reacciones de desarilación/desalquilación del CPF catalizadas por diferentes CYPs, la hidrólisis del CPFO a compuestos inactivos mediada por oxonasas plasmáticas (PON1) representa la vía principal de detoxificación (Costa, Cole, Vitalone, & Furlong, 2005; Li, Furlong, & Costa, 1995; Pond et al., 1995). La PON1 es activa sobre CPFO y no es capaz de hidrolizar el CPF (Costa et al., 2005). La PON1 es polimórfica; sus alelos Q192 y R192 muestran diferente eficacia enzimática en dependencia del sustrato, siendo R192 más eficiente en la hidrólisis del CPFO (Costa, 2006).

Las CE se unen estequiométricamente al CPFO y actúan como dianas alternativas a la AChE, disminuyendo la concentración del CPFO en sangre (J. E. Chambers & Carr, 1993; Kutz, Cook, Carter-Pokras, Brody, & Murphy, 1992; Pond et al., 1995; Talcott, Mallipudi, Umetsu, & Fukuto, 1979). Estas enzimas son una familia multigénica ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos, con mayores niveles de expresión en hígado, sistema gastrointestinal y cerebro (T. Satoh & Hosokawa, 1998; Tetsuo Satoh et al., 2002). *Li et al*, (2005) han demostrado que la actividad CE del suero humano está prácticamente ausente en comparación con ratas (Satoh et al., 2002), y hCE2 en el intestino (Imai, Taketani, Shii, Hosokawa, & Chiba, 2006), si bien no se ha clarificado cual está implicada en la detoxificación del CPF.

La BChE es la colinesterasa predominante en suero (> 99%), siendo la defensa principal contra la toxicidad por CPF. Su porcentaje de inhibición, junto con la detección urinaria de TCP y la actividad de la AChE eritrocitaria han sido utilizados como biomarcadores de exposición al CPF (Testai et al., 2010). Se ha descrito que la actividad plasmática de la BChE está relacionada negativamente con la concentración urinaria de TCP (Garabrant et al., 2009).

La conjugación de GSH con CPF o CPFO mediada por GST se ha evidenciado por la presencia de metabolitos derivados del glutatión, en orina de pacientes con intoxicaciones agudas por CPF (Bicker, Lämmerhofer, & Lindner, 2005). Otras enzimas que participan en el metabolismo del CPF son las glucuronil transferasas y sulfotransferasas, las cuales conjugan el CPF con ácido glucurónico y sulfato. Los conjugados son mucho más hidrofílicos que el CPF y pueden ser excretados por la bilis y/o la orina (Bicker et al., 2005; Choi, Joo, Rose, & Hodgson, 2006).

Eliminación

La principal ruta de eliminación del CPF es la excreción urinaria, siendo el TCP el metabolito más abundante. Otros metabolitos son el DEP', DETP, conjugados GSH, sulfatos y glucurónidos (Bicker et al., 2005; Nolan, Rick, Freshour, & Saunders, 1984). El CPF sin metabolizar no se presenta en la orina. La $t_{1/2}$ de eliminación en humanos se estima de 27 horas, con la tasa máxima de excreción de TCP, tras una exposición dérmica, ocurriendo entre las 24 – 48 horas (Nolan et al., 1984).

El CPF también puede ser eliminado por la bilis como conjugados GSH y glucurónidos, los cuales pueden ser hidrolizados en el lumen intestinal y ser reabsorbidos entrando en un ciclo de circulación enterohepática (Hirom, Millburn, Smith, & Williams, 1972; Testai et al., 2010). Otra ruta de eliminación el CPF es mediante la leche materna, la cual al ser relativamente rica en grasa puede acumular el CPF y el CPFO (Sanghi, Pillai, Jayalekshmi, & Nair, 2003).

1.2.3. SITUACIÓN LEGAL DEL CLORPIRIFÓS EN EUROPA (EN AGOSTO 2019)

La *Directiva 98/8/CE* (CE, 1998), estableció un programa de revisión de todas las sustancias activas y productos biocidas en uso en la UE, con un calendario para que la industria presente expediente de solicitud de incluir dichas sustancias activas en la lista de biocidas autorizados de acuerdo con dicha Directiva. Esta Directiva fue sustituida por el *Reglamento (UE) no 528/2012* (UE, 2012).

En ese programa el clorpirifós como biocida de tipo insecticida, le correspondía el plazo hasta 2006. La empresa propietaria del clorpirifós en su uso como biocida, declinó hacer dicha solicitud, y usar en sus productos otras sustancias activas. Como consecuencia, cumplido el plazo, y no habiéndose interesado otra empresa, dejó de estar autorizado para su uso, y se formaliza en una Decisión publicada en 2007 (CE, 2007).

Por el contrario, la empresa propietaria registró el CPF como sustancia activa como insecticida para uso agrícola y esta licencia vence en enero 2020. En la base de datos de registro de fitosanitarios en España, hay en total 12 productos registrados con CPF en 4 formulaciones al 0,3, 1, 5 y 48% para diversas aplicaciones agrícolas (MAPA, 2019). Tienen fecha de caducidad 2020 y pendiente de que se apruebe o no la renovación de la sustancia activa.

Actualmente (2019) está en proceso de revisión de la solicitud de renovación de la sustancia activa cuya licencia vence en enero 2020. El dossier de renovación generó el correspondiente RAR (*Rapporteur Assessment Report*) (EC, 2017) y está disponible y se expuso a consulta pública (EFSA, 2017).

El 2 de agosto 2019, la EFSA ha hecho públicos dictámenes (*Statements*) finalizados en julio 2019 (a petición de la CE) (EFSA, 2019a) tanto para el clorpirifós (EFSA, 2019c) como para el clorpirifós-metil (EFSA, 2019b). Concluye que hay motivos de preocupación en riesgos a la salud, especialmente en base a potenciales efectos al desarrollo y propone clasificación 1B (pendiente para el caso del metil-CPF). Concluye con la imposibilidad de establecer valores de AOEL para evaluación de riesgo. La conclusión del dictamen es que no cumple los criterios sobre riesgos a la salud humana. Sobre esta base corre el riesgo de que no se aprobase la renovación de la autorización o se le impusiera fuertes restricciones.

1.2.4. PERFIL TOXICOLÓGICO DEL CPF

El mecanismo de toxicidad aguda causado por los plaguicidas OP es la inhibición de la AChE, como resultado de una reacción química entre el grupo fosforilo (P=O) del OP y el grupo serina hidroxilo del sitio activo de la AChE (Klaassen, 2008). Previo a ejercer su máximo efecto inhibitorio sobre la AChE, el CPF debe ser transformado a CPFO, el metabolito activo (Huff, Corcoran, Anderson, & Abou-Donia, 1994; Ma & Chambers, 1994). Otras proteínas y enzimas también presentan aminoácidos serina de forma ortostérica o alostérica a su sitio activo, de manera que, el clorpirifós puede afectar sus funciones, abriendo la posibilidad de efectos tóxicos adicionales a la inhibición de la AChE (Barone, Das, Lassiter, & White, 2000; Casida & Quistad, 2004; Pope, 1999).

Sin importar la ruta de administración, después de la exposición a CPF, los signos clínicos agudos corresponden a la inhibición de la AChE, produciéndose el síndrome colinérgico (Testai et al., 2010). A medida que la cantidad de acetilcolina (ACh) en el sistema nervioso parasimpático aumenta, la toxicidad se asocia con la estimulación de receptores muscarínicos (p ej. sialorrea, hiperhidrosis, epífora, disnea, parálisis flácida, vómitos, espasmos abdominales, diarrea, piloerección, exoftalmia, visión borrosa, entre otros). Los signos de toxicidad asociados con la estimulación y subsecuente desensibilización de receptores nicotínicos (localizados tanto en el sistema nervioso autónomo como en el sistema nervioso somático) incluyen taquicardia, hipertensión, fasciculaciones, temblores y parálisis flácida (Becker, 2012).

La acumulación de ACh en el SNC, donde existen tanto receptores muscarínicos como nicotínicos, resulta en una toxicidad combinada que incluye ataxia, letargia, confusión, debilidad, convulsiones, insuficiencia respiratoria, coma y muerte (Bird, 2019; Klaassen, 2008; Kwong, 2002). En el 20 – 50% de los casos de intoxicación aguda, el CPF causa efectos retardados (Síndrome intermedio), de 1 a 4 semanas posterior a la exposición, con o sin la presencia de síntomas y/o signos inmediatos (Bird, 2019; Karalliedde, Baker, & Marrs, 2006; Senanayake & Karalliedde, 1987).

Tras intoxicaciones agudas o exposiciones subcrónicas, algunos OPTs, incluyendo el CPF (Kaplan, Kessler, Rosenberg, Pack, & Schaumburg, 1993; Moretto & Lotti, 1998), son capaces de producir neuropatía retardada inducida por OP (OPIDN). Esta neuropatía se caracteriza por la degeneración de axones motores y/o sensitivos, en regiones distales de nervios periféricos (Bird, 2019; Moretto & Lotti, 1998; Sevim, Aktekin, Dogu, Ozturk, & Ertas, 2003). Se ha asociado la OPIDN con la inhibición de la NTE (Neuropathy target esterase), una proteína no relacionada a la AChE, localizada en tejido nervioso y linfocitos (Glynn, 1999). A

fin de producir OPIDN, la NTE deber ser fosforilada y luego eliminarse una cadena lateral alquilo (envejecimiento [aging]) (Richardson, 1995; Sultatos, 1994).



2. OBJETIVOS

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El clorpirifós (CPF) es uno de los OP usados con mayor frecuencia debido a su amplio espectro y costo-efectividad en comparación con otros insecticidas. Aunque sus propiedades farmacocinéticas y toxicológicas agudas, relacionadas con la formación de oxón y con la inhibición de la AchE, han sido ampliamente estudiadas, todavía ocurren una gran cantidad de intoxicaciones a nivel mundial, fundamentalmente en países de renta baja (Bird, 2019; Testai et al., 2010).

Los efectos tóxicos derivados de la exposición crónica hacia este compuesto continúan sin ser completamente clarificados. La identificación y mecanismos moleculares responsables de estos efectos tóxicos tanto agudos como crónicos, utilizando modelos in vitro, resulta fundamental en la caracterización de las rutas de efecto adverso (AOP) y en la evaluación del riesgo asociado al uso de este compuesto.

Lo anterior, nos genera la siguiente pregunta:

¿Existen alteraciones transcriptómicas en un modelo de células gliales humanas (glioblastoma T98G) tras la exposición a clorpirifós que se puedan relacionar con su mecanismo de neurotoxicidad y otros efectos adversos?

A fin de responder esta interrogante, nos planteamos los objetivos que se describen en el siguiente apartado.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Analizar las alteraciones transcriptómicas ocurridas en células T98G de glioblastoma humano tras la exposición a clorpirifós.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir la similitud de las secuencias de ARN mensajero de células control y células expuestas a clorpirifós frente al genoma humano codificante de referencia.
2. Cuantificar las alteraciones en la expresión génica de células T98G producto de la exposición a clorpirifós.
3. Determinar las funciones moleculares, procesos biológicos, componentes celulares y rutas moleculares alteradas en las células T98G expuestas a clorpirifós.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

3.1.1. MEDIO DE CULTIVO

De acuerdo con las especificaciones del fabricante (ECACC, 2019), utilizamos: EMEM (EBSS) + 2mM Glutamina + 1% NEAA + 1% NaP + 10% FBS.

Cada 100 mL de medio de cultivo contenía:

- 88 mL de medio de cultivo base DMEM (IX) 4,5 g/L glucosa, piruvato (-)
 - Referencia GIBCO: 32430-027, 500 mL
- 10 mL FBS (10%)
- 1 mL de aminoácidos no esenciales (MEM NEAA)
 - Referencia GIBCO: 11140-035, 100 mL
- 1 mL de penicilina (10,000 UI/mL) / estreptomicina (10, 000 ug/mL)
 - Referencia GIBCO: 15140-122, 100mL

Medio de crecimiento completo (EMEM, DMEM)

El EMEM es una modificación del BME (Basal médium Eagle) de acuerdo con las necesidades celulares de aminoácidos, por tanto, las concentraciones de aminoácidos encontradas en el EMEM doblan las presentes en el BME. Los aminoácidos no esenciales, los cuales pueden ser sintetizados por las células, no son incluidos en su formulación original (Yao & Asayama, 2017). La composición y características del EMEM se presentan en la web de *American Type Culture Collection (ATCC)* (ATCC, 2003).

DMEM está modificado para contener una concentración de aminoácidos cuatro veces superior a la del BME y se desarrolló para estudiar la capacidad formadora de placa de los virus polio en células embrionarias de ratón. Se han efectuado diversas modificaciones al DMEM, las cuales incluyen la adición de aminoácidos no esenciales, glicina y serina, hierro y piruvato. La concentración de glucosa puede ser aumentada hasta 25 mmol L⁻¹ a fin de ser óptima para células con elevados requerimientos nutricionales (Dulbecco & Freeman, 1959; Yao & Asayama, 2017). Para una mayor descripción de las características y composición del DMEM puede visitarse la web de *ThermoFisher Scientific* (ThermoFisher, 2019c).

Suero Fetal Bovino (SFB [FBS])

En cultivos celulares el suero sirve como una fuente de aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, hormonas, factores de crecimiento, sales inorgánicas, elementos traza y otros compuestos. Este también proporciona una capacidad amortiguadora del pH y ayuda en reducción del daño por fuerzas de cizallamiento (inherente al uso de pipetas y centrifugas). El

suero altera las condiciones del sustrato de cultivo, facilitando la proliferación de células adherentes. El SFB es el suero más utilizado actualmente. Es rico en factores de crecimiento y contiene niveles bajos de γ -globulinas (las cuales tienen un efecto inhibitor sobre el crecimiento celular), lo que es apropiado para células de difícil crecimiento en cultivos y para la clonación celular (Yao & Asayama, 2017). Podemos encontrar una descripción de las características del SFB utilizado en la web de *Sigma-Aldrich* (Sigma-Aldrich, 2011).

DPBS [PBS]

La disolución DPBS es uno de los amortiguadores biológicos utilizados con mayor frecuencia. El DPBS es isotónico y carece de toxicidad para células, además de tener la capacidad de mantener su osmolaridad, lo que es ideal para efectuar lavados en cultivos celulares y para procedimientos de inmunoensayo e inmunohistoquímica. Para una descripción de las características y composición de esta disolución puede visitarse la web de *Sigma-Aldrich* y de *Medicago* (Dulbecco & Freeman, 1959; Medicago, n.d.; Sigma-Aldrich, 2019).

3.1.2. TRIPSINA/EDTA, 0.25% (T/E)

La tripsina es una serina proteasa producida por el páncreas. El EDTA actúa como un agente quelante secuestrando iones metálicos (p.ej. Ca^{+2} y el Mg^{+2}), lo cual potencia la reacción de tripsinización. La disolución Tripsina/EDTA 0.25% es utilizada para desprender células adherentes de la superficie de cultivo. Esta disolución contiene 0.25% de tripsina y 0.5 mM de EDTA.

Una descripción más amplia de las características y composición de esta disolución puede encontrarse en la web de *ScienCell Research Laboratories* y de *ThermoFisher Scientific* (ScienCell, n.d.; ThermoFisher, n.d.-a). Puede consultarse información adicional respecto a los métodos de disociación para células adherentes en la sección de **Introducción y Antecedentes**.

3.1.3. PLAGUICIDAS

Para este experimento se utilizó clorpirifós (CPF). El CPF (CAS#: **2921-88-2**) es un tiofosfato orgánico, con fórmula molecular **$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$** , perteneciente a la familia de los OPT. Este presenta actividad como inhibidor de EC 3.1.1.7 (AChE) y de EC 3.1.1.8 (colinesterasa), agroquímico, contaminante medioambiental, xenobiótico, acaricida e insecticida. De acuerdo con el Sistema Globalmente Harmonizado (GHS) este tiene categorías H301, H312, H319, H330, H370, H372, H373, H400 y H410 (PubChem, 2019).

El proveedor del CPF fue Sigma-Aldrich. Chlorpyrifos (calidad PESTANAL), referencia: 45395, formulado: 250mg.

3.2. CULTIVOS CELULARES Y MANEJO DE LAS CÉLULAS T98G

3.2.1. LÍNEA CELULAR

Se utilizaron células de glioblastoma humano (T98G), las cuales fueron suministradas por la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), número de catálogo 92090213 (ECACC 92090213). De acuerdo con las especificaciones proporcionadas por la ECACC, esta línea celular procede del glioblastoma multiforme de un paciente masculino caucásico de 61 años (Stein, 1979). El modo de crecimiento de estas células es por adherencia. El resto de información puede ser revisada en Public Health England (ECACC, 2019).

3.2.2. RUTINA DE SUBCULTIVO, CONCENTRACIÓN Y CONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS

En cada etapa de la manipulación celular se implementaron medidas estándares de asepsia (abcam, 2019b).

En la rutina de cultivo se han adoptado las recomendaciones del fabricante concernientes a la línea celular T98G (Stein, 1979). Los pases celulares se efectuaron cuando se alcanzó una confluencia del 70 – 80 % (razón de separación [*split ratio*] 1:3 a 1:6). Las siembras celulares sucesivas se efectuaron a densidades entre 2 – 4 x 10⁴ células/cm². Las células fueron incubadas a 37°C y con CO₂ al 5% (ECACC, 2019).

Subcultivo

Para subcultivar las células efectuó la siguiente rutina (Stein, 1979; ThermoFisher, 2019a):

1. Se eliminó el excedente de medio de crecimiento desde los platos de cultivo.
2. Se lavaron las células utilizando una disolución de sal balanceada sin calcio o magnesio (aproximadamente 2 mL de disolución por cada 10 cm² del área de superficie de cultivo)
3. Se removió la solución de lavado desde los platos de cultivo.
4. Se agregó el reactivo de disociación precalentado (tripsina/EDTA 0.25%). La cantidad utilizada fue suficiente para cubrir la capa celular (aproximadamente 0.5 mL por cada 10 cm²). Agitamos y dimos pequeños golpes a la placa de cultivo para conseguir una distribución homogénea del reactivo de disociación y un tiempo de desprendimiento óptimo.
5. Se incubaron las células a 37°C durante 2 minutos.
6. Se observó la placa bajo el microscopio óptico para corroborar que se había producido un desprendimiento celular superior al 90%.

7. Una vez se consiguió un desprendimiento celular superior al 90%, se agregaron 2 volúmenes (dos veces el volumen utilizado con la disolución de disociación) de medio de crecimiento completo precalentado. Dispersamos varias veces el medio de crecimiento sobre la capa celular con la ayuda de una pipeta.
8. Se transfirieron las células a un tubo cónico de 15 mL, el cual se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos
9. Se resuspendió el agregado celular en un volumen mínimo de medio de cultivo completo precalentado. De esta suspensión se separó un pequeño volumen para realizar el recuento celular.
10. Realizamos el conteo celular y determinamos la viabilidad celular utilizando una cámara de Neubauer (hemocytometer), un contador celular y la prueba de exclusión con azul tripan (Trypan blue exclusion test of cell viability, 0.4%) (abcam, 2019a; Strober, 2001; ThermoFisher, n.d.-b). Para información adicional se sugiere revisar <https://www.youtube.com/watch?v=WWS9sZbGj6A>
11. Se diluyó la suspensión celular hasta obtener la densidad de siembra recomendada.
12. Finalmente se pipeteó el volumen celular deseado hacia platos de cultivo nuevos, los cuales fueron almacenados en la incubadora.

Concentración

Para concentrar las células se efectuó la siguiente rutina (ThermoFisher, 2019d):

1. Se transfirieron las células en suspensión hacia un tubo de centrifugado estéril con dimensiones apropiadas.
2. Se centrifugaron las células durante 10 minutos a 800 x g.
3. Se removió el sobrenadante sin perturbar el precipitado celular.
4. Se agregó un volumen determinado de medio fresco (EMEM) para resuspender el precipitado celular.
5. Se transfirieron las células a un contenedor estéril.

Congelación

Para congelar las células se efectuó la siguiente rutina (abcam, 2019c; ThermoFisher, 2019e):

1. Se despegaron las células de su sustrato (**Rutina de subcultivo**, arriba).
2. Se resuspendieron las células utilizando medio completo de crecimiento (EMEM) y se efectúa un conteo de células viables.

3. Se centrifugaron las células a 200 x g durante 5 minutos (hasta obtener un precipitado celular).
4. Se retiró la mayor cantidad de sobrenadante posible, sin perturbar el precipitado celular.
5. Se resuspendieron las células en medio de criopreservación hasta una concentración de $2-3 \times 10^6$ células/mL (el proveedor recomienda como máxima entre 5×10^6 y 5×10^7 células/mL).

El medio de criopreservación está compuesto de 5% DMSO (crioperservativo), 80% de EMEM completo (medio base) y 15% SFB (fuente de proteínas).

6. Se prepararon alícuotas (de 1 mL) en los viales criogénicos respectivos y se almacenan durante 5 minutos en un refrigerador a 4°C.
7. Se colocaron los viales en una caja aislante, la cual se almacena en un congelador a una temperatura entre -70°C y -80°C . Posteriormente, las células fueron transferidas a un depósito de nitrógeno líquido, donde se almacenaron hasta su utilización posterior.

3.2.3. EXPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS A ORGANOFOSFORADOS

En el día cero (**día_0**), las células se sembraron en placas de cultivo de 60 mm, a una densidad de 165, 000 células por placa y fueron incubadas con medio de crecimiento completo durante 24 horas en atmosfera con CO_2 al 5% y a 37°C . En el día uno (**día_1**), se reemplazó el medio de cultivo y las células fueron expuestas a concentraciones predeterminadas de clorpirifós [CPF] ($20 \mu\text{M}$) o clorpirifós oxón [CPFO] ($10 \mu\text{M}$) o etanol [ETOH]. Las células permanecieron expuestas a los plaguicidas (CPF o CPFO) o etanol durante las subsecuentes 72 horas.

En este experimento probamos dos condiciones experimentales, “**cps**” fueron las placas expuestas a CPF, por otro lado “**c**” eran las placas control. En este documento no se analizan las alteraciones transcriptómicas de las células expuestas a CPFO.

3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Las alteraciones de la viabilidad celular por la exposición a los plaguicidas CPF y CPFO se evaluó mediante las pruebas de MTT (Jain et al., 2018; Präbst, Engelhardt, Ringgeler, & Hübner, 2017) y NR (Ates, Vanhaecke, Rogiers, & Rodrigues, 2017; Jain et al., 2018). Se determinó la dosis máxima tolerable (MTD), definida como la dosis del plaguicida que redujo la viabilidad de las células T98G a menos del 10%, después de una exposición durante 72 horas.

3.2.5. AISLAMIENTO DEL ARN

En el día cero (**día_0**) se sembraron seis placas (3 placas por cada condición [**cps1**, **cps2**, **cps3** representan las placas expuestas a CPF. **c1**, **c2** y **c3** representan las placas control]) a una densidad de 165, 000 células por placa. En el día uno (**día_1**) se retiró el medio de cultivo y se reemplazó con medio de cultivo nuevo que contenía los plaguicidas a evaluar. El volumen total de medio añadido fue de 4 mL y contenía CPF 20 μ M y CPFO 10 μ M.

Pasadas 72 horas de exposición, el plaguicida se retiró de las placas de cultivo. Posteriormente se extrajo el ARN utilizando el reactivo TRIzol (invitrogen) (Chomczynski, 1993), siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor (invitrogen, n.d.).

En resumen:

1. Se lisó y homogeneizó la muestra (**tubo A**) utilizando el reactivo TRIzol y se almacenó a temperatura de -80°C .

Una vez se cumplió el intervalo de almacenamiento se prosiguió con la rutina de extracción del ARN:

2. La muestra se incubó con 0.3 mL de reactivo TRIzol durante 5 minutos.
3. Se agregó cloroformo 0.2 mL por cada mL de TRIzol utilizado.
4. La muestra se incubó durante 2 – 3 minutos adicionales.
5. Centrifugamos a 12,000 x g (4°C) durante 15 minutos.
6. Se separó la fase acuosa en un nuevo tubo (**tubo B**).
7. Agregamos isopropanol en el tubo B (0.5 mL por cada mL de TRIzol utilizado).
8. Incubamos el tubo B durante 10 minutos, luego lo centrifugamos a 12, 000 x g (4°C) durante 10 minutos.
9. Descartamos el sobrenadante y nos quedamos con el precipitado.
10. Resuspendimos el agregado en 1 mL de etanol al 75% por cada mL de TRIzol utilizado.
11. Dimos un toque de agitador Vortex y luego centrifugamos a 7,500 x g (4°C) durante 5 minutos.
12. Descartamos el sobrenadante y dejamos secar el precipitado con aire seco durante 5 – 10 minutos.
13. Se resuspendió el precipitado en 20 – 50 μ L de agua libre de ARNasa o 0.1 mM EDTA o 0.5% de solución SDS.
14. Se incubó la muestra en un baño de agua a $55 - 60^{\circ}\text{C}$ durante 10 – 15 minutos.

El ARN obtenido fue diluido hasta llevarlo a una concentración de 150 ng/ μ L, con un volumen final de 60 μ L.

Algoritmo RIN

Una herramienta analítica optimizada para el análisis del ARN total es el Bioanalyzer de Agilent 2100. Esta tecnología usa una combinación de microfluidos, electroforesis capilar y la

fluorescencia para evaluar tanto la concentración como la integridad del ARN. Una ventaja de esta tecnología es que se precisa un volumen de muestra reducido, permitiendo que los usuarios puedan valorar la calidad del ARN incluso de muestras pequeñas (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2004; ThermoFisher, 2019b).

A respecto del Bioanalyzer 2100 de Agilent y con el objetivo de eliminar la interpretación de la calidad del ARN dependiente del usuario, se desarrolló el software RIN. Con este método la caracterización de las muestras de ARN es ampliamente independiente del instrumento, de la concentración de la muestra y del operador, permitiendo la comparación de muestras en distintos laboratorios.

Para el desarrollo de este algoritmo, se emplearon herramientas de aprendizaje adaptativo como redes neuronales, permitiendo la determinación de características críticas que podían ser extraídas mediante el registro de electroforesis. Estas características críticas incluyen áreas de señal, intensidades y proporciones, las cuales pueden ser analizadas utilizando un integrador apropiado. Dentro de los elementos importantes de un electroferograma tenemos diferentes regiones (pre-, 5S-, fast-, inter-, precursor-, post-region) y picos (marker, 18S, 28S).

El algoritmo RIN puntúa la calidad del ARN en una escala del 1 – 10, siendo 10 la máxima calidad. Los estudios que han comparado algunos de los métodos mencionados para determinar la calidad del ARN, demuestran que se obtienen menores coeficientes de varianza al determinar el RIN con respecto al uso de la razón ribosómica. Debemos considerar que, al utilizar el RIN para valorar la integridad del ARN, los resultados más precisos se obtienen a concentraciones de ARN superiores a los 50 ng/uL y que existe falta de precisión del método ante valores de ARN inferiores a 25 ng/uL. Una de las limitaciones de este método es la necesidad de realizar un análisis de correlación con el fin de identificar el valor umbral RIN necesario para obtener el mayor rendimiento en las aplicaciones corriente abajo de las muestras evaluadas (Mueller et al., 2004).

Determinación de la integridad del ARN

La calidad del ARN fue valorada mediante la determinación del número de integridad del ARN (RIN). Para ello se empleó el Bioanalyzer 2100 (Agilent). La calidad fue considerada óptima si el RIN fue superior a 7. Este método consiste en la puntuación del ARN (entre 1 – 10) basándose en las características electroferográficas de las muestras (**Algoritmo RIN, arriba**). Los análisis de calidad del ARN fueron realizados en el Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) en la Universidad de Murcia (<https://www.um.es/web/acti/>). Se prosiguió al envío de muestras hacia MACROGEN Inc. República de Corea del Sur (<https://dna.macrogen.com/eng/>), para la realización de secuenciación masivamente paralela del ARN (RNAseq).

3.3. SECUENCIACIÓN DE ARN MASIVAMENTE PARALELA

Las tecnologías NGS (Next-generation sequencing) utilizan el principio químico de la secuenciación masivamente paralela por síntesis (MPSS) para efectuar la secuenciación a nivel de transcriptoma (Chen & Wong, 2019; Marioni, Mason, Mane, Stephens, & Gilad, 2008). El estudio transcriptómico se realizó mediante la plataforma Illumina NGS, donde el ARN aislado de las muestras es fragmentado, para luego añadirse una **molécula adaptadora** a la cual también se añaden **códigos índices**, **primer de secuenciación** y **primers de amplificación**. El ARN así conformado se retrotranscribe a ADN complementario (cDNA) mediante el cual se sintetiza una segunda hebra de ADN, para producir un ADN de doble hélice. Esta molécula de ADN es amplificada y luego secuenciada por síntesis (un nucleótido en cada reacción), produciéndose con la adición de cada nucleótido una señal fluorescente. Cada secuencia obtenida a partir de una hebra molde (*template*) se denomina **lectura (read)** (Chen & Wong, 2019).

En resumen, se sigue un flujograma de trabajo de cuatro pasos (figura 4).



Figura 4. Flujo de trabajo para RNAseq mediante Illumina NGS platform. Tomado del reporte de MACROGEN Inc.

1. **Preparación de las muestras.** Previo a la construcción de librerías, se realiza un análisis local de calidad del ARN y solo aquellas muestras con una calidad apropiada prosiguen hacia la creación de librerías.
2. **Construcción de librerías.** La librería de secuenciación se prepara mediante la fragmentación aleatoria de una muestra de ADNc, seguida por el anclaje de un adaptador en dirección 5'→3'. Los fragmentos ligados al adaptador son posteriormente amplificados por PCR y purificados por gel.
3. **Secuenciación.** Para la generación de grupos, la librería se carga en una celda de flujo donde los fragmentos son capturados en un área con oligos unidos a superficie complementarios a los adaptadores de la librería. Utilizando **amplificación por puentes (bridge amplification)** cada fragmento es amplificado en grupos clonales específicos. Cuando se completa la generación de grupos, los moldes (*templates*) son considerados óptimos para la secuenciación. La tecnología Illumina SBS utiliza un

método autóctono basado en un terminador reversible el cual detecta bases únicas en la medida que estas son incorporadas en la hebra molde de ADN. Debido a que los cuatro dNTPs, unidas al terminador de forma reversible, están presentes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza los sesgos de incorporación y reduce de forma importante las tasas crudas de error en comparación a otras tecnologías. El resultado por tanto es bastante preciso en la forma base por base, lo que prácticamente elimina los errores de secuencia dependiente del contexto, incluso con secuencias de regiones repetitivas y homopolímeros.

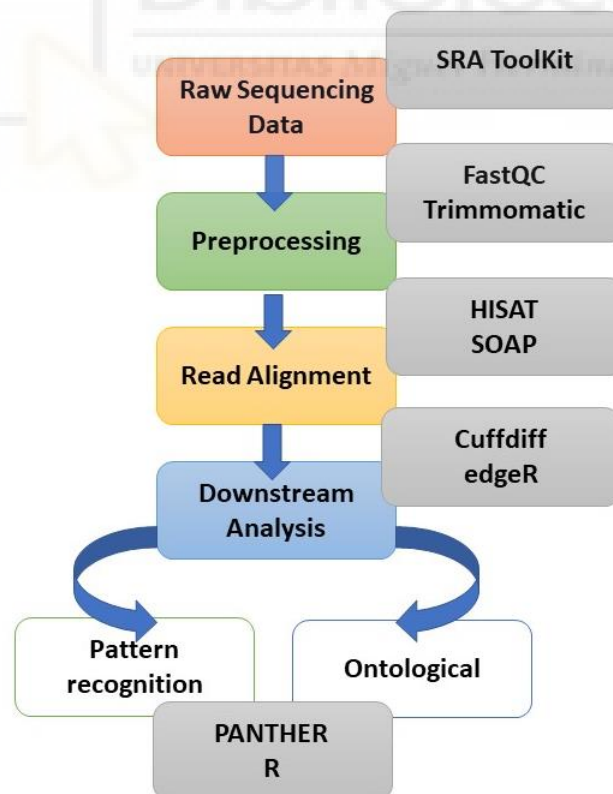
4. **Obtención de datos crudos.** Los datos de secuenciación son convertidos en datos crudos en formatos normalizados para realizar el análisis bioinformático.

3.4. PROCESAMIENTO BIOINFORMÁTICO

Flujo de procesamiento de los datos crudos

En la figura 5 se presenta el flujograma global del análisis bioinformático realizado en este trabajo.

Figura 5. Pasos efectuados durante el análisis bioinformático. Los cuadros grises representan las herramientas bioinformáticas utilizadas.



3.4.1. ANÁLISIS ONTOLÓGICO

El análisis ontológico se efectuó mediante las plataformas GENEONTOLOGY (GO) y PANTHER Classification System. El objetivo de este análisis fue determinar si los genes expresados de forma diferencial en las placas tratadas con CPF (**list_01**) presentaban sobre o infra representación, y/o enriquecimiento en alguno de los dominios ontológicos (**GO – Slim Biological Process**, **GO – Slim Molecular Function** y **GO – Slim Cellular Component**) con sus correspondientes categorías y subcategorías ontológicas, en comparación con el transcriptoma blanco (**REF_01**) o el genoma codificante humano (Homo sapiens, **REF_00**).

Respecto a las bases de datos utilizadas, mediante GENEONTOLOGY podemos efectuar análisis inferenciales basados en tres dominios ontológicos, a saber:

Proceso biológico (**GO – Slim Biological Process**)

Componente celular (**GO – Slim Cellular Component**)

Función molecular (**GO – Slim Molecular Function**)

Cada uno de estos dominios se subdivide en nombres (**name**), los que su vez están compuestos de diversas categorías (**Parent Lineages**) y estas en subcategorías (**Child**), sobre las cuales se efectúan los análisis de sobre – representación (**Statistical overrepresentation test**) y enriquecimiento (**Statistical enrichment test**).

A su vez, GENEONTOLOGY está basada en las funcionalidades y argumentos de **PANTHER Classification System** (Mi, Muruganujan, Casagrande, & Thomas, 2013; Mi, Muruganujan, & Thomas, 2013; PANTHER, 2017) para efectuar los análisis mencionados. PANTHER Classification System también permite efectuar inferencias estadísticas basadas en la clase proteica (**PANTHER Protein Class**) y en las vías celulares expresadas (**PANTHER Pathways**).

Para realizar el análisis de sobre – representación la base de datos PANTHER utiliza el estadístico exacto de Fisher o la prueba de distribución binomial, ambas ya sea con la corrección de Bonferroni o calculando el FDR (**False Discovery Rate**). Para el análisis de enriquecimiento se utiliza el estadístico U de Mann – Whitney.

Parámetros del análisis ontológico

Para este análisis se utilizó la base de datos **GENEONTOLOGY** [<http://geneontology.org/>], específicamente la sección correspondiente al análisis de enriquecimiento (**GO Enrichment Analysis**). Se efectuó partiendo de códigos con formato “**Ensembl**: Ensembl gene identifier”, el cual es uno de los formatos validados por **GO** para llevar la evaluación del enriquecimiento. A su vez, el servicio de análisis de enriquecimiento de **GO** conecta con la herramienta de análisis desde **PANTHER Classification System** [<http://pantherdb.org/>].

Los parámetros de análisis ontológico fueron:

- Tipo de análisis (**Analysis type**): PANTHER Overrepresentation Test (Released 20190711) o PANTHER Statistical enrichment test
- Fecha de liberación (**release date**) y versión de anotación (**Annotation Version**): PANTHER versión 14.1 Released 2019-03-12
- Lista de referencia (**Reference list**): Homo sapiens (all genes in database) **or Experimental obtained** (control), **REF_00** y **REF_01** respectivamente
- Conjunto de datos de anotación (**Annotation Data Set**): PANTHER GO-Slim Biological Process **or** PANTHER GO-Slim Molecular Function **or** PANTHER GO-Slim Cellular Component
- Tipo de prueba (**Test Type**): Fisher's Exact or Mann-Whitney U test (Wilcoxon Rank-Sum Test)
- Corrección (**Correction**): False Discovery Rate (FDR $p < 0.05$) **or** Bonferroni correction for multiple testing ($p < 0.05$)



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS ONTOLÓGICO

4.1.1. CONJUNTOS DE DATOS UTILIZADOS Y CATEGORÍAS FUNCIONALES

A lo largo de esta sección haremos referencia a tres conjuntos de datos, REF_00, REF_01 y list_01. **REF_00** representa las áreas codificantes del genoma humano (*Homo sapiens*), de acuerdo con la versión existente en la base de datos “**GENEONTOLOGY Unifying Biology**” al momento de este análisis (GENEONTOLOGY, 2019).

REF_01 representa todos los genes expresados por las células en las placas control que fueron 11379. **list_01** representa el conjunto de genes que se expresaron de forma diferencial en el experimento, por las células que estuvieron expuestas a la sustancia de estudio (CPF), en relación con todos los genes expresados en las células control (**REF_00**).

Para los análisis inferenciales que se describen en los siguientes apartados, se han considerado los “Dominios ontológicos” y sus correspondientes “Categorías” y “Subcategorías”, de acuerdo con la base de datos “*PANTHER Classification System*”:

- Dominio Función molecular
- Dominio Proceso Biológico
- Dominio Componente Celular

Además, efectuamos un análisis descriptivo basado en la Clasificación funcional (*Functional classification*) de los genes evaluados, tanto en células control como en células tratadas con CPF.

Debido a que los paquetes y bases de datos utilizados expresan sus epígrafes (dominios ontológicos, categorías, subcategorías y vías celulares) en inglés y debido a la falta de una traducción al castellano normalizada, en este documento presentaremos dichos términos en inglés con una traducción sugerida al castellano diseñada por el autor del trabajo.

4.1.2. CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES EXPRESADOS EN LAS CÉLULAS CONTROL

Para REF_01, de acuerdo con la base de datos “*PANTHER Classification System*”, se efectuó un análisis de la distribución por “Categorías Funcionales” (tabla 1A, Anexos)

Dominio Función molecular

Del total de genes expresados en REF_01 (n = 11,379) hubo 8,033 coincidencias (*hits*) al clasificarlos por su **función molecular**. Respecto a este dominio ontológico (*GO – Slim Molecular Function*), las categorías predominantes para REF_01 fueron:

- actividad catalítica (*catalytic activity [GO:0003824]*),
- unión (*binding [GO:0005488]*) y
- actividad reguladora de la transcripción (*transcription regulator activity [GO:0140110]*).

Dominio Proceso Biológico

En lo que respecta al dominio de **proceso biológico** (*GO – Slim Biological Process*), del total de genes expresados en REF_01 hubo 11,013 coincidencias. Aquí las categorías predominantes fueron:

- el proceso celular (*cellular process [GO:0009987]*),
- el proceso metabólico (*metabolic process [GO:0008152]*) y
- la regulación biológica (*biological regulation [GO:0065007]*).

Dominio Componente Celular

Al analizar el dominio del **componte celular** (*GO – Slim Cellular Component*), se obtuvieron 7,943 coincidencias, siendo las categorías más relevantes:

- célula (*cell [GO:0005623]*),
- organelos (*organelle [GO:0043226]*) y
- complejo que contiene proteínas (*proteín – containing complex [GO:0032991]*)

4.1.3. ANÁLISIS DE SOBRE-REPRESENTACIÓN EN LAS CÉLULAS CONTROL

Aunque de forma global se observó una alta similitud en la distribución de categorías entre **REF_01** (transcriptoma control de la línea celular T98G) y **REF_00** (genoma codificante de Homo sapiens), existieron diferencias tanto porcentuales como en la representación de algunas categorías ontológicas, con diferencias significativas. A fin de presentarlas de forma cuantitativa, se efectuó un análisis estadístico de sobre-representación (*Statistical overrepresentation test*). Para este análisis se utilizó el estadístico exacto de Fisher con la corrección de Bonferroni. Los resultados se muestran en tablas 2A, 3A y 4A, y figuras 1A y 2A de Anexos.

Dominio Proceso Biológico

En el dominio Proceso Biológico, las categorías padres sobre-representadas para REF_01 fueron, el **proceso metabólico** (*metabolic process*), el **proceso celular metabólico macromolecular** (*cellular macromolecule metabolic process*) y la **respuesta celular frente al daño del ADN** (*cellular response to DNA damage stimulus*). Estas categorías confluyeron la subcategoría **reparación del ADN** (*DNA repair*).

Otras categorías padres sobre-representadas fueron el **proceso metabólico proteico celular** (*cellular protein metabolic process*) confluyendo en la subcategoría **ubiquitinación proteica**

(*protein ubiquitination*); el **proceso catabólico proteico** (*protein catabolic process*) con la subcategoría **proceso catabólico proteico del proteoma** (*proteasomal protein catabolic process*) (tabla 2A).

Aún más, en REF_01 encontramos sobre-representación de la categoría padre **traducción celular** (*translation*), cuya subcategoría fue la **formación del complejo ternario de iniciación de la traducción** (*formation of translation initiation ternary complex*). En correspondencia con lo antes mencionado, las subcategorías **elongación de la traducción** (*translational elongation*), **terminación de la traducción** (*translational termination*) y **proceso metabólico del ARN** (*RNA metabolic process*) también estaban sobre-representadas.

Otras categorías padres sobre-representadas que estaban relacionadas con el procesamiento del material genético (ADN y ARN), la formación de macromoléculas y su direccionamiento celular fueron la **organización de organelos** (*organelle organization*), **regulación de procesos metabólicos** (*regulation of metabolic process*) y la **localización celular** (*cellular localization*), especialmente la subcategoría **localización celular proteica** (*cellular protein localization*).

Para este dominio también se encontraron una serie de categorías padre infra-representadas, entre ellas: **señal célula – célula** (*cell – cell signal*), con la subcategoría **transmisión sináptica química** (*chemical synaptic transmission*); **respuesta a químicos** (*response to chemicals*) con la subcategoría **respuesta hacia sustancias orgánicas** (*response to organic substance*); **regulación de la concentración citosólica de calcio** (*regulation of the cytosolic calcium ion concentration*); **regulación del potencial de membrana** (*regulation of membrane potential*); categoría padre **proceso del sistema inmune** (*immune system process*) con la subcategoría **proceso efector inmune** (*immune effector process*); **fagocitosis** (*phagocytosis*); categorías padre **respuesta de defensa** (*defense response*) y **respuesta inmune** (*immune response*) ambas con la subcategoría **respuesta inmune innata** (*innate immune response*), categoría padre **respuesta inmune adaptativa** (*adaptative immune response*).

Otras categorías padre infra representadas, algunas asociadas a la respuesta inmune fueron, la **vía de señalización de receptores acoplados a proteínas G** (*G – protein coupled receptor signaling pathway*), con la subcategoría **vía de señalización de neuropéptidos** (*neuropeptide signaling pathway*); la **regulación de la activación celular** (*regulation of cell activation*) particularmente la subcategoría **regulación de la activación de linfocitos** (*regulation of lymphocyte activation*); la **respuesta inmune humoral** (*humoral immune response*); el **proceso organismal multicelular** (*multicellular organismal process*), con la subcategoría **percepción sensorial hacia estímulos químicos** (*sensory perception to*

chemical stimulus); **respuesta hacia bacterias** (*response to bacterium*) y **respuesta hacia estímulos bióticos** (*response to biotic stimulus*) ambos con la subcategoría **respuesta de defensa contra bacterias** (*defense response to bacterium*); la **respuesta inmune regulada por la señalización de receptores de superficie celular** (*immune response – regulating cell surface receptor signaling pathway*), con la subcategoría **vía de señalización de receptores de células B** (*B cell receptor signaling pathway*) y la **activación leucocitaria** (*leukocyte activation*), específicamente la subcategoría **activación de células B** (*B cell activation*)

Estos datos permiten concluir que las células T98G presentan una capacidad biosintética macromolecular (especialmente de proteínas) mayor respecto al genoma codificante humano (**REF_00**). Además, su capacidad reparadora del material genético parece superior. Podemos observar una actividad inmune infra – representada, sobre todo la relacionada con el componente humoral y los linfocitos B. Lo anterior **no debe interpretarse** como una capacidad de respuesta inmune no funcional y/o inexistente puesto que las células evaluadas (**REF_01**) no se habían expuesto a ningún estímulo lesivo. En la tabla 2A y 3A se presentan estos datos con sus respectivos parámetros estadísticos.

Estos resultados son consistentes con las funciones descritas para la neuroglia, las cuales están implicadas en el soporte físico y metabólico de las neuronas (Pawlina & Ross, 2018; Sherwood, 2015).

Dominio Función Molecular

Los resultados de un análisis similar, esta vez evaluado el dominio ontológico **Función molecular** (*GO – Slim Molecular Function*) se muestran en la tabla 4A y figura 1A. Aquí observamos sobre-representación de la actividad catalítica (sobre ácidos anhidridos heterocíclicos, como el ARN y ADN) encaminada a la formación de proteínas, a la vez que existe infra-representación de categorías relacionadas con la interacción y respuesta celular ante estímulos externos. Estos datos parecen corresponder con lo descrito en el dominio Proceso biológico (*GO – Slim Biological Process*), donde se observó sobre-representación de las categorías relacionadas con la capacidad biosintética ribosomal, además de la infra-representación en las funciones inmunes.

Insistimos en que esta infra–representación en la **actividad inmune** y/o en las categorías de interacción celular no deben ser interpretadas como la ausencia de capacidad funcional para responder ante estímulos inmunes u otros eventos extracelulares, más bien puede representar un estado de **quiescencia celular** ante la falta de tales estímulos.

Dominio Componente Celular

Para reforzar los conceptos expuestos, al efectuar el análisis del dominio ontológico **Componente Celular** (*GO – Slim Cellular Component*) observamos sobre-representación de los componentes celulares nucleares y ribosomales relacionados con el procesamiento y síntesis proteica, así como una infra-representación de los componentes de membrana plasmática (especialmente la membrana celular externa) encargados de la comunicación celular (figura 2A).

4.1.4. GENES PARA EL ANÁLISIS ONTOLÓGICO EN CÉLULAS TRATADAS CON CPF

En el caso de las células que fueron expuestas a CPF (*list_01*), identificamos 304 genes que se expresaron de forma diferencial ($p < 0.05$) respecto al control (*REF_01*). Esta lista se generó mediante un sólo experimento, en el cual existían tres platos de cultivos donde las células estaban expuestas al plaguicida (cada plato con su respectivo control) (Material y Métodos). Han sido considerados sólo aquellos genes que se expresaron de forma diferencial en los tres platos de cultivo de forma simultánea.

4.1.5. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO EN CÉLULAS TRATADAS POR CPF

Al efectuar este análisis no logramos identificar categorías enriquecidas para los dominios Función molecular, Proceso biológico y Componente celular. Lo anterior se traduce en que, asumiendo una distribución normal para *list_01*, los subconjuntos de genes que mapearon a categorías ontológicas específicas pertenecen a dicha distribución (no presentan una distribución distinta a la distribución general). Para este análisis se utilizó el estadístico U de Mann-Whitney, corrigiendo en base al FDR.

4.1.6. CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE GENES EXPRESADOS EN CÉLULAS TRATADAS CON CPF

Dominio Función Molecular

Para el dominio **Función molecular** las categorías predominantes fueron: **unión** (*binding* [*GO:0005488*]), **actividad catalítica** (*catalytic activity* [*GO:0003824*]), y **reguladora de la función molecular** (*molecular function regulator* [*GO:0098772*]) (tabla 2). Si bien estas categorías son las similares a las mencionadas para *REF_01*, el orden y magnitud de representación son diferentes, dejando la categoría **unión** (*binding*) por encima de **actividad catalítica** (*catalytic activity*), y sustituyendo la **actividad reguladora de la transcripción** (*transcription regulator activity*) por la categoría **regulador de la función molecular** (*molecular function regulator*).

Tabla 2. Distribución de categorías ontológicas en los dominios Función molecular, Proceso biológico y Componente celular para list_01

Dominio ontológico	Category (accession)*	Hitted genes [#]	Perc. total [§]	Perc. category ^{&}
Proceso biológico				
	cellular process (GO:0009987)	112	38.6%	33.9%
	biological regulation (GO:0065007)	47	16.2%	14.2%
	metabolic process (GO:0008152)	44	15.2%	13.3%
	localization (GO:0051179)	29	10.0%	8.8%
	response to stimulus (GO:0050896)	28	9.7%	8.5%
	multicellular organismal process (GO:0032501)	26	9.0%	7.9%
	immune system process (GO:0002376)	13	4.5%	3.9%
	biological adhesion (GO:0022610)	12	4.1%	3.6%
	developmental process (GO:0032502)	10	3.4%	3.0%
	cell proliferation (GO:0008283)	4	1.4%	1.2%
	reproduction (GO:0000003)	3	1.0%	0.9%
	cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	2	0.7%	0.6%
Función molecular				
	binding (GO:0005488)	89	30.7%	37.6%
	catalytic activity (GO:0003824)	71	24.5%	30.0%
	molecular function regulator (GO:0098772)	24	8.3%	10.1%
	molecular transducer activity (GO:0060089)	22	7.6%	9.3%
	transcription regulator activity (GO:0140110)	13	4.5%	5.5%
	transporter activity (GO:0005215)	10	3.4%	4.2%
	structural molecule activity (GO:0005198)	7	2.4%	3.0%
	translation regulator activity (GO:0045182)	1	0.3%	0.4%
Componente celular				
	cell (GO:0005623)	89	30.7%	42.2%
	organelle (GO:0043226)	41	14.1%	19.4%
	extracellular region (GO:0005576)	30	10.3%	14.2%
	membrane (GO:0016020)	25	8.6%	11.8%
	protein-containing complex (GO:0032991)	22	7.6%	10.4%
	cell junction (GO:0030054)	4	1.4%	1.9%

*Nombre de las **categorías ontológicas** con su **ID.** [#] Número de **genes** en **list_01** que fueron mapeados hacia la categoría ontológica específica. [§] Porcentaje de **genes mapeados** en la categoría ontológica específica respecto al total de **genes en list_01.** [&] Porcentaje de **genes mapeados** en la categoría ontológica específica respecto al total de **genes mapeados hacia el dominio ontológico.**

Además, la **actividad transductora molecular** (*molecular transducer activity* [GO:0060089]) se muestra como cuarta categoría en orden de representación (ubicada como séptima en **REF_01**, tabla 1A). Las definiciones proporcionadas por la ontología génica vinculan estas categorías a eventos de respuesta celular, lo cual coincide con que estas células han sido expuestas al CPF.

Dominio Proceso Biológico

Para el dominio de **Proceso biológico**, las categorías con mayor representación en list_01 fueron, el **proceso celular** (*cellular process [GO:0009987]*), la **regulación biológica** (*biological regulation [GO:0065007]*), el **proceso metabólico** (*metabolic process [GO:0008152]*), la **localización** (*localization [GO: 0051179]*) y la **respuesta hacia estímulos** (*response to stimulus [GO: 0050896]*). Respecto a los datos presentados para REF_01, en list_01 la distribución de categorías similar, si bien los porcentajes dentro de cada categoría son ligeramente distintos (tabla 2).

Adicionalmente, existe un ascenso no despreciable en la categoría **respuesta a estímulos** (*response to stimulus*) (posición seis en REF_01, posición 5 en list_01). Esta categoría también mostró un aumento porcentual (3.7% en REF_01 a 8.5% en list_01). Aún más, se observó un cambio de posición, esta vez un descenso, en la categoría **proceso metabólico** (*metabolic process*) (segunda posición en REF_01, tercera posición en list_01); este descenso estuvo acompañado de una caída porcentual en la representación (25.1% en REF_01 a 13.3% en list_01). Los cambios observados sugieren una capacidad de interacción y respuesta celular aumentada.

Dominio Componente Celular

Al analizar el dominio **Componente celular**, las categorías con mayor representación fueron **célula** (*cell [GO: 0005623]*), **organelos** (*organelle [GO: 0043226]*), **región extracelular** (*extracellular region [GO: 0005576]*), **membrana** (*membrane [GO:0016020]*) y **complejos que contienen proteínas** (*protein-containing complex [GO: 0032991]*) (tabla 2). Se identificó ascenso en la categoría **región extracelular** (*extracellular region*) (quinta posición REF_01, tercera en list_01). Este ascenso se acompañó de un aumento porcentual en la representación (3.4% en REF_01 a 14.2% en list_01). Otro aspecto notable fue la disminución porcentual en la categoría **organelos** (*organelles*) (33.9% en REF_01, 19.4% en list_01).

Aunque la categoría **membrana** (*membrane*) no cambió de posición respecto a REF_01, su porcentaje de representación incremento ligeramente (tabla 2). Los cambios observados en la distribución de **categorías funciones** en list_01 respecto a REF_01 sugieren que las células tratadas con CPF han dejado el estado de quiescencia, y se encuentran en un estado funcional de respuesta hacia estímulos externos.

Comparaciones gráficas de diferencias de expresión en células tratadas

Para profundizar gráficamente en la idea de que existen diferencias en la expresión génica entre las células tratadas con CPF (list_01) y las células control (REF_01) obsérvese las figuras 6 y 3A. La figura 6 muestra la presencia de dos grupos (clustering), células control (c1,

c2, c3) y células tratadas con CPF (cps1, cps2, cps3), con zonas no superpuestas de diferente intensidad colorimétrica indicando mayor expresión (número de lecturas corregido por la profundidad y longitud del transcrito [RPKM]) de ciertos genes. Esta figura incluye solo los genes expresados diferencialmente entre las células tratadas y el control.

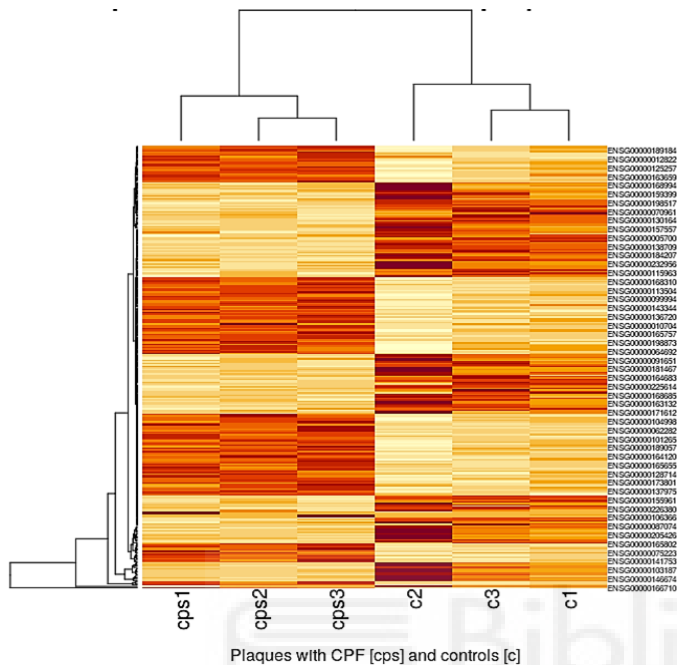


Figura 6. Expresión génica en placas tratadas con CPF versus placas control

La figura 3A (Anexos) nos brinda una información similar, sin embargo, para el diseño del mapa de calor se ha transformado la matriz de datos (escalado [*scaling*]) a fin de mejorar su comparabilidad. Acá observamos la condensación en dos grupos (**control** y **CPF_treated**) con zonas claramente diferenciadas. La figura 3A incluye todos los genes expresados en las células control (tanto los que presentaban expresión diferencial como los que no) y en las células tratadas.

4.1.7. SOBRE-REPRESENTACIÓN EN CÉLULAS EXPUESTAS A CPF VERSUS REF_00

Dominio Proceso Biológico

Al comparar **list_01** (genes expresados de forma diferencial en el experimento) contra **REF_00** (genoma codificante humano) utilizando el dominio **Proceso biológico**, mediante la prueba de sobre-representación estadística (*Statistical overrepresentation test*), observamos sobre-representación del nombre **vía de señalización proteica de receptores acoplados a enzimas** (*enzyme linked receptor protein signaling pathway [GO: 0007167]*), el cual está relacionado con la activación de diversos procesos celulares de forma secundaria a la

estimulación de receptores de membrana ligados a enzimas. Dentro de este **nombre**, la subcategoría sobre-representada fue **vía de señalización de receptores de superficie celular** (*cell surface receptor signaling pathway [GO: 0007166]*), relacionada con la activación de procesos celulares secundarios a modificaciones en la actividad de receptores del plasmalema. Para esta subcategoría, la categoría sobre-representada fue **transducción de la señal** (*signal transduction [GO: 0007165]*). Bajo esta categoría ubicamos a diferentes moléculas (mediadores y enzimas) encargadas de regular los procesos internos celulares, mediante el transporte de señales generadas tras la activación de receptores tanto de membrana como intracelulares (tabla 5A, Anexos). En este análisis se registraron 13 IDs sin mapear (*Unmapped IDs*).

Al realizar una corrección estadística más estricta (*Bonferroni correction for multiple testing*) se obtuvieron los mismos resultados.

Dominios Componente Celular y Función Molecular

Se efectuó el mismo tipo de análisis (utilizando el FDR o la corrección de Bonferroni) para los dominios Función molecular y Componente celular. En el dominio Función molecular no hubo resultados estadísticamente significativos.

Los resultados del análisis del dominio *Componente Celular* se presentan en la tabla 5A. Como puede observarse, en relación con **REF_00**, las células que estuvieron expuestas a CPF presentan enriquecimiento de genes codificantes para proteínas de secreción extracelular. La tabla 3 muestra una lista de estas proteínas, con su respectivo código **Uniprot** y una breve descripción de su función. Para realizar la descripción se tomaron los conceptos que el autor considero pertinente de las bases de datos Uniprot y Proteínas (NCBI).

Muchas de estas proteínas están relacionadas con la respuesta celular inflamatoria (tanto aguda como subaguda) ante un estímulo lesivo, otras se relacionan con el crecimiento y proliferación. Estos datos son coherentes con el estado de exposición de estas células a CPF, además de reflejar una de las funciones descritas para la neuroglia, la defensa inmune (Pawlina & Ross, 2018; Sherwood, 2015). Se repitió este análisis cambiando el FDR por la corrección de Bonferroni y se obtuvieron los mismos resultados.

Tabla 3. Proteínas del dominio *GO-Slim Cellular Component* modificadas tras la exposición hacia CPF

GenID Uniprot	Mapped ID	Gene Name	Gene Symbol	UniProt Funct
UniProtKB= P22692	ENSG0000014 1753	Insulin-like growth factor-binding protein 4	IGFBP4	Inhibe o estimula los efectos promotores del crecimiento de IGFs.
UniProtKB= P32970	ENSG0000012 5726	CD70 antigen	CD70	Desempeña un papel en la activación y proliferación de células T (citotóxicas).
UniProtKB= P10145	ENSG0000016 9429	Interleukin-8	CXCL8	Factor quimiotáctico liberado en respuesta a estímulos inflamatorios. Implicado en la activación de neutrófilos.
UniProtKB= P0DMV8	ENSG0000020 4389	Heat shock 70 kDa protein 1A	HSPA1A	Chaperona molecular implicada en la protección del proteoma contra el stress celular.
UniProtKB= P19876	ENSG0000016 3734	C-X-C motif chemokine 3	CXCL3	Presenta actividad quimiotáctica para neutrófilos. Ejerce efectos autocrinos sobre células endoteliales.
UniProtKB= P05121	ENSG0000010 6366	Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE 1	Regulador negativo de la fibrinólisis. Promueve la degradación controlada de los coágulos sanguíneos
UniProtKB= P05997	ENSG0000020 4262	Collagen alpha-2(V) chain	COL5A2	Determinante clave del ensamblaje de matrices tejido específicas
UniProtKB= P17936	ENSG0000014 6674	Insulin-like growth factor-binding protein 3	IGFBP3	Similar a IGFBP4, si bien presenta efectos antiproliferativos y apoptóticos que son independientes de IGF
UniProtKB= O00622	ENSG0000014 2871	Protein CYR61	CYR61	Promueve la proliferación celular, quimiotaxis, angiogénesis y adhesión celular.
UniProtKB= P58166	ENSG0000013 9269	Inhibin beta E chain	INHBE	Parece contrarrestar los efectos de las activinas. Ambas están implicadas en la supervivencia de células nerviosas.
UniProtKB= P26022	ENSG0000016 3661	Pentraxin-related protein PTX3	PTX3	Está implicada en la regulación innata contra patógenos y reacciones inflamatorias.
UniProtKB= P43234	ENSG0000025 6043	Cathepsin O	CTSO	Enzima proteolítica implicada en la degradación y recambio de proteínas celulares.
UniProtKB= P15018	ENSG0000012 8342	Leukemia inhibitory factor	LIF	Implicada en la inducción de diferenciación en células neuronales y en la estimulación de la síntesis de reactantes de fase aguda.
UniProtKB= Q9H3T3	ENSG0000016 7680	Semaphorin-6B	SEMA6B	Tiene importancia en el desarrollo del sistema nervioso central y periférico
UniProtKB= Q99075	ENSG0000011 3070	Proheparin-binding EGF-like growth factor	HBEGF	Factor de crecimiento implicado en la proliferación celular mediada por macrófagos. Es mitótico para fibroblastos.
UniProtKB= P29279	ENSG0000011 8523	Connective tissue growth factor	CTGF	Mitoatrayente para tejido conectivo, secretado por el endotelio.
UniProtKB= Q31612	ENSG0000023 4745	HLA class I histocompatibility antigen, B-73 alpha chain	HLA-B	Implicado en la presentación de antígenos ante el sistema inmunológico.
UniProtKB= Q5KU26	ENSG0000015 8270	Collectin-12	COLEC12	Receptor scavenger con distintas funciones asociadas a la defensa del huésped.
UniProtKB= P13500	ENSG0000010 8691	C-C motif chemokine 2	CCL2	Tras su unión y activación del receptor CCR2 induce una respuesta quimiotáctica, además de la movilización de iones calcio intracelulares
UniProtKB= P08476	ENSG0000012 2641	Inhibin beta A chain	INHBA	Similar a INHBE (arriba)

UniProtKB= Q6UXI7	ENSG0000020 5221	Vitrin	VIT	Promueve el ensamblaje de matriz celular y la adhesividad celular. Regula la proliferación y diferenciación de células madre neuronales.
UniProtKB= Q99988	ENSG0000013 0513	Growth/differentiation factor 15	GDF15	Regula la ingesta alimenticia, gasto de energía y peso corporal en respuesta a condiciones de stress por toxinas y metabólico.
UniProtKB= P00750	ENSG0000010 4368	Tissue-type plasminogen activator	PLAT	Mediante el control de la proteólisis mediada por plasmina, juega un papel importante en la degradación y remodelación tisular, además de en la migración celular (facilita la migración neuronal)
UniProtKB= P09871	ENSG0000018 2326	Complement C1s subcomponent	C1S	Participa en la vía clásica del complemento, cuyo fin es la quimiotaxis de células inmunes, además de la opsonización de células dañadas.
UniProtKB= P07093	ENSG0000013 5919	Glia-derived nexin	SERPINE 2	Inhibidor de serina proteasas con actividad hacia la trombina, la tripsina y la uroquinasa. Promueve la extensión de neuritas mediante la inhibición de la trombina
UniProtKB= Q99985	ENSG0000007 5223	Semaphorin-3C	SEMA3C	Funciona como atrayente de axones en crecimiento, y por lo tanto desempeña un papel importante en el crecimiento axonal.
UniProtKB= P30511	ENSG0000020 4642	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain F	HLA-F	Implicada en la vigilancia y tolerancia inmune, además de la inflamación. Desempeña un papel en las respuestas inflamatorias del sistema nervioso periférico.
UniProtKB= Q02297	ENSG0000015 7168	Pro-neuregulin-1, membrane-bound isoform	NRG1	Ligando de receptores tirosina quinasa (ERBB3, ERBB4). Una de sus funciones es la inducción del crecimiento y diferenciación de células epiteliales, gliales, neuronales y musculares.
UniProtKB= P49908	ENSG0000025 0722	Selenoprotein P	SELENOP	Puede suplementar selenio a tejidos como el cerebro y los testículos. Puede además ser responsable de algunos de los efectos antioxidantes del selenio.
UniProtKB= Q30201	ENSG0000001 0704	Hereditary hemochromatosis protein	HFE	Se une al receptor de transferrina y reduce su afinidad por la transferrina cargada de hierro, con lo que se disminuye la internalización celular de hierro

* IGF (Insulin-like growth factor).

4.1.8. SOBRE-REPRESENTACIÓN EN CÉLULAS EXPUESTAS A CPF VERSUS REF_01

Dominio Proceso Biológico

En la tabla 6A de Anexos y figura 7 se muestran las distintas categorías y subcategorías ontológicas del **dominio Proceso biológico** que se encontraron sobre o infra-representadas al evaluar **list_01** versus **REF_01**. De forma global se aprecia una importante **razón de cambio** (*Fold Enrichment*) hacia valores positivos (sobre-representación) en las categorías relacionadas con procesos inmunes y de respuesta celular ante estímulos lesivos. Las categorías padres sobre-representadas con mayores razones de cambio fueron, la **respuesta inmune adaptativa** (*adaptative immune response*), la **vía de señalización mediada por citoquinas** (*cytokine – mediated signaling pathway*), la **respuesta celular hacia estímulos**

por citoquinas (*cellular response to cytokine stimulus*), la **respuesta inmune innata** (*innate immune response*) y la **respuesta de defensa** (*defense response*). La única categoría que presentó infra-representación fue **proceso metabólico** (*metabolic process*).

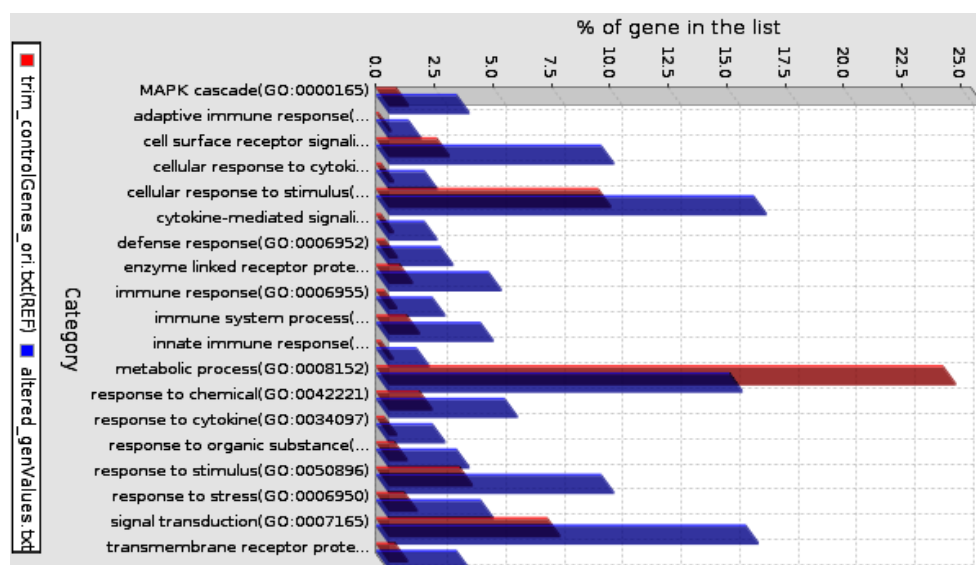


Figura 7. Representación de distintas categorías ontológicas del dominio *GO-Slim Biological Process* entre *list_01* y *REF_01*

Al comparar estos resultados con lo observado en el análisis entre *REF_01* y *REF_00*, donde la mayor parte de estas categorías se encontraban infra-representadas, se hace plausible la existencia de una respuesta celular inflamatoria manifiesta ante la exposición de las células al CPF.

Ordenando las categorías de forma jerárquica (*Hierarchy*), notamos que dentro de las categorías padres sobre-expresadas se encontraba la **respuesta a sustancias químicas** (*response to chemical*) con la subcategoría **respuesta a sustancias orgánicas** (*response to organic substances*). Esto profundiza en la idea de una **respuesta celular** ante un estímulo exógeno (o bien únicamente extracelular). Algunos autores han reportado las propiedades inflamatorias, secundarias a la producción de estrés oxidativo, del CPF (Fu, Li, Song, Zhang, & Xie, 2019; Salyha & Salyha, 2018). Estos estudios se han enfocado en el rol de vías celulares específicas (Shou et al., 2019; Zhao, Yang, & Zhao, 2019). Otros autores han descrito la presencia de neurotoxicidad por CPF como resultado de alteraciones en el sistema de microtúbulos (Schopfer & Lockridge, 2018). A este respecto, en este trabajo se identificaron alteraciones en la expresión de ciertas proteínas relacionadas con el sistema de microtúbulos.

Cuando se efectuó una corrección estadística más rigurosa (**Bonferroni correction**), si bien la cantidad de categorías sobre-representadas fue menor, se extrajo una conclusión similar, ya que las categorías sobre-representadas estaban relacionadas con la respuesta celular ante

estímulos nocivos. Dentro de las categorías padres sobre-representadas se encontraban, la **respuesta a estímulos** (*response to stimulus*) con la subcategoría **respuesta de defensa** (*defense response*) y la **transducción de señales** (*signal transduction*) con la subcategoría **vía de señalización de receptores asociados a enzimas** (*enzyme linked receptor protein signaling pathway*) (tabla 6A).

Dominio Función Molecular

En concordancia con lo descrito hasta ahora, la evaluación del dominio **Función molecular** mostró que las categorías sobre-representadas estaban relacionadas con la respuesta celular ante estímulos lesivos, particularmente la **respuesta celular mediada por citoquinas**. Acá, las subcategorías que mostraron las mayores razones de cambio fueron: la **unión a receptores de citoquinas** (*cytokine receptor binding*) y la **actividad de citoquinas** (*cytokine activity*) con sus correspondientes categorías padres, **unión a proteínas** (*protein binding*) y **actividad reguladora de receptor** (*receptor regulator activity*) (figura 4A, Anexos). Al realizar este análisis ajustando por la corrección de Bonferroni se obtuvieron los mismos resultados.

Dominio Componente Celular

En el análisis del dominio Componente celular, observamos sobre-representación de categorías relacionadas con la maquinaria de **comunicación y respuesta celular**. Las categorías padres que mostraron mayores razones de cambio fueron: la **superficie celular** (*cell surface*) y la **región extracelular** (*extracellular region*), esta última con la subcategoría **espacio extracelular** (*extracellular space*). Al aplicar la corrección de Bonferroni, se obtuvieron resultados similares, siendo la **región extracelular** (*extracellular region*) la única categoría padre sobre-representada.

Valoración combinada de los tres dominios

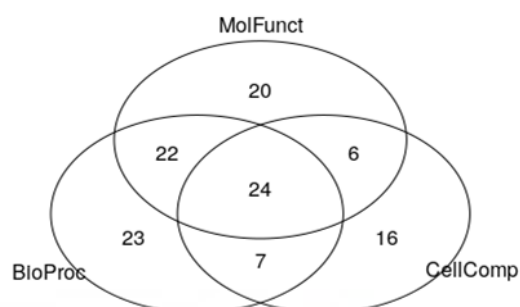
Los resultados combinados de los tres dominios ontológicos nos sugieren la puesta en marcha de las funciones inmunes y de respuesta celular ante agentes lesivos, con la consecuente producción de mediadores (particularmente **citoquinas**) inflamatorios y la expresión de receptores de membrana celular destinados a modificar el ambiente celular interno. Todo esto coincide con la exposición de estas células al CPF, si bien nos hace pensar en la existencia de **dianas no convencionales** que expliquen estos efectos. Estos resultados apoyan lo reportado por algunos autores, respecto a posibles efectos inmunológicos tras la exposición a CPF (Jang et al., 2015; Thrasher, Heuser, & Broughton, 2002).

4.1.9. ANÁLISIS DE RUTAS INTRACELULARES SOBRE REPRESENTADAS

En un intento por clarificar la existencia de rutas celulares modificadas tras la exposición a CPF, filtramos aquellos genes (**filter_ints_genes_01**) cuya sobre-representación se observó

en las tres categorías ontológicas evaluadas entre list_01 y REF_01. Este proceso nos produjo un total de 24 genes candidatos (figura 8 y tabla 4). Puede corroborarse la alta similitud entre estos genes (**filter_ints_genes_01**) y los sobre-representados en el dominio **Componente celular** cuando se comparó REF_00 y list_01 (tabla 3). La mayor parte de los genes filtrados pertenecen a categorías relacionadas con la **respuesta celular ante agentes lesivos** y a la **respuesta inmune**.

Figura 8. Confluencia de genes sobre – expresados en las placas tratadas con CPF (list_01) al contrastar los dominios ontológicos evaluados*.



***MolFunc** representa el número de genes sobre – representados en el dominio función molecular. **BioProc** representa el número de genes sobre – representados en el dominio proceso biológico. **CellComp** representa el número de genes sobre – representados en el dominio componente celular.

Mediante la herramienta **PANTHER Pathways** se realizó un análisis de sobre-representación entre **filter_ints_01** y REF_01 en el que pudo identificarse la existencia de una ruta de señalización intracelular alterada, a saber, la **vía de señalización del TGF – beta** (*TGF – beta signaling pathway [Transforming growth factor beta]*). Los resultados de este análisis mostraron una razón de cambio (*Fold Enrichment*) de 29.18 y fueron reproducibles al utilizar la corrección de Bonferroni. La tabla 4 muestra cuales de los genes filtrados corresponden con la vía de señalización mencionada (4/24 genes).

La presencia de sobre-representación en la misma ruta de señalización intracelular se constató al comparar list_01 con REF_01, si bien en este caso la razón de enriquecimiento fue de 4.6, lo que nos sugiere que el proceso de filtrado de genes candidatos mejoró la sensibilidad y especificidad el análisis.

Como se ha mencionado, algunos autores han demostrado el papel del CPF en la alteración de otras vías inflamatorias (Shou et al., 2019; Zhao et al., 2019), por lo que su efecto como sustancia capaz de alterar la vía de señalización del TGF-beta deberá ser revisado.

Tabla 4. Genes sobre – representados confluentes en los tres dominios ontológicos para las placas expuestas a CPF (list_01)

UniprotID	Gene Name	Función	TGF-beta*
P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A	tabla 3	-
Q16288	NT-3 growth factor receptor	Receptor tirosina quinasa implicado en procesos de supervivencia y diferenciación celular	-
P17936	Insulin-like growth factor-binding protein 3	tabla 3	-
P58166	Inhibin beta E chain	tabla 3	+
Q6UWB1	Interleukin-27 receptor subunit alpha	Implicado en la regulación de respuestas inmunes del tipo Th1. También está implicado en los mecanismos innatos de defensa	-
P08476	Inhibin beta A chain	tabla 3	+
Q99988	Growth/differentiation factor 15	tabla 3	+
P30511	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain F	tabla 3	-
Q02297	Pro-neuregulin-1, membrane-bound isoform	tabla 3	-
P22692	Insulin-like growth factor-binding protein 4	tabla 3	-
P10145	Interleukin-8	tabla 3	-
P46091	G-protein coupled receptor 1	Receptor con funciones reguladoras en la inflamación. Se une a chemerin/RARRES2** (quimioatrayente de leucocitos asociado a la inflamación)	-
P19876	C-X-C motif chemokine 3	tabla 3	-
P37023	Serine/threonine-protein kinase receptor R3	Receptor de tipo 1 los ligandos BMP9/GDF2 y BMP10 de la familia del TGF – beta. Activa los reguladores transcripcionales SMAD ⁵	+
P26022	Pentraxin-related protein PTX3	tabla 3	-
P15018	Leukemia inhibitory factor	tabla 3	-
Q9H3T3	Semaphorin-6B	tabla 3	-
O00478	Butyrophilin subfamily 3 member A3	Implicada en la respuesta de células T como parte de la inmunidad adaptativa	-
Q99075	Proheparin-binding EGF-like growth factor	tabla 3	-
Q31612	HLA class I histocompatibility antigen, B-73 alpha chain	tabla 3	-
Q5KU26	Collectin-12	tabla 3	-
P13500	C-C motif chemokine 2	tabla 3	-
Q10589	Bone marrow stromal antigen 2	Factor de restricción antiviral inducido por IFN [#] . Tiene funciones adicionales relacionadas con la inhibición del crecimiento y migración celular	-
Q99985	Semaphorin-3C	tabla 3	-

* Indica si el gen pertenece a la vía de señalización intracelular del TGF – beta.

4.2. BÚSQUEDA DE DIANAS PARA OP

En un intento por clarificar la relevancia de los genes expresados diferencialmente entre las células control y las células tratadas con CPF, como dianas capaces de explicar el inicio de las alteraciones inflamatorias encontradas, efectuamos una búsqueda patrones para **esterasas de serina** dentro de las secuencias proteicas tanto en células control como en células tratadas.

Se utilizaron dos patrones para esta búsqueda, pattern0 y pattern1. **pattern0** (G-x-S-x-G) representa la **secuencia consenso** para las esterasas de serina. **pattern1** (G-x-S-[STAG]-G) representa dicha secuencia consenso, pero con una restricción en los aminoácidos posibles dentro de la 4 posición del patrón.

Utilizando el pattern0, en las células control identificamos 2358 genes codificantes de proteínas cuyas secuencias presentaban al menos una región con el patrón de interés. Realizando una búsqueda similar, utilizando pattern1, identificamos 1020 genes codificantes de proteínas que contenían en sus secuencias el pattern1 (recuérdese que pattern1 es más restrictivo).

Al realizar búsquedas similares en el conjunto genes expresados diferencialmente entre las células control (REF_01) y las células tratadas con CPF (list_01), con pattern0 y pattern1 se identificaron 49 y 20 genes respectivamente. En la tabla 5 se presenta una lista con los genes identificados utilizando pattern0, además de un resumen de sus roles biológicos (tabla 7A, Anexos). La mayor parte están relacionados con el neurodesarrollo, la supervivencia y proliferación celular, la respuesta inflamatoria y los procesos de oncogénesis.

Como se ha mencionado (**arriba, Introduccion**), los efectos tóxicos de los OP se han relacionado con su capacidad de modificar enzimas con actividad serina esterasa. Tomando en cuenta que los productos proteicos de los genes identificados presentan en sus secuencias sitios serina esterasa y que muchos codifican proteínas con esta actividad enzimática, podemos inferir que podrían ser susceptibles de modificarse por plaguicidas OP y por tanto ser responsables del inicio de las alteraciones biológicas observadas. No se postula un gen único como responsable, sino más bien un efecto combinado tras la alteración de diversos procesos celulares mediados por genes susceptibles.

Si bien comprendemos que existen diversos factores que condicionan la interacción de dos moléculas (en este caso un OP y otra macromolécula), la AOP plateada tiene fundamento en la evidencia experimental de que los OP pueden alterar enzimas en cuyas secuencias encontramos los patrones evaluados (Bird, 2019; Glynn, 1999; Karalliedde et al., 2006).

Para corroborar la presencia de los patrones utilizados dentro de las secuencias de enzimas conocidas por ser dianas de OP, efectuamos dicho reconocimiento de patrón en la secuencia proteica de la NTE (Neuropathy Target Esterase), una enzima postulada como responsable de la neuropatía retardada (OPIDN) observada con los OP. En este caso solo se identificó la presencia de pattern0 (no se identificó pattern1). Esto nos sugiere que dicho patrón en efecto **identifica a proteínas susceptibles** de ser modificadas por OP y con ello candidatas a ser responsables de los efectos tóxicos de estos compuestos. Una comprobación similar se realizó para las secuencias proteicas de la AChE (acetilcolinesterasa) y la BChE (butirilcolinoesterasa), identificándose la presencia de ambos patrones.

En algunas de las secuencias proteicas de los genes identificados se observó la presencia de más de un sitio con el patrón (pattern0 o pattern1) de interés, esto fue cierto tanto para genes expresados por las células control como por células tratadas (tabla 5). Además, del total de genes que presentaron el patrón de interés en list_01 (genes expresados diferencialmente), la mayoría se encontraban sobre-expresados (29, n = 49).

Resulta de interés que la mayor parte (46, n = 49) de genes identificados debido a que sus productos proteicos contenían los patrones evaluados, **no se encontraban** dentro de los genes sobre-representados en los tres dominios ontológicos (**filter_ints_genes_01**). Esta observación apoya la hipótesis de que la modificación de dichos genes en las células expuestas a CPF podría representar el evento iniciador o de perpetuación de las alteraciones celulares identificadas.

Tabla 5. Genes en células expuestas a CPF con secuencias proteicas que presentan el pattern0*

UniProt ID	Proteína	Gen	E.D.	F.C.
Q15562	Transcriptional enhancer factor TEF-4	TEAD2	+	0.52
Q9BQE4	Selenoprotein S	SELENOS	-	-0.49
O75084	Frizzled-7	FZD7	+	0.54
Q9H7S9	Zinc finger protein 703	ZNF703	-	-0.63
Q96F45	Zinc finger protein 503	ZNF503	+	0.63
Q16288	NT-3 growth factor receptor	NTRK3	-	-2.39
Q96N28	PRELI domain containing protein 3A	PRELID3A	-	-1.04
P14316	Interferon regulatory factor 2	IRF2	+	0.61
Q14721	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1	KCNB1	+	4.29
Q96IP4	Putative nucleotidyltransferase FAM46A	FAM46A	-	-0.71
Q9HCU4	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	CELSR2	+	0.704
Q9Y6M5	Zinc transporter 1	SLC30A1	-	-0.54
Q9Y4H2	Insulin receptor substrate 2	IRS2	-	-1.06
Q5TH69	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3	ARFGEF3	-	-0.78
P98172	Ephrin-B1	EFNB1	+	0.48
Q9UPQ0	LIM and calponin homology domains-containing protein 1	LIMCH1	+	0.87
O95834	Echinoderm microtubule-associated protein-like 2	EML2	+	1.82
Q5K651	Sterile alpha motif domain-containing protein 9	SAMD9	+	0.49
Q96JG9	Zinc finger protein 469	ZNF469	-	-0.54
Q6UXI7	Vitrin	VIT	+	1.02
O75808	Calpain-15	CAPN15	-	-0.53
P50591	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10	TNFSF10	+	1.7
Q99836	Myeloid differentiation primary response protein MyD88	MYD88	+	0.55
P00750	Tissue-type plasminogen activator	PLAT	-	-0.7
Q8IZP7	Heparan-sulfate 6-O-sulfotransferase 3	HS6ST3	+	0.75
Q6ZV29	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 7	PNPLA7#	+	0.87
P06681	Complement C2	C2	+	1.13
P22692	Insulin-like growth factor-binding protein 4	IGFBP4	+	1.36
P55317	Hepatocyte nuclear factor 3-alpha	FOXA1	+	0.86
Q7Z7A3	Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 1	CTU1	-	-0.71
Q9UHV9	Prefoldin subunit 2	PFDN2	-	-0.65
P55287	Cadherin-11	CDH11	+	0.93
P43234	Cathepsin O	CTSO	+	0.87
P15018	Leukemia inhibitory factor	LIF	-	-0.78
Q9H3T3	Semaphorin-6B	SEMA6B	+	1
O43474	Krueppel-like factor 4	KLF4	-	-0.64
O00478	Butyrophilin subfamily 3 member A3	BTN3A3	+	0.58
P32456	Guanylate-binding protein 2	GBP2	+	0.62
O60243	Heparan-sulfate 6-O-sulfotransferase 1	HS6ST1	+	0.5
Q96MK2	RIPOR family member 3	RIPOR3 (FAM65C)	+	1.16
P15407	Fos-related antigen 1	FOSL1	-	-0.57
P08254	Stromelysin-1	MMP3	-	-1.66
P09871	Complement C1s subcomponent	C1S	+	0.54
Q14469	Transcription factor HES-1	HES1	+	0.96

UniProt ID	Proteína	Gen	E.D.	F.C.
P46821	Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	-	-0.5
Q96S99	Pleckstrin homology domain-containing family F member 1	PLEKHF1	-	-0.63
Q14533	Keratin, type II cuticular Hb1	KRT81	-	-0.85
Q96CX2	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	KCTD12	+	0.66
Q9HCN8	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1	SDF2L1	-	-0.44

*Ver Tabla 7A Anexos el listado de funciones de estas proteínas.

En rojo se presentan los códigos UniProt de aquellas proteínas sobreexpresadas. En azul se presenta el código UniProt que las proteínas que también se detectaron en la tabla 3 (*GO-Slim Cellular Component*). **E.D.** representa la expresión diferencial (+ = sobreexpresión, - = infraexpresión). **F.C.** (log. Fold change) representa el logaritmo de la razón de cambio.



5. CONCLUSIONES

- La línea celular T98G es un modelo celular apropiado para el estudio de alteraciones transcriptómicas ante la exposición a sustancias químicas (en este caso CPF).
- En las células T98G (REF_01) existe una aparente mayor capacidad biosintética macromolecular y reparadora del material genético en relación con el genoma codificante humano (REF_00).
- Aunque las células T98G (REF_01) presentan infra-representación de las categorías pertinentes a la interacción y respuesta celular, esto debe ser interpretado como un estado de quiescencia celular ante la falta de estímulos exógenos, y no como la ausencia de capacidad de respuesta ante estímulos inmunes.
- Para las células expuestas a CPF (list_01) se aprecia un aumento significativo en las funciones asociadas con la capacidad de respuesta e interacción celular, con la consiguiente sobreexpresión de distintas moléculas de señalización y receptores implicados en respuestas inflamatorias.
- En las células expuestas a CPF se observó una expresión diferencial de genes relacionados con los procesos de crecimiento y diferenciación celular. Lo anterior puede ser secundario a los cambios inflamatorios.
- La vía de señalización del TGF – beta parece ser clave tanto para explicar este aumento en la capacidad de interacción celular, como para explicar potenciales efectos neurodegenerativos de los plaguicidas OP.
- Dentro de los genes expresados diferencialmente en las células expuestas a CPF se identificaron genes codificantes de proteínas cuyas secuencias podrían ser susceptibles de ser modificadas por OPs y por ser eventos iniciadores o de mantenimiento en AOPs (Adverse Outcomes Pathways) alternativas.
- Dentro de los genes expresados diferencialmente que codifican proteínas cuyas secuencias contenían los patrones evaluados, la mayoría se relacionan con el neurodesarrollo, la supervivencia y proliferación celular, la respuesta inflamatoria y los procesos de oncogénesis.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- abcam. (2019a, June 11). Counting cells using a hemocytometer. Retrieved June 11, 2019, from <https://www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-haemocytometer>
- abcam. (2019b, June 16). Aseptic technique tips. Retrieved from <https://docs.abcam.com/pdf/protocols/aseptic-technique.pdf>
- abcam. (2019c, November 6). Cryopreservation protocol. Retrieved June 11, 2019, from <https://www.abcam.com/protocols/cryopreservation-of-mammalian-cell-lines-video-protocol>
- Abdel-Rahman, A. A., Blumenthal, G. M., Abou-Donia, S. A., Ali, F. A. F., Abdel-Monem, A. E., & Abou-Donia, M. B. (2002). Pharmacokinetic profile and placental transfer of a single intravenous injection of [(14)C] chlorpyrifos in pregnant rats. *Archives of Toxicology*, 76(8), 452–459. <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0366-2>
- ATCC. (2003). *Formulation for Eagle's Minimun Essential Medium (EMEM)*. Retrieved from <http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Documents/Microbial%20Media%20Formulations/2/8/3/ATCC%20Medium%2030-2003.ashx>
- Ates, G., Vanhaecke, T., Rogiers, V., & Rodrigues, R. M. (2017). Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. In D. F. Gilbert & O. Friedrich (Eds.), *Cell Viability Assays: Methods and Protocols* (pp. 19–26). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2
- Barone, S., Das, K. P., Lassiter, T. L., & White, L. D. (2000). Vulnerable processes of nervous system development: A review of markers and methods. *Neurotoxicology*, 21(1–2), 15–36.
- Becker, D. E. (2012). Basic and Clinical Pharmacology of Autonomic Drugs. *Anesthesia Progress*, 59(4), 159–169. <https://doi.org/10.2344/0003-3006-59.4.159>
- Berteau, P. E., & Deen, W. A. (1978). A comparison of oral and inhalation toxicities of four insecticides to mice and rats [for the purpose of assessing hazards to field workers]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology (USA)*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US7867297>
- Bicker, W., Lämmerhofer, M., & Lindner, W. (2005). Determination of chlorpyrifos metabolites in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 822(1–2), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.003>
- Bird, S. (2019, January 29). Organophosphate and carbamate poisoning—UpToDate. Retrieved August 22, 2019, from https://www.uptodate.com/contents/organophosphate-and-carbamate-poisoning?search=organophosphate%20poisoning&source=search_result&selectedTitle=1~27&usage_type=default&display_rank=1#H3

- Brenner, F. E., Bond, G. G., McLaren, E. A., Green, S., & Cook, R. R. (1989). Morbidity among employees engaged in the manufacture or formulation of chlorpyrifos. *British Journal of Industrial Medicine*, 46(2), 133–137.
- Buratti, F. M., Leoni, C., & Testai, E. (2006). Foetal and adult human CYP3A isoforms in the bioactivation of organophosphorothionate insecticides. *Toxicology Letters*, 167(3), 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.10.006>
- Buratti, F. M., Volpe, M. T., Meneguz, A., Vittozzi, L., & Testai, E. (2003). CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 186(3), 143–154. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(02\)00027-3](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(02)00027-3)
- Casida, J. E., & Quistad, G. B. (2004). Organophosphate toxicology: Safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical Research in Toxicology*, 17(8), 983–998. <https://doi.org/10.1021/tx0499259>
- CE. (1998). *Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market*. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1998/8/oj>
- CE. (2007). *Decisión de la Comisión de 14 de agosto de 2007 sobre la no inclusión, en los anexos I, IA o IB de la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la comercialización de biocidas, de determinadas sustancias que han de examinarse en el marco del programa de trabajo de diez años contemplado en su artículo 16, apartado 2. DOCE L216/17 (21.08.2007)*. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32007D0565>
- Chambers, H. W., Meek, E. C., & Chambers, J. E. (2010). Chemistry of Organophosphorus Insecticides. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1395–1398). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00064-1>
- Chambers, J. E., & Carr, R. L. (1993). Inhibition patterns of brain acetylcholinesterase and hepatic and plasma aliesterases following exposures to three phosphorothionate insecticides and their oxons in rats. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology*, 21(1), 111–119.
- Chambers, J. E., & Chambers, H. W. (1989). Oxidative desulfuration of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, and leptophos by rat brain and liver. *Journal of Biochemical Toxicology*, 4(3), 201–203.
- Chen, L., & Wong, G. (2019). Transcriptome Informatics. In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (Vol. 2, pp. 324–340). Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780128114322/encyclopedia-of-bioinformatics-and-computational-biology#book-description>

- Choi, K., Joo, H., Rose, R. L., & Hodgson, E. (2006). Metabolism of chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon by human hepatocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 20(6), 279–291. <https://doi.org/10.1002/jbt.20145>
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15(3), 532–534, 536–537.
- Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 366(1–2), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.10.008>
- Costa, L. G., Cole, T. B., Vitalone, A., & Furlong, C. E. (2005). Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 352(1–2), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.09.019>
- Dulbecco, R., & Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8(3), 396–397. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(59\)90043-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(59)90043-1)
- EC. (2017). *Chlorpyrifos Draft Renewal Assessment Report prepared according to the Commission Regulation (EU) N° 1107/2009. Rapporteur Member State: Spain, Co-Rapporteur Member State: Poland.* Retrieved from <https://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/171018-0>
- ECACC. (2019, August 22). ECACC General Cell Collection: T98G. Retrieved August 22, 2019, from Culture Collections website: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=92090213&collection=ecacc_gc
- EFSA. (2017, December 18). Public consultation on the active substance chlorpyrifos. Retrieved March 9, 2019, from European Food Safety Authority website: <https://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/171018-0>
- EFSA. (2019a). Chlorpyrifos: Assessment identifies human health effects [Press News]. Retrieved March 9, 2019, from European Food Safety Authority website: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/chlorpyrifos-assessment-identifies-human-health-effects>
- EFSA. (2019b, July 31). *Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos-methyl.* Retrieved from <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5810>
- EFSA. (2019c, August). *Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos.* Retrieved from <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5809>
- EPA, U. (2002). *Interim reregistration eligibility decision for chlorpyrifos.* US EPA Washington DC.

- Forsyth, C. S., & Chambers, J. E. (1989). Activation and degradation of the phosphorothionate insecticides parathion and EPN by rat brain. *Biochemical Pharmacology*, 38(10), 1597–1603. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90307-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90307-9)
- Fu, D.-J., Li, P., Song, J., Zhang, S.-Y., & Xie, H.-Z. (2019). Mechanisms of synergistic neurotoxicity induced by two high risk pesticide residues—Chlorpyrifos and Carbofuran via oxidative stress. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 54, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.10.016>
- Garabrant, D. H., Aylward, L. L., Berent, S., Chen, Q., Timchalk, C., Burns, C. J., ... Albers, J. W. (2009). Cholinesterase inhibition in chlorpyrifos workers: Characterization of biomarkers of exposure and response in relation to urinary TCPy. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 19(7), 634–642. <https://doi.org/10.1038/jes.2008.51>
- GENEONTOLOGY. (2019, July 1). Gene Ontology Resource. Retrieved August 23, 2019, from Gene Ontology Resource website: <http://geneontology.org/>
- Glynn, P. (1999). Neuropathy target esterase. *The Biochemical Journal*, 344 Pt 3, 625–631.
- Griffin, P., Mason, H., Heywood, K., & Cocker, J. (1999). Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: A human volunteer study. *Occupational and Environmental Medicine*, 56(1), 10–13.
- Hrom, P. C., Millburn, P., Smith, R. L., & Williams, R. T. (1972). Species variations in the threshold molecular-weight factor for the biliary excretion of organic anions. *The Biochemical Journal*, 129(5), 1071–1077. <https://doi.org/10.1042/bj1291071>
- Huff, R. A., Corcoran, J. J., Anderson, J. K., & Abou-Donia, M. B. (1994). Chlorpyrifos oxon binds directly to muscarinic receptors and inhibits cAMP accumulation in rat striatum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 269(1), 329–335.
- Imai, T., Taketani, M., Shii, M., Hosokawa, M., & Chiba, K. (2006). Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 34(10), 1734–1741. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.009381>
- Ingelman-Sundberg, M. (2002). Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology*, 181–182, 447–452. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00492-4](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00492-4)
- invitrogen. (n.d.). *TRizol Reagent*. Retrieved from https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf
- Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., & Pandey, A. K. (2018). Chapter 3—Models and Methods for In Vitro Toxicity. In A. Dhawan & S. Kwon (Eds.), *In Vitro Toxicology* (pp. 45–65). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804667-8.00003-1>
- Jang, Y., Lee, A. Y., Jeong, S.-H., Park, K.-H., Paik, M.-K., Cho, N.-J., ... Cho, M.-H. (2015). Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and pyroptosis/apoptosis via mitochondrial

- oxidative stress in human keratinocyte HaCaT cells. *Toxicology*, 338, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.09.006>
- Kaplan, J. G., Kessler, J., Rosenberg, N., Pack, D., & Schaumburg, H. H. (1993). Sensory neuropathy associated with Dursban (chlorpyrifos) exposure. *Neurology*, 43(11), 2193–2196. <https://doi.org/10.1212/wnl.43.11.2193>
- Karalliedde, L., Baker, D., & Marrs, T. C. (2006). Organophosphate-induced intermediate syndrome: Aetiology and relationships with myopathy. *Toxicological Reviews*, 25(1), 1–14.
- Klaassen, C. D. (2008). *Casarett and Doull's Toxicology: Basic Science of Poisons—7th edition*. <https://doi.org/10.1036/0071470514>
- Krieger, R. I. (1995). Pesticide exposure assessment. *Toxicology Letters*, 82–83, 65–72. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03545-1](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03545-1)
- Kutz, F. W., Cook, B. T., Carter-Pokras, O. D., Brody, D., & Murphy, R. S. (1992). Selected pesticide residues and metabolites in urine from a survey of the U.S. general population. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 37(2), 277–291. <https://doi.org/10.1080/15287399209531670>
- Kwong, T. C. (2002). Organophosphate pesticides: Biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24(1), 144–149.
- Li, W. F., Furlong, C. E., & Costa, L. G. (1995). Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicology Letters*, 76(3), 219–226. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)80006-y](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)80006-y)
- Ma, T., & Chambers, J. E. (1994). Kinetic parameters of desulfuration and dearylation of parathion and chlorpyrifos by rat liver microsomes. *Food and Chemical Toxicology*, 32(8), 763–767. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(09\)80009-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(09)80009-4)
- MAPA. (2019). Registro de productos fitosanitarios. Retrieved August 3, 2019, from MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN website: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>
- Marioni, J. C., Mason, C. E., Mane, S. M., Stephens, M., & Gilad, Y. (2008). RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research*, 18(9), 1509–1517. <https://doi.org/10.1101/gr.079558.108>
- Medicago. (n.d.). *Phosphate Buffered Saline*. Retrieved from http://www.medicago.se/sites/default/files/pdf/productsheets/PBS_Buffer_v._01.pdf
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. T., & Thomas, P. D. (2013). Large-scale gene function analysis with PANTHER Classification System. *Nature Protocols*, 8(8), 1551–1566. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.092>
- Mi, H., Muruganujan, A., & Thomas, P. D. (2013). PANTHER in 2013: Modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D377–D386. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1118>

- Moretto, A., & Lotti, M. (1998). Poisoning by organophosphorus insecticides and sensory neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 64(4), 463–468. <https://doi.org/10.1136/jnnp.64.4.463>
- Mueller, O., Lightfoot, S., & Schroeder, A. (2004). RNA integrity number (RIN)–standardization of RNA quality control. *Agilent Application Note, Publication*, 1, 1–8.
- Mutch, E., & Williams, F. M. (2006). Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver. *Toxicology*, 224(1–2), 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.024>
- Nolan, R. J., Rick, D. L., Freshour, N. L., & Saunders, J. H. (1984). Chlorpyrifos: Pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 73(1), 8–15. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(84\)90046-2](https://doi.org/10.1016/0041-008x(84)90046-2)
- PANTHER. (2017, June 7). *PANTHER User Manual*. Retrieved from http://pantherdb.org/help/PANTHER_user_manual.pdf
- Pawlina, W., & Ross, M. H. (2018). Nerve Tissue. In *Histology: A text and atlas: With correlated cell and molecular biology* (Seventh Edition, pp. 371–378). Lippincott Williams & Wilkins.
- Poet, T. S., Wu, H., Kousba, A. A., & Timchalk, C. (2003). In vitro rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 72(2), 193–200. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg035>
- Pond, A. L., Chambers, H. W., & Chambers, J. E. (1995). Organophosphate detoxication potential of various rat tissues via A-esterase and aliesterase activities. *Toxicology Letters*, 78(3), 245–252. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03327-h](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03327-h)
- Pope, C. N. (1999). Organophosphorus pesticides: Do they all have the same mechanism of toxicity? *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 2(2), 161–181. <https://doi.org/10.1080/109374099281205>
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In D. F. Gilbert & O. Friedrich (Eds.), *Cell Viability Assays: Methods and Protocols* (pp. 1–17). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1
- PubChem. (2019, August 23). Chlorpyrifos. Retrieved August 23, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2730>
- Richardson, R. J. (1995). Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: A critical review of the literature. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 44(2), 135–165. <https://doi.org/10.1080/15287399509531952>
- Salyha, N., & Salyha, Y. (2018). Protective role of l-glutamic acid and l-cysteine in mitigation the chlorpyrifos-induced oxidative stress in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 64, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.10.010>

- Sams, C., Cocker, J., & Lennard, M. S. (2004). Biotransformation of chlorpyrifos and diazinon by human liver microsomes and recombinant human cytochrome P450s (CYP). *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 34(10), 861–873. <https://doi.org/10.1080/00498250400017273>
- Sanghi, R., Pillai, M. K. K., Jayalekshmi, T. R., & Nair, A. (2003). Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Human & Experimental Toxicology*, 22(2), 73–76. <https://doi.org/10.1191/0960327103ht321oa>
- Satoh, T., & Hosokawa, M. (1998). The mammalian carboxylesterases: From molecules to functions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38, 257–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.257>
- Satoh, Tetsuo, Taylor, P., Bosron, W. F., Sanghani, S. P., Hosokawa, M., & La Du, B. N. (2002). Current progress on esterases: From molecular structure to function. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 30(5), 488–493. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.5.488>
- Schopfer, L. M., & Lockridge, O. (2018). Chlorpyrifos oxon promotes tubulin aggregation via isopeptide cross-linking between diethoxyphospho-Lys and Glu or Asp: Implications for neurotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(35), 13566–13577. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004172>
- ScienCell. (n.d.). *Trypsin/EDTA Solution, 0.25% (T/E)*. Retrieved from <https://www.sciencellonline.com/PS/103.pdf>
- Senanayake, N., & Karalliedde, L. (1987). Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 316(13), 761–763. <https://doi.org/10.1056/NEJM198703263161301>
- Sevim, S., Aktekin, M., Dogu, O., Ozturk, H., & Ertas, M. (2003). Late onset polyneuropathy due to organophosphate (DDVP) intoxication. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 30(1), 75–78.
- Sherwood, L. (2015). *Human physiology: From cells to systems*. Cengage learning.
- Shou, L., Bei, Y., Song, Y., Wang, L., Ai, L., Yan, Q., & He, W. (2019). Nrf2 mediates the protective effect of edaravone after chlorpyrifos-induced nervous system toxicity. *Environmental Toxicology*, 34(5), 626–633. <https://doi.org/10.1002/tox.22728>
- Sigma-Aldrich. (2011). *Fetal Bovine Serum*. Retrieved from https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/p12303.pdf
- Sigma-Aldrich. (2019, August 22). *Dubelcco's Phosphate Buffered Saline*. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Formulation/d5773for.pdf>

- Stein, G. H. (1979). T98G: An anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, 99(1), 43–54. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040990107>
- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, Appendix 3, Appendix 3B. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>
- Sultatos, L. G. (1994). Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 43(3), 271–289. <https://doi.org/10.1080/15287399409531921>
- Sultatos, L. G., Minor, L. D., & Murphy, S. D. (1985). Metabolic activation of phosphorothioate pesticides: Role of the liver. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 232(3), 624–628.
- Talcott, R. E., Mallipudi, N. M., Umetsu, N., & Fukuto, T. R. (1979). Inactivation of esterases by impurities isolated from technical malathion. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 49(1), 107–112. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(79\)90282-5](https://doi.org/10.1016/0041-008X(79)90282-5)
- Tang, J., Cao, Y., Rose, R. L., Brimfield, A. A., Dai, D., Goldstein, J. A., & Hodgson, E. (2001). Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 29(9), 1201–1204.
- Testai, E., Buratti, F. M., & Di Consiglio, E. (2010). Chlorpyrifos. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, 1505–1526. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00070-7>
- ThermoFisher. (2019a). Subculturing Adherent Cells. Retrieved June 10, 2019, from <https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/subculturing-adherent-cells.html>
- ThermoFisher. (2019b, June 13). Assessing ARN Quality. Retrieved June 13, 2019, from <https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/assessing-rna-quality.html>
- ThermoFisher. (2019c, August 22). 32430—DMEM, high glucose, GlutaMAX(TM), HEPES. Retrieved August 22, 2019, from <https://www.thermofisher.com/es/es/home/technical-resources/media-formulation.177.html>
- ThermoFisher. (2019d, October 6). Concentrating Cells. Retrieved June 10, 2019, from <https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/concentrating-cells.html>
- ThermoFisher. (2019e, October 6). Cryopreservation of Mammalian Cells. Retrieved June 10, 2019, from <https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cryopreservation-of-mammalian-cells.html>

- ThermoFisher. (n.d.-a). 25200-0.25% Trypsin-EDTA (1x), phenol red. Retrieved August 23, 2019, from <https://www.thermofisher.com/es/es/home/technical-resources/media-formulation.298.html>
- ThermoFisher. (n.d.-b). Counting Cells in a Hemacytometer. Retrieved June 11, 2019, from <https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/counting-cells-in-a-hemacytometer.html>
- Thrasher, J. D., Heuser, G., & Broughton, A. (2002). Immunological abnormalities in humans chronically exposed to chlorpyrifos. *Archives of Environmental Health*, 57(3), 181–187. <https://doi.org/10.1080/00039890209602934>
- Timchalk, C., Nolan, R. J., Mendrala, A. L., Dittenber, D. A., Brzak, K. A., & Mattsson, J. L. (2002). A Physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model for the organophosphate insecticide chlorpyrifos in rats and humans. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 66(1), 34–53. <https://doi.org/10.1093/toxsci/66.1.34>
- UE. (2012). *Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products Text with EEA relevance*. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj>
- WHO. (2015). *WHO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR PUBLIC HEALTH PESTICIDES, CHLORPYRIFOS*. Retrieved from https://www.who.int/whopes/quality/Chlorpyrifos_WHO_specs_eval_Aug_2015.pdf
- Whyatt, R. M., & Barr, D. B. (2001). Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: A validation study. *Environmental Health Perspectives*, 109(4), 417–420.
- Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2), 99–117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>
- Zhao, M.-W., Yang, P., & Zhao, L.-L. (2019). Chlorpyrifos activates cell pyroptosis and increases susceptibility on oxidative stress-induced toxicity by miR-181/SIRT1/PGC-1 α /Nrf2 signaling pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Implication for association between chlorpyrifos and Parkinson's disease. *Environmental Toxicology*, 34(6), 699–707. <https://doi.org/10.1002/tox.22736>

7. ANEXOS



Tabla 1A. Distribución de categorías ontológicas en los dominios Función molecular, Proceso biológico y Componente celular para REF_01

Dominio ontológico	Categoría (Accession)*	Genes hitted [#]	Genes hitted total [§]	Genes hitted domain ^{&}
Proceso biológico				
	cellular process (GO:0009987)	3486	30.6%	31.7%
	metabolic process (GO:0008152)	2759	24.2%	25.1%
	biological regulation (GO:0065007)	1702	15.0%	15.5%
	localization (GO:0051179)	1276	11.2%	11.6%
	multicellular organismal process (GO:0032501)	513	4.5%	4.7%
	response to stimulus (GO:0050896)	407	3.6%	3.7%
	developmental process (GO:0032502)	206	1.8%	1.9%
	cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	179	1.6%	1.6%
	immune system process (GO:0002376)	149	1.3%	1.4%
	biological adhesion (GO:0022610)	148	1.3%	1.3%
	reproduction (GO:0000003)	100	0.9%	0.9%
	cell proliferation (GO:0008283)	41	0.4%	0.4%
	biological phase (GO:0044848)	20	0.2%	0.2%
	rhythmic process (GO:0048511)	14	0.1%	0.1%
	signaling (GO:0023052)	5	0.0%	0.0%
	pigmentation (GO:0043473)	4	0.0%	0.0%
	multi-organism process (GO:0051704)	3	0.0%	0.0%
	locomotion (GO:0040011)	1	0.0%	0.0%
Componente celular				
	cell (GO:0005623)	3406	29.9%	42.9%
	organelle (GO:0043226)	2691	23.6%	33.9%
	protein-containing complex (GO:0032991)	1016	8.9%	12.8%
	membrane (GO:0016020)	458	4.0%	5.8%
	extracellular region (GO:0005576)	272	2.4%	3.4%
	cell junction (GO:0030054)	66	0.6%	0.8%
	supramolecular complex (GO:0099080)	20	0.2%	0.3%
	synapse (GO:0045202)	14	0.1%	0.2%
Función molecular				
	catalytic activity (GO:0003824)	2987	26.3%	37.2%
	binding (GO:0005488)	2948	25.9%	36.7%
	transcription regulator activity (GO:0140110)	547	4.8%	6.8%
	molecular function regulator (GO:0098772)	462	4.1%	5.8%
	transporter activity (GO:0005215)	458	4.0%	5.7%
	structural molecule activity (GO:0005198)	301	2.6%	3.7%
	molecular transducer activity (GO:0060089)	296	2.6%	3.7%
	translation regulator activity (GO:0045182)	29	0.3%	0.4%
	cargo receptor activity (GO:0038024)	5	0.0%	0.1%

* Nombre de las categorías ontológicas con su ID.

Número de **genes** en **REF_01** que fueron mapeados hacia la categoría ontológica específica.

§ Porcentaje de **genes mapeados** en la categoría ontológica específica respecto al total de **genes en REF_01**

& Porcentaje de **genes mapeados** en la categoría ontológica específica respecto al total de **genes mapeados hacia el dominio ontológico**.



Tabla 2A. Categorías ontológicas del dominio Proceso biológico (GO – Slim Biological Process) supra – representadas al analizar REF_00 versus REF_01

Categorías	REF_00 [#]	REF_01 [§]	Esp.*	F.E.**	p
ribonucleoprotein complex biogenesis (GO:0022613)	138	128	75	1.71	0.020
cellular response to DNA damage stimulus (GO:0006974)	221	199	120	1.66	0.000
protein modification by small protein conjugation or removal (GO:0070647)	217	195	118	1.66	0.000
protein modification by small protein conjugation (GO:0032446)	217	195	118	1.66	0.000
DNA repair (GO:0006281)	177	159	96	1.66	0.006
protein ubiquitination (GO:0016567)	200	179	108	1.65	0.002
proteasomal protein catabolic process (GO:0010498)	153	136	83	1.64	0.045
formation of translation initiation ternary complex (GO:0001677)	217	190	118	1.62	0.003
translational termination (GO:0006415)	217	190	118	1.62	0.003
translational elongation (GO:0006414)	217	190	118	1.62	0.003
proteolysis involved in cellular protein catabolic process (GO:0051603)	253	220	137	1.60	0.000
cellular protein catabolic process (GO:0044257)	255	220	138	1.59	0.001
translation (GO:0006412)	253	218	137	1.59	0.001
cellular response to stress (GO:0033554)	336	284	182	1.56	0.000
protein catabolic process (GO:0030163)	289	242	157	1.55	0.001
macromolecule catabolic process (GO:0009057)	300	249	163	1.53	0.001
RNA metabolic process (GO:0016070)	275	226	149	1.52	0.005
nucleic acid metabolic process (GO:0090304)	386	312	209	1.49	0.000
macromolecule metabolic process (GO:0043170)	2419	1749	1311	1.33	0.000
organelle organization (GO:0006996)	771	553	418	1.32	0.001
organic substance metabolic process (GO:0071704)	3338	2346	1809	1.30	0.000
cellular localization (GO:0051641)	934	656	506	1.30	0.000
cellular macromolecule localization (GO:0070727)	857	601	464	1.29	0.001
cellular protein localization (GO:0034613)	853	598	462	1.29	0.001
gene expression (GO:0010467)	1842	1284	998	1.29	0.000
cellular protein modification process (GO:0006464)	907	620	492	1.26	0.008
metabolic process (GO:0008152)	4072	2759	2207	1.25	0.000
regulation of metabolic process (GO:0019222)	1347	911	730	1.25	0.000
cellular macromolecule metabolic process (GO:0044260)	1001	670	543	1.24	0.026
cellular protein metabolic process (GO:0044267)	998	667	541	1.23	0.028
cellular metabolic process (GO:0044237)	1744	1129	945	1.19	0.002

[#] Represente el número de genes existentes en el genoma de referencia para la categoría ontológica evaluada (REF_00)

[§] Represente en número de genes, pertenecientes a la categoría ontológica específica, existentes en el genoma de evaluado (REF_01)

*El número de genes que se espera pertenezcan a una categoría ontológica específica en el genoma evaluado.

** Razón (Fold Enrichment) entre REF_01 y “Esp”.

Tabla 3A. Categorías ontológicas del dominio Proceso biológico (GO – Slim Biological Process) infra – representadas al analizar REF_00 versus REF_01

Categoría	REF_00 [#]	REF_01 [§]	Esp. [*]	F.E ^{**}	p
B cell activation (GO:0042113)	118	2	63.95	0.03	0.00
defense response to bacterium (GO:0042742)	124	3	67.2	0.04	0.00
response to external biotic stimulus (GO:0043207)	126	3	68.29	0.04	0.00
response to other organism (GO:0051707)	126	3	68.29	0.04	0.00
response to bacterium (GO:0009617)	126	3	68.29	0.04	0.00
response to biotic stimulus (GO:0009607)	127	3	68.83	0.04	0.00
B cell receptor signaling pathway (GO:0050853)	100	2	54.2	0.04	0.00
humoral immune response (GO:0006959)	139	5	75.33	0.07	0.00
sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	224	8	121.4	0.07	0.00
lymphocyte activation (GO:0046649)	146	9	79.13	0.11	0.00
regulation of lymphocyte activation (GO:0051249)	114	7	61.78	0.11	0.00
regulation of leukocyte activation (GO:0002694)	116	8	62.87	0.13	0.00
regulation of cell activation (GO:0050865)	118	8	63.95	0.13	0.00
leukocyte activation (GO:0045321)	153	12	82.92	0.14	0.00
adaptive immune response (GO:0002250)	137	11	74.25	0.15	0.00
neuropeptide signaling pathway (GO:0007218)	50	4	27.1	0.15	0.01
antigen receptor-mediated signaling pathway (GO:0050851)	125	11	67.75	0.16	0.00
immune response-activating cell surface receptor signaling pathway (GO:0002429)	136	13	73.71	0.18	0.00
immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway (GO:0002768)	136	13	73.71	0.18	0.00
immune response (GO:0006955)	350	39	189.69	0.21	0.00
innate immune response (GO:0045087)	173	22	93.76	0.23	0.00
sensory perception (GO:0007600)	335	48	181.56	0.26	0.00
immune effector process (GO:0002252)	175	25	94.84	0.26	0.00
phagocytosis (GO:0006909)	121	17	65.58	0.26	0.00
defense response (GO:0006952)	246	42	133.32	0.32	0.00
regulation of cytosolic calcium ion concentration (GO:0051480)	84	16	45.52	0.35	0.05
regulation of membrane potential (GO:0042391)	139	26	75.33	0.35	0.00
immune system process (GO:0002376)	620	149	336.02	0.44	0.00
nervous system process (GO:0050877)	609	174	330.05	0.53	0.00
system process (GO:0003008)	717	210	388.59	0.54	0.00

response to organic substance (GO:0010033)	285	90	154.46	0.58	0.00
G-protein coupled receptor signaling pathway (GO:0007186)	309	102	167.47	0.61	0.01
response to stimulus (GO:0050896)	1190	407	644.93	0.63	0.00
response to stress (GO:0006950)	406	138	220.04	0.63	0.00
chemical synaptic transmission (GO:0007268)	330	115	178.85	0.64	0.04
anterograde trans-synaptic signaling (GO:0098916)	330	115	178.85	0.64	0.04
trans-synaptic signaling (GO:0099537)	331	116	179.39	0.65	0.05
synaptic signaling (GO:0099536)	331	116	179.39	0.65	0.05
response to chemical (GO:0042221)	576	211	312.17	0.68	0.00
multicellular organismal process (GO:0032501)	1375	513	745.2	0.69	0.00
cell-cell signaling (GO:0007267)	523	202	283.45	0.71	0.04

Represente el número de genes existentes en el genoma de referencia para la categoría ontológica evaluada (REF_00)

\$ Represente en número de genes, pertenecientes a la categoría ontológica específica, existentes en el genoma de evaluado (REF_01)

* El número de genes que se espera pertenezcan a una categoría ontológica específica en el genoma evaluado.

** Razón entre REF_01 y ESPERADO.



Tabla 4A. Categorías ontológicas del dominio Función molecular (GO – Slim Molecular Function) infra o sobre representadas al analizar REF_00 versus REF_01^c

Categoría	REF_00 [#]	REF_01 [§]	Esp.*	Rep.**	F.E***	p
G-protein coupled receptor binding (GO:0001664)	126	33	68.29	-	0.48	0.0386
cytokine receptor binding (GO:0005126)	129	33	69.91	-	0.47	0.0216
ligand-gated channel activity (GO:0022834)	125	30	67.75	-	0.44	0.0096
ligand-gated ion channel activity (GO:0015276)	125	30	67.75	-	0.44	0.0096
potassium ion transmembrane transporter activity (GO:0015079)	144	36	78.04	-	0.46	0.0046
voltage-gated potassium channel activity (GO:0005249)	70	10	37.94	-	0.26	0.0027
extracellular ligand-gated ion channel activity (GO:0005230)	85	14	46.07	-	0.30	0.0018
G-protein coupled peptide receptor activity (GO:0008528)	76	11	41.19	-	0.27	0.0013
cytokine activity (GO:0005125)	145	33	78.58	-	0.42	0.0006
potassium channel activity (GO:0005267)	108	19	58.53	-	0.32	0.0002
neurotransmitter binding (GO:0042165)	97	15	52.57	-	0.29	0.0001
receptor ligand activity (GO:0048018)	278	78	150.66	-	0.52	0.0000
neurotransmitter receptor activity (GO:0030594)	107	14	57.99	-	0.24	0.0000
receptor regulator activity (GO:0030545)	305	83	165.3	-	0.50	0.0000
signaling receptor binding (GO:0005102)	674	174	365.28	-	0.48	0.0000
molecular transducer activity (GO:0060089)	1223	296	662.82	-	0.45	0.0000
G-protein coupled receptor activity (GO:0004930)	666	95	360.95	-	0.26	0.0000
transmembrane signaling receptor activity (GO:0004888)	898	155	486.68	-	0.32	0.0000
signaling receptor activity (GO:0038023)	1148	237	622.17	-	0.38	0.0000
Unclassified (UNCLASSIFIED)	11177	5691	6057.49	-	0.94	0.0000
structural constituent of ribosome (GO:0003735)	128	116	69.37	+	1.67	0.0307
nucleoside-triphosphatase activity (GO:0017111)	708	485	383.71	+	1.26	0.0268
protein kinase activity (GO:0004672)	540	383	292.66	+	1.31	0.0259
pyrophosphatase activity (GO:0016462)	736	507	398.88	+	1.27	0.0131
hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides (GO:0016818)	738	509	399.97	+	1.27	0.0104
hydrolase activity, acting on acid anhydrides (GO:0016817)	738	509	399.97	+	1.27	0.0104
ligase activity (GO:0016874)	232	192	125.73	+	1.53	0.0073
phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor (GO:0016773)	631	451	341.98	+	1.32	0.0030
hydrolase activity (GO:0016787)	1963	1244	1063.87	+	1.17	0.0028
protein serine/threonine kinase activity (GO:0004674)	368	285	199.44	+	1.43	0.0028
ubiquitin-protein transferase activity (GO:0004842)	243	206	131.7	+	1.56	0.0012
ubiquitin-like protein transferase activity (GO:0019787)	307	257	166.38	+	1.54	0.0001
transferase activity, transferring phosphorus-containing groups (GO:0016772)	796	586	431.4	+	1.36	0.0000
RNA binding (GO:0003723)	558	447	302.41	+	1.48	0.0000
heterocyclic compound binding (GO:1901363)	1738	1190	941.93	+	1.26	0.0000
nucleic acid binding (GO:0003676)	1649	1169	893.69	+	1.31	0.0000
transferase activity (GO:0016740)	1649	1215	893.69	+	1.36	0.0000

catalytic activity (GO:0003824)	4490	2987	2433.4	+	1.23	0.0000
---------------------------------	------	------	--------	---	------	--------

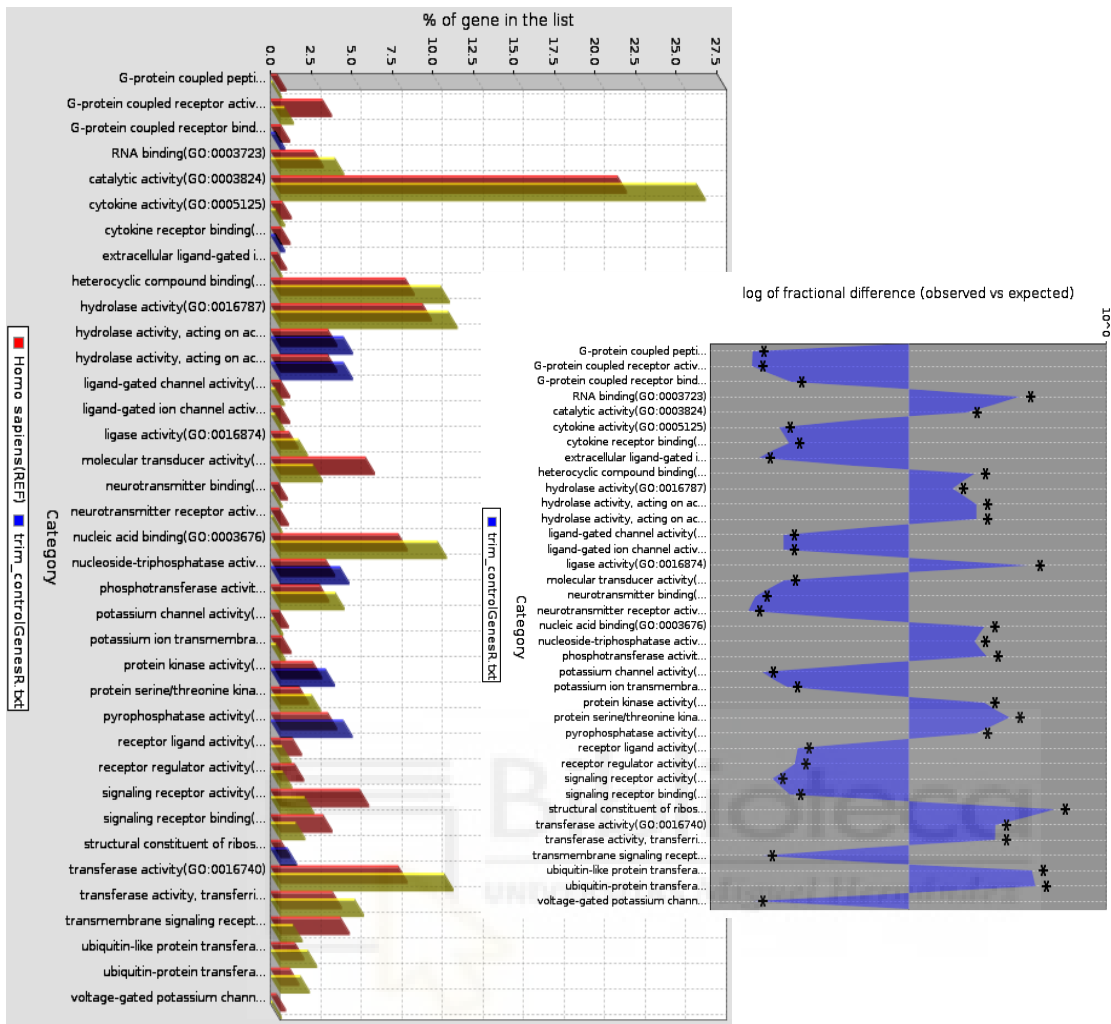
^c La tabla se encuentra ordenada de forma descendente en relación con valor de p.

^{**} Indica el tipo de representación, sobre – representación (+) e infra – representación (-).

^{*,#, \$, %} Ver tabla 2A

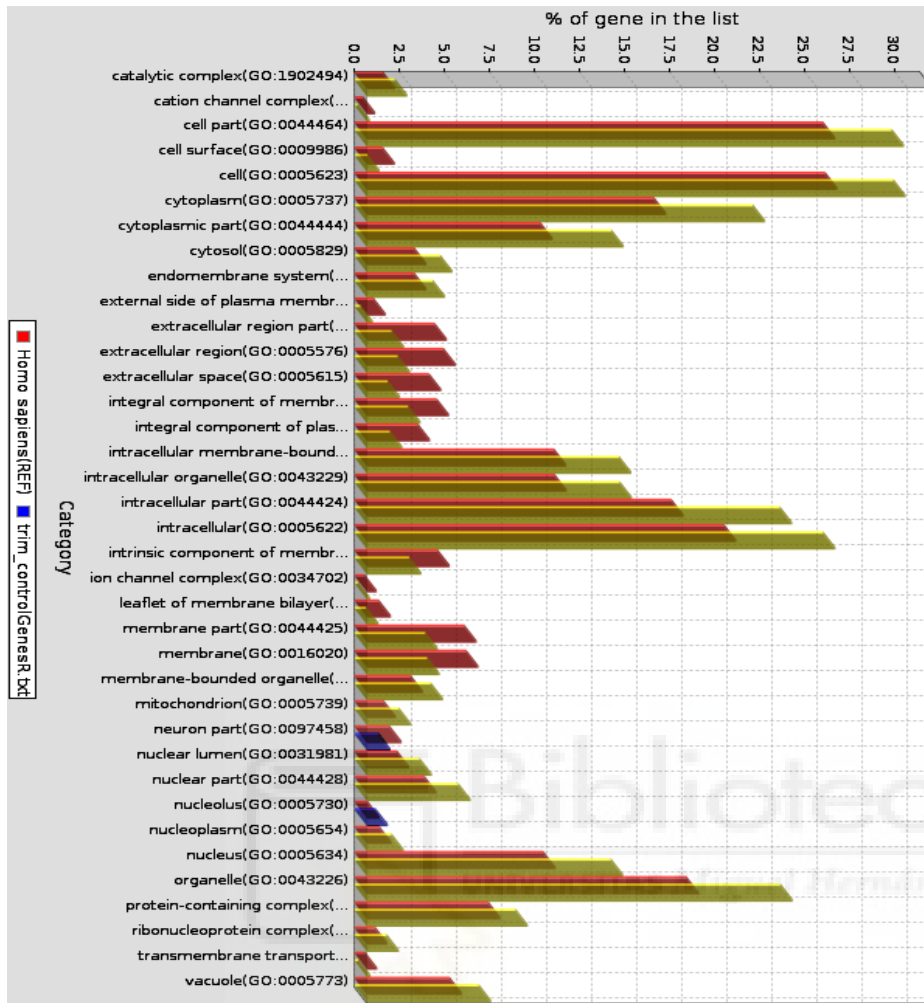


Figura 1A. Sobre e infra – representación de distintas categorías ontológicas del dominio Función Molecular al comparar REF_00 con REF_01



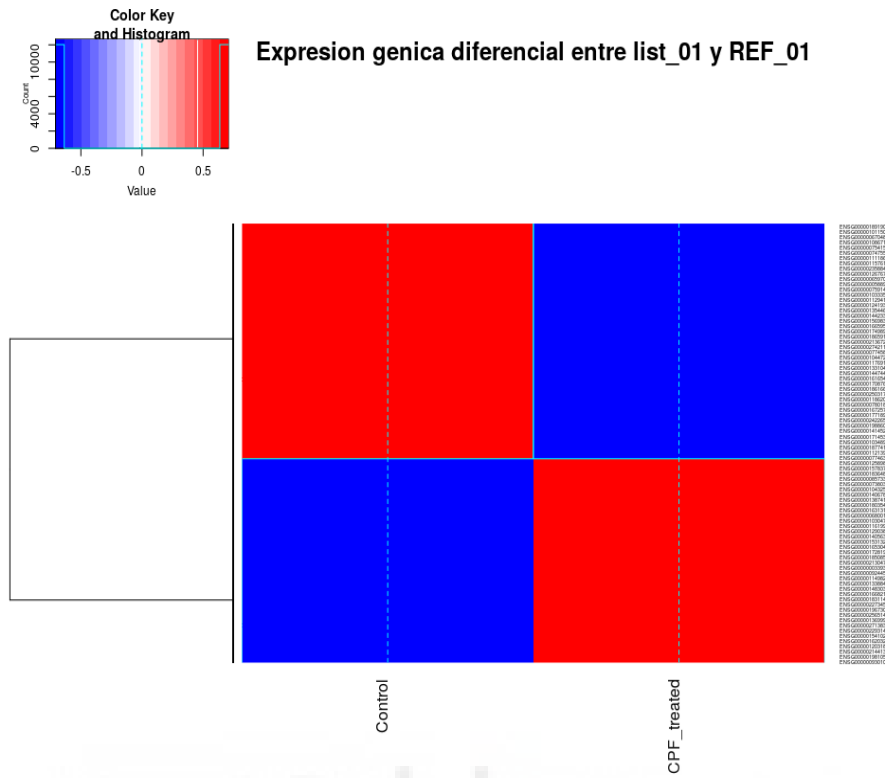
* En amarillo se representan diferencias entre REF_01 y REF_00 con valores de p inferiores a 0.01. El resto representa diferencias con valores de p inferiores a 0.05.

Figura 2A. Representación de distintas categorías ontológicas del dominio Componente Celular al comparar REF_00 con REF_01



* En amarillo se representan diferencias entre REF_01 y REF_00 con valores de p inferiores a 0.01. El resto representa diferencias con valores de p inferiores a 0.05.

Figura 3A. Expresión génica entre list_01 (CPF_treated) y REF_01 (control)



* **“Control”** representa el conglomerado de las placas control
 ** **“CPF_treated”** representa el conglomerado de las placas tratadas con CPF

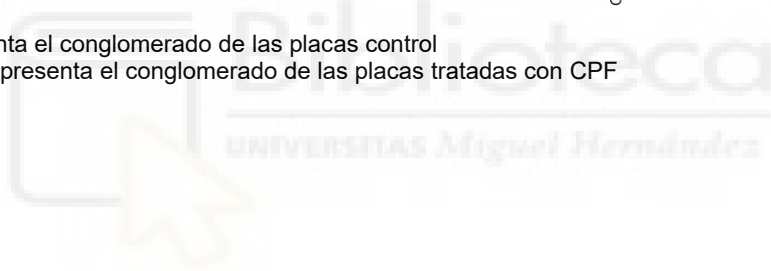


Tabla 5A. Análisis de sobre – representación en células expuestas a CPF para los dominios *GO-Slim Biological Process* y *GO-Slim Cellular Component*[&]

Dominio / Categoría	REF_00#	list_01#	#Esp.	Enriq.	+/-	p [§]	FDR [#]
Proceso biológico							
Enzyme linked receptor protein signaling pathway	238	14	3.30	4.24	+	1.05E-05	9.47E-03
• Cell surface receptor signaling pathway	716	28	9.92	2.82	+	1.41E-06	2.53E-03
◦ Signal transduction	1685	46	23.35	1.97	+	1.20E-05	7.18E-03
Componente celular							
Extracellular space	863	28	11.96	2.34	+	4.32E-05	9.67E-03
• Extracellular region part	928	30	12.86	2.33	+	2.35E-05	1.05E-02
◦ Extracellular region	1033	30	14.32	2.10	+	1.86E-05	2.78E-02

[&] La tabla se muestra de forma jerárquica ascendente, de forma que “*Signal transduction*” representa la categoría padre (**parent**) para “*Cell surface receptor signaling pathway*” (**child**).

[§] Valor de p crudo. [#] False Discovery Rate

REF_01# representa los genes mapeados del genoma de referencia (genoma codificante de Homo Sapiens) a una categoría ontológica específica. **list_01#** representa los genes expresados diferencialmente en las células expuestas a CPF que mapearon a una categoría ontológica específica. **#Esp.** representa el número de genes que debería mapear a categorías ontológicas específicas en las células expuestas a CPF. **Enriq** representa la razón entre **list_01#** y **Esp.**



Tabla 6A. Análisis de sobre – representación entre las placas expuestas a CPF (list_01) y las placas control (REF_01) para el dominio *GO-Slim Biological Process**

Categoría	#_C	#_E	#Esp.	Rep.	R.C.	p	FDR
adaptive immune response (GO:0002250)	11	4	0.280	+	14.220	0.000	0.040
cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	23	6	0.590	+	10.200	0.000	0.019
cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	24	6	0.610	+	9.780	0.000	0.020
innate immune response (GO:0045087)	22	5	0.560	+	8.890	0.000	0.043
defense response (GO:0006952)	42	8	1.070	+	7.450	0.000	0.010
immune response (GO:0006955)	39	7	1.000	+	7.020	0.000	0.025
response to cytokine (GO:0034097)	39	7	1.000	+	7.020	0.000	0.022
enzyme linked receptor protein signaling pathway (GO:0007167)	115	14	2.940	+	4.760	0.000	0.002
response to organic substance (GO:0010033)	90	10	2.300	+	4.340	0.000	0.027
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway (GO:0007169)	92	10	2.350	+	4.250	0.000	0.026
MAPK cascade (GO:0000165)	96	10	2.460	+	4.070	0.000	0.033
cell surface receptor signaling pathway (GO:0007166)	294	28	7.520	+	3.720	0.000	0.000
response to stress (GO:0006950)	138	13	3.530	+	3.680	0.000	0.022
immune system process (GO:0002376)	149	13	3.810	+	3.410	0.000	0.027
response to chemical (GO:0042221)	211	16	5.400	+	2.970	0.000	0.028
response to stimulus (GO:0050896)	407	28	10.410	+	2.690	0.000	0.002
signal transduction (GO:0007165)	833	46	21.300	+	2.160	0.000	0.001
cellular response to stimulus (GO:0051716)	1080	47	27.620	+	1.700	0.000	0.040
metabolic process (GO:0008152)	2759	44	70.560	-	0.620	0.000	0.027

*#_C hace referencia al número de genes dentro de REF_01 que fueron mapeados hacia la categoría ontológica específica. #_E hace referencia a los genes que fueron mapeados hacia la categoría específica dentro de list_01. #Esp. ver tabla 5A. R.C. (razón de cambio) se refiere a el número de veces que la categoría ontológica específica estaba sobre o infra – representada en relación con la columna #Esp.. False Discovery Rate (FDR).

Figura 4A. Categorías ontológicas del dominio *GO-Slim Molecular Function* expresadas de forma diferencial en list_01

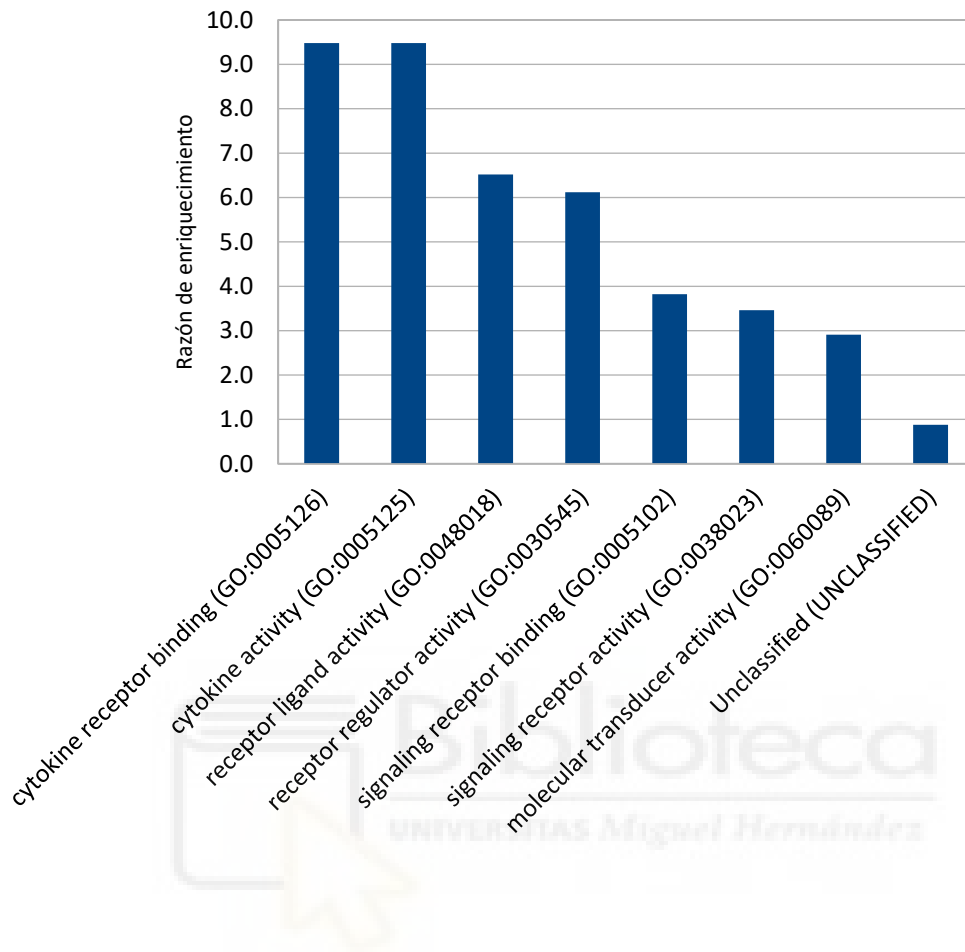


Tabla 7A. Listado de funciones de los genes en células expuestas a CPF cuyas secuencias proteicas presentan el pattern0

UniProt ID	Proteína	Clase	Función
Q15562	Transcriptional enhancer factor TEF-4	Transcription factor (PC00218)	Implicado en la vía de señalización Hippo (vía regulatoria del tamaño de órganos y la supresión de tumores)
Q9BQE4	Selenoprotein S		Relacionada con el proceso de degradación en proteínas lumenales del retículo endoplasmático con plegamiento deficiente
O75084	Frizzled-7	G-protein coupled receptor (PC00021) Protease inhibitor (PC00191) Signaling molecule (PC00207)	Receptor para proteínas Wnt. La mayoría de estos receptores están acoplados a la vía de señalización canónica de la beta – catenina. Puede estar implicada en la transducción y transmisión intracelular de información de polaridad durante la morfogénesis de los tejidos y/o tejidos diferenciados
Q9H7S9	Zinc finger protein 703		Corepresor transcripcional el cual puede regular la transcripción mediante el reclutamiento de deacetilasas de histonas hacia los promotores de genes. Regula la adhesión, migración y proliferación celular
Q96F45	Zinc finger protein 503		Puede funcionar como un represor transcripcional
Q16288	NT-3 growth factor receptor		Receptor tirosina quinasa relacionado con el desarrollo del sistema nervioso y el corazón. Tras su unión con su ligando controla la supervivencia y diferenciación celular
Q96N28	PRELI domain containing protein 3A		El complejo TRIAP1:PRELID3A media la transferencia de ácido fosfatídico (PA) entre liposomas y probablemente funciona como un transportador de PA a través del espacio intermembrana mitocondrial. El PA es importante para la formación de cardiolipina
P14316	Interferon regulatory factor 2	Nucleic acid binding (PC00171) Winged helix/forkhead transcription factor (PC00246)	Implicado en la regulación del ciclo celular a través de la unión al sitio II (HIN-F-M) de la región promotora de H4 y activando la transcripción durante el crecimiento celular
Q14721	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1		Canal de potasio dependiente de voltaje presente en las membranas de células excitables (principalmente en el cerebro). Contribuye con la corriente de potasio pro apoptósica observada en neuronas en respuesta hacia daños oxidativos
Q96IP4	Putative nucleotidyltransferase FAM46A		Probable nucleotidiltransferasa que puede actuar como una poli (A) ARN polimerasa no canónica
Q9HCU4	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	G-protein coupled receptor (PC00021) Cadherin (PC00057)	Receptor que puede tener un papel importante en la señalización celular durante la formación del sistema nervioso central
Q9Y6M5	Zinc transporter 1		Puede estar implicado en el transporte de zinc fuera de la célula
Q9Y4H2	Insulin receptor substrate 2		Puede mediar el control de distintos procesos celulares por la insulina
Q5TH69	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3		Participa en la regulación sistémica de la homeostásis de la glucosa, donde regula de forma negativa la biogénesis de los gránulos de insulina en las células beta de los islotes pancreáticos
P98172	Ephrin-B1	Membrane-bound signaling molecule (PC00152)	Ligando transmembrana de superficie celular para receptores Eph. Los receptores Eph son cruciales para la migración, repulsión y adhesión durante el desarrollo neuronal, vascular y epitelial

UniProt ID	Proteína	Clase	Función
Q9UPQ0	LIM and calponin homology domains-containing protein 1	Actin family cytoskeletal protein (PC00041)	Activa el complejo no muscular de miosina IIa mediante la fosforilación de su subunidad reguladora MRLC/MYL9. El resultado es la regulación negativa de la propagación y migración celular
O95834	Echinoderm microtubule-associated protein-like 2		Proteína de unión a tubulina que inhibe el crecimiento y nucleación de los microtúbulos
Q5K651	Sterile alpha motif domain-containing protein 9		Desempeña un papel en la respuesta inflamatoria hacia la lesión tisular y el control de la calcificación extraósea, actuando como un blanco corriente abajo de la vía de señalización TNF-alfa
Q96JG9	Zinc finger protein 469		Puede estar involucrado en la regulación transcripcional
Q6UXI7	Vitrin	Receptor (PC00197)	Promueve el ensamblaje de matriz y la adhesividad celulares. Regula la proliferación y diferenciación de células madre neuronales. Implicada en la formación de la médula espinal
O75808	Calpain-15	Annexin (PC00050) Calmodulin (PC00061) Cysteine protease (PC00081)	Puede funcionar como un factor de transcripción, proteína de unión RNA o en interacciones proteína-proteína durante el desarrollo del sistema visual*
P50591	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10	Tumor necrosis factor family member (PC00229)	Citoquina inductora de apoptosis
Q99836	Myeloid differentiation primary response protein MyD88	Kinase activator (PC00138)	Proteína adaptadora implicada en las vías de señalización de la inmunidad innata para receptores Toll-like e IL-1. Estas vías terminan en la activación del NF-Kappa-B, la secreción de citoquinas y la respuesta inflamatoria
P00750	Tissue-type plasminogen activator	Serine protease (PC00203)	Mediante el control de la proteólisis mediada por plasmina, juega un papel importante en la degradación y remodelación tisular, además de la migración celular (facilita la migración neuronal)
Q8IZP7	Heparan-sulfate 6-O-sulfotransferase 3	Transferase (PC00220)	Enzima de sulfatación 6-O que cataliza la transferencia de sulfato desde fosfoadenosina 3' fosfosulfato 5' (PAPS) a la posición 6 del residuo N-sulfoglucosamina (GlcNS) del heparan sulfato
Q6ZV29	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 7	Esterase (PC00097)	Serina hidrolasa cuya modificación química por compuestos organofosforados conduce a axonopatía distal
P06681	Complement C2		Parte de la vía clásica del sistema del complemento. Después de ser escindido por C1a, genera los fragmentos C2a y C2b. C2a es una serina proteasa, que se une con el factor C4b para formar la convertasa de C3 o C5. El completo es parte de la inmunidad innata
P22692	Insulin-like growth factor-binding protein 4	Protease inhibitor (PC00191)	Inhibe o estimula los efectos promotores del crecimiento de IGFs
P55317	Hepatocyte nuclear factor 3-alpha	DNA binding protein (PC00009) Winged helix/forkhead transcription factor (PC00246)	Factor de transcripción implicado en el desarrollo embrionario, el establecimiento de la expresión génica tejido específico y la regulación de la expresión génica en tejidos diferenciados. Implicado en la regulación de la apoptosis por inhibir la expresión de BCL2. Implicado en la regulación del ciclo celular mediante la activación de la expresión de CDKN1B
Q7Z7A3	Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 1		Implicado en la 2-tiolación de mcm ₅ S ₂ U en posiciones tRNA wobble del tRNA (Lys), tRNA (Glu) y tRNA (Gln). Se une directamente al tRNA y probablemente actúa catalizando la adenilación de tRNAs (un intermediario requerido para la tiolación)
Q9UHV9	Prefoldin subunit 2	Chaperone (PC00072)	Se une específicamente a la chaperonina citosólica (c-CPN) y le transfiere proteínas. Se une a la cadena

UniProt ID	Proteína	Clase	Función
			polipeptídica naciente y promueve el plegamiento en un ambiente donde existen muchas vías competitivas para proteínas no nativas
P55287	Cadherin-11		Proteína de adhesión calcio dependiente. Las cadherinas interaccionan entre ellas de forma homofílica con lo que contribuyen a la clasificación de tipos celulares heterogéneos
P43234	Cathepsin O	Cysteine protease (PC00081) Protease inhibitor (PC00191)	Enzima proteolítica implicada en la degradación celular de proteínas, así como en su recambio
P15018	Leukemia inhibitory factor	Cytokine (PC00083)	Implicada en la inducción de diferenciación en células mieloides y neuronales, y en la estimulación de la síntesis de reactantes de fase aguda
Q9H3T3	Semaphorin-6B	Membrane-bound signaling molecule (PC00152)	Tiene importancia en el desarrollo del sistema nervioso central y periférico
O43474	Krüppel-like factor 4	DNA binding protein (PC00009) Transcription cofactor (PC00217) Zinc finger transcription factor (PC00244)	Factor de transcripción que puede funcionar como activador o represor. Puede activar su propia transcripción. Regula la expresión de factores de transcripción claves durante el desarrollo embrionario. Desempeña un papel en el mantenimiento de células madre embrionarias y en la prevención de su diferenciación. Contribuye con la regulación a la baja de la transcripción por p53/TP53
O00478	Butyrophilin subfamily 3 member A3	Protease inhibitor (PC00191)	Implicada en la respuesta de células T como parte de la inmunidad adaptativa
P32456	Guanylate-binding protein 2	Heterotrimeric G-protein (PC00117)	Hidroliza GTP a GMP pero el principal producto de reacción es GDP. Promueve la muerte oxidativa y la entrega de péptidos antimicrobianos en autofagolisosomas, proporcionando una amplia protección del huésped hacia diferentes clases de patógenos
O60243	Heparan-sulfate 6-O-sulfotransferase 1	Transferase (PC00220)	Similar a HS6ST3 (arriba). Desempeña un rol crítico en el desarrollo normal neuronal donde tiene un papel en la ramificación neuronal. También está relacionado con el desarrollo de las extremidades
Q96MK2	RIPOR family member 3		Pertenece a la familia FAM65. Esta familia esta implica en la localización de los procesos mayores y cuerpo celular de los podocitos (FAM65A). FAM65B se encuentra regulada al alza durante la diferenciación de células musculares y tiene dos isoformas (corta y larga). FAM65C también parece poseer dos isoformas ⁵
P15407	Fos-related antigen 1	Basic leucine zipper transcription factor (PC00056)	La familia de genes Fos consta de 4 miembros. Estos genes codifican proteínas con zipper de leucina que pueden dimerizarse con la familia JUN, formando el factor de transcripción complejo AP-1. Las proteínas Fos han sido implicadas como reguladores de la proliferación, diferenciación y transformación celular*
P08254	Stromelysin-1	Metalloprotease (PC00153)	Puede degradar fibronectina, laminina, gelatinas (tipo I, III, IV y V), colágeno (III, IV, X Y IX) y proteoglicanos de cartílago. Activa la procollagenasa
P09871	Complement C1s subcomponent	Serine protease (PC00203)	Constituyente principal del subcomponente C1 del sistema del complemento. Participa en la vía clásica del complemento, cuyo fin es la quimiotaxis de células inmunes, además de la opsonización de células dañadas*
Q14469	Transcription factor HES-1	Basic helix-loop-helix transcription factor (PC00055)	Represor transcripcional de genes que requieren una proteína bHLH para su transcripción. Puede actuar como un regulador negativo de la miogénesis. Puede desempeñar un papel en la respuesta funcional del "FA core complex" ante daño por entrecruzamiento del

UniProt ID	Proteína	Clase	Función
			ADN, siendo requerido para la estabilización y la localización nuclear de las proteínas del FA core complex
P46821	Microtubule-associated protein 1B	Non-motor Microtubule binding protein (PC00166)	Facilita la tirosinación de la tubulina alfa en microtúbulos neuronales. MAP1B fosforilado puede desempeñar un papel en los cambios del citoesqueleto que acompañan a la extensión de neuritas
Q96S99	Pleckstrin homology domain-containing family F member 1		Puede inducir apoptosis mediante la vía lisosomal – mitocondrial. Se transloca al lisosoma iniciando la permeabilización de la membrana lisosomal con la consecuente liberación de CTSD y CTSL hacia el citoplasma. Desencadena la apoptosis independiente de caspasas por alterar la permeabilización de membrana mitocondrial con la liberación de PDCD8
Q14533	Keratin, type II cuticular Hb1		Se heterodimeriza con queratinas de tipo 1 para formar el cabello y las uñas.
Q96CX2	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	Enzyme modulator (PC00095)	Subunidad auxiliar de receptores GABA-B que determina la farmacología y cinética de la respuesta. Acelera el inicio de la respuesta ante agonistas y promueve la desensibilización. Los receptores GABA-B son inhibitorios de la actividad neuronal.
Q9HCN8	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1		Bajo revisión preliminar*.

* De acuerdo con la base de datos "Protein" de NCBI.

Nótese que este gen es similar al PNPLA6 codificante para la NTE (Neuropathy target esterase)

\$ De acuerdo con la base de datos "InterPro" de EMBL-EBI

