



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE MÉDICA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUATING HEMOLYTIC AND PHOTOHEMOLITIC
POTENTIAL OF ORGANOPHOSPHORUS BY *IN VITRO*
METHOD AS AN ALTERNATIVE TOOL**

**TESIS DE
ARTÍCULO ESPECIALIZADO PARA
PUBLICAR EN REVISTA INDIZADA**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

ANA LAURA GARCÍA SORIA

ASESORES:

Dra. en CARN. Esvieta Tenorio Borroto
Dr.en C Juan Carlos Vázquez Chagoyán

Toluca, México febrero 2021



Contenido

I.	INTRODUCCIÓN	3
II.	REVISION BIBLIOGRAFICA.....	6
1.	Generalidades de los Organofosforados	6
1.1.	<i>Características Físico Químicas.</i>	7
1.2.	<i>Clasificación y Mecanismo de acción.</i>	8
1.3.	<i>Efectos Tóxicos</i>	10
1.4.	<i>Herramientas para la destoxificación y Bioremediación de organofosforados. Tecnologías Limpias</i>	14
2.	Métodos Convencionales para evaluar toxicidad local.....	16
2.1.	<i>Método Clásico para evaluar la irritabilidad ocular y sus modificaciones.</i>	16
2.2.	<i>Método Clásico para evaluar la Fototoxicidad y sus modificaciones.</i>	18
3.	Generalidades de los Métodos Alternativos.....	18
3.1.	<i>Origen</i>	19
3.2.	<i>Concepto y tipos de métodos alternativos importancia de la validación.</i>	20
3.3.	<i>Validación actual de los métodos alternativos.</i>	21
3.4.	<i>Tendencias actuales de los métodos alternativos.</i>	22
4.	Métodos alternativos validados para evaluar la irritabilidad.	23
4.1.	<i>Validación y empleo del test de hemólisis y desnaturalización de proteínas (RBC/DNP).</i> ..	24
4.2.	<i>Métodos alternativos validados para evaluar la Fototoxicidad.</i>	25
4.3.	<i>Validación y empleo de la prueba de fotohemólisis.</i>	26
4.4.	<i>Criterios de la Agencias Internacionales Regulatoras para su aceptación</i>	27
III.	JUSTIFICACIÓN	28
IV.	HIPÓTESIS.....	30
V.	OBJETIVOS.....	31
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	32

VII. LÍMITE DE ESPACIO.....	35
VIII. LÍMITE DE TIEMPO.....	36
IX. RESULTADOS	36
X. DISCUSION.....	40
XI. CONCLUSIONES	44
XII. LITERATURA CITADA.....	47

I. INTRODUCCIÓN

La fototoxicidad es un proceso donde intervienen las radiaciones solares y se expresa en reacciones anormales mediadas por sustancias químicas exógenas en los sistemas biológicos. Por su parte la irritación es un efecto adverso local provocado por contacto con agentes externos. Ambos procesos manifiestan a través de irritación y edema en la piel. El número de informes que se ocupan de este tipo de efectos está aumentando cada año, principalmente debido a la larga lista de nuevos productos químicos que entran en nuestro entorno (fármacos, cosméticos, productos químicos industriales) y también a la valoración social de bronceado que ha estado acompañada por la exposición inusual la radiación solar natural y lámparas solares artificiales. (Park, Jeong et al. 2011, Setoguchi, Nagata-Akaho et al. 2020)

Varios métodos *in vitro* para evaluar la fototoxicidad y la irritabilidad ocular de las sustancias químicas se han desarrollado.(Bhagav, Upadhyay et al. 2011). El Test de Draize de irritación ocular *in vivo*, se ha aplicado de manera convencional para investigar la seguridad de los productos cosméticos y sus ingredientes, ya que representa la irritación de los ojos de forma directa cuando estos se exponen a los productos químicos (Alves et al., 2008, Budai et al., 2010). Por otro lado, la fototoxicidad del riesgo toxicológico de productos químicos, se ha evaluado mediante pruebas en animales como cobayas, conejos y ratones (Ceridono et al. 2012). Sin embargo, desde el punto de vista del bienestar animal, es deseable desarrollar técnicas *in vitro* fiables que disminuyan el dolor y estrés en el animal. Varios informes respecto a métodos *in vitro* para la predicción de la citotoxicidad y la irritabilidad han sido validados, publicados y aceptados por las agencias regulatorias. Todos ellos sobre la base de la clasificación bioquímica de las respuestas en los tejidos y los vasos sanguíneos a sustancias químicas, por ejemplo, marcadores como la desnaturalización de proteínas, la hemólisis en los glóbulos rojos y la hemólisis provocada por la fototoxicidad han sido seleccionados como los ensayos alternativos para evaluar

la seguridad de principios activos, además de incluir ensayos *in vivo* con reducción del número de animales (Kumar, Devi et al. 2009) (Khattak, Ahmad et al. 2012).

Los plaguicidas organofosforados (OP) son ésteres de ácido fosfórico que inhiben e inactivan la acetilcolinesterasa (AChE) y la pseudo-plasma o butirilcolinesterasa (BuChE), por ataque nucleofílico al grupo hidroxilo de la serina en sus sitios activos, dando como resultado enzimas fosforiladas inactivas. La inhibición de esta enzima, causa efectos perjudiciales crónicos sobre la salud humana, por ejemplo, trastornos neuropsicológicos, la alteración del sistema endocrino, anomalías del desarrollo, trastornos del sistema inmunológico e hipersensibilidad (Abdollahi and Karami-Mohajeri 2012)(Bayir, Kara et al. 2013). Estos compuestos son agentes tensioactivos, debido a que estos se emplean como excipientes para sus formulados, estos tensoactivos también son de uso frecuente en cosméticos, fármacos y productos agrícola (Azazh 2011). En la literatura se reporta que los formulados que contienen estos tensoactivos, puede dar lugar a irritación de ojos y piel u otras reacciones secundarias.

Una posible relación ha sido reportada entre la exposición a los OP y los cánceres de pulmón, próstata, así como linfoma no Hodgkin y la leucemia (Eddleston et al. 2012, Lu et al. 2012). En 2012, un estudio mostró que el insecticida es más perjudicial para el desarrollo mental(Aras, Schmitt et al. 2013) del niño que de las niñas (Bajgar de 2004). La exposición puede ocurrir en tres escenarios diferentes: la exposición ocupacional, la exposición medioambiental para las comunidades que viven en áreas de exposición intensiva agrícola y alimentaria de la población en general. Las mujeres y los niños de familias residentes de la granja y los que viven cerca de la aplicación y / o sitios de disposición tienen un mayor riesgo de exposición a través de contacto con la piel (Belsey, Cordery et al. 2011) (Aras, Schmitt et al. 2013).

El ensayo de hemólisis o prueba de Red Blood Cell (RBC), se basa en la evaluación del potencial (citotóxico) de una sustancia química para romper las membranas celulares. Este daño de la membrana se puede evaluar mediante la medición de fotométrica de la

concentración de la hemoglobina desnaturalizada, obtenidos de los eritrocitos recién aislados e incubados con materiales en condiciones estándar (Mehling, Kleber et al. 2007). Estos ensayos se utilizan como puntos finales de ensayo toxicológico, que se lleva a cabo en dos pasos. El estudio principal sirve para establecer una curva de concentración-respuesta más precisa de fugas de hemoglobina con el fin de calcular la concentración que causa el 50 por ciento de hemólisis (valor H50) (Pape et al. 1999, Pape et al. 2001). La desnaturalización de la OxiHb, se expresa como Dosis Máxima (D-max), es decir el porcentaje máximo de desnaturalización visto en cualquier concentración ensayada, y Dosis Baja (D-bajo), es decir, la concentración más baja a la que la desnaturalización se hace mayor del 10 por ciento (Preté, Domingues et al. 2011).

El objetivo del presente estudio es investigar la irritabilidad y la fototoxicidad de los organofosforados formulados con tensioactivos empleando el ensayo de hemólisis en eritrocitos. El empleo de este método alternativo permitirá conocer la correlación entre los organofosforados formulados con tensioactivos y actividad la hemolítica facilitando la selección de excipientes menos tóxicos para el formulado. En particular, las observaciones sobre los efectos *in vitro* en eritrocitos, permite garantizar la seguridad de los productos sin el empleo de animales de laboratorio contribuyendo al bienestar animal.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

1. Generalidades de los Organofosforados

El progreso de la Industria Química en el siglo XX ha propiciado la producción de una gran cantidad de sustancias de alta agresividad contra los organismos dañinos, pero cuyos efectos sobre el hombre y el equilibrio del ecosistema continúan siendo debatidos. Según la definición dada por la FAO (Additives 2006) un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedad humana o animal, especies indeseadas de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o mercado de los alimentos, u otros productos agrícolas, madera y sus derivados o alimentos animales, o que pueden ser administrados a los animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas en sus organismos (Gebremichael, Birhanu et al. 2013).

El concepto moderno de plaguicida surge en el siglo XIX período en el que se sintetizaron múltiples principios activos cuyas propiedades tóxicas e insecticidas se descubrieron y utilizaron más adelante (LeDoux 2011). La investigación de compuestos arsenicales dio lugar al empleo del arsenito de cobre para combatir un tipo de escarabajo en Estados Unidos (EE.UU), y la extensión de su empleo promovió la primera legislación conocida sobre pesticidas en el año 1900. El diclorodifeniltricloroetano (DDT), sintetizado en 1874, demostró su potencia insecticida en 1939 y comenzó a ser utilizado como tal en 1942 (Apeti, Lauenstein et al. 2010). El hexaclorociclohexano (HCH), sintetizado en 1825, se usó como gas de guerra en la 1ª Guerra Mundial y como insecticida en 1942 (Hu, Huang et al. 2013, Mishra, Sharma et al. 2013).

A partir de la 2ª mitad del siglo XX se acelera la síntesis de productos organofosforados (Dimefox en 1949, Malatión en 1950) y de Carbamatos (Carbaryl en 1956, Aldicarb en 1965). Desde 1942 se han sintetizado más de 50.000 productos de este tipo y se emplean como insecticidas, acaricidas, nematocidas y fungicidas. Algunos actúan como insecticidas de contacto y otros como insecticidas sistémicos (Casas, Bonilla et al. 2010, Couso-Ferrer, Arouri et al. 2011)

1.1. Características Físico Químicas.

La fórmula estructural general de estos compuestos, que se caracterizan por la presencia de (en general) tres funciones éster, y su fórmula general deriva del ácido fosfórico (**Figura 1**) y es la siguiente:

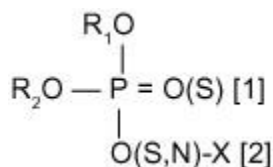


Figura 1 Estructura química de los organofosforados

En la que R_1 y R_2 son radicales alquilo, generalmente metilo o etilo, el grupo X es característico de cada especie química, siendo frecuentemente un radical arilo, y suele contribuir de forma importante a sus propiedades físicas y químicas y biológicas. A tenor de los elementos concretos que ocupen determinadas posiciones en la molécula, los organofosforados se pueden dividir en 14 grupos, de los que los más importantes son: fosfatos, con un O en las posiciones [1] y [2]; O-fosforotioatos (o tionatos), con un S en [1] y un O en [2], S-fosfortioatos (o tiolatos), con un S en [2] y un O en [1]; fosforoditioatos (o tiolotionatos), con un S en [1] y en [2]; fosfonatos, con R_1 (en lugar de R_1O), O o bien S en [1] y O en [2], y fosforoamidatos, con un O en [1] y un N en [2] (Younes, Mohamed et al. 2013, Zhao and Yu 2013).

En general los compuestos organofosforados (COF) son sustancias muy liposolubles (Juhler 1997, Zhou, Zhan et al. 2010). Su volatilidad es variable, aunque se suelen utilizar como insecticidas organofosforados (IOF) los compuestos menos volátiles (Richardson and Caruso 2007). Una vez que entran en un organismo vivo, poseen una

corta vida media en el plasma y un elevado volumen de distribución en los tejidos(Shih, McMonagle et al. 1994, Eyer 2003, Gresham, Rosenbaum et al. 2010) .

1.2. Clasificación y Mecanismo de acción.

Los insecticidas organofosforados tienen como característica fundamental el ser muy tóxicos y liposolubles y pertenecen a diferentes familias: fosfatos, fosfonatos, fosforoamidotoatos, fosforodiamidatos, varias de ellas azufradas. Los compuestos fosforados orgánicos que contienen nitrógeno cuaternario (fosforilcolina) son, no sólo potentes inhibidores de la colinesterasa, sino directamente colinérgicos. Su mecanismo de acción está muy ligado a su estructura química y por lo tanto a su clasificación(Delgado, Catalán et al. 2010, Azazh 2011).

Algunos de ellos (soman, sarin, tabun) han sido utilizados como gases de guerra y se denominan gases nerviosos por ser ésta la diana fundamental de su acción (Pohanka, Karasova et al. 2010) . Su mecanismo tóxico más importante es la inhibición de la acetilcolinesterasa que da lugar a acumulación de acetilcolina en los tejidos (Bolton-Warberg, Coen et al. 2007, Chen, Chen et al. 2010) (Ehrich, Van Tassell et al. 2011). Los compuestos fosforados orgánicos son ésteres que se transforman a través de las esterasas orgánicas A y B. Las esterasas de tipo A dan lugar por hidrólisis a productos tóxicamente inactivos y excretables. Las B-esterasas, entre las que se cuentan las colinesterasas, reaccionan con los compuestos organofosforados fosforilándose y quedando inhibidas. De este hecho se derivan la mayor parte de sus efectos tóxicos (Lajmanovich, Attademo et al. 2011).

La acetilcolinesterasa, además de encontrarse en los glóbulos rojos, donde no se le conoce acción fisiológica, regula la transmisión de los impulsos nerviosos en las terminaciones colinérgicas (por hidrólisis de la acetilcolina, que actúa como neurotransmisor, una vez ha alcanzado su destino) de las neuronas preganglionares del sistema simpático y parasimpático (receptores nicotínicos), de las pos-sinápticas del

sistema parasimpático (receptores muscarínicos), de una parte importante de las sinapsis existentes entre neuronas del propio Sistema Nervioso Central (SNC), y de las terminaciones motoras en los músculos estriados (voluntarios), en las uniones neuromusculares, también con receptores nicotínicos (Chan, Chan et al. 2006, Roldan-Tapia, Nieto-Escamez et al. 2006, Melstrom and Williams 2007, Stum, Girard et al. 2008, Jayawardane, Senanayake et al. 2012) .

La acetilcolina es el mediador químico responsable de la transmisión fisiológica del impulso nervioso de:

- a. Las neuronas pre-ganglionares a las post-ganglionares en los sistemas parasimpáticos y simpáticos.
- b. Las fibras post-ganglionares parasimpáticas a los órganos efectores y de las fibras post-ganglionares simpáticas a las glándulas sudoríparas.
- c. Los nervios motores al músculo esquelético.
- d. Algunas terminaciones nerviosas en el SNC.

Liberada en las terminaciones de las fibras colinérgicas en respuesta a la conducción de un potencial de acción contacta con los receptores colinérgicos en la superficie de la célula diana materializando la transmisión del impulso. Existen dos tipos de receptores para este neurotransmisor: el receptor muscarínico, receptor vinculado a proteínas G, y el receptor nicotínico que contiene un canal de Na. Inmediatamente, tras ser liberada del receptor, es hidrolizada por la colinesterasa lo que produce la brevedad y unidad de cada impulso propagado. Los O-P reaccionan con la zona esterásica de la colinesterasa formando una unión estable que, si no se rompe mediante el tratamiento, envejece y se hace irreversible, quedando la enzima inhabilitada para su función normal (Jayawardane, Senanayake et al. 2009).

La acetilcolina se acumula entonces en la hendidura sináptica. Una pequeña acumulación da lugar a gran estimulación, mientras que un exceso superior tiene el efecto contrario, lo que es especialmente patente a nivel del músculo esquelético y queda reflejado en la secuencia clínica. Los IOF fosforilan otras enzimas: fosfatasa ácida, aliesterasas, lipasas, tripsina, quemotripsina, succinooxidasa, oxidasa-ácido ascórbico, deshidrogenasas, enzimas sulfidrilo. Durante el desarrollo

de los diferentes organofosforados se han efectuado varios ensayos que demuestran su mecanismo de acción. (Bajgar 2004, Pope, Karanth et al. 2005)

Los organofosforados insecticidas ejercen sus efectos agudos en tanto en insectos como en mamíferos inhibiendo la acetilcolinesterasa que es un neurotransmisor (Eddleston, Street et al. 2012, Cortés-Eslava, Gómez-Arroyo et al. 2013). En muchos casos la enzima del organofosforilado es bastante estable, de manera que recuperación de intoxicación sería lenta (Küçükkilinç, Cochran et al. 2010, Eddleston, Adhikari et al. 2012, Joshi, Manoria et al. 2013, Singh, Akhtar et al. 2013)

En estudios recientes se ha revelado al estrés oxidativo como un mecanismo principal de los organofosforados causando una alta producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) provocando alteración en el equilibrio del organismo fundamentalmente en la producción de antioxidantes y en la actividad de las enzimas protectoras endógenas (Karami-Mohajeri, Hadian et al. 2013, Nurulain, Szegi et al. 2013). La alta producción de ROS genera un desequilibrio en el organismo que puede llegar a ser irreversible estos pueden actuar sobre diferentes dianas del organismo como DNA, proteínas, lípidos, etc. Llevando a un estado de estrés oxidativo al organismo (Rastogi, Satyanarayan et al. 2009, Zhang, Lv et al. 2010, Lu, Ma et al. 2012).

1.3. Efectos Tóxicos.

Las investigaciones modernas sobre los insecticidas organofosforados datan de 1932, año en que Lange y Krueger sintetizaron los dimetil y dietil fosfluoridatos, y describieron por vez primera los efectos nocivos de los compuestos organofosforados sobre los seres vivos. La declaración de los autores de que la inhalación de los vapores de estos compuestos causaba una persistente sensación de ahogo y visión borrosa fue lo que llevó al alemán Schrader, un investigador de la I. G. Farbenindustrie, a explorar la actividad insecticida de estos compuestos. A este investigador debemos el descubrimiento de los dos primeros IOF sistémicos: el OMPA o Schradan (1941) y el TEPF o *bladan* (1944) (Kasagami, Miyamoto et al. 2002). Los descubrimientos sobre la toxicidad de los IOF

llevaron a muchos investigadores a pensar en su uso como armas de guerra química. Por ello los COF fueron prohibidos como armamento químico por la Convención de Génova de la Liga de las Naciones en 1925, aunque algunos países se reservaron el derecho a utilizarlos si eran atacados primero con ellos (Juillet, Gibert et al. 2005, Koskela, Grigoriu et al. 2006, Babakov, Goncharov et al. 2009, Mayer, Valdez et al. 2012) .

A pesar de tal prohibición, a finales de los años 30 y principios de los 40 los COF fueron ampliamente investigados por el mismo Schrader, y otros muchos como armas de guerra química (Meier 2004). Este investigador llegó a sintetizar unos 300 COF con fines militares, de los cuales uno de los más conocidos es el DFP. Durante la II Guerra Mundial se crearon en Alemania nuevos COF como el Tabún, el Sarin y el Somán; debido a su elevada toxicidad, su descubrimiento fue mantenido en secreto por el gobierno alemán (Epstein, Samanta et al. 2009) . Aunque con menor empeño, los aliados también buscaron COF tóxicos. Sin embargo, ya fuera por la prohibición de la Liga de las Naciones o por el miedo a represalias, no fueron empleados durante la II Guerra Mundial (Koskela, Ervasti et al. 2009) .

En 1944 Schrader obtuvo la síntesis del Paratión, un IOF ampliamente utilizado en la agricultura por su elevada potencia insecticida, su baja volatilidad y su buena estabilidad en el agua (Racke 1993, Koffi, Ahoua Alou et al. 2013, Maloney, Ancca-Juarez et al. 2013). En 1950 se descubrió el Malatión, también de amplio espectro pero de menor toxicidad para los mamíferos (Shayeghi, Khoobdel et al. 2007). Estos dos IOF han sido ampliamente utilizados, y aún hoy son los dos IOF que a nivel mundial producen mayor número de intoxicación aguda (IA). Desde entonces hasta nuestros días se han sintetizado más de 35.000 COF de los que unos 50 son los habitualmente utilizados en la

agricultura(Chambers and Oppenheimer 2004, Venkateswara Rao, Kavitha et al. 2007).

A pesar de que el acuerdo de la Convención de Génova fue ratificado por la Conferencia de París de 1989, en la última década algunos países y grupos terroristas han vuelto a utilizarlos como armas de guerra (Sato and Hosokawa 2000). Según su metabolismo los COF son atacados por una serie de enzimas (esterasas, enzimas microsomales, transferasas), fundamentalmente en el hígado, sufriendo una serie de transformaciones químicas(Sams and Mason 1999, Reiner 2001, Torres-Altora, Mathur et al. 2011, Mangas, Vilanova et al. 2012). Estas transformaciones tienden a aumentar la hidrosolubilidad del plaguicida, y por consiguiente facilitan su excreción (Saieva, Aprea et al. 2004, Hore, Robson et al. 2005). Pero a veces el metabolismo aumenta su toxicidad, como sucede con las formas oxón en que son transformadas el Paratión y el Malatión(Prashanthi, Narayana et al. 2006, Arufe, Arellano et al. 2010, Arias-Almeida and Rico-Martínez 2011, Kundu, Roychoudhury et al. 2011, Lavado and Schlenk 2011, Edwards, Yedjou et al. 2013).

Debido a su alta liposolubilidad los COF se acumulan en tejidos ricos en grasas, como el pánículo adiposo o el tejido nervioso, desde donde pueden ser liberados nuevamente al torrente sanguíneo(Glynn 2006). Los COF se eliminan por vía urinaria y heces, en su forma activa o previa metabolización hepática (Southam, Lange et al. 2011, Cecchi, Rovedatti et al. 2012). Debido a estas características son absorbidos por la piel, membranas y mucosas como la oral, conjuntiva y gastrointestinal y por el tracto respiratorio la severidad de la reacción depende de la dosis, la vía y el tiempo de exposición(Cocker, Mason et al. 2002).

Los principales efectos tóxicos que se reportan son intoxicaciones agudas y retardadas. Es difícil calcular el número mundial de IA por IOF, pero parece que supera los dos millones y medio de casos anuales (Jafarzadeh, Nasrabadi et al. 2013, Rivadeneira, Agrelo et al. 2013, Ross, McManus et al. 2013). Los principales sistemas afectados por estos compuesto son el inmune(Ding, Han et al. 2012, Eisenkraft, Falk et al. 2013, Schäfer, Koppe et al. 2013), urinario Ding, Han et al. 2012, reproductivo el páncreas y la presencia de cambios hematológicos y bioquímicos(Queiroz, Adesogan et al. 2012). Dentro de los organofosforados los más empleados son:

Tabla 1. Características Toxicológicas de los organofosforados

Compuesto	Características	Efecto Toxico
Acephate		LD50 en ratas hembras por vía oral 945 mg/kg Irritación dérmica y sensibilizante débil
Clorpirifos	(etil clorpirifos, tiofosfato de O,O-dietilo y de O-(3, 5, 6-tricloro 2-piridilo) Fue descubierto en 1956. Es un insecticida-acaricida activo por ingestión, contacto e inhalación. Pertenece al grupo IV.2 (dietoxi) Se utiliza no solo en la agricultura sino también en los hogares, contra las cucarachas. La marca comercial más utilizada es Dursban	Su toxicidad es moderada (DL ₅₀ oral para la rata de 96-270 mg/kg) y es irritante en piel y ojos
Diazinon		LD50 Rat male oral 250 mg/kg LD50 Rat female oral 285 mg/kg
Diclorvos		LD50 Rat acute oral 56 to 80 mg/kg, no irritante en ojos
Dimetoato	(ditiofosfato de O,O-dimetilo y de S-(N-metilcarbamoil) metilo): Es un insecticida-acaricida sistémico con actividad por ingestión y contacto . Pertenece al grupo IV.1 (dimetoxi). Se utiliza con frecuencia en las zonas olivaderas	Dimetoato
Malatión	(ditiofosfato de O,O-dimetilo y de S-(1,2-dietoxicarboniletilo): Es un insecticida-acaricida con acción por ingestión y contacto Pertenece al	Baja toxicidad para los mamíferos. En los organismos vivos se metaboliza a maloxón,

	grupo IV.1 (dimetoxi).	su forma más tóxica. Su toxicidad es baja (DL ₅₀ oral para la rata de 1.000-2.800 mg/kg)
Metamidofos	(Tiofosforamidato de O,S-dimetilo): Es un insecticida-acaricida con actividad por vía sistémica, ingestión y contacto. Pertenece al grupo IV.8 (sustituyentes mixtos).	Su toxicidad es alta (DL ₅₀ oral para la rata de 20 mg/kg), por lo que está prohibido su uso en invernaderos y en recintos cerrados. Irritante ocular ⁽³⁴⁾
Metil Paratión		LD50 en ratas hembras y machos por vía oral 14 mg/kg y 24 mg/kg es no irritante

1.4. *Herramientas para la destoxificación y Bioremediación de organofosforados. Tecnologías Limpias*

Los organofosforados de forma general son altamente tóxicos (Stepić, Hackenberger et al. 2013) y se absorben fácilmente por vía inhalatoria, oral y dérmica además son poco biodegradables es por ello que actualmente es una problemática a resolver para la comunidad científica pues se necesitan herramientas más elaboradas para lograr su eliminación del ecosistema. A pesar de que se han realizado modificaciones en su estructura química que han permitido una mayor efectividad de estos con menos efectos tóxicos. El empleo sistemático de plaguicidas, principalmente para prevenir la acción de parásitos agrícolas, ha supuesto una gran mejora en la calidad de vida de los pueblos. No obstante, a los espectaculares resultados que se consiguieron al comienzo de su empleo de forma intensiva siguieron otros problemas al observarse que la aplicación masiva e indiscriminada de estos productos tenía consecuencias sobre la salud humana (Bayir, Kara et al. 2013), sobre el medio ambiente, e incluso sobre la efectividad del producto.

En la actualidad muchos procesos de tecnologías limpias han sido creados dentro de ellos el empleo de bacterias, creándose la Bio-remediación nueva temática que ha propiciado el mejoramiento del medio ambiente(Colla, Andrezza et al. 2013, Frascari, Bucchi et al. 2013).

La biorremediación surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el diseño de microorganismos capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrios en el medio ambiente(Al-Bader, Eliyas et al. 2012, Stępniewska and Kuźniar 2013). Las primeras observaciones de biorremediación fueron con el petróleo (Harkness and Fisher 2013, Soleimani, Farhoudi et al. 2013, Watson, Wu et al. 2013),

después de algunos organoclorados y organofosforados (Raynes, Pearce et al. 2011); “se advirtió que los microorganismos no sólo eran patógenos, sino que además eran capaces de absorber compuestos orgánicos, algunos naturales, otros sintéticos, y degradarlos, lo que constituye el objetivo de la biorremediación”. Se pueden emplear diversos organismos en los procesos de biorremediación. Los más usados son los microorganismos (tanto bacterias, como algas y hongos)(Ibrahim and Gamila 2004, Melucci, Fedi et al. 2013, Singh, Vishwakarma et al. 2013) y las plantas (Macci, Doni et al. 2012). Estos pueden procesar a todos aquellos contaminantes que puedan ser degradados o transformados por los seres vivos son susceptibles de ser eliminados mediante procesos de biorremediación. Los compuestos orgánicos suelen ser degradados total o parcialmente y eliminados por completo del ecosistema.

Históricamente el compostaje fue una primitiva forma de biorremediación en donde los residuos por ej. Derivados de la recolección domiciliaria (restos orgánicos, inorgánicos, residuos industriales, etc.) son incluidos en contenedor permitiendo que puedan ser biodegradados por microorganismos (Fang, Zhao et al. 2010, Sayara, Sarrà et al. 2010, Zhang, Wang et al. 2011).

Los factores que gobiernan la biorremediación son complejos y pueden variar enormemente dependiendo de la aplicación. En muchos casos puede llegar a ser difícil distinguir entre los factores bióticos y abióticos que contribuyen con la biorremediación.

La biorremediación es un fenómeno común en la naturaleza cuando en un ambiente o ecosistema se produce una alteración del equilibrio como es el caso de una gran tala de árboles, esto origina un aumento considerable de materia orgánica en el suelo

Los organofosforados pueden ser eliminados por técnicas de Biorremediación de dos formas:

- I) La sustancia favorece el crecimiento microbiano y es empleada como fuente de carbono, energía y raras veces como fuente de nitrógeno, azufre, etc. El número de microorganismos aumenta y el aislamiento se realiza utilizando el plaguicida como única fuente de nutrientes. Luego de que el compuesto fue degradado las poblaciones decrecen.
- II) Por metabolismo, el compuesto no actúa directamente como fuente de nutrientes sino que se debe emplear otras como la glucosa, que al disminuir en el medio inducen las

enzimas necesarias para la degradación del plaguicida.(Yang, Chang et al. 1999, Penny, Vuilleumier et al. 2010, Stenuit and Agathos 2010)

2. Métodos Convencionales para evaluar toxicidad local.

La evaluación de la toxicidad siempre fue preocupación de la comunidad científica desarrollando métodos que garantizaran la seguridad de los productos empleados. La irritación ocular de materiales se ha evaluado en modelos animales desde el 1930 cuando en los Estados Unidos se encontró que un tinte de pestaña con p-felendiamina, causo un daño serio al ojo. Siguiendo a este suceso fueron revisados los procedimientos de los test in vivo desarrollados para garantizar la seguridad de los productos en uso (Parascandola 1991, Haseman, Allen et al. 2011, Ema, Matsuda et al. 2013, Kim, Song et al. 2013).

Mann& Pullinger en 1942 estaba entre los primeros en usar conejos como modelo de la prueba para evaluar la probable irritación al ojo del humano. Se desarrolló un procedimiento entonces por Friedenwald en 1944 para evaluar los efectos de ácidos y bases en el ojo del conejo observando los efectos de los materiales de la prueba en la córnea, la conjuntiva y el iris de forma separada(Sharpe 1985, Walz 1985, Bullock, Warwar et al. 1998). Finalmente, John Draize, estandarizo y simplifico el sistema de puntuación. Así es que el "Draize" en conejos y sus varias modificaciones se volvieron el procedimiento de la comprobación para evaluar el potencial de irritación de los compuestos de la prueba(Cho, An et al. 2012).

2.1. Método Clásico para evaluar la irritabilidad ocular y sus modificaciones.

El test de Draize que se efectúa en Conejos continua siendo un método empleado para evaluar la irritación ocular de productos este método es aceptado por las agencias regulatoria pero ha sido fuertemente criticado por varios científicos por lo cruento que resulta(Hartung, Bruner et al. 2010). El protocolo del original de Draize sirvió como base inicial a las agencias

regulatorias para comprobar la irritación ocular. Pero de ahí surgieron varias modificaciones que contribuyeron a una mejor eficiencia del método(Kishore, Surekha et al. 2008).

El continuo uso del Draize no se debe a la escasez de métodos alternativos con gran potencialidad, pues donde más esfuerzo se ha puesto probablemente ha sido en el desarrollo de alternativas encaminadas a probar la irritación y la toxicidad aguda, sin embargo, ninguna prueba o combinación de ellas ha sido totalmente aceptada por todas las agencias reguladoras sin embargo actualmente algunas de estas autoridades han aceptado algunas de ellas. Se polemiza de varias razones por las cuales no se han aceptado los ensayos alternativos y una de ellas es que la prueba *in vivo* se basó en evaluaciones subjetivas de las lesiones en el tejido del ojo proporcionando gran variabilidad en la estimación de la irritabilidad (Lilienblum 2008, Alépée, Tornier et al. 2010). La variabilidad de la prueba de Draize en cada fase del estudio era bastante llamativa, en la fase II, la variabilidad era más pequeña por que los químicos eran menos irritantes, otra de las razones puede estar relacionada con la insuficiencia de protocolos para la evaluación no animal, así como la opción de análisis estadísticos. Se realizó un taller en irritación del ojo donde participaron expertos en el campo de industrial y gubernamental los cuales repasaron la aprobación de la irritación del ojo y se discutió un número de iniciativas que podrían llevar a la reducción y refinamiento a corto plazo y al reemplazo a largo plazo (Vinardell and Mitjans 2008, Smith, Weissberg et al. 2010, Dholakiya and Barile 2013).

Sin embargo, COLIPA ha desarrollado un programa de investigación en colaboración con académicos externos con el objetivo de consolidar la industria cosmética (Brantom, Bruner et al. 1997, Courtellemont, Pannetier et al. 1999). Los objetivos de este programa es identificar un punto final *in vitro* para la evaluación predictiva de la irritación, define las circunstancias de usar de forma apropiada los diferentes tipos de sistemas inclusive cultivos de tejido epitelial simple, y tridimensionales, conduciendo los estudios en células corneales humanas y de conejos (Kaluzhny, Kandárová et al. 2011, Mahmood and Akhtar 2013). En este programa se encuentra otras organizaciones como El Instituto de ciencias naturales Internacional (ILSI) y el Instituto de Salud y las Ciencias Medioambiental (HESI) desarrollando una clasificación de irritación en ojos a partir de un esquema(Donahue, Avalos et al. 2011). Dentro de los protocolos validados existen varias pruebas con excelentes resultados entre ellas la opacidad corneal de bovinos (BCOP)(Hayashi, Mori et al. 2012, Verstraelen, Jacobs et al. 2013), el ensayo en la membrana corioalantoidea (Het CAM) (Brantner, Quehenberger et al. 2002, Djabari, Bauza et al. 2002, Budai, Lehel et al. 2010) y

ya se aceptan por autoridades regulatorias en casos de irritantes severos sobre todo por la OECD y países miembros como medio de reducir y refinamiento el uso del Draize

2.2. Método Clásico para evaluar la Fototoxicidad y sus modificaciones.

Es conocido que algunos productos cuando se exponen a la luz pueden ocasionar reacciones adversas, y las mismas han sido evaluadas por la toxicología mediante ensayos, dentro de los primeros que propusieron estos ensayos fue Draize, existen disimiles terminologías que diferencian a las reacciones que se presentan por la acción de la luz como la foto irritación fotoalergia y otros(Harber, Armstrong et al. 1982, Ljunggren and Wirestrand 1989, Nishio, Nakashima et al. 2009). Son disimiles las modificaciones efectuadas a este ensayo el cual se realiza con curieles además de otros test in vivo efectuados en humanos como el test del parche(Maibach 1986, Maibach and Marzulli 1986), Los alemanes, austríacos y suizos fundaron grupo prueba en 1984, para investigar reacciones foto-alérgicas y su la epidemiología en Europa Central. Durante el primer período del proyecto (1985-1990), se probaron 32 sustancias en pacientes los cuales mostraron estar fotosensibles (Fjellner 1983). Observándose que el mayor problema se encontraba en la fototoxicidad para reducir clínicamente la aparición de esta reacción cambiaron las sustancias y disminuyeron sus dosis y se incluyeron algunos cosméticos Este estudio puso en evidencia la necesidad de desarrollar métodos *in vitro* para predecir la fototoxicidad de todas aquellas sustancias a la que se expone el hombre(Wang, Wang et al. 2013).

El mecanismo de sus reacciones ha sido repasadas extensivamente la Absorción de luz en el 300-750nm rango indica la habilidad para activar a la molécula a un estado donde el oxígeno se descompone a oxígeno singlete, dando como resultado de esta foto oxidación a sustancias toxicas que desencadenan estas reacciones(Xia, Chiang et al. 2012).

3. Generalidades de los Métodos Alternativos

El Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos es parte del Centro de Investigaciones Conjuntas de la Comisión Europea establecido en respuesta al artículo 23 de la directiva 86/609/EEC de protección a los animales de laboratorio (Hartung 2010).

Esta organización coordina la pre-validación y validación de los estudios donde no se empleen animales de laboratorio, conduciendo las investigaciones a diferentes áreas de la toxicología para desarrollar relevantes ensayos que posibiliten la seguridad de las diferentes sustancias químicas incluyendo cosméticos y fármacos. Tomando en consideración los métodos *in vivo* reportados la ECVAM ha establecido una línea para el futuro desarrollo de los métodos alternativos distribuyéndolos en varias temáticas (Kinsner-Ovaskainen, Maxwell et al. 2012).

Dentro de ellas se encuentran la Toxicidad sistémica, toxicidad tóxica, sensibilización, carcinogénesis, toxicidad de la reproducción, toxico-cinética, ecotoxicología, Información científica, relación estructura actividad. Biológica, y estrategias de desarrollo (Lilienblum 2008, Adler, Basketter et al. 2011, Hartung, Blaauboer et al. 2011). Dentro de estas áreas nos interesa principalmente la toxicidad aguda temática en la cual desarrollaremos nuestro trabajo. Esta incluye los estudios de irritación y corrosión en piel, fototoxicidad, absorción percutánea e irritabilidad oftálmica, para ello el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos coordinó estudios de validación en nueve laboratorios para tres métodos *in vitro* con el objetivo de reemplazar el método tradicional de Draize realizado en Conejos. Actualmente varios métodos para evaluar este tipo de toxicidad han sido aceptados por las agencias regulatorias, como la Organización de desarrollo y cooperación Europeo (Ohno 2004).

3.1. Origen.

Las Tres R's se originaron en una propuesta hecha en 1954 por Charles Hume, fundador de la Federación de las Universidades para Bienestar Animal (UFAW) esta organización emprendió un estudio científico de técnica humana en laboratorio los experimentos animales. El proyecto fue manejado por un comité bajo la presidencia de Señor Peter Medawar, el Nobel de inmunología, con William Senda-Petter, que pertenece a la Secretaria de la Sociedad de Defensa de Investigación de Gran Bretaña, entre sus miembros. Christine Stevens, fundador del Instituto de Bienestar Animal (AWI) en el EE. UU., con tal de que el apoyo financiero para el proyecto. W.M.S. Russell, zoólogo, y R.L. se apoyaron en Burch, un microbiólogo, para llevar a cabo el trabajo que concluyo con la publicación del libro Los Principios de Técnica Experimental Humana en 1959. Las alternativas son técnicas para reducir el número de animales usado en investigación médica y

científica y así mitigan el sufrimiento de cualquier animal que tiene que ser usado, siempre que sea posible, reemplaza animales a través de otras técnicas (Buchheit 2001) (Rogiers 2005, Kandárová and Letašiová 2011).

3.2. Concepto y tipos de métodos alternativos importancia de la validación.

En 1995, un grupo internacional de científicos se reunieron en Sheringham, Norfolk, Reino Unido, en un taller denominado las tres R: con la participación de William Russell y Burch Rex, el grupo analizó cada una de las 3R en detalle, e hizo recomendaciones concretas sobre la forma de promover su desarrollo y aplicación dentro de la comunidad científica. Los métodos alternativos se clasifican según sus postulados en:



Figura 2. Diagrama de clasificación de los métodos Alternativos

Reemplazo: Son procedimientos que emplean animales por otros que no los precisen que se incluyen, cualquier sistema experimental que no traiga consigo el uso de animales como un todo, se considera que es una alternativa de reemplazo. Algunos de éstos son reemplazos relativos, cuando ellos todavía traen consigo la matanza de un animal con el propósito de obtener células, tejidos u órganos para subsecuente en estudios *in vitro*. Otros son alternativas absolutas que no requieren ningún material biológico derivadas de un animal vertebrado (Kinsner-Ovaskainen, Maxwell et al. 2012) Schaeck, Van den Broeck et al. 2013)

Reducción: El concepto de alternativas de la reducción cubre cualquier estrategia que producirá menos animales a usar para obtener la misma cantidad de información, o máximo de la información obtenida usando mayor cantidad de animales y limitando así o evitando el uso subsecuente de animales adicionales. Para ello se emplean métodos estadísticos, ensayos pilotos y empleo de gran información (Daneshian, Akbarsha et al. 2011).

Refinamiento: Son los métodos usados para mejorar la eficacia o disminuir el dolor o sufrimiento infligido. El término refinamiento significa que la modificación de cualquier procedimiento en el tiempo que se encuentra el animal en el laboratorio desde que nace hasta su muerte se debe minimizar el dolor experimentado por el animal, y así se refuerza su bienestar. Esto es tomando la consideración desde el punto de la ética y además la experiencia demuestra que el dolor y la otra tensión producen cambios fisiológicos que pueden aumentar la variabilidad de los resultados en los experimentales. Al final del experimento, el método más humano de eutanasia debe escogerse (Mehlman, Pfitzer et al. 1989, Schaeck, Van den Broeck et al. 2013) (Stokes, Srinivas et al. 2013).

3.3. Validación actual de los métodos alternativos.

La aprobación de métodos alternativos es un proceso largo y caro que está coordinado por el Centro Europeo para la Aprobación de Métodos Alternativos (ECVAM) que es parte de la Comisión Europea (Olivry, Linder et al. 2012, Wilda, Lavoria et al. 2012, Belanger, Rawlings et al. 2013, Kim, Song et al. 2013). En febrero del 2000 Estados Unidos aceptó tres métodos alternativos formalmente. Aunque los métodos alternativos son usados a través de industria para evaluar seguridad, las autoridades reguladoras son a menudo renuentes a aceptar datos de las nuevas pruebas alternativas, y prefiere datos de estudios en animales antes de que les permitan liberar sus productos al mercado (Featherstone, Stookey et al. 2011).

Actualmente la Instituto de Investigaciones Toxicológicas *in vitro* (INVITOX) ha validado 125 protocolos dentro de ellos 40 son para evaluar irritabilidad y 10 para evaluar fototoxicidad y de estos solo 5 han sido aceptados por las agencias regulatorias. Esta validación garantiza la

reproducibilidad, sensibilidad y eficiencia del ensayo (Kolman 2004) (Boess, Scholz et al. 2003, Spielmann 2009).

3.4. Tendencias actuales de los métodos alternativos.

Hay tres maneras en las que la situación que existe hoy con los animales de experimentación podría cambiar pues:

1. *Podrían prohibirse los experimentos y pruebas que involucran el uso de animales del laboratorio completamente*

Si había una prohibición inmediata y total en el uso de animales, muchas investigaciones médicas básicas se detendrían, como la producción de ciertas vacunas. Ningún nuevo fármaco se desarrollaría, y la seguridad no sería la adecuada para exponerlos al público general y pacientes (Page and Godlovitch 2007).

2. *Las cosas podrían continuar como ahora, o podría haber un aumento incluso en el número de experimentos animales*

Al presente, no se tiene ningún tratamiento eficaz para muchas enfermedades serias y que amenazan la vida como enfermedades del corazón, muchos tipos de cáncer, VIH y nuevas variantes que surgen cada día. Investigaciones que involucran animales puede llevar a los descubrimientos en estas áreas. Sin embargo, en 1986 el Reino Unido y el Directorio de la CEE planteo que debemos estar apuntando, dondequiera que posible, para reducir el número de animales usado, y que se deben buscar alternativas (Puget 2004, Foëx 2007).

3. *Podría haber un movimiento progresivo para reducir, refinar y reemplazar el uso de animales en experimentos*

Esto se llama el 3Rs y parece ser en lo adelante la manera más sensata. Ofrece la oportunidad para científicos y activistas el bienestar de los animales (Tremayne-Lloyd and Srebrolow 2007, Horner and Minifie 2011, Goffi 2013).

4. Métodos alternativos validados para evaluar la irritabilidad.

En la progresión de nuevos ensayos desde su validación hasta su aceptación se consideran cinco fases de acuerdo con la CEVMA(Combes 2002, Kinsner-Ovaskainen, Akkan et al. 2009, Kinsner-Ovaskainen, Maxwell et al. 2012).

1. Desarrollo del ensayo
2. Prevalidación
3. Validación
4. Evaluación
5. Progreso hacia su aceptación

En el agosto de 2003, el Comité Científico Asesor de Métodos Alternativos (SACATM) recomendaron que ICCVAM repasara el estado de la aprobación de en métodos de pruebas in vitro que pueden identificar irritantes oculares. Unos meses más tarde, en el octubre de 2003, la EPA sugirió cuatro métodos in vitro para evaluar toxicidad del ojo, severa o corrosiva. Dentro de los cuatro métodos se incluyó el de Opacidad Corneal Bovino (BCOP)(Hayashi, Mori et al. 2012), la prueba de la Membrana Corioalantoidea (HET-CAM) (Brantner, Quehenberger et al. 2002, Budai, Lehel et al. 2010), el enucleado de pollo (CEET)(Prinsen 1996) y el aislamiento del ojo de conejo (IRA).

La Interagencia de Coordinación de los Comité en la Aprobación de Métodos Alternativos (ICCVAM) en enero del 2005, considero que los cuatro en métodos de la prueba sugeridos para medir irritación del ojo estaban validados (Fentem and Botham 2004, Birnbaum 2013). Repasándose en marzo las sugerencias hechas por las agencias regulatorias en cuanto a los mecanismos que inducen la lesión ocular y la recuperación. Aprobando finalmente el HetCAM como método alternativo para evaluar irritabilidad ocular esto se considera un primer paso en la aceptación de nuevos ensayos que tendrán como fin sustituir el método de Draize (Marquardt, Matuschek et al. 2010, Jung, Goers et al. 2012, Stokes, Kulpa-Eddy et al. 2012).

4.1. Validación y empleo del test de hemólisis y desnaturalización de proteínas (RBC/DNP).

Existen otros ensayos validados como el de prueba de hemólisis, validado por Pape (Pape, Pfannenbecker et al. 1987, Pape and Hoppe 1990, Pape and Hoppe 1991, Pape, Pfannenbecker et al. 1999, Pape, Maurer et al. 2001). Este protocolo describe el uso de células de la sangre rojas para cuantificar efectos adversos de surfactantes y productos del detergente en la membrana citoplasmática en combinación con el daño de proteínas celulares donde algunos incluyen la desnaturalización de la oxihemoglobina a partir de la lectura de la absorbancia por lo tanto permite conocer el daño de proteínas estructurales y funcionales. Esta prueba ha sido empleada en varias ocasiones para evaluar cosméticos, pero su alta sensibilidad permite evaluar otros productos (Lagarto, Vega et al. 2006, Alves, Presgrave et al. 2008)

El ensayo de células rojas de sangre (RBC) se usa estimar irritación potencial de agentes tensoactivos y detergentes. Se mide lisis de la membrana de la célula y desnaturalización de la proteína de la célula se evaluaron 20 formulaciones empleándose eritrocitos de rata y de bovino varios de las sustancias eran falsos negativos con sangre de la rata. Concluyéndose que los ensayos con eritrocitos de ternero e preferible teniendo en cuenta la estrategia de refinamiento (Ying, Xingfen et al. 2010, Su, Zhao et al. 2011). También se han empleado eritrocitos humanos este método se basa en la estimación de la diferenciación entre la lisis de la membrana

celular célula y la desnaturalización de la oxihemoglobina. Este método se validó con 100 champús con una correlación entre los resultados dado por el test *in vivo* existiendo una buena correlación entre ambos de un 80% este ensayo es barato, rápido, y proporciona resultados fiables con buena reproductibilidad (Martinez, Corsini et al. 2006, Ying, Xingfen et al. 2010).

Este ensayo permite su correlación con los efectos producidos por los tensoactivos sobre el globo ocular de conejo, según el Test de Draize; perfilándola como una herramienta alternativa y/o complementaria en los procesos de evaluación de la tolerancia ocular de los agentes surfactantes (Fowler, Doncel et al. 2003, Benavides, Mitjans et al. 2004).

4.2. Métodos alternativos validados para evaluar la Fototoxicidad.

La fototoxicidad se encuentra de la temática de toxicidad local y para ello han validado varios métodos alternativos la comprobación de la fototoxicidad *in vitro* era el tema del segundo taller de la ECVAM en 1993 (Vargas, Rivas et al. 2000, Vargas, Rivas et al. 2003, Nafecz-Jawecki, Hajnas et al. 2008) y su objetivo primario era planear una aprobación de un ensayo prometedor para evaluar fototoxicidad e identificar un número fijo de químicos a partir de los datos reportados *in vivo* en humanos se escogió en colaboración con el COLIPA excelente expertos europeos de la industria y la academia (Spielmann 2001, Spielmann and Liebsch 2002) Para la valoración se comenzó con la terminología de la temática fototoxicidad es una respuesta aguda tóxica después de la primera exposición de la piel a ciertos químicos y la exposición subsecuente a las radiaciones de luz/ UV , y es semejante al inducido por irradiación después de la administración de un químico fotosensibilizador, también se usa el término de foto irritación que es un tipo particular de fototoxicidad que son reacciones superficiales inducidas por químicos 0-72 horas después de exposición a la radiación (Andrisano, Ballardini et al. 2001)

En la validación del el 3T3 NRU prueba de fototoxicidad, se condujeron tres estudios y el de pre validación se condujo con químicos codificados estos se realizaron en ocho laboratorios donde 158 datos apuntan que los químicos fueron correctamente clasificados pues coincidieron con un estudio que condujo independientemente del EU/ COLIPA en un Instituto, en Japón, en 1994, con el mismo juego de químicos (Spielmann, Balls et al. 1998). La aprobación formal se estudia 1994-1996 luego la ECVAM en un taller dedicado a la temática informa resultados contundentes que demuestran la efectividad de la prueba para evaluar la fototoxicidad (Nam, An et al. 2004, Clothier 2007).

Este estudio fue aceptado por las agencias regulatorias, aunque otros ensayos han transitado por el proceso de validación aún no han sido aceptados entre ellos El ensayo de foto activación de complemento protocolo 77, el de cultivo de células humanas Nro 44' ensayo de queratinocitos humanos Nro 79, ATS piel ZK 1350 Nro 83 y otros que engrosan la lista de ensayos para fototoxicidad (Lynch and Wilcox 2011).

4.3. Validación y empleo de la prueba de fotohemólisis.

Dentro de los protocolos validados se encuentran el de foto-hemólisis unido a la desnaturalización de la oxihe-moglobina para evaluar fototoxicidad . En la literatura se han descritos trabajos que refieren el empleo de estos protocolos como la evaluación de la fototoxicidad de la hidroclorotiazina donde además del ensayo de foto hemólisis se utiliza el de *Candida albicans* (Chabrier-Roselló, Foster et al. 2005).

Las radiaciones Ultravioletas (UV) causan hemólisis de eritrocitos en presencia de foto sensibilizadores por lo que se puede usar como un modelo del *in vitro* para evaluar propiedades fotosensibilizante de sustancias como los Antioxidantes tal como ácido ascórbico (vitamina C) y d-alfa-tocoferol (vitamina E) lo que se le han encontrado ser fotoprotectores en tales sistemas de prueba(Selvaag, Petersen et al. 2002) (Canudas, Zamora et al. 2005).

En este sistema se reveló que las propiedades fototóxicas fuertes, dependen de la concentración de la droga y las dosis de la irradiación cuando se evaluó sustancias antilipémicas, las dosis de irradiación fueron de 40 J/ cm² de un UVA (320-400 [nm]) o 1,6 J/ cm² UVB/ 0,8 J/ cm² UVA de un UVB (280-320 [nm]) observándose una hemólisis total. Este se empleó para evaluar un grupo de diuréticos de los que 19 de las 25 sustancias revelaron fotohemólisis después de la exposición a radiación UVA, demostrándose con la adición del ácido ascórbico, el alfa-tocoferol y la superóxido dismutasa sus propiedades antioxidantes al inhibir la foto hemólisis. Además se empleó con drogas antiinflamatorias y antiuréticas (Ladizinski and Elpern 2013) dado los efectos conocidos de estos agentes atribuidos normalmente a la radiación ultravioleta (UV), ocho compuestos Carprofeno, Diclofenaco, Ibuprofeno, Ketoprofeno, Naproxeno, Piroxicam, en los estudios se usó una lámpara experimental visible ligera, emite 5% UVA al máximo encontrando foto hemolisis en Carprofeno, Naproxeno y Fenylbutazone (Okumura, Yamauchi et al. 2005,

Ortonne, Queille-Roussel et al. 2006, Musa and Eriksson 2007, Vargas, Rivas et al. 2007, Musa and Eriksson 2008).

4.4. Criterios de la Agencias Internacionales Regulatoras para su aceptación.

La rigurosidad de las agencias regulatorias trae consigo la lentitud en la aceptación de los métodos alternativos validados se procede a estimar la probabilidad de clasificar a los irritantes oculares en severo y corrosivos el método de prueba presente incluye tres animales basado en pautas protocolares de la OECD y las Naciones Unidas (ONU) para ello empleo el Sistema Globalizado de Armonización de Clasificación (GHS) y Etiqueta de Químicos de la ONU. Este análisis se basó en un banco de datos de 128 substancias clasificando como Categoría 1 a irritantes corrosivos e irritantes severos, basado en 142 estudios usando un total de 661 conejos (Ohno, Kaneko et al. 1999).

Este estudio se realizó a partir de datos coleccionados por el Instituto nacional de seguridad y salud ocupacional (NIOSH) el cual estimo que la exposición accidental en humanos produjo aproximadamente 39.200 lesiones del ojo químico-relacionadas en 1998, basado en la sección de emergencia ojo-lesión.

Aproximadamente atribuyendo 10.000 de estos casos a un no identificado/ químico no especificado. Casos adicionales más de 2500 de las lesiones fueron ocasionadas por químicos específicos ácidos incluidos. A partir de este estudio demostró la importancia de la aceptación de los métodos alternativos y la necesidad de incrementar estas pruebas. El Comité de Coordinación en la Aprobación de Métodos Alternativos evaluó los estados de aprobación de cuatro en métodos *in Vitro* para identificar corrosivos e irritantes severos oculares (Bagley, Gardner et al. 1999, Gerner and Schleder 2002).

En apoyo al Programa Nacional de Toxicología para la evaluación de métodos alternativos en toxicología (NICEATM) el cual solicitó datos de estudios en animales y humanos *in vivo* para

reducir el número de animales a emplear y comparar en la validación de los test alternativos para ser aceptados por las agencias regulatorias. La decisión de las autoridades regulatorias de reducir el número de animales de seis a tres está basada en el hecho que se consideró suficientemente la reproducibilidad de la prueba tal es que se demostró que usar menos animales no alteraría significativamente la exactitud del método.

Actualmente se han aceptado cinco ensayos para evaluar irritación ocular a pesar de que se han validado varios protocolos y solo uno para fototoxicidad (Spielmann, Kalweit et al. 1993, Mancebo, Hernández et al. 2008, Schrage, Hempel et al. 2011, Ceridono, Tellner et al. 2012).

III. JUSTIFICACIÓN

Los organofosforados provocan efectos adversos como irritación, fototoxicidad y son potencialmente hemolíticos debido a su formulación con excipientes tensoactivos, por lo que es necesario demostrar el impacto que pueden llegar a tener sobre los animales y en el ecosistema. Por su parte la creación del Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) en 1992 se dio respuesta al artículo 23 de la directiva 86/609/EEC elaborado para la protección a los animales de laboratorio. Esta organización coordina la pre-validación y validación de los estudios donde no se empleen animales de laboratorio, conduciendo las investigaciones a diferentes áreas de la toxicología para desarrollar relevantes ensayos que posibiliten la seguridad de las diferentes sustancias químicas que se emplean como fertilizantes, cosméticos y fármacos. Tomando en consideración los métodos *in vitro* validados por la ECVAM para evitar el uso de animales de laboratorio y en particular el ensayo *in vitro* de alta sensibilidad para medir efecto irritante y fototóxico empleando células rojas (RBC) que mide los porcentajes de la hemólisis eritrocitaria originado por efecto hemotóxico y la desnaturalización de la hemoglobina de excipientes tensoactivos, se propone este proyecto con el fin de evaluar a 5 organofosforados formulados con excipientes tensoactivos que además de originar efectos sobre la enzima

acetilcolinesterasa puede llevar al padecimiento de una anemia hemolítica en los animales debido al uso de excipientes tensoactivos.

IV. HIPÓTESIS

Las pruebas alternativas *in vitro* de hemólisis y fotólisis permiten determinar de manera cuantitativa la irritación y la fototoxicidad de los organofosforados.

V. OBJETIVOS

Evaluar la irritación y la fototoxicidad de los organofosforados formulados con tensioactivos a partir de la hemólisis y la fotólisis en los glóbulos rojos humanos.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Las sustancias de ensayo

Las sustancias de ensayo utilizados en el estudio se muestran en la **Tabla 1**

Tabla 2. Las formulaciones estudiadas organofosforados e in vivo los resultados de Irritación ocular (EPA)

Orgafosforados	Concentracion	Clasificación <i>in vivo</i>
Acefate	500 g/kg	Ligeramente Toxicico
Chlorpirifus	480 g/L	Moderadamente
Malathion	500 g/L	Ligeramente
Metamidophos	483g/L	Altamente toxico
Methyl Paration	500 g/L	Extremadamente

2.2 Preparación de la suspensión de RBC

La sangre humana conservada se obtuvo a partir de un c (Toluca, México). El RBC se separaron por centrifugación (aprox. 3500 g) a 4°C durante 10 min. Los sedimentos de células se suspendieron en solución de PBS a una densidad celular de 2×10^9 células / ml.

2.3 Ensayo de hemólisis

El estudio se llevó a cabo según el protocolo INVITTOX NO ° 37 (CEVMA, 1992). Cada sustancia de ensayo se disolvió en concentraciones en PBS. Acerca de 50 l de alícuotas de

suspensión de eritrocitos se expusieron a diversas concentraciones del fosfato orgánico disuelto en solución de PBS en un volumen total de 1 ml. Dos controles se prepararon resuspendiendo suspensión de eritrocitos ya sea en tampón solo (control negativo) o en agua destilada. dodecil sulfato de sodio (SDS) se utilizó como control positivo. Después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 3500 g durante 5 min a 48°C. La cantidad de hemoglobina en el sobrenadante se midió espectrofotométricamente a 540 nm y 575 nm. La desnaturalización de la hemoglobina en el sobrenadante se confirmó usando absorción de 575 nm. El grado de desnaturalización se expresa como una relación de hemoglobina desnaturalización (HD) ($R = (\text{Abs. } 575 / \text{Abs. } 540) / 100$).

2.4. Desnaturalización de las proteínas

La desnaturalización de proteínas se determinó mediante la comparación de la relación de absorbancia a 575 y 540 nm en una de doble haz UV-Vis espectrofotómetro. Esta proporción se usa para calcular el índice de hemoglobina desnaturalización (DI) que se compara con los efectos de SDS como el estándar interno. La curva de concentración-respuesta se trazó a partir de los resultados de seis medidas / experimentos independientes. Si el valor R era más pequeño que 90, la sustancia se considera que es HD positivo y los resultados no fueron incluidos en el análisis.

2.5 Evaluación de la irritación ocular potencial

El índice de irritación se determinó de acuerdo a la relación de lisis / desnaturalización (L / D) se obtiene dividiendo la HC50 por el índice de desnaturalización. Los tensioactivos se clasifican de acuerdo con esta relación L / D como no irritante (> 100), ligeramente irritante (> 10), irritante medio (> 1), de alta irritante (> 0,1), y muy irritante (<0,1) (Pape et al., 1987)

2.6 Esayo de fotohemolisis

Acerca de 50 l de glóbulos rojos (RBC) se añadieron a una placa de 24 pocillos que contenía diferentes concentraciones de 0,1 a 1000 mg / ml de la organofosforado formulado con surfactante y se expusieron durante 30 min a una lámpara UV (Ultra-vitalux®, Osram , Alemania) (960wcm² UVA (6,9 J cm²) y UVB 220 wcm² (1,58 J cm²)). Otros 50 l de glóbulos rojos (RBC) se añadieron a una placa de 24 pocillos que contenía diferentes concentraciones de 0,1 a 1 mg / ml de la organofosforado formulado con surfactante y no irradian con UV. el HC50 se determinó en las placas irradian y no irradie. el factor de foto hemólisis (PHF) se calculó dividiendo el HC50 de las células no irradiar por el HC50 de la irradiado las células. Un compuesto se considera irritante foto del factor fotohemólisis (PHF es ≥ 3.0) y la densidad óptica (DO > 0,05) (Pape et al., 2001).

VII. LÍMITE DE ESPACIO

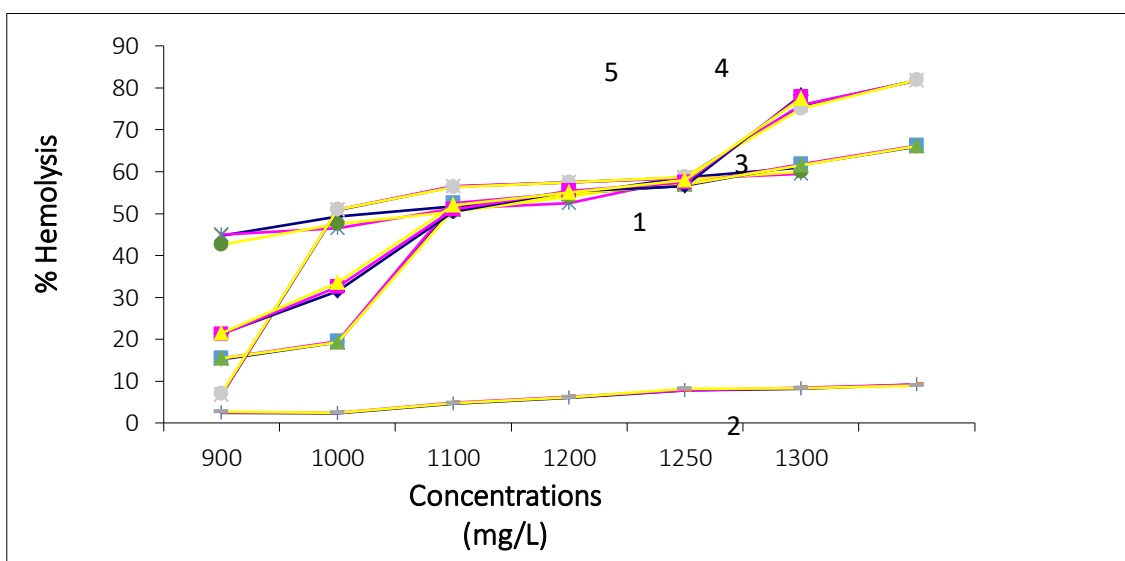
El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Citometría de Flujo del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

VIII. LÍMITE DE TIEMPO

El trabajo experimental se llevó a cabo de enero a junio de 2015 y la escritura del artículo científico de septiembre a diciembre 2015.

IX. RESULTADOS

Los resultados de la hemólisis de los organofosforados se compararon con una muestra control en la que 2×10^9 RBC/mL, fueron completamente lisadas por agua destilada y medidas. La absorbancia 1,985 de este control representa el 100% de hemólisis. Los organofosforados formulados con tensioactivos (Gráfica 1), se evaluaron por triplicado y no mostraron diferencias significativas entre los ensayos replicados para $p \leq 0.05$. En estos resultados se muestra que el Acefato es el que menor hemólisis ocasiona a los eritrocitos por su parte el Metamidofos es el más hemolítico. Esto puede comprobarse en los valores que se muestran en la Tabla 3. Donde el Acefato es clasificado como no irritante en nuestro ensayo *in vitro* y ligeramente irritante según el ensayo *in vivo* empleando el ensayo clásico de Draize.



Gráfica 1 Relación entre 1: Malatión, 2: Acefato 3: Metamidofos 4: Clorpirifos 5: Concentración de paratión de metilo y % de hemólisis en ambos tipos de sangre.

Se muestra que el Índice de desnaturalización (DI) en Metamidofos fue de 22.01% y es clasificado como severamente irritante. En menos grado de irritación se encuentra el Malatión, Clorpirifus y el Metil Paratión. Los resultados muestran una correlación moderada entre los ensayos de irritabilidad ocular *in vitro* e *in vivo*

Tabla 3. Clasificación de la irritación ocular inducida por el organofosforado probado según su relación L/D calculada a partir de HC50 y el índice de desnaturalización (DI) en sangre humana.

Organofosforados	HC50 (mg/L)	DI (%)	L/D	Clasif. <i>in vitro</i>	Clasif. <i>in vivo</i>
Acetato	No lisis	NDT	NDT	NI	LI
Clorpirifos	5	34.59	0.14	I	I
Malatión	2.5	59.74	0.041	VI	I
Metamidofos	1.17	22.01	0.053	VI	IS
Metil Paration	0.90	28.30	0.031	VI	I
SDS	0.53	27.98	0.018	VI	I

Índice Desnaturalización (DI), Radio de Clasificación (L/D), Muy irritante (VI), Irritante(I), No Irritante (NI)

En el ensayo de fototoxicidad realizado no se observó hemólisis cuando los glóbulos rojos se incubaron con organofosforados en la oscuridad o irradiaron con UVA y UVB (Gráfico 2 y Tabla 3). El organofosforado no podía inducir la foto hemólisis en los eritrocitos humanos. El índice de fototoxicidad (IF>3) en sangre humana y densidad óptica >0.05. El HC50 de eritrocitos humanos expuestos con organofosforados irradiados fue de 0,9 – 5 (mg/ml). Por otro lado, la concentración hemolítica 50 (HC50) de eritrocitos humanos expuestos con organofosforados no irradiados fue de 0,55-6,25 (mg/ml).

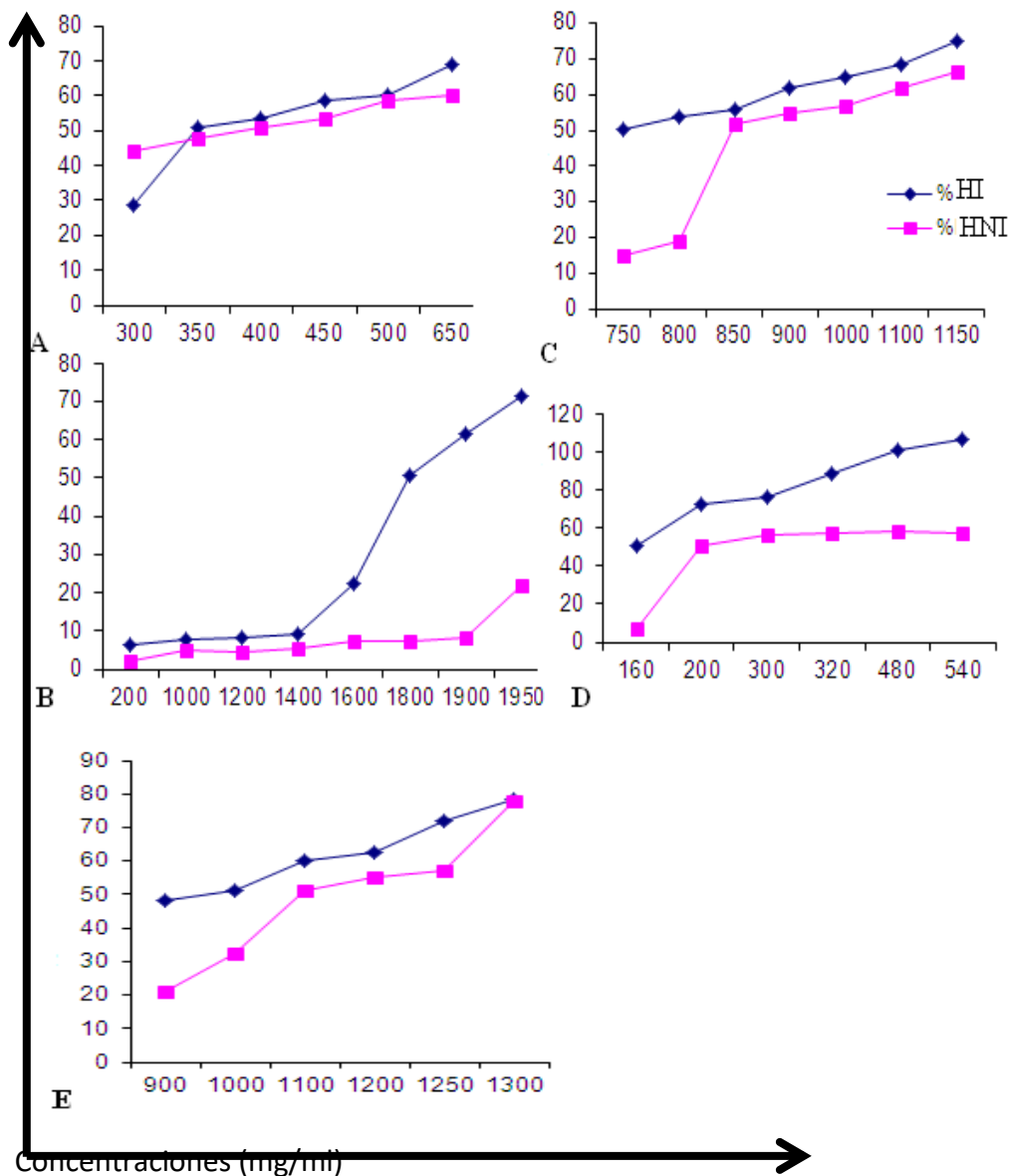
Tabla 4 Clasificación de la fototoxicidad inducida por organofosforados expuestos a eritrocitos humanos empleando ensayo *in vitro* de foto-hemólisis según su Índice de fototoxicidad (IF>3).

Organofosforados	HC50 I (mg/ml)	CH50 NI (mg/ml)	IP CH50 I/CH50 NI	Fototoxicidad
Acetato	0	0.55	0	No fototoxicidad
Clorpirifos	5	6.25	0.76	No fototoxicidad
Malatión	2.5	2.8	0.89	No fototoxicidad
Methamidophos	1.17	1.33	0.87	No fototoxicidad
Paratión de Metilo	0.9	1	0.90	No fototoxicidad
Clorpromazina	1			

El HC50 en glóbulos rojos irradiados y no irradiados fue similar para cada organofosforado e indica que no hay acción fototóxica (**Gráfica 2**), a pesar de la inclusión de altos niveles de

UV en la exposición a los glóbulos rojos. Los organofosforados menos hemolíticos según la concentración empleada (Malation, Acefato, Metamidofos, Clorpirifos y Metil Paratión) mostró un HC50, tanto en glóbulos rojos irradiados como no irradiados, bajo menor a 1 mg/ml, lo que indica que tampoco hay acción fototóxica.

% hemólisis



Gráfica 2. Relación entre la concentración y el % de hemólisis de los eritrocitos irradiados (HI) y no irradiados (HNI). A: Malathion, B: Acefato, C: Methamidophos D: Chlorpyrifos E: Paratión de Metilo

La crítica de los métodos clásicos *in vivo* para predecir la irritación de la piel o la irritación ocular y la fototoxicidad estimuló el desarrollo de varios métodos *in vitro* de reemplazo, que han sido revisados recientemente para reducir el número de experimentos con animales. Los sustitutos de la prueba *in vitro* incluyen RBC y desnaturalización de la hemoglobina de proteína. Los eritrocitos se han sugerido como un blanco fácilmente disponible y bueno para la evaluación de la irritabilidad ocular y la fototoxicidad. Por otra parte, el ensayo *in vitro* de RBC es una herramienta de cribado útil para la evaluación de la irritabilidad y fototoxicidad de organofosforados formulados con tensioactivos.

X. DISCUSION

La posible irritación ocular de los organofosforados formulados con tensioactivo se estudió con un método basado en el uso de RBC para cuantificar los efectos adversos de los surfactantes y detergentes en la membrana citoplasmática (hemólisis) en combinación con el daño a las proteínas celulares liberadas (desnaturalización) (Benavides et al. 2004). Los glóbulos rojos han sido utilizados por muchos investigadores como modelo de estudios de irritabilidad y fototoxicidad para indicaciones preliminares sobre posibles agentes fototóxicos e irritantes. Ciertas clases de irritantes químicos (principalmente tensioactivos u organofosforados) causan daño a las membranas plasmáticas celulares y/o desnaturalización de varios tipos de proteínas (Lankerani and Baron 2004, Kleinman, Smith et al. 2010).

Actualmente se estima que las ventas anuales de adyuvante en todo el mundo valen más de 1.500 millones de dólares. Una gran parte de esta estimación representa el valor de los adyuvantes incorporados en las formulaciones de plaguicidas. Pero muchos millones de

dólares también se gastan en productos independientes al por menor como adyuvantes, tensioactivos y agentes humectantes. Un adyuvante es cualquier material que cuando se añade a una solución de pulverización mejora o modifica la acción de un pesticida. La clasificación más útil de los adyuvantes es por grupo químico con los adyuvantes divididos en las amplias categorías de tensioactivos, aceites, acidificadores y tampones, adyuvantes de fertilizantes y 'otros'. Además, las moléculas adyuvantes tensioactivas se mueven entre las moléculas de agua forzándolas a separarlas. Los surfactantes reducen la tensión superficial de la gota de pulverización moviéndose a la superficie donde forman una capa de 'micela'. Estos tensioactivos pueden causar hemólisis en eritrocitos e irritación.

El índice de irritación se determinó de acuerdo con la relación lisis/desnaturalización obtenida (L/D) dividiendo el HC50 (g/ml) por la DI. La DI de cada organofosforado formulado con tensioactivo se determinó comparando la desnaturalización de la hemoglobina inducida por el tensioactivo y la SDS como control positivo. Por otro lado, la prueba de hemólisis, es una prueba fotométrica que mide las densidades ópticas a 540/575 nm, mide una de las máximas de absorción de HbO₂, para determinar los dos extremos: Liberación de Hb después del daño de membrana e interacción proteica, es decir, desnaturalización de Hb.

Además, el mecanismo para la respuesta fotohemolítica se ha investigado ampliamente en sistemas *in vitro*. Es probablemente el resultado de la generación de compuestos tóxicos de oxígeno (Vargas et al. 2007) con la posterior oxidación de las proteínas de membrana de eritrocitos. Los eritrocitos (RBC) son muy sensibles y se dañan por la acción de las especies de radicales libres de oxígeno. Se ha postulado que la acción dañina de estos radicales libres de oxígeno podría ocurrir por la oxidación de lípidos de membrana que conduce a la lisis de RBC. Estudios previos informaron que los radicales superóxidos que participan causan daño sobre las RBC, y puede ser inhibido por la adición de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa. La respuesta fototóxica o fotoalérgica a los medicamentos administrados sistémica o tópicamente se notifica con frecuencia como reacciones adversas a medicamentos (Blakely, Drucker et al. 2019).

Por otro lado, el conocimiento de la irritación y el potencial fototóxico de los nuevos productos es muy importante para la seguridad de las personas que los manipulan.

Los compuestos OPs pueden ser absorbidos a través de la piel, conjuntiva, mucosa oral, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio, por contacto directo, ingestión, inhalación e inyección. Después de la exposición a los compuestos de organofosforados (Al-Zubaidy, Mousa et al. 2011), las características tóxicas suelen ser obvias en un plazo de 30 minutos a 3 horas. Esto puede retrasarse en algunos casos dependiendo de la tasa y la cantidad de absorción sistémica. El disolvente de hidrocarburos también produce sus efectos. La mayoría de los pacientes se vuelven sintomáticos rápidamente, aunque la aparición y la gravedad de los síntomas dependiendo de la naturaleza del compuesto, la cantidad, la vía de exposición y la tasa de degradación metabólica. Particularmente Acefate y Metamidofos pueden producir irritación dérmica y ocular, pero la mayoría son sensibilizantes débiles (Chen et al. 2010). Por el contrario, Clorpirifus no se absorbe bien a través de la piel, pero la exposición dérmica puede ser significativa cuando otras vías de exposición son bajas. La inhalación y las vías dérmicas de exposición son importantes en los formuladores y aplicadores de plaguicidas. Los trabajadores que manipulan y apliquen plaguicidas deben someterse a un examen médico anual al comienzo de cada temporada agrícola (Babina, Dollard et al. 2012). La actividad de la colinesterasa sanguínea debe determinarse antes de que comience el trabajo.

La intoxicación por organofosforados (OPP) es un problema importante en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo, con millones de casos y cientos de miles de muertes que ocurren cada año. La mortalidad total oscila entre el 10 y el 20 %, especialmente en las zonas rurales. Por ejemplo, en un estudio reciente de México que examinó una muestra representativa a nivel nacional de 518 suicidios, el 62% de las muertes se debieron a la ingestión de pesticidas y sólo al 27% a métodos físicos. (Rodríguez-Vivas, Alonso-Díaz et al. 2006, Blanco-Muñoz, Morales et al. 2010)

Varios autores se han centrado en la salud de los niños desde el momento de su concepción en asociación con la exposición doméstica y agrícola a los OP durante el embarazo. Encontraron un mayor riesgo de restricción del crecimiento, aborto espontáneo y defectos congénitos que resultaron en la muerte fetal, así como el crecimiento fetal alterado y la longitud de la gestación (Cecchi et al. 2012). Los signos y síntomas característicos de la intoxicación aguda OP generalmente se cree que surgen de la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) y la crisis colinérgica subsiguiente. Debido a esta inhibición enzimática, la acetilcolina del sustrato se está acumulando. La estimulación continua del receptor de acetilcolina explica los signos clínicos y síntomas de la intoxicación por OP. Signos de OP se clasifican en efectos secundarios a los receptores muscarínicos, nicotínicos, y del sistema nervioso central (SNC) siendo sobre-estimulado por la acumulación de acetilcolina en las sinapsis. Debido a la estimulación excesiva de los receptores muscarínicos, dolor abdominal, diarrea, hipersalivación, sudoración, lagrimeo aumento de la secreción bronquial y otros signos y síntomas se parecen. La estimulación de los receptores nicotínicos en las uniones neuromusculares causa espasmos musculares involuntarios y temblores, debilidad y parálisis (Bayrami, Hashemi et al. 2012).

El modo de exposición a insecticidas organofosforados incluye los gastrointestinales, inhaladores y dérmicos. Se llevó a cabo una investigación sobre la inhalación y las exposiciones a acetato de los trabajadores de la formulación de pesticidas. Se recogieron y analizaron muestras de sangre venosa en busca de acetilcolinesterasa de eritrocitos y colinesterasa plasmática. La mediana de las concentraciones de acetato ponderadas durante 8 horas osciló entre 0,278 y 2,170 mg. El análisis de los niveles de plaguicidas organofosforados en la sangre permite la medición directa de compuestos primarios en lugar de metabolitos y puede representar con mayor precisión la dosis que alcanza el tejido objetivo (Ding et al. 2012). Aunque la tasa de aclaramiento de la sangre es inicialmente bastante rápida, clorpirifos y diazinon son lipofílicos por lo que la porción de compuesto que divide en grasa corporal puede eliminarse más lentamente.

Además, los tensioactivos conforman con mucho el grupo más grande de adyuvantes en aerosol. En aplicaciones agrícolas, los tensioactivos no iónicos (sin carga eléctrica neta) (NIS) constituyen la mayoría de los productos, aunque varias formulaciones utilizan tensioactivos aniónicos para ayudar a la dispersión de formulaciones en forma seca (Basalious, El-Sebaie et al. 2011). El equilibrio hidrófilo-lipofílico (HLB) de un tensioactivo es una medida de la contribución relativa del componente hidrófilo y lipofílico. Puede tener una clara influencia en el rendimiento de los adyuvantes con diferentes pesticidas (Zheng, Zhao et al. 2011). Tanto el tipo como el tamaño de las porciones hidrófilas y lipofílicas de un surfactante pueden influir en la propagación de gotas, el rebote de gotas, la evaporación y la absorción de pesticidas (Seebunrueng, Santaladchaiyakit et al. 2012).

Este tensioactivo puede aumentar el efecto adverso del organofosforado. Se llegó a la conclusión de que la prueba combinada foto-RBC puede considerarse como la mejor segunda prueba *in vitro*, que puede utilizarse de manera ventajosa para obtener información mecanicista, en particular sobre los efectos fotodinámicos sobre proteínas celulares (Hartung et al. 2010).

XI. CONCLUSIONES

1. Los organofosforados formulados con excipientes tensoactivos Clorpirifos, Malatión, Metamidofos y Metil Paratión fueron clasificados como irritantes en el ensayo de RBC por lo que pueden causar hemólisis en animales.
2. El Acefate no causa hemólisis en eritrocitos y su clasificación como no irritante se correlaciona de forma moderada con su clasificación de ligeramente irritante empleando el ensayo *in vivo* de Draize.
3. Los Organofosforados evaluados fueron clasificados como no fototóxicos a pesar de aplicar altos niveles de radiaciones UV.
4. El ensayo *in vitro* RBC permite evaluar el efecto irritante y fototóxico de formulados con excipientes tensoactivos sin el

empleo de animales de laboratorio contribuyendo al bienestar animal

> Curr Top Med Chem. 2020;20(9):738-745. doi: 10.2174/1568026620666200226104029.

Evaluating Hemolytic and Photo Hemolytic Potential of Organophosphorus by In Vitro Method as an Alternative Tool Using Human Erythrocytes

Ana L G Soria ¹, Fabiola R Ramirez ², Alberto B Pliego ¹, Héctor R D Guadarrama ¹, Guadalupe P M Farrera ³, Gilberto Y Angel ³, Juan C V Chagoyán ¹, Raafat M M Gomaa ⁴, Esvieta Tenorio-Borroto ¹

Affiliations + expand

PMID: 32101124 DOI: 10.2174/1568026620666200226104029

Abstract

ACTIONS

- [Cite](#)
- [Favorites](#)

SHARE




PAGE NAVIGATION

< Title & authors

[Feedback](#)

NEW IN 2020 CORONAVIRUSES JOIN EDITORIAL BOARD



Purchase PDF

Research Article

Evaluating Hemolytic and Photo Hemolytic Potential of Organophosphorus by In Vitro Method as an Alternative Tool Using Human Erythrocytes

Author(s): Ana L.G. Soria, Fabiola R. Ramirez, Alberto B. Pliego, Héctor R.D. Guadarrama, Guadalupe P.M. Farrera, Gilberto Y. Angel, Juan C.V. Chagoyán, Raafat M.M. Gomaa, Esvieta Tenorio-Borroto*

Journal Name: Current Topics in Medicinal Chemistry

Volume 20, Issue 9, 2020 **DOI:** 10.2174/1568026620666200226104029

[Journal Home](#)

Become An **Editorial Board Member** [Register Here](#)

Become a **Reviewer** [Register Here](#)

WEBINAR FOR AUTHORS

HOW TO WRITE AND PUBLISH YOUR PAPERS IN HIGH IMPACT JOURNALS

TUESDAY 3 NOVEMBER AT 15.00 MOSCOW TIME [13.00 UK TIME]

REGISTER HERE

BENTHAM SCIENCE

DIFFUSION EDITING



Current Topics in Medicinal Chemistry

ISSN (Print): 1568-0266
ISSN (Online): 1873-4294

Volume 20, 32 Issues, 2020

[Download PDF Flyer](#)

[Open Access Funding](#)

[Promote Your Article](#)

[Table of Contents Alerts](#)

Current Topics in Medicinal Chemistry

[Aims & Scope](#) [Abstracted/Indexed in](#)

Ranking and Category:

- 18th of 59 in Chemistry, Medicinal

[Submit Abstracts / Manuscripts Online](#) [Animated Abstract Submission](#)

EDITOR-IN-CHIEF



Allen B. Reitz
Fox Chase Chemical Diversity Center, Inc.
Doylestown, PA
(USA)

[View Full Editorial Board](#)

[Personal Subscription](#)

IMPACT FACTOR
Current: 3.218
5 - Year: 3.335

[Journal Home](#)

[Editorial Policies](#)

[Publishing Ethics](#)

[Self Archiving Policies](#)

[Reviewer Guidelines](#)

[Instructions for Authors](#)

[Free Copies Online](#)

[Open Access Articles](#)

[Most Cited Articles](#)

[Advertise With Us](#)

[Most Accessed Articles](#)

[Highlighted Article](#)

[Trial Requests](#)

[Library Recommendation](#)

[Most Popular Articles](#)

[Thematic Issues](#)

[Special Issue Submission](#)

[Subscribe](#)

WEBINAR FOR AUTHORS

HOW TO WRITE AND PUBLISH YOUR PAPERS IN HIGH IMPACT JOURNALS

TUESDAY 3 NOVEMBER AT 15.00 MOSCOW TIME (13.00 UK TIME)

REGISTER HERE



BENTHAM SCIENCE

DIFFUSION EDITING

XII. LITERATURA CITADA

- Abdollahi, M. and S. Karami-Mohajeri (2012). "A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning." Toxicol Appl Pharmacol **258**(3): 309-314.
- Additives, J. F. W. E. C. o. F. (2006). "Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Sixty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives." World Health Organ Tech Rep Ser(939): 1-80, backcover.
- Adler, S., D. Basketter, S. Creton, O. Pelkonen, J. van Benthem, V. Zuang, K. E. Andersen, A. Angers-Loustau, A. Aptula, A. Bal-Price, E. Benfenati, U. Bernauer, J. Bessems, F. Y. Bois, A. Boobis, E. Brandon, S. Bremer, T. Broschard, S. Casati, S. Coecke, R. Corvi, M. Cronin, G. Daston, W. Dekant, S. Felter, E. Grignard, U. Gundert-Remy, T. Heinonen, I. Kimber, J. Kleinjans, H. Komulainen, R. Kreiling, J. Kreysa, S. B. Leite, G. Loizou, G. Maxwell, P. Mazzatorta, S. Munn, S. Pfuhler, P. Phrakonkham, A. Piersma, A. Poth, P. Prieto, G. Repetto, V. Rogiers, G. Schoeters, M. Schwarz, R. Serafimova, H. Tähti, E. Testai, J. van Delft, H. van Loveren, M. Vincken, A. Worth and J. M. Zaldivar (2011). "Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010." Arch Toxicol **85**(5): 367-485.

Al-Bader, D., M. Eliyas, R. Rayan and S. Radwan (2012). "Air-dust-borne associations of phototrophic and hydrocarbon-utilizing microorganisms: promising consortia in volatile hydrocarbon bioremediation." Environ Sci Pollut Res Int **19**(9): 3997-4005.

Al-Zubaidy, M. H., Y. J. Mousa, M. M. Hasan and F. K. Mohammad (2011). "Acute toxicity of veterinary and agricultural formulations of organophosphates dichlorvos and diazinon in chicks." Arh Hig Rada Toksikol **62**(4): 317-323.

Alves, E. N., R. e. F. Presgrave, O. A. Presgrave, F. P. Sabagh, J. C. de Freitas and A. P. Corrado (2008). "A reassessment of the in vitro RBC haemolysis assay with defibrinated sheep blood for the determination of the ocular irritation potential of cosmetic products: comparison with the in vivo Draize rabbit test." Altern Lab Anim **36**(3): 275-284.

Alépée, N., C. Tornier, C. Robert, C. Amsellem, M. H. Roux, O. Doucet, J. Pachot, M. Méloni and A. de Brugerolle de Fraissinette (2010). "A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test." Toxicol In Vitro **24**(1): 257-266.

Andrisano, V., R. Ballardini, P. Hrelia, N. Cameli, A. Tosti, R. Gotti and V. Cavrini (2001). "Studies on the photostability and in vitro phototoxicity of Labetalol." Eur J Pharm Sci **12**(4): 495-504.

Apeti, D. A., G. G. Lauenstein, J. D. Christensen, K. Kimbrough, W. E. Johnson, M. Kennedy and K. G. Grant (2010). "A historical assessment of coastal contamination in Birch Harbor, Maine based on the analysis of mussels collected in the 1940s and the Mussel Watch Program." Mar Pollut Bull **60**(5): 732-742.

Aras, M., C. Schmitt, M. Glaizal, M. Kervégant, L. Tichadou and L. de Haro (2013). "Accidental occupational exposure to phytosanitary products: experience of the Poison Control Center in Marseille from 2008 to 2010." J Agromedicine **18**(2): 117-121.

Arias-Almeida, J. C. and R. Rico-Martínez (2011). "Toxicity of cadmium, lead, mercury and methyl parathion on *Euchlanis dilatata* Ehrenberg 1832 (Rotifera: Monogononta)." Bull Environ Contam Toxicol **87**(2): 138-142.

Arufe, M. I., J. M. Arellano, G. Albendín and C. Sarasquete (2010). "Toxicity of parathion on embryo and yolk-sac larvae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): effects on survival, cholinesterase, and carboxylesterase activity." Environ Toxicol **25**(6): 601-607.

Azazh, A. (2011). "Severe organophosphate poisoning with delayed cholinergic crisis, intermediate syndrome and organophosphate induced delayed polyneuropathy on succession." Ethiop J Health Sci **21**(3): 203-208.

Babakov, V. N., N. V. Goncharov, A. S. Radilov, E. P. Glashkina, E. P. Podol'skaia, E. E. Ermolaeva, V. V. Shilov, D. S. Prokof'eva, N. G. Voitenko and N. A. Egorov (2009). "[New approaches to early diagnosis of chronic organophosphorus chemicals intoxication in workers at chemical weapons extermination objects]." Med Tr Prom Ekol(4): 23-26.

Babina, K., M. Dollard, L. Pilotto and J. W. Edwards (2012). "Environmental exposure to organophosphorus and pyrethroid pesticides in South Australian preschool children: a cross sectional study." Environ Int **48**: 109-120.

Bagley, D. M., J. R. Gardner, G. Holland, R. W. Lewis, H. Vrijhof and A. P. Walker (1999). "Eye irritation: updated reference chemicals data bank." Toxicol In Vitro **13**(3): 505-510.

Bajgar, J. (2004). "Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment." Adv Clin Chem **38**: 151-216.

Basalious, E. B., W. El-Sebaie and O. El-Gazayerly (2011). "Application of pharmaceutical QbD for enhancement of the solubility and dissolution of a class II BCS drug using polymeric surfactants and crystallization inhibitors: development of controlled-release tablets." AAPS PharmSciTech **12**(3): 799-810.

Bayir, A., H. Kara, O. Köylü, R. Kocabas and A. Ak (2013). "The effects of ubiquinone (CoQ10) on heart tissue in cardiac toxicity related to organophosphate poisoning." Hum Exp Toxicol **32**(1): 45-52.

Bayrami, M., T. Hashemi, A. A. Malekirad, H. Ashayeri, F. Faraji and M. Abdollahi (2012). "Electroencephalogram, cognitive state, psychological disorders, clinical symptom, and oxidative stress in horticulture farmers exposed to organophosphate pesticides." Toxicol Ind Health **28**(1): 90-96.

Belanger, S. E., J. M. Rawlings and G. J. Carr (2013). "Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals." Environ Toxicol Chem **32**(8): 1768-1783.

Belsey, N. A., S. F. Cordery, A. L. Bunge and R. H. Guy (2011). "Assessment of dermal exposure to pesticide residues during re-entry." Environ Sci Technol **45**(10): 4609-4615.

Benavides, T., M. Mitjans, V. Martínez, P. Clapés, M. R. Infante, R. H. Clothier and M. P. Vinardell (2004). "Assessment of primary eye and skin irritants by in vitro cytotoxicity and phototoxicity models: an in vitro approach of new arginine-based surfactant-induced irritation." Toxicology **197**(3): 229-237.

Bhagav, P., H. Upadhyay and S. Chandran (2011). "Brimonidine tartrate-eudragit long-acting nanoparticles: formulation, optimization, in vitro and in vivo evaluation." AAPS PharmSciTech **12**(4): 1087-1101.

Birnbaum, L. S. (2013). "15 years out: reinventing ICCVAM." Environ Health Perspect **121**(2): a40.

Blakely, K. M., A. M. Drucker and C. F. Rosen (2019). "Drug-Induced Photosensitivity-An Update: Culprit Drugs, Prevention and Management." Drug Saf **42**(7): 827-847.

Blanco-Muñoz, J., M. M. Morales, M. Lacasaña, C. Aguilar-Garduño, S. Bassol and M. E. Cebrián (2010). "Exposure to organophosphate pesticides and male hormone profile in floriculturist of the state of Morelos, Mexico." Hum Reprod **25**(7): 1787-1795.

Boess, F., G. Scholz and H. Spielman (2003). "[INVITOX 2002: 12th International workshop on in vitro toxicology]." ALTEX **20**(1): 36-39.

Bolton-Warberg, M., L. D. Coen and J. E. Weinstein (2007). "Acute toxicity and acetylcholinesterase inhibition in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to the organophosphate dichlorvos: laboratory and field studies." Arch Environ Contam Toxicol **52**(2): 207-216.

Brantner, A. H., F. Quehenberger, A. Chakraborty, J. Polligger, S. Sosa and R. Della Loggia (2002). "HET-CAM bioassay as in vitro alternative to the croton oil test for investigating steroidal and non-steroidal compounds." ALTEX **19**(2): 51-56.

Brantom, P. G., L. H. Bruner, M. Chamberlain, O. De Silva, J. Dupuis, L. K. Earl, D. P. Lovell, W. J. Pape, M. Uttley, D. M. Bagley, F. W. Baker, M. Bracher, P. Courtellemont, L. Declercq, S. Freeman, W. Steiling, A. P. Walker, G. J. Carr, N. Dami, G. Thomas, J. Harbell, P. A. Jones, U. Pfannenbecker, J. A. Southee, M. Tcheng, H. Argembeaux, D. Castelli, R. Clothier, D. J. Esdaile, H. Itigaki, K. Jung, Y. Kasai, H. Kojima, U. Kristen, M. Larnicol, R. W. Lewis, K. Marenus, O. Moreno, A. Peterson, E. S. Rasmussen, C. Robles and M. Stern (1997). "A summary report of the COLIPA international validation study on alternatives to the draize rabbit eye irritation test." Toxicol In Vitro **11**(1-2): 141-179.

Buchheit, K. H. (2001). "[Development of alternative methods by the EDQM and the Biological Standardization Program]." ALTEX **18**(1): 19-22.

Budai, P., J. Lehel, J. Tavaszi and E. Kormos (2010). "HET-CAM test for determining the possible eye irritancy of pesticides." Acta Vet Hung **58**(3): 369-377.

Bullock, J. D., R. E. Warwar and W. R. Green (1998). "Ocular explosion during cataract surgery: a clinical, histopathological, experimental, and biophysical study." Trans Am Ophthalmol Soc **96**: 243-276; discussion 276-281.

Canudas, N., D. Zamora, J. E. Villamizar, J. Fuentes, C. Castelli and A. Taddei (2005). "Photosensitizing properties of 6-methoxy-2-naphthylacetic acid, the major metabolite of the phototoxic non-steroidal anti-inflammatory and analgesic drug nabumetone." Pharmazie **60**(8): 604-608.

Casas, E., E. Bonilla, Y. Ducolomb and M. Betancourt (2010). "Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro." Toxicol In Vitro **24**(1): 224-230.

Cecchi, A., M. G. Rovedatti, G. Sabino and G. G. Magnarelli (2012). "Environmental exposure to organophosphate pesticides: assessment of endocrine disruption and hepatotoxicity in pregnant women." Ecotoxicol Environ Saf **80**: 280-287.

Ceridono, M., P. Tellner, D. Bauer, J. Barroso, N. Alépée, R. Corvi, A. De Smedt, M. D. Fellows, N. K. Gibbs, E. Heisler, A. Jacobs, D. Jirova, D. Jones, H. Kandárová, P. Kasper, J. K. Akunda, C. Krul, D. Learn, M. Liebsch, A. M. Lynch, W. Muster, K. Nakamura, J. F. Nash, U. Pfannenbecker, G. Phillips, C. Robles, V. Rogiers, F. Van De Water, U. W. Liminga, H. W. Vohr, O. Wattrelos, J. Woods, V. Zuang, J. Kreysa and P. Wilcox (2012). "The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: practical experience and implications for phototoxicity testing--the report of an ECVAM-EFPIA workshop." Regul Toxicol Pharmacol **63**(3): 480-488.

Chabrier-Roselló, Y., T. H. Foster, N. Pérez-Nazario, S. Mitra and C. G. Haidaris (2005). "Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity." Antimicrob Agents Chemother **49**(10): 4288-4295.

Chambers, J. and S. F. Oppenheimer (2004). "Organophosphates, serine esterase inhibition, and modeling of organophosphate toxicity." Toxicol Sci **77**(2): 185-187.

Chan, J. Y., S. H. Chan, K. Y. Dai, H. L. Cheng, J. L. Chou and A. Y. Chang (2006). "Cholinergic-receptor-independent dysfunction of mitochondrial respiratory chain enzymes, reduced mitochondrial transmembrane potential and ATP depletion underlie necrotic cell death induced by the organophosphate poison mevinphos." Neuropharmacology **51**(7-8): 1109-1119.

Chen, D., C. Chen and D. Du (2010). "Detection of organophosphate pesticide using polyaniline and carbon nanotubes composite based on acetylcholinesterase inhibition." J Nanosci Nanotechnol **10**(9): 5662-5666.

Cho, S. A., S. An, E. Lee, K. Shin, J. C. Cho and T. R. Lee (2012). "A new cell-based method for assessing the eye irritation potential of chemicals: an alternative to the Draize test." Toxicol Lett **212**(2): 198-204.

Clothier, R. H. (2007). "Phototoxicity and acute toxicity studies conducted by the FRAME Alternatives Laboratory: a brief review." Altern Lab Anim **35**(5): 515-519.

Cocker, J., H. J. Mason, S. J. Garfitt and K. Jones (2002). "Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides." Toxicol Lett **134**(1-3): 97-103.

Colla, T. S., R. Andreazza, F. Bücke, M. M. de Souza, L. Tramontini, G. R. Prado, A. P. Frazzon, F. A. Camargo and F. M. Bento (2013). "Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy." Environ Sci Pollut Res Int.

Combes, R. D. (2002). "The ECVAM workshops: a critical assessment of their impact on the development, validation and acceptance of alternative methods." Altern Lab Anim **30 Suppl 2**: 151-165.

Cortés-Eslava, J., S. Gómez-Arroyo, F. Arenas-Huertero, S. Flores-Maya, M. E. Díaz-Hernández, M. E. Calderón-Segura, R. Valencia-Quintana, J. J. Espinosa-Aguirre and R. Villalobos-Pietrini (2013). "The role of plant metabolism in the mutagenic and cytotoxic effects of four organophosphorus insecticides in *Salmonella typhimurium* and in human cell lines." Chemosphere **92**(9): 1117-1125.

Courtellemont, P., M. Pannetier, J. P. Biesse, M. Larnicol, J. P. Baret and B. Breda (1999). "Evaluation of the EYTEX(TM) system in the COLIPA eye irritation program." Toxicol In Vitro **13**(2): 295-304.

Couso-Ferrer, F., R. Arouri, B. Beroiz, N. Perera, A. Cervera, V. Navarro-Llopis, P. Castañera, P. Hernández-Crespo and F. Ortegoa (2011). "Cross-resistance to insecticides in a malathion-resistant strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)." J Econ Entomol **104**(4): 1349-1356.

Daneshian, M., M. A. Akbarsha, B. Blaauboer, F. Caloni, P. Cosson, R. Curren, A. Goldberg, F. Gruber, F. Ohl, W. Pfaller, J. van der Valk, P. Vinardell, J. Zurlo, T. Hartung and M. Leist (2011). "A framework program for the teaching of alternative methods (replacement, reduction, refinement) to animal experimentation." ALTEX **28**(4): 341-352.

Delgado, M., I. Catalán, J. Masclans and A. Mas (2010). "[Simultaneous cholinergic and intermediate syndromes in organophosphate poisoning]." Med Intensiva **34**(8): 573.

Dholakiya, S. L. and F. A. Barile (2013). "Alternative methods for ocular toxicology testing: validation, applications and troubleshooting." Expert Opin Drug Metab Toxicol **9**(6): 699-712.

Ding, G., S. Han, P. Wang, Y. Gao, R. Shi, G. Wang and Y. Tian (2012). "Increased levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine are attributable to organophosphate pesticide exposure among young children." Environ Pollut **167**: 110-114.

Djabari, Z., E. Bauza, C. Dal Farra and N. Domloge (2002). "The HET-CAM test combined with histological studies for better evaluation of active ingredient innocuity." Int J Tissue React **24**(4): 117-121.

Donahue, D. A., J. Avalos, L. E. Kaufman, F. A. Simion and D. R. Cerven (2011). "Ocular irritation reversibility assessment for personal care products using a porcine corneal culture assay." Toxicol In Vitro **25**(3): 708-714.

Eddleston, M., S. Adhikari, S. Egodage, H. Ranganath, F. Mohamed, G. Manuweera, S. Azher, S. Jayamanne, E. Juzczak, M. R. Sheriff, A. H. Dawson and N. A. Buckley (2012). "Effects of a provincial ban of two toxic organophosphorus insecticides on pesticide poisoning hospital admissions." Clin Toxicol (Phila) **50**(3): 202-209.

Eddleston, M., J. M. Street, I. Self, A. Thompson, T. King, N. Williams, G. Naredo, K. Dissanayake, L. M. Yu, F. Worek, H. John, S. Smith, H. Thiermann, J. B. Harris and R. Eddie Clutton (2012). "A role for solvents in the toxicity of agricultural organophosphorus pesticides." Toxicology **294**(2-3): 94-103.

Edwards, F. L., C. G. Yedjou and P. B. Tchounwou (2013). "Involvement of oxidative stress in methyl parathion and parathion-induced toxicity and genotoxicity to human liver carcinoma (HepG₂) cells." Environ Toxicol **28**(6): 342-348.

Ehrich, M., R. Van Tassell, Y. Li, Z. Zhou and C. L. Kepley (2011). "Fullerene antioxidants decrease organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition in vitro." Toxicol In Vitro **25**(1): 301-307.

Eisenkraft, A., A. Falk and A. Finkelstein (2013). "The role of glutamate and the immune system in organophosphate-induced CNS damage." Neurotox Res **24**(2): 265-279.

Ema, M., A. Matsuda, N. Kobayashi, M. Naya and J. Nakanishi (2013). "Dermal and ocular irritation and skin sensitization studies of fullerene C60 nanoparticles." Cutan Ocul Toxicol **32**(2): 128-134.

Epstein, T. M., U. Samanta, S. D. Kirby, D. M. Cerasoli and B. J. Bahnson (2009). "Crystal structures of brain group-VIII phospholipase A2 in nonaged complexes with the organophosphorus nerve agents soman and sarin." Biochemistry **48**(15): 3425-3435.

Eyer, P. (2003). "The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning." Toxicol Rev **22**(3): 165-190.

Fang, Y., X. L. Zhao, Y. S. Wei, Y. Yang, Y. Shen and J. X. Zheng (2010). "[Comparison of bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soil by composting in the spring and winter]." Huan Jing Ke Xue **31**(6): 1688-1696.

Featherstone, J. D., G. K. Stookey, M. A. Kaminski and R. V. Faller (2011). "Recommendation for a non-animal alternative to rat caries testing." Am J Dent **24**(5): 289-294.

Fentem, J. H. and P. A. Botham (2004). "Update on the validation and regulatory acceptance of alternative tests for skin corrosion and irritation." Altern Lab Anim **32 Suppl 1B**: 683-688.

Fjellner, B. (1983). "Photosensitivity induced by piroxicam." Acta Derm Venereol **63**(6): 557-558.

Fowler, P. T., G. F. Doncel, P. M. Bummer and G. A. Digenis (2003). "Coprecipitation of nonoxynol-9 with polyvinylpyrrolidone to decrease vaginal irritation potential while maintaining spermicidal potency." AAPS PharmSciTech **4**(3): E30.

Foëx, B. A. (2007). "The ethics of animal experimentation." Emerg Med J **24**(11): 750-751.

Frascardi, D., G. Bucchi, F. Doria, A. Rosato, N. Tavanaie, R. Salviulo, R. Ciavarelli, D. Pinelli, S. Fraraccio, G. Zanaroli and F. Fava (2013). "Development of an attached-growth process for the on-site bioremediation of an aquifer polluted by chlorinated solvents." Biodegradation.

Gebremichael, S., T. Birhanu and D. A. Tessema (2013). "Analysis of organochlorine pesticide residues in human and cow's milk in the towns of Asendabo, Serbo and Jimma in South-Western Ethiopia." Chemosphere **90**(5): 1652-1657.

Gerner, I. and E. Schlede (2002). "Introduction of in vitro data into local irritation/corrosion testing strategies by means of SAR considerations: assessment of chemicals." Toxicol Lett **127**(1-3): 169-175.

Glynn, P. (2006). "A mechanism for organophosphate-induced delayed neuropathy." Toxicol Lett **162**(1): 94-97.

Goffi, J. Y. (2013). "[The ethics of animal experimentation]." J Int Bioethique **24**(1): 39-54, 88-39.

Gresham, C., C. Rosenbaum, R. J. Gaspari, C. J. Jackson and S. B. Bird (2010). "Kinetics and efficacy of an organophosphorus hydrolase in a rodent model of methyl-parathion poisoning." Acad Emerg Med **17**(7): 736-740.

Harber, L. C., R. B. Armstrong and H. Ichikawa (1982). "Current status of predictive animal models for drug photoallergy and their correlation with drug photoallergy in humans." J Natl Cancer Inst **69**(1): 237-244.

Harkness, M. and A. Fisher (2013). "Use of emulsified vegetable oil to support bioremediation of TCE DNAPL in soil columns." J Contam Hydrol **151**: 16-33.

Hartung, T. (2010). "Comparative analysis of the revised Directive 2010/63/EU for the protection of laboratory animals with its predecessor 86/609/EEC - a t4 report." ALTEX **27**(4): 285-303.

Hartung, T., B. J. Blaauboer, S. Bosgra, E. Carney, J. Coenen, R. B. Conolly, E. Corsini, S. Green, E. M. Faustman, A. Gaspari, M. Hayashi, A. Wallace Hayes, J. G. Hengstler, L. E. Knudsen, T. B. Knudsen, J. M. McKim, W. Pfaller and E. L. Roggen (2011). "An expert consortium review of the EC-commissioned report "alternative (Non-Animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects - 2010"." ALTEX **28**(3): 183-209.

Hartung, T., L. Bruner, R. Curren, C. Eskes, A. Goldberg, P. McNamee, L. Scott and V. Zung (2010). "First alternative method validated by a retrospective weight-of-evidence approach to replace the Draize eye test for the identification of non-irritant substances for a defined applicability domain." ALTEX **27**(1): 43-51.

Haseman, J. K., D. G. Allen, E. A. Lipscomb, J. F. Truax and W. S. Stokes (2011). "Using fewer animals to identify chemical eye hazards: revised criteria necessary to maintain equivalent hazard classification." Regul Toxicol Pharmacol **61**(1): 98-104.

Hayashi, K., T. Mori, T. Abo, M. Koike, Y. Takahashi, H. Sakaguchi and N. Nishiyama (2012). "A tiered approach combining the short time exposure (STE) test and the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay for predicting eye irritation potential of chemicals." J Toxicol Sci **37**(2): 269-280.

Hore, P., M. Robson, N. Freeman, J. Zhang, D. Wartenberg, H. Ozkaynak, N. Tulve, L. Sheldon, L. Needham, D. Barr and P. J. Liroy (2005). "Chlorpyrifos accumulation patterns for child-accessible surfaces and objects and urinary metabolite excretion by children for 2 weeks after crack-and-crevice application." Environ Health Perspect **113**(2): 211-219.

Horner, J. and F. D. Minifie (2011). "Research ethics I: Responsible conduct of research (RCR)--historical and contemporary issues pertaining to human and animal experimentation." J Speech Lang Hear Res **54**(1): S303-329.

Hu, W., B. Huang, Y. Zhao, W. Sun and Z. Gu (2013). "Distribution, sources and potential risk of HCH and DDT in soils from a typical alluvial plain of the Yangtze River Delta region, China." Environ Geochem Health.

Ibrahim, M. B. and H. A. Gamila (2004). "Algal bioassay for evaluating the role of algae in bioremediation of crude oil: II. Freshwater phytoplankton assemblages." Bull Environ Contam Toxicol **73**(6): 971-978.

Jafarzadeh, M., Z. N. Nasrabadi, A. Sheikhzadi, A. Abbaspour, S. Vasigh, V. Yousefinejad and S. M. Marashi (2013). "Is there a role for progesterone in the management of acute organophosphate poisoning during pregnancy?" Med Hypotheses **80**(6): 804-805.

Jayawardane, P., N. Senanayake, N. A. Buckley and A. H. Dawson (2012). "Electrophysiological correlates of respiratory failure in acute organophosphate poisoning: evidence for differential roles of muscarinic and nicotinic stimulation." Clin Toxicol (Phila) **50**(4): 250-253.

Jayawardane, P., N. Senanayake and A. Dawson (2009). "Electrophysiological correlates of intermediate syndrome following acute organophosphate poisoning." Clin Toxicol (Phila) **47**(3): 193-205.

Joshi, P., P. Manoria, D. Joseph and Z. Gandhi (2013). "Acute myocardial infarction: can it be a complication of acute organophosphorus compound poisoning?" J Postgrad Med **59**(2): 142-144.

Juhler, R. K. (1997). "Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices." J Chromatogr A **786**(1): 145-153.

Juillet, Y., E. Gibert, A. Bégos and B. Bellier (2005). "Investigation of compound-independent calibration and partial molecular formula determination by gas chromatography-atomic-emission detection for characterisation of organophosphorus and organosulfur agents related to the chemical weapons convention." Anal Bioanal Chem **383**(5): 848-856.

Jung, F., J. Goers, T. Roch, A. Zaupa, B. F. Pierce, A. T. Neffe and A. Lendlein (2012). "Physically crosslinked gelatins functionalized with tyrosine moieties do not induce angiogenesis or thrombus formation in the developing vasculature in the avian chorioallantoic membrane." Clin Hemorheol Microcirc **50**(1-2): 55-63.

Kaluzhny, Y., H. Kandárová, P. Hayden, J. Kubilus, L. d'Argembeau-Thornton and M. Klausner (2011). "Development of the EpiOcular(TM) eye irritation test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals in response to the requirements of the EU cosmetics directive and REACH legislation." Altern Lab Anim **39**(4): 339-364.

Kandárová, H. and S. Letašiová (2011). "Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods." Interdiscip Toxicol **4**(3): 107-113.

Karami-Mohajeri, S., M. Hadian, S. Fouladdel, E. Azizi, M. Ghahramani, R. Hosseini and M. Abdollahi (2013). "Mechanisms of muscular electrophysiological and mitochondrial dysfunction following exposure to malathion, an organophosphorus pesticide." Hum Exp Toxicol.

Kasagami, T., T. Miyamoto and I. Yamamoto (2002). "Activated transformations of organophosphorus insecticides in the case of non-AChE inhibitory oxons." Pest Manag Sci **58**(11): 1107-1117.

Khattak, S. U., I. Ahmad, K. Usmanghani and M. S. Qazi (2012). "In vitro evaluation of betamethasone esters for phototoxic potential." Drug Chem Toxicol **35**(1): 43-47.

Kim, J. S., K. S. Song, J. H. Sung, H. R. Ryu, B. G. Choi, H. S. Cho, J. K. Lee and I. J. Yu (2013). "Genotoxicity, acute oral and dermal toxicity, eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitisation evaluation of silver nanoparticles." Nanotoxicology **7**(5): 953-960.

Kinsner-Ovaskainen, A., Z. Akkan, S. Casati, S. Coecke, R. Corvi, G. Dal Negro, J. De Bruijn, O. De Silva, L. Gribaldo, C. Griesinger, J. Jaworska, J. Kreysa, G. Maxwell, P. McNamee, A. Price, P. Prieto, R. Schubert, L. Tosti, A. Worth and V. Zuang (2009). "Overcoming barriers to validation of non-animal partial replacement methods/Integrated Testing Strategies: the report of an EPAA-ECVAM workshop." Altern Lab Anim **37**(4): 437-444.

Kinsner-Ovaskainen, A., G. Maxwell, J. Kreysa, J. Barroso, E. Adriaens, N. Alépée, N. Berg, S. Bremer, S. Coecke, J. Z. Comenges, R. Corvi, S. Casati, G. Dal Negro, M. Marrec-Fairley, C. Griesinger, M. Halder, E. Heisler, D. Hirman, A. Kleinsang, A. Kopp-Schneider, S. Lapenna, S. Munn, P. Prieto, L. Schechtman, T. Schultz, J. M. Vidal, A. Worth and V. Zuang (2012). "Report of the EPAA-ECVAM workshop on the validation of Integrated Testing Strategies (ITS)." Altern Lab Anim **40**(3): 175-181.

Kishore, A. S., P. A. Surekha, P. V. Sekhar, A. Srinivas and P. B. Murthy (2008). "Hen egg chorioallantoic membrane bioassay: an in vitro alternative to draize eye irritation test for pesticide screening." Int J Toxicol **27**(6): 449-453.

Kleinman, M. H., M. D. Smith, E. Kurali, S. Kleinpeter, K. Jiang, Y. Zhang, S. A. Kennedy-Gabb, A. M. Lynch and C. D. Geddes (2010). "An evaluation of chemical photoreactivity and the relationship to phototoxicity." Regul Toxicol Pharmacol **58**(2): 224-232.

Koffi, A. A., L. P. Ahoua Alou, M. A. Adja, F. Chandre and C. Penetier (2013). "Insecticide resistance status of *Anopheles gambiae* s.s population from M'Bé: a WHOPES-labelled experimental hut station, 10 years after the political crisis in Côte d'Ivoire." Malar J **12**: 151.

Kolman, A. (2004). "INVITOX 2004: 13th Workshop of the European Society of Toxicology In Vitro, organised in cooperation with the Scandinavian Society for Cell Toxicology." Altern Lab Anim **32**(6): 625-629.

Koskela, H., M. Ervasti, H. Björk and P. Vanninen (2009). "On-flow pulsed field gradient heteronuclear correlation spectrometry in off-line LC-SPE-NMR analysis of chemicals related to the chemical weapons convention." Anal Chem **81**(3): 1262-1269.

Koskela, H., N. Grigoriu and P. Vanninen (2006). "Screening and identification of organophosphorus compounds related to the chemical weapons convention with 1D and 2D NMR spectroscopy." Anal Chem **78**(11): 3715-3722.

Kumar, S., S. Devi, P. Misra and Priyanka (2009). "Solar and artificial ultraviolet-B induced erythrocytes hemolysis with photosensitizers." Indian J Exp Biol **47**(11): 906-910.

Kundu, C. R., S. Roychoudhury and M. Capcarova (2011). "Malathion-induced sublethal toxicity on the intestine of cricket frog (*Fejervarya limnocharis*)." J Environ Sci Health B **46**(8): 691-696.

Küçükkilinç, T., R. Cochran, J. Kalisiak, E. Garcia, A. Valle, G. Amitai, Z. Radić and P. Taylor (2010). "Investigating the structural influence of surface mutations on acetylcholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and oxime reactivation." Chem Biol Interact **187**(1-3): 238-240.

Ladizinski, B. and D. J. Elpern (2013). "Dronaderone-induced phototoxicity." J Drugs Dermatol **12**(8): 946-947.

Lagarto, A., R. Vega, Y. Vega, I. Guerra and R. González (2006). "Comparative study of red blood cell method in rat and calves blood as alternatives of Draize eye irritation test." Toxicol In Vitro **20**(4): 529-533.

Lajmanovich, R. C., A. M. Attademo, P. M. Peltzer, C. M. Junges and M. C. Cabagna (2011). "Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (anura: bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors." Arch Environ Contam Toxicol **60**(4): 681-689.

Lankerani, L. and E. D. Baron (2004). "Photosensitivity to exogenous agents." J Cutan Med Surg **8**(6): 424-431.

Lavado, R. and D. Schlenk (2011). "Microsomal biotransformation of chlorpyrifos, parathion and fenthion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): mechanistic insights into interspecific differences in toxicity." Aquat Toxicol **101**(1): 57-63.

LeDoux, M. (2011). "Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades." J Chromatogr A **1218**(8): 1021-1036.

Lilienblum, W. (2008). "[Alternative methods to animal experiments. What can they afford in the safety testing of chemical substances under REACH?]." Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz **51**(12): 1434-1443.

Ljunggren, B. and L. E. Wirestrand (1989). "Dynamics of systemic quinidine photoallergy in the mouse." Photodermatol **6**(4): 166-170.

Lu, X. T., Y. Ma, C. Wang, X. F. Zhang, d. Q. Jin and C. J. Huang (2012). "Cytotoxicity and DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12 cells and protection by vitamin E." J Environ Sci Health B **47**(5): 445-454.

Lynch, A. M. and P. Wilcox (2011). "Review of the performance of the 3T3 NRU in vitro phototoxicity assay in the pharmaceutical industry." Exp Toxicol Pathol **63**(3): 209-214.

Macci, C., S. Doni, E. Peruzzi, B. Ceccanti and G. Masciandaro (2012). "Bioremediation of polluted soil through the combined application of plants, earthworms and organic matter." J Environ Monit **14**(10): 2710-2717.

Mahmood, T. and N. Akhtar (2013). "Short term study of human skin irritation by single application closed patch test: assessment of four multiple emulsion formulations loaded with botanical extracts." Cutan Ocul Toxicol **32**(1): 35-40.

Maibach, H. I. (1986). "Irritation, sensitization, photoirritation and photosensitization assays with a glyphosate herbicide." Contact Dermatitis **15**(3): 152-156.

Maibach, H. I. and F. N. Marzulli (1986). "Photoirritation (phototoxicity) from topical agents." Dermatol Clin **4**(2): 217-222.

Maloney, K. M., J. Ancca-Juarez, R. Salazar, K. Borrini-Mayori, M. Niemierko, J. O. Yukich, C. Naquira, J. A. Keating and M. Z. Levy (2013). "Comparison of insecticidal paint and deltamethrin against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) feeding and mortality in simulated natural conditions." J Vector Ecol **38**(1): 6-11.

Mancebo, A., O. Hernández, Y. González, L. Aldana and O. Carballo (2008). "Assessment of skin and eye irritation of 14 products under the stepwise approach of the OECD." Cutan Ocul Toxicol **27**(3): 173-185.

Mangas, I., E. Vilanova and J. Estévez (2012). "NTE and non-NTE esterases in brain membrane: kinetic characterization with organophosphates." Toxicology **297**(1-3): 17-25.

Marquardt, C., E. Matuschek, E. Bölke, P. A. Gerber, M. Peiper, J. V Seydlitz-Kurzbach, B. A. Bühren, M. van Griensven, W. Budach, M. Hassan, G. Kukova, R. Mota, D. Höfer, K. Orth and W. Fleischmann (2010). "Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HETCAM)." Eur J Med Res **15**(5): 204-209.

Martinez, V., E. Corsini, M. Mitjans, A. Pinazo and M. P. Vinardell (2006). "Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different in vitro endpoints as alternatives to the in vivo assays." Toxicol Lett **164**(3): 259-267.

Mayer, B. P., C. A. Valdez, S. Hok, S. C. Chinn and B. R. Hart (2012). "31P-edited diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy for the spectral isolation and identification of organophosphorus compounds related to chemical weapons agents and their degradation products." Anal Chem **84**(23): 10478-10484.

Mehling, A., M. Kleber and H. Hensen (2007). "Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants." Food Chem Toxicol **45**(5): 747-758.

Mehlman, M. A., E. A. Pfitzer and R. A. Scala (1989). "A report on methods to reduce, refine and replace animal testing in industrial toxicology laboratories." Cell Biol Toxicol **5**(3): 349-358.

Meier, U. C. (2004). "Application of nonselective 1D (1)H-(31)P inverse NMR spectroscopy to the screening of solutions for the presence of organophosphorus compounds related to the chemical weapons convention." Anal Chem **76**(2): 392-398.

Melstrom, P. C. and P. L. Williams (2007). "Measuring Movement to Determine Physiological Roles of Acetylcholinesterase Classes in *Caenorhabditis elegans*." J Nematol **39**(4): 317-320.

Melucci, D., S. Fedi, M. Locatelli, C. Locatelli, S. Montalbani and M. Cappelletti (2013). "Application of pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry and multivariate analysis to study bacteria and fungi in biofilms used for bioremediation." Curr Drug Targets **14**(9): 1023-1033.

Mishra, K., R. C. Sharma and S. Kumar (2013). "Contamination profile of DDT and HCH in surface sediments and their spatial distribution from North-East India." Ecotoxicol Environ Saf **95**: 113-122.

Musa, K. A. and L. A. Eriksson (2007). "Theoretical study of ibuprofen phototoxicity." J Phys Chem B **111**(46): 13345-13352.

Musa, K. A. and L. A. Eriksson (2008). "Theoretical study of the phototoxicity of naproxen and the active form of nabumetone." J Phys Chem A **112**(43): 10921-10930.

Nam, C., S. An, E. Lee, S. Moon, J. Kang and I. Chang (2004). "An in vitro phototoxicity assay battery (photohaemolysis and 3T3 NRU PT test) to assess phototoxic potential of fragrances." Altern Lab Anim **32 Suppl 1B**: 693-697.

Nafecz-Jawecki, G., A. Hajnas and J. Sawicki (2008). "Photodegradation and phototoxicity of thioridazine and chlorpromazine evaluated with chemical analysis and aquatic organisms." Ecotoxicology **17**(1): 13-20.

Nishio, D., D. Nakashima, T. Mori, K. Kabashima and Y. Tokura (2009). "Induction of eosinophil-infiltrating drug photoallergy in mice." J Dermatol Sci **55**(1): 34-39.

Nurulain, S. M., P. Szegi, K. Tekes and S. N. Naqvi (2013). "Antioxidants in organophosphorus compounds poisoning." Arh Hig Rada Toksikol **64**(1): 169-177.

Ohno, Y. (2004). "The validation and regulatory acceptance of alternative methods in Japan." Altern Lab Anim **32 Suppl 1B**: 643-655.

Ohno, Y., T. Kaneko, T. Inoue, Y. Morikawa, T. Yoshida, A. Fujii, M. Masuda, T. Ohno, M. Hayashi, J. Momma, T. Uchiyama, K. Chiba, N. Ikeda, Y. Imanishi, H. Itakagaki, H. Kakishima, Y. Kasai, A. Kurishita, H. Kojima, K. Matsukawa, T. Nakamura, K. Ohkoshi, H. Okumura, K. Saijo, K. Sakamoto, T. Suzuki, K. Takano, H. Tatsumi, N. Tani, M. Usami and R. Watanabe (1999). "Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests." Toxicol In Vitro **13**(1): 73-98.

Okumura, Y., H. Yamauchi, S. Takayama, H. Kato and M. Kokubu (2005). "Phototoxicity study of a ketoprofen poultice in guinea pigs." J Toxicol Sci **30**(1): 19-28.

Olivry, T., K. E. Linder, J. S. Paps, P. Bizikova, S. Dunston, N. Donne and L. Mondoulet (2012). "Validation of a novel epicutaneous delivery system for patch testing of house dust mite-hypersensitive dogs." Vet Dermatol **23**(6): 525-e106.

Ortonne, J. P., C. Queille-Roussel and L. Duteil (2006). "3% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid (Solaraze) does not induce photosensitivity or phototoxicity alone or in combination with sunscreens." Eur J Dermatol **16**(4): 385-390.

Page, S. and G. Godlovitch (2007). "Tremayne-Lloyd T, Srebrolow G. Research ethics approval for human and animal experimentation: consequences of failing to obtain approval--including legal and professional liability JCCA 2007; 51(1):56-60." J Can Chiropr Assoc **51**(3): 186; author reply 186-187.

Pape, W. J. and U. Hoppe (1990). "Standardization of an in vitro red blood cell test for evaluating the acute cytotoxic potential of tensides." Arzneimittelforschung **40**(4): 498-502.

Pape, W. J. and U. Hoppe (1991). "In vitro methods for the assessment of primary local effects of topically applied preparations." Skin Pharmacol **4**(3): 205-212.

Pape, W. J., T. Maurer, U. Pfannenbecker and W. Steiling (2001). "The red blood cell phototoxicity test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA validation programme on phototoxicity (phase II)." Altern Lab Anim **29**(2): 145-162.

Pape, W. J., U. Pfannenbecker, H. Argembeaux, M. Bracher, D. J. Esdaile, S. Hagino, Y. Kasai and R. W. Lewis (1999). "COLIPA validation project on in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients and finished products (phase I): the red blood cell test for the estimation of acute eye irritation potentials. Present status." Toxicol In Vitro **13**(2): 343-354.

Pape, W. J., U. Pfannenbecker and U. Hoppe (1987). "Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants." Mol Toxicol **1**(4): 525-536.

Parascandola, J. (1991). "The development of the Draize test for eye toxicity." Pharm Hist **33**(3): 111-117.

Park, Y. H., S. H. Jeong, S. M. Yi, B. H. Choi, Y. R. Kim, I. K. Kim, M. K. Kim and S. W. Son (2011). "Analysis for the potential of polystyrene and TiO₂ nanoparticles to induce skin irritation, phototoxicity, and sensitization." Toxicol In Vitro **25**(8): 1863-1869.

Penny, C., S. Vuilleumier and F. Bringel (2010). "Microbial degradation of tetrachloromethane: mechanisms and perspectives for bioremediation." FEMS Microbiol Ecol **74**(2): 257-275.

Pohanka, M., J. Z. Karasova, K. Kuca, J. Pikula, O. Holas, J. Korabecny and J. Cabal (2010). "Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and VX." Talanta **81**(1-2): 621-624.

Pope, C., S. Karanth and J. Liu (2005). "Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action." Environ Toxicol Pharmacol **19**(3): 433-446.

Prashanthi, N., K. Narayana, A. Nayanatara, H. H. Chandra Kumar, K. L. Bairy and U. J. D'Souza (2006). "The reproductive toxicity of the organophosphate pesticide O, O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate (methyl parathion) in the male rat." Folia Morphol (Warsz) **65**(4): 309-321.

Preté, P. S., C. C. Domingues, N. C. Meirelles, S. V. Malheiros, F. M. Goñi, E. de Paula and S. Schreier (2011). "Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction--a spin label study." Biochim Biophys Acta **1808**(1): 164-170.

Prinsen, M. K. (1996). "The chicken enucleated eye test (CEET): a practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials." Food Chem Toxicol **34**(3): 291-296.

Puget, A. (2004). "[Local ethics committees for animal experimentation]." Therapie **59**(1): 57-59.

Queiroz, O. C., A. T. Adesogan, K. G. Arriola and M. F. Queiroz (2012). "Effect of a dual-purpose inoculant on the quality and nutrient losses from corn silage produced in farm-scale silos." J Dairy Sci **95**(6): 3354-3362.

Racke, K. D. (1993). "Environmental fate of chlorpyrifos." Rev Environ Contam Toxicol **131**: 1-150.

Rastogi, S. K., P. V. Satyanarayan, D. Ravishankar and S. Tripathi (2009). "A study on oxidative stress and antioxidant status of agricultural workers exposed to organophosphorus insecticides during spraying." Indian J Occup Environ Med **13**(3): 131-134.

Raynes, J. K., F. G. Pearce, S. J. Meade and J. A. Gerrard (2011). "Immobilization of organophosphate hydrolase on an amyloid fibril nanoscaffold: towards bioremediation and chemical detoxification." Biotechnol Prog **27**(2): 360-367.

Reiner, E. (2001). "Organophosphorus compounds and esterases: current research topics concerning the toxicity of and protection against organophosphates." Arh Hig Rada Toksikol **52**(3): 323-331.

Richardson, D. D. and J. A. Caruso (2007). "Derivatization of organophosphorus nerve agent degradation products for gas chromatography with ICPMS and TOF-MS detection." Anal Bioanal Chem **388**(4): 809-823.

Rivadeneira, P. R., M. Agrelo, S. Otero and G. Kristoff (2013). "Different effects of subchronic exposure to low concentrations of the organophosphate insecticide chlorpyrifos in a freshwater gastropod." Ecotoxicol Environ Saf **90**: 82-88.

Rodríguez-Vivas, R. I., M. A. Alonso-Díaz, F. Rodríguez-Arevalo, H. Fragosó-Sánchez, V. M. Santamaria and R. Rosario-Cruz (2006). "Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico." Vet Parasitol **136**(3-4): 335-342.

Rogiers, V. (2005). "Recent developments in the way forward for alternative methods: formation of national consensus platforms in Europe." Toxicol Appl Pharmacol **207**(2 Suppl): 408-413.

Roldan-Tapia, L., F. A. Nieto-Escamez, E. M. del Aguila, F. Laynez, T. Parron and F. Sanchez-Santed (2006). "Neuropsychological sequelae from acute poisoning and long-term exposure to carbamate and organophosphate pesticides." Neurotoxicol Teratol **28**(6): 694-703.

Ross, S. M., I. C. McManus, V. Harrison and O. Mason (2013). "Neurobehavioral problems following low-level exposure to organophosphate pesticides: a systematic and meta-analytic review." Crit Rev Toxicol **43**(1): 21-44.

Saieva, C., C. Aprea, R. Tumino, G. Masala, S. Salvini, G. Frasca, M. C. Giurandella, I. Zanna, A. Decarli, G. Sciarra and D. Palli (2004). "Twenty-four-hour urinary excretion of ten pesticide metabolites in healthy adults in two different areas of Italy (Florence and Ragusa)." Sci Total Environ **332**(1-3): 71-80.

Sams, C. and H. J. Mason (1999). "Detoxification of organophosphates by A-esterases in human serum." Hum Exp Toxicol **18**(11): 653-658.

Sato, T. and M. Hosokawa (2000). "Organophosphates and their impact on the global environment." Neurotoxicology **21**(1-2): 223-227.

Sayara, T., M. Sarrà and A. Sánchez (2010). "Effects of compost stability and contaminant concentration on the bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting." J Hazard Mater **179**(1-3): 999-1006.

Schaeck, M., W. Van den Broeck, K. Hermans and A. Decostere (2013). "Fish as research tools: alternatives to in vivo experiments." Altern Lab Anim **41**(3): 219-229.

Schrage, A., K. Hempel, M. Schulz, S. N. Kollé, B. van Ravenzwaay and R. Landsiedel (2011). "Refinement and reduction of acute oral toxicity testing: a critical review of the use of cytotoxicity data." Altern Lab Anim **39**(3): 273-295.

Schäfer, M., F. Koppe, B. Stenger, C. Brochhausen, A. Schmidt, D. Steinritz, H. Thiermann, C. J. Kirkpatrick and C. Pohl (2013). "Influence of organophosphate poisoning on human dendritic cells." Chem Biol Interact.

Seebunrueng, K., Y. Santaladchaiyakit and S. Srijaranai (2012). "Study on the effect of chain-length compatibility of mixed anionic-cationic surfactants on the cloud-point extraction of selected organophosphorus pesticides." Anal Bioanal Chem **404**(5): 1539-1548.

Selvaag, E., A. B. Petersen, R. Gniadecki, T. Thorn and H. C. Wulf (2002). "Phototoxicity to diuretics and antidiabetics in the cultured keratinocyte cell line HaCaT: evaluation by clonogenic assay and single cell gel electrophoresis Comet assay." Photodermatol Photoimmunol Photomed **18**(2): 90-95.

Setoguchi, S., N. Nagata-Akaho, S. Goto, H. Yamakawa, D. Watase, K. Terada, M. Koga, K. Matsunaga, Y. Karube and J. Takata (2020). "Evaluation of photostability and phototoxicity of esterified derivatives of ubiquinol-10 and their application as prodrugs of reduced coenzyme Q." Biofactors.

Sharpe, R. (1985). "The Draize test--motivations for change." Food Chem Toxicol **23**(2): 139-143.

Shayeghi, M., M. Khoobdel and H. Vatandoost (2007). "Determination of organophosphorus insecticides (malathion and diazinon) residue in the drinking water." Pak J Biol Sci **10**(17): 2900-2904.

Shih, M. L., J. D. McMonagle, T. W. Dolzine and V. C. Gresham (1994). "Metabolite pharmacokinetics of soman, sarin and GF in rats and biological monitoring of exposure to toxic organophosphorus agents." J Appl Toxicol **14**(3): 195-199.

Singh, M. P., S. K. Vishwakarma and A. K. Srivastava (2013). "Bioremediation of direct blue 14 and extracellular ligninolytic enzyme production by white rot fungi: *Pleurotus* spp." Biomed Res Int **2013**: 180156.

Singh, U. C., A. Akhtar, S. Ahmed, S. K. Gupta and V. K. Shukla (2013). "Development of huge pancreatic pseudocyst following organophosphorus poisoning - a case report and review of literature." Trop Gastroenterol **34**(1): 44-47.

Smith, K., E. Weissberg and T. G. Trivison (2010). "Alternative Methods of Refraction: A Comparison of Three Techniques." Optom Vis Sci.

Soleimani, M., M. Farhoudi and J. H. Christensen (2013). "Chemometric assessment of enhanced bioremediation of oil contaminated soils." J Hazard Mater **254-255**: 372-381.

Southam, A. D., A. Lange, A. Hines, E. M. Hill, Y. Katsu, T. Iguchi, C. R. Tyler and M. R. Viant (2011). "Metabolomics reveals target and off-target toxicities of a model organophosphate pesticide to roach (*Rutilus rutilus*): implications for biomonitoring." Environ Sci Technol **45**(8): 3759-3767.

Spielmann, H. (2001). "[White Paper of the Commission of European Community--strategy for a future chemicals policy]." ALTEX **18**(2): 147-148.

Spielmann, H. (2009). "Collaboration between ZEBET, FRAME, and ECVAM: FRAME's contribution to establishing the Three Rs in Europe." Altern Lab Anim **37 Suppl 2**: 23-27.

Spielmann, H., M. Balls, J. Dupuis, W. J. Pape, G. Pechovitch, O. de Silva, H. G. Holzhütter, R. Clothier, P. Desolle, F. Gerberick, M. Liebsch, W. W. Lovell, T. Maurer, U. Pfannenbecker, J. M. Potthast, M. Csato, D. Sladowski, W. Steiling and P. Brantom (1998). "The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test." Toxicol In Vitro **12**(3): 305-327.

Spielmann, H., S. Kalweit, M. Liebsch, T. Wirnsberger, I. Gerner, E. Bertram-Neis, K. Krauser, R. Kreiling, H. G. Miltenburger, W. Pape and W. Steiling (1993). "Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: Cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals." Toxicol In Vitro **7**(4): 505-510.

Spielmann, H. and M. Liebsch (2002). "Validation successes: chemicals." Altern Lab Anim **30 Suppl 2**: 33-40.

Stenuit, B. A. and S. N. Agathos (2010). "Microbial 2,4,6-trinitrotoluene degradation: could we learn from (bio)chemistry for bioremediation and vice versa?" Appl Microbiol Biotechnol **88**(5): 1043-1064.

Stepić, S., B. K. Hackenberger, M. Velki, D. K. Hackenberger and Z. Lončarić (2013). "Potentiation effect of metolachlor on toxicity of organochlorine and organophosphate insecticides in earthworm *Eisenia andrei*." Bull Environ Contam Toxicol **91**(1): 55-61.

Stokes, W., G. Srinivas, R. McFarland, J. Kulpa-Eddy, W. Casey, A. Walker, H. Draayer, R. Sebring, K. Brown, E. Balks, C. Stirling, E. Klaasen, R. Hill, B. Rippke, K. Ruby, D. Alt, S. Mukhopadhyay, H. Kojima, N. Johnson, L. Rinckel, V. Doelling and B. Jones (2013). "Report on the international

workshop on alternative methods for *Leptospira* vaccine potency testing: State of the science and the way forward." Biologicals **41**(5): 279-294.

Stokes, W. S., J. Kulpa-Eddy, K. Brown, G. Srinivas and R. McFarland (2012). "Recent progress and future directions for reduction, refinement, and replacement of animal use in veterinary vaccine potency and safety testing: a report from the 2010 NICEATM-ICCVAM International Vaccine Workshop." Dev Biol (Basel) **134**: 9-21.

Stum, M., E. Girard, M. Bangratz, V. Bernard, M. Herbin, A. Vignaud, A. Ferry, C. S. Davoine, A. Echaniz-Laguna, F. René, C. Marcel, J. Molgó, B. Fontaine, E. Krejci and S. Nicole (2008). "Evidence of a dosage effect and a physiological endplate acetylcholinesterase deficiency in the first mouse models mimicking Schwartz-Jampel syndrome neuromyotonia." Hum Mol Genet **17**(20): 3166-3179.

Stępniewska, Z. and A. Kuźniar (2013). "Endophytic microorganisms-promising applications in bioremediation of greenhouse gases." Appl Microbiol Biotechnol.

Su, M., M. Zhao, Y. Luo, X. Lin, L. Xu, H. He, H. Xu and X. Tang (2011). "Evaluation of the efficacy, toxicity and safety of vinorelbine incorporated in a lipid emulsion." Int J Pharm **411**(1-2): 188-196.

Torres-Altora, M. I., B. N. Mathur, J. M. Drerup, R. Thomas, D. M. Lovinger, J. P. O'Callaghan and J. A. Bibb (2011). "Organophosphates dysregulate dopamine signaling, glutamatergic neurotransmission, and induce neuronal injury markers in striatum." J Neurochem **119**(2): 303-313.

Tremayne-Lloyd, T. and G. Srebralow (2007). "Research ethics approval for human and animal experimentation: consequences of failing to obtain approval--including legal and professional liability." J Can Chiropr Assoc **51**(1): 56-60.

Vargas, F., C. Rivas, Y. Díaz and A. Fuentes (2003). "Photodegradation pathways and the in vitro phototoxicity of pyrazinamide, a phototoxic antitubercular drug." J Photochem Photobiol B **72**(1-3): 87-94.

Vargas, F., C. Rivas, H. Méndez, A. Fuentes, G. Fraile and M. Velásquez (2000). "Photochemistry and phototoxicity studies of flutamide, a phototoxic anti-cancer drug." J Photochem Photobiol B **58**(2-3): 108-114.

Vargas, F., C. Rivas, T. Zoltan, A. Fuentes, L. Padrón, Y. Díaz and C. Izzo (2007). "Photodegradation and in vitro phototoxicity of aceclofenac." Pharmazie **62**(5): 337-341.

Venkateswara Rao, J., P. Kavitha, N. M. Jakka, V. Sridhar and P. K. Usman (2007). "Toxicity of organophosphates on morphology and locomotor behavior in brine shrimp, *Artemia salina*." Arch Environ Contam Toxicol **53**(2): 227-232.

Verstraelen, S., A. Jacobs, B. De Wever and P. Vanparys (2013). "Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test." Toxicol In Vitro **27**(4): 1298-1311.

Vinardell, M. P. and M. Mitjans (2008). "Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview." J Pharm Sci **97**(1): 46-59.

Walz, D. (1985). "Irritant action due to physico-chemical parameters of test solutions." Food Chem Toxicol **23**(2): 299-302.

Wang, C. C., S. Wang, Q. Xia, W. He, J. J. Yin, P. P. Fu and J. H. Li (2013). "Phototoxicity of zinc oxide nanoparticles in HaCaT keratinocytes-generation of oxidative DNA damage during UVA and visible light irradiation." J Nanosci Nanotechnol **13**(6): 3880-3888.

Watson, D. B., W. M. Wu, T. Mehlhorn, G. Tang, J. Earles, K. Lowe, T. M. Gihring, G. Zhang, J. Phillips, M. I. Boyanov, B. P. Spalding, C. Schadt, K. M. Kemner, C. S. Criddle, P. M. Jardine and S. C. Brooks (2013). "In situ bioremediation of uranium with emulsified vegetable oil as the electron donor." Environ Sci Technol **47**(12): 6440-6448.

Wilda, M., M. Lavoria, A. Giráldez, O. L. Franco-Mahecha, F. Mansilla, M. Érguiz, M. E. Iglesias and A. V. Capozzo (2012). "Development and preliminary validation of an antibody filtration-assisted single-dilution chemiluminometric immunoassay for potency testing of *Piscirickettsia salmonis* vaccines." Biologicals **40**(6): 415-420.

Xia, Q., H. M. Chiang, Y. T. Zhou, J. J. Yin, F. Liu, C. Wang, L. Guo and P. P. Fu (2012). "Phototoxicity of kava - formation of reactive oxygen species leading to lipid peroxidation and DNA damage." Am J Chin Med **40**(6): 1271-1288.

Yang, L., Y. Chang and M. Chou (1999). "Feasibility of bioremediation of trichloroethylene contaminated sites by nitrifying bacteria through cometabolism with ammonia." J Hazard Mater **69**(1): 111-126.

Ying, Y., Y. Xingfen, Z. Wengai, C. Jinheng, X. Jinyu, Y. Guangyu, T. Xiaohua, X. Xiaoping, X. Xikun, H. Junming and G. Xiang (2010). "Combined in vitro tests as an alternative to in vivo eye irritation tests." Altern Lab Anim **38**(4): 303-314.

Younes, S. H., S. K. Mohamed and M. R. Albayati (2013). "Studies on Organophosphorus Compounds. Part 1: Synthesis and In Vitro Antimicrobial Activity of Some New Pyrimido[5',4':5,6]pyrano[2,3-d][1,3,2]thiazaphosphinine Compounds." Arch Pharm (Weinheim).

Zhang, J. W., G. C. Lv and Y. Zhao (2010). "The significance of the measurement of serum xanthine oxidase and oxidation markers in patients with acute organophosphorus pesticide poisoning." J Int Med Res **38**(2): 458-465.

Zhang, S. Y., Q. F. Wang, R. Wan and S. G. Xie (2011). "Changes in bacterial community of anthracene bioremediation in municipal solid waste composting soil." J Zhejiang Univ Sci B **12**(9): 760-768.

Zhao, J. and S. Yu (2013). "Quantitative structure-activity relationship of organophosphate compounds based on molecular interaction fields descriptors." Environ Toxicol Pharmacol **35**(2): 228-234.

Zheng, G., Z. Zhao and J. W. Wong (2011). "Role of non-ionic surfactants and plant oils on the solubilization of organochlorine pesticides by oil-in-water microemulsions." Environ Technol **32**(3-4): 269-279.

Zhou, Y., C. Zhan, Y. Li, Q. Zhong, H. Pan and G. Yang (2010). "Intravenous lipid emulsions combine extracorporeal blood purification: a novel therapeutic strategy for severe organophosphate poisoning." Med Hypotheses **74**(2): 309-311.