

Daño genotóxico inducido por extractos de durazno, *Prunus persica* cultivados en Cácosta Norte de Santander.

Genotoxic damage induced by extracts of peach, *Prunus persica* grown in Cácosta Norte de Santander.

Iván Meléndez Gélvez ^a
Alfonso Quijano Parra ^b
Luis Fabián Yáñez ^a

Fecha de Recepción: 15 - dic. - 2015.

Fecha de Aceptación: 22 - may. - 2018.

Resumen

La Producción del durazno en Colombia se concentra en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Norte de Santander, Santander, Antioquia, Caldas y Nariño, el principal productor es Boyacá con 677 ha, especialmente en el municipio de Sotaquirá y en otros municipios como Jenesano, Nuevo Colón, Cómbita y Tuta; el tercer departamento productor es Norte de Santander con 480 Ha, la mayor producción se encuentra en los municipios de Pamplonita y Chitagá. Los pesticidas son considerados como uno de los principales factores de contaminación del medio ambiente; como es conocido son ampliamente utilizados para mejorar la producción de alimentos en la agricultura y para el control de plagas y vectores de enfermedades; muchos han sido clasificados como cancerígenos, porque inducen daño en el material genético. En este trabajo se determinó la genotoxicidad producida por extractos de durazno (*Prunus pérsica* (L.) Batsch) cultivado en Cacota, Norte de Santander. El ensayo cometa fue utilizado para la evaluación de la actividad genotóxica. Los resultados obtenidos indican que los extractos de durazno inducen lesiones en el ADN de linfocitos humanos, que varían de acuerdo a la dosis del extracto. Ya que el durazno es un producto de exportación y de alto consumo en nuestra región, la ingesta de este podría convertirse en un factor de riesgo para la población.

Palabras clave: Durazno, genotoxicidad, ensayo cometa, pesticidas, Cácosta, Norte de Santander, Colombia.

a Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Biología Molecular y Genética.

b Universidad de Pamplona, Colombia, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Química. Grupo de Investigación en Química.

Abstract

Peach Production in Colombia is concentrated in the departments of Boyacá, Cundinamarca, Norte de Santander, Santander, Antioquia, Caldas and Nariño, the main producer is Boyacá with 677 ha, especially in the municipality of Sotaquirá and in other municipalities such as Jenesano, Nuevo Colón, Combita and Tuta; the third production department is Norte de Santander with 480 Ha. Currently the production is concentrated mainly in the municipalities of Chitagá, Pamplonita and Cacota. Pesticides are considered one of the main factors of environmental pollution; As it is known they are widely used to improve the production of food in agriculture and for the control of pests and disease vectors, many have been classified as carcinogenic, because they induce damage to the genetic material. In this work the genotoxicity produced by extracts of peach (*Prunus pérsica* (L.) Batsch) cultivated in Cacota, Norte de Santander was determined. The comet assay was used for the evaluation of genotoxic activity. The results obtained indicate that the peach extracts induce lesions in the DNA of human lymphocytes, which vary according to the dose of the extract. Considering that the peach is an export product and high consumption in our region, the intake of this could become a risk factor for the population.

Keywords: Peach, genotoxicity, comet assay, pesticides, Cúcuta, Norte de Santander, Colombia.

INTRODUCCIÓN

La Producción del durazno en Colombia se concentra en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Norte de Santander, Santander, Antioquia, Caldas y Nariño, el principal productor es Boyacá con 677 ha, especialmente en el municipio de Sotaquirá y en otros municipios como Jenesano, Nuevo Colón, Cúmbita y Tuta; el tercer departamento productor es Norte de Santander con 480 Ha. Actualmente concentrada la producción principalmente en los municipios de Cúcuta, Chitagá y Pamplonita con calidad de exportación. En el campo nacional este fruto es apetecido y altamente consumido en todas las regiones¹. El abuso indiscriminado en la utilización de pesticidas por parte de los agricultores superando las dosis requeridas para el control de plagas ya sea por cultura, para evitar pérdidas en la producción, aumentar la productividad e intentar reducir costos; posiblemente ocasionan que queden residuos en partes de la planta y en el fruto, los cuales llegan de forma directa a los consumidores. Según reportes de los cultivadores de la región, los productos que más usan son: el funlate score, karate, sunfire, vertimek, lannate, fipronil, microthiol, daconil, derosal, forum, manzate, finale, baycor, difenoconazol, opera, tilt, azimut, nilo. (muchos de los cuales se ha demostrado tener efectos adversos en la salud y ocasionar daño genotóxico [2-6]. La exposición a plaguicidas se ha asociado con el cáncer, enfermedades neurológicas degenerativas y respuesta inmune alterada, entre otras [7]. Estudios como

el realizado por [8-9] demuestra que Lambda-Cyhalothrin, componente activo de Karate Zeon (insecticida piretroide), es utilizado altamente en la agricultura y puede causar alteración de la conciencia y convulsiones ya que afecta directamente al sistema nervioso central de los seres humanos. Otros estudios involucran pesticidas como el insecticida y acaricida Lannate, el cual se identifica por contener un potencial de citotoxicidad y genotoxicidad de su componente activo metomilo (S-Metil-N-[(metilcarbamoil)oxi]tioacetamidato) [2]. A sí mismo en estudios realizados por [3-5] nos muestran una considerable genotoxicidad de metomilo en linfocitos humanos, induciendo aberraciones cromosómicas y micronúcleos. Considerando que el durazno es un fruto ampliamente producido y comercializado en el ámbito local, nacional e internacional, se hace necesario realizar estudios que nos indiquen presencia o ausencia de residuos de pesticidas, los cuales pueden llegar a generar un efecto genotóxico y cancerígeno sobre los consumidores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La muestra de durazno fue tomada en un cultivo localizado en el municipio de Cúcuta de Velasco, este municipio está ubicado en la zona suroccidental del Departamento Norte de Santander, siendo su posición geográfica la siguiente: desde 1.148.600 a 1.165.420 longitud oeste y desde

1.287.090 a 1.302.850 latitud norte. Su superficie tiene un área de 139.71 kilómetros cuadrados.

Toma de la muestra

Se realizaron dos (2) muestreos justo en el momento en el que son colectados para ser llevados al mercado. Tomando en total 1 kg de durazno, luego se guardó en cajas o termos de icopor para evitar cualquier tipo de contaminación y posteriormente almacenado a bajas temperaturas hasta el momento de su procesamiento.

Obtención y preparación del extracto

Se maceró 120 g de durazno durante 15 minutos hasta obtener el jugo, luego se adicionó 30 mL de acetona, posteriormente se centrifuga a 3500 rpm durante 20 minutos después de los cuales se retiró y se almaceno el sobrenadante. Este procedimiento se repite 5 veces. Para la concentración del material presente en el extracto, el sobrenadante recolectado se pasó a través de una columna que contenía amberlita XAD-2 (15g) a una velocidad de 15 mL/min; el material retenido por la amberlita fue eluido con 100 mL de diclorometano. Después de obtenido el extracto, se concentró en un evaporador rotatorio de vacío a baja presión (Heidolph modelo Laborota 400-1), hasta la sequedad, seguidamente se cuantificó el extracto seco equivalente a los 120 gramos iniciales. El extracto obtenido se dividió en dos partes, la primera parte para los análisis genotóxicos el cual se diluyó en 3 ml de dimetil sulfóxido al 1% y la parte restante para el análisis cromatográfico.

Extracción de linfocitos: Para los experimentos de genotoxicidad, se usaron linfocitos de sangre periférica, que se extrajeron de una persona joven y sana. Los linfocitos se separaron de la sangre total, usando un gradiente de ficoll-hi-paque. Seguidamente, se determinó la viabilidad, la cual siempre se mantuvo por encima del 90%.

Detección de daño del ADN por el Ensayo Cometa

Se trataron alrededor de 40.000 células o linfocitos con tres dosis (100µg, 200 µg y 300 µg) de extractos de durazno, se incubaron por un periodo de 1 hora a 37°C, las placas se sumergieron 1h en

solución de lisis. Las placas se lavaron con PBS y se colocaron en una unidad de electroforesis horizontal con un buffer pH>13 y se incubó por 30 minutos, luego se corrió a 25V y 300 mA por 30 minutos. Después de la electroforesis, las placas fueron lavadas con un buffer neutralizante por 10, luego se tiñeron con 50 µl de Bromuro de etidio (0.02mg/mL). Las observaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia (Olimpus Cx41) equipado con filtro de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Para estos resultados se hicieron tres experimentos por cada tratamiento y en cada uno se contaron 100 células. Como control negativo se utilizó, el DMSO al 1%, que fue el solvente de las muestras. La ocurrencia de daño en el ADN se determinó mediante el uso del software (Tritek Comet Score™ freeware v1.5) basado en las siguientes mediciones: longitud total del cometa, área del cometa (µm²), diámetro de la cabeza (µm), %DNA en cabeza, longitud de la cola µm, %DNA en cola.

RESULTADOS

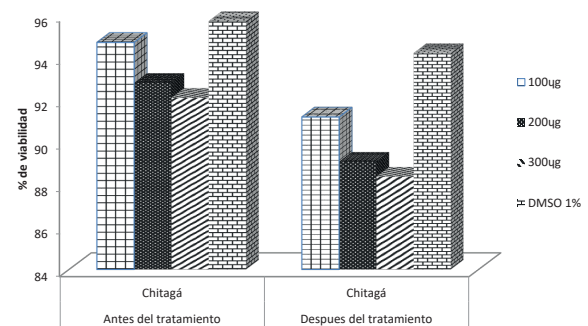


Figura 1. Porcentaje de Viabilidad, antes y después del tratamiento con extractos de durazno en el municipio de Cácosta, Norte de Santander, Colombia.

Se observa (figura 1) el porcentaje de viabilidad de los linfocitos expuestos a las diferentes dosis de los extractos de durazno obtenidos en Cácosta, así mismo, el respectivo control negativo. Los valores representan la media del porcentaje de la viabilidad celular luego de someter a las células a los diferentes extractos; se puede observar (figura 1), que la viabilidad de los linfocitos disminuye gradualmente a medida que aumentan las dosis de los extractos, obteniendo una viabilidad menor en las dosis de 300µg, con porcentaje de 88.4. Cabe resaltar que la viabilidad se mantiene por encima del 80%.

Detección de daño del ADN por el Ensayo Cometa

En la tabla 1 se muestra la detección de Daño del ADN mediante el ensayo cometa evidenciando la genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos

a extracto de durazno. Los resultados indican que existe un efecto genotóxico (longitud del cometa), dependiente de la dosis utilizada, con un $P < 0.05$, según la prueba Tukey. Se observa que a medida que se aumenta la dosis los valores analizados aumentan comparados con el control negativo.

Tabla 1. Daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes dosis de extracto de durazno cultivado en el municipio de Cécota N/S.

	Longitud cometa (μm)	Diámetro cabeza (μm)	%DNA cabeza	Longitud cola (μm)	%DNA cola	Momento de cola	Momento Olive
DMSO 1 %	47.3	42.8	98.3	5.1	2.4	0.1	0.3
H₂O₂ 100 μM	87.7	38.7	95.9	48.3	4.4	1.9	1.2
100 μg	50.3	40.6	97.6	16.7	1.9	0.3	0.3
200 μg	73.9	36.4	94.8	40.0	3.5	1.5	0.8
300 μg	116.7*	34.5	91.8	71.5	5.8	3.8	2.1

*Como control negativo se utilizó DMSO 1%. Como control positivo se utilizó peróxido de hidrógeno H₂O₂ 100 μM control, Diferentes dosis de extracto de durazno 100 μg , 200 μg , 300 μg . * diferencia estadísticamente significativa con $P > 0.05$.*

Como se puede observar en la tabla 1; Las células tratadas con DMSO 1%, muestran un daño espontáneo, de 47.3 μm de longitud, de igual manera las células tratadas con H₂O₂ 100 μM muestran un valor de 87.7 μm , superando casi el doble en longitud al control negativo. Como se puede evidenciar, la longitud del cometa para este municipio mostró un valor de 50.3 μm , para la dosis menor, que al ser comparados con el control negativo no muestra una diferencia estadísticamente significativa $P > 0.05$ (Tabla 1, Figura 2). Si observamos la dosis de 200 μg supera aproximadamente 1 vez la respuesta del control negativo, nos damos cuenta que se genera incremento moderado del daño genético de las células expuestas al extracto. De igual manera la dosis de 300 μg supera 2.5 veces la respuesta del control negativo, indicando que a esta concentración genera un daño estadísticamente significativo > 0.05 . Se evidencia en la tabla 1 y figura 2, que a medida que se incrementa la concentración de extracto, disminuye el diámetro de la cabeza (μm) en

comparación con el control negativo (DMSO 1%, 42.8 μm) en la dosis de 100 μg disminuye su diámetro en un 5.14%, en la dosis de 200 μg en un 19.39% y en la dosis de 300 μg en un 19.39%.

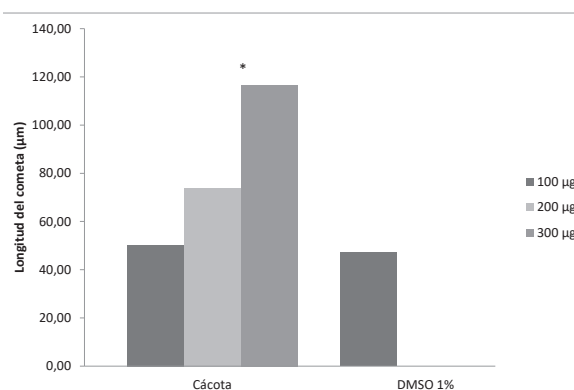


Figura 2. Longitud del cometa inducido por extracto de durazno proveniente del municipio de Cécota. Genotoxicidad inducida por extractos de durazno. *: Diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo, $P < 0.05$.

Tabla 2. Matriz de correlaciones de la longitud del cometa con cada una de las demás variables.

VARIABLE	LONGITUD DEL COMETA	DIÁMETRO DE LA CABEZA	% DE ADN EN CABEZA	LONGITUD DE COLA	% DE ADN EN COLA
LONGITUD DEL COMETA	1,0000	-	-	-	-
DIÁMETRO DE LA CABEZA	-0,8353	1,0000	-	-	-
% DE ADN EN CABEZA	-0,9241	0,9443	1,0000	-	-
LONGITUD DE COLA	0,9930	-0,8664	-0,9398	1,0000	-
% DE ADN EN COLA	0,9771	-0,8198	-0,9252	0,9797	1,0000

Se evidencia una correlación existente entre la longitud del cometa y diámetro de la cabeza de (-0.8353) (Tabla 2), mostrando un comportamiento que es inversamente proporcional; lo que significa que a medida que aumenta la longitud del cometa, el diámetro de la cabeza de estas células disminuye significativamente. Así mismo observamos en la Tabla 2 una correlación existente entre el porcentaje de ADN en cabeza y la longitud del cometa de (-0,9241), también se observa un comportamiento inversamente proporcional. A medida que disminuye el porcentaje de ADN en cabeza, aumenta la longitud del cometa, evidenciando un claro daño de las células tratadas con las diferentes dosis de extractos de durazno. Se muestra correlación entre la longitud del cometa y dos medidas en este caso, la longitud de cola (0,9930) y el porcentaje de ADN en cola (0,9771), la cual es directamente proporcional ya que a medida que aumenta la longitud del cometa, aumenta tanto la longitud de la cola como el porcentaje de ADN den cola (tabla 2). Así mismo se observan que los rangos de porcentaje de ADN en cabeza tiene la misma tendencia a disminuir a medida que se aumenta la concentración de cada dosis de extracto de durazno. En la tabla 1 se evidencia un porcentaje de ADN en cabeza de 97.6%, dosis de 100 µg en la dosis de 200 µg 94.8%, y en la dosis de 300 µg 91.8% estos datos varían inversamente proporcional a la concentración de cada dosis; si las dosis aumentan, disminuye tanto el diámetro de la cabeza como su porcentaje de ADN. Se observa para el control negativo valores en longitud de cola de 5.1 µm., para la dosis de 100ug un aumento en 3.2 veces. la dosis de 200 µg nos muestra un aumento de 7.8 veces; de igual mane-

ra, la dosis de 300 µg nos muestra un aumento de 14 veces en la longitud de cola (Tabla 1).

DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos en cada una de las dosis de extracto de durazno y comparados con el control negativo, se notó una tendencia creciente de daño genotóxico según el aumento de la concentración de las mismas, llevando a un incremento de las lesiones primarias sobre el ADN, lo cual está directamente relacionado con el aumento en las alteraciones genéticas celulares. Resultados similares han sido reportado por [9-10], quienes encontraron que los pesticidas inducen daño oxidativo en el ADN a través de especies reactivas de oxígeno. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) están implicadas en la toxicidad de diversos plaguicidas incluidos los plaguicidas organofosforados. Se sabe que ROS induce varios tipos de lesiones en el ADN incluidas rupturas simples y dobles, sitios lábiles alcalinos y oxidación de purinas y pirimidinas que son detectados fácilmente por el ensayo de cometa [11-12]. En estudios realizados por [6-13], observaron que las dosis en la que se induce mayor frecuencia de células con daño en el ADN, también muestran mayor longitud de migración del ADN. Esto podría indicar que los genotóxicos que producen más daño en el ADN, también afectan más número de células. Otros estudios demuestran que el efecto que produce alteraciones en el material genético es probablemente causado, además, por la presencia de metales, incluyendo el hierro, manganeso, cobre, zinc y arsénico, debido a su alta actividad mutagénica y

genotóxica [14]. Se ha demostrado que los iones metálicos presentes en algunos pesticidas pueden interferir con la reparación del ADN y producir especies reactivas de oxígeno (ROS), que conducen a daño oxidativo [15]. Hay evidencia que demuestra que el exceso de cobre puede inducir estrés oxidativo que puede dar lugar a ataques de radicales libres, vía reacciones Fenton [16]. Aunque el cobre es un metal bioesencial para el funcionamiento normal de las células, también puede catalizar la formación de radicales libres de hidróxilo en las reacciones de Haber-Weiss catalizada por metales Fenton, lo que resulta en daño oxidativo del ADN [17]. Existen evidencias que han sugerido que el arsénico es causante de enfermedades como cáncer de vejiga, pulmón, hígado y piel, así como trastornos del sistema cardiovascular y nervioso [18]. Estudios de [19-20], describen el arsénico como causante de intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y aneuploidías. Además, se ha encontrado que causa la inhibición del crecimiento celular, bloqueo del ciclo celular en la mitosis induciendo apoptosis [21-22].

De acuerdo a los reportes en literatura y a los encontrados en este estudio, podríamos relacionar la genotoxicidad encontrada en este ensayo con la presencia de residuos de pesticidas en el fruto del durazno (datos no mostrados), dado que en análisis preliminares se evidenció la presencia del pesticidas de la familia de los organoclorados como el endosulfán II y el Beta BHC. Estudios realizados por [23] caracterizan a endosulfán como un agente carcinógeno potencial en humanos así como genotóxico en bacterias, células humanas y en células de ratones, además de ser promotor de tumores y agente mutagénico [24]. El lindano (como γ -hexaclorociclohexano BHC), hexaclorociclohexano (grado técnico) y otros isómeros de hexaclorociclohexano son razonablemente sustancias cancerígenas para el ser humano basadas en pruebas suficientes carcinogenicidad de estudios en animales [25]. Exposición oral en roedores causaron tumores en dos sitios de tejido diferentes. Administración en la dieta de lindano, α - o β -hexaclorociclohexano, o mezclas de varios isómeros causó tumores hepáticos y en el sistema linfático en ambos

sexos de varias cepas de ratones [25-26]. Estudios realizados en ratones por [26-27] demuestran que la endrina y el lindano inducen retardo del crecimiento fetal y disminuciones en el timo fetal y pesos placentarios.

Estudios realizados por [28-29], demuestran que el endosulfán induce daños en el ADN y activó la vía de señalización de respuesta al daño del ADN (ATM / Chk2 y ATR / Chk1) y por consiguiente al control del ciclo celular. Además, el endosulfán promovió la apoptosis celular a través de la vía del receptor de muerte (complejo de señalización inductor) resultante del estrés oxidativo.

Un estudio reciente demostró que el endosulfán induce daños en el ADN y perturbaciones en el DDR (una red de vías de transducción de señales que pueden detectar y reparar el daño del ADN para mantener la integridad genómica), promoviendo así la inestabilidad genómica en las enfermedades del sistema reproductivo [30-32]. han demostrado que el endosulfán puede conducir al daño del ADN y a la detención del ciclo celular en las células endoteliales [33]. Sin embargo, si DDR está involucrado en el proceso de acción tóxica en las células endoteliales en su funcionamiento es aún poco conocido. Por lo tanto, se han diseñado diferentes investigaciones para aclarar más el papel del endosulfán en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares.

Podemos concluir que extractos de durazno cultivados en el municipio de Cácuta y que están siendo comercializados en la provincia de pampón, inducen actividad genotóxica en linfocitos humanos, lo cual podría constituir un factor de riesgo para la población expuesta, teniendo en cuenta la relación que existe entre daño genotóxico y aparición de enfermedades tales como el cáncer. También debemos resaltar que se deben plantear alternativas para disminuir el uso indiscriminado de plaguicidas organoclorados ya que son considerados como uno de los principales problemas ambientales y de salud humana en el mundo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Carranza C., Miranda D. Zonificación actual de los sistemas de producción de frutales caducifolios en Colombia. Situación actual, sistemas de cultivo y plan de desarrollo. *Soc. Col. Cienc. Hort.* 2013; 67-86.
- [2] Xiang Guanggang, Li Diqui, Yuan Jianzhong, Guan Jingmin, Zhai Huifeng, Shi Mingan, Tao Liming. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. *Food and Chemical toxicology.* 2013; 53: 352-358.
- [3] Bolognesi C., Peluso M., Degan P., Rabboni R., Munni A., Abbondandolo A. Genotoxic effects of the carbamate insecticide, methomyl. II. In vivo studies with pure compound and the technical formulation, "Lannate 25" *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 1994; 235-242.
- [4] Falck GC, Hirvonen A., Scarpato R., Saarikoski ST, Migliore L, Norppa H. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers *Mutation Research.* 1991; 441: 225-237.
- [5] Sun XY, Jin YT, Wu B, Wang WQ, Pang XL, Wang J. Study on genotoxicity of aldicarb and methomyl. *Huan Jing Ke Xue.* 2010; 31: 2973-2980.
- [6] Pabuena Duban E., Ortiz Isabel C., López Juan, Orozco Luz J., Quijano Parra Alfonso, Pardo Enrique, Meléndez Iván. Actividad genotóxica inducida por extracto de fresa fumigada con pesticidas en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Universidad, Ciencia y Tecnología.* 2015; 19: 76.
- [7] Simoniello, M.F.; Kleinsorge, E.C.; Scagnetti, J.A.; Grigolato, R.A.; Poletta, G.L. y Carballo, M.A., 2008. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *J. Appl. Toxicol.* 28, 8: 957-965.
- [8] Haibing Li, Yuling Li, Jing Cheng. Molecularly Imprinted Silica Nanospheres Embedded CdSe Quantum Dots for Highly Selective and Sensitive Optosensing of Pyrethroids. *Central China Normal University, China.* 2010; 22: 2451-2457.
- [9] Oudou HC, Alonso RM, Bruun Hansen HC. Voltammetric behaviour of the synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin and its determination in soil and well water. *Analytica chemical Acta* 2004; 523: 69-74.
- [10] Idris S, Ambali S., Ayo J. Cytotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin: the ameliorative effects of antioxidants. *Afr J Biotechnol.* 2012; 11 (99): 16461-16467.
- [11] Collins AR, Dobson VL., Dusinska M., Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us. *Mutat.* 1997; 375 : 183-193.
- [12] Meléndez I., Pedro E., Quijano A. Actividad genotóxica de aguas antes y después de clorar en la planta de potabilización Empo-pamplona. *Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.* 2015.13(2):12-23. DNA.
- [13] Meléndez Gélvez I., Martínez Montañez ML, Quijano Parra A. Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP2,5 en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Iatreia.* 2012; 25 (4): 347-356.
- [14] Vargas V., Migliavacca S., Melo A., Horn R. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mut.* 2001; 490: 141-158.
- [15] Bull S., Fletcher K., Boobis AR, Battershill JM, Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis,* 2006; 21 (2): 93-103.

- [16] Bertoncini CR, Meneghini R. DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3'-phosphoglycolate termini *Nucleic Acids*. 1995; 23: 2995–3002.
- [17] Shrivastava R, Upreti RK, Seth PK, Chaturvedi UC. Effects of chromium on the immune system *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2002; 34 (1): 1–7.
- [18] Nesnow S., Roop BC, Lambert G., Kadiiska M., Mason RP, Cullen W.R, Mass MJ. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chemical Research Toxicology*. 2002; 15: 1627–1634.
- [19] Basu A, Ghosh P, Das JK, Banerjee A, Ray K, Giri AK. Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2004; 13: 820–827.
- [20] Mahata J., Basu A., Ghoshal S., Sarkar JN, Roy AK, Poddar G., Nandy AK, Banerjee A., Ray K., Natarajan AT, Nilsson R, Giri AK. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutation Research*. 2003; 534: 133–143.
- [21] Ling YH, Jiang JD, Holland JF, Perez Soler R. Arsenic trioxide polymerization of microtubules and mitotic arrest before apoptosis in human tumor cell lines *Molecular Pharmacology*. 2002; 62: 529–538.
- [22] Nesnow S., Roop BC, Lambert G., Kadiiska M., Mason RP, Cullen WR, Mass MJ. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chemical Research Toxicology*. 2002; 15: 1627–1634.
- [23] Antherieu S., Ledirac N., Luzy AP., Lenormand P., Caron JC, Rahmani R. Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: Partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. *J Cell Physiol*. 2007; 213: 177-86.
- [24] Chaudhuri K, Selvaraj S, Pal AK. Studies on the genotoxicity of endosulfan in bacterial systems.1999. *Mutat Res* 439 (1): 63-7.
- [25] IARC. 1987. Hexachlorocyclohexanes. In Overall Evaluations of Carcinogenicity. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, suppl. 7. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.pp. 220-222.
- [26] Schulte-Hermann R, Parzefall W. 1981. Failure to discriminate initiation from promotion of liver tumors in a long-term study with the phenobarbital-type inducer alpha-hexachlorocyclohexane and the role of sustained stimulation of hepatic growth and monooxygenases. *Cancer Res* 41(10): 4140-4146
- [27] Ecobicon, D.J. Toxic effects of pesticides. In: Klaassen et al. (eds). *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*, 4th ed. New York: Maxwell McMillan Pergamon; 1991:573-580
- [28] 132. Volpe, E., Sambucci, M., Battistini, L., Borsellino, G., 2016. Fas-Fas ligand: checkpoint of T cell functions in multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 7, 382.
- [29] Wei, J., Zhang, L., Ren, L., Zhang, J., Yu, Y., Wang, J., Duan, J., Peng, C., Sun, Z., Zhou, X., 2017. Endosulfan inhibits proliferation through the Notch signaling Path way in human umbilical vein endothelial cells. *Environ. Pollut.* 221, 26–36.

- [30] Chen, Z.Y., Liu, C., Lu, Y.H., Yang, L.L., Li, M., He, M.D., et al., 2016. Cadmium exposure enhances bisphenol A-induced genotoxicity through 8-oxoguanine-DNA glycosylase-1 OGG1 inhibition in NIH3T3 fibroblast cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 39, 961–974.
- [31] Sebastian, R., Raghavan, S.C., 2016. Induction of DNA damage and erroneous repair can explain genomic instability caused by Endosulfan. *Carcinogenesis*
- [32] Palou, R., Palou, G., Quintana, D.G., 2016. A role for the spindle assembly checkpoint in the DNA damage response. *Curr. Genet*
- [33] Wei, J., Zhang, L., Wang, J., Guo, F., Li, Y., Zhou, X., Sun, Z., 2015. Endosulfan inducing blood hypercoagulability and endothelial cells apoptosis via the death receptor pathway in Wistar rats. *Toxicol. Res.* 4, 1282–1288

