



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE LOS INSECTICIDAS  
BULLDOCK 125 SC Y CALYPSO 480 SC EN LINFOCITOS  
PERIFÉRICOS HUMANOS IN VITRO, MEDIANTE EL  
ENSAYO COMETA ALCALINO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

DIANA ELIZABETH FLORES RAMÍREZ



TUTORA  
DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA

MÉXICO, D. F. Agosto 2009.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Para las personas creyentes, Dios esta al principio. Para los científicos está el final de todas sus reflexiones.*

*Max Planck (1858-1947)  
Físico alemán.*

*Agradecidamente a Dios.*

Esta tesis ofrezco a mis padres, que me permitieron tener vida e inteligencia para culminar mis estudios, agradeciendo su apoyo, atenciones y recursos que siempre me concedieron.

Agradezco a la Doctora María Elena Calderón, que con su infinita paciencia, conocimientos e instrucción, pude terminar esta investigación. De igual manera agradezco al Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera, el apoyo para la realización de esta tesis, teniendo como titular a la Doctora Sandra Luz Gómez Arroyo que permitió mis trabajos en el mismo.

Doy gracias a la Maestra en Ciencias Isabel Rodríguez Romero quien al inicio en este laboratorio me ayudó y enseñó las técnicas usadas para esta tesis.

Así recuerdo a Laura, Nalleli, Hugo y Ángel que con su presencia han sido aliento en mi realización. Y no menos importante a mi hermana.

Retribuyo y agradezco al: El Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) 2008 de la DGPA, UNAM, por el apoyo otorgado al proyecto IN213908, igualmente al Sistema Nacional de Becas de La Secretaria de Educación Publica por su apoyo a través del Programa Nacional de Becas a la Excelencia Académica y Aprovechamiento Escolar 2008.

Y hoy estoy segura de agradecer profundamente a la UNAM y a todos los profesores de los que he aprendido, por que me permitieron terminar e iniciar una nueva etapa en mi vida y estudios. Asimismo estoy consiente de la labor y las obligaciones presentes y futuras que tengo con mi vida, con mi país y las retribuciones a mi casa de estudios, las cuales tengo el privilegio de enfrentar.

## ÍNDICE

<i>Resumen</i> .....	1
<i>I. Introducción.</i>	
1.1 Plaguicidas: historia y usos.....	2
1.2. Clasificación de los plaguicidas.....	5
1.3. Efectos tóxicos de los plaguicidas.....	9
<i>II. Antecedentes.</i>	
2.1. Insecticidas neonicotinoides.....	12
2.1.1. Mecanismos de acción.....	16
2.1.2. Efectos tóxicos.....	17
2.2. Calypso 480 SC (tiacloprid).....	18
2.3. Insecticidas piretroides.....	20
2.3.1. Mecanismos de acción.....	22
2.3.2. Efectos tóxicos.....	25
2.4. Bulldock 125 SC ( $\beta$ -ciflutrina).....	26
2.5. Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa alcalino).....	29
<i>III. Justificación</i> .....	32
<i>IV. Objetivos</i> .....	33
<i>V. Hipótesis</i> .....	34
<i>VI. Materiales y métodos.</i>	
6.1. Preparación de la soluciones patrón de los insecticidas.....	35
6.2. Aislamiento de linfocitos.....	35
6.3. Tratamientos directos de los insecticidas Calypso 480 SC y Bulldock 125 SC en los linfocitos de sangre periférica humana y ensayo de viabilidad.....	36
6.4. Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa alcalino.....	36
6.5. Análisis estadístico.....	37
<i>VII. Resultados</i> .....	38
<i>VIII. Discusión</i> .....	40
<i>IX. Conclusión</i> .....	48
<i>X. Referencias</i> .....	49
<i>XI. Tablas y gráficas</i> .....	63

## RESUMEN

En el presente estudio se investigaron los efectos genotóxico y citotóxico de nuevos insecticidas: el neonicotinoide Calypso 480 SC (tiacloprid) y el piretroide Bulldock 125 SC ( $\beta$ -ciflutrina) en linfocitos periféricos humanos *in vitro*, mediante los ensayos de electroforesis unicelular alcalina y de la tinción con el azul tripano, respectivamente. Los resultados de los tratamientos directos con diferentes concentraciones de los dos plaguicidas a las células sanguíneas humanas, muestran que ambos insecticidas son agentes genotóxicos *in vitro*, al aumentar significativamente el promedio de la frecuencia de células con cometa y la longitud de sus caudas con relación al testigo. A concentraciones elevadas los dos insecticidas ocasionan mayor fragmentación del genoma.

El análisis de regresión aplicado a los promedios de la frecuencia de células con daño al ADN y de la longitud de la cauda del cometa en los dos insecticidas, evidencia una relación de concentración-efecto.

Al comparar la acción genotóxica de ambos compuestos se observa que *in vitro* el neonicotinoide Calypso produce mayor fragmentación del genoma humano que el piretroide Bulldock.

En cuanto al efecto citotóxico; la viabilidad de los linfocitos antes y después del tratamiento con las diferentes concentraciones de Calypso no se modifica con relación al valor testigo. Sin embargo, a partir de 75 mg/mL del piretroide Bulldock, la viabilidad disminuye significativamente comparada con el testigo, hasta producir muerte celular por toxicidad .

# I INTRODUCCIÓN

## 1.1 Plaguicidas: historia y usos

Desde la implementación de la agricultura y de las cosechas como medio de supervivencia para el hombre ha surgido la preocupación por aumentar y preservar la calidad de las mismas, en la lucha por conseguirlo se ha llegado al uso inadecuado y excesivo de plaguicidas, fertilizantes y otros productos agrícolas que han generado problemas como infertilidad de suelos, así como deterioro en la calidad de los alimentos y la generación de plagas resistentes, entre otros. A pesar de todos los esfuerzos realizados, las plagas destruyen anualmente cerca del 35 % de las cosechas en todo el mundo e incluso ya almacenadas, así insectos, microorganismos, roedores y aves ocasionan pérdidas adicionales de entre 40 % y 50 %; como una forma de reducir estos efectos se ha implantado el uso de fertilizantes para el mejoramiento de suelos y de cultivos agrícolas e insecticidas para controlar fitoparásitos, erradicar áfidos, pulgones y otros vectores de enfermedades transmisibles (Badii et al. 2006).

Según la FAO, un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades en animales y en el ser humano, los fitopatógenos como hongos, bacterias, micoplasmas y partículas virales causantes de daños o que interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o mercado de los alimentos y otros productos agrícolas, como madera y sus derivados, asimismo la eliminación de ectoparásitos (Barberá 1989a).

Los plaguicidas, son compuestos sintéticos, constituidos de uno o más ingredientes activos y otros componentes químicos con diversas presentaciones como disolventes, emulsificantes y amortiguadores, entre otros (Bolognesi 2003; Tomizawa y Casida 2005).

La historia de los insecticidas se remonta aproximadamente a 2 500 años a. C., cuando los sumerios utilizaban sulfuro debido a sus propiedades de acaricida e insecticida, más tarde en China alrededor de 1 200 años a. C., se usaba la tiza y la madera para el control de insectos en espacios cerrados, así como extractos de plantas para tratar los granos y el sulfato de arsénico para el control de los piojos en los seres humanos (Perry y Yamamoto 1997).

El concepto moderno de plaguicida surge en el siglo XIX, cuando se sintetizaron múltiples sustancias con propiedades tóxicas y de insecticidas tales como sulfuro, arsénicos, flúor, jabón, queroseno y extractos botánicos como nicotina, rotenona, piretro, sabadilla y la quassia (Perry y Yamamoto 1997; Ferrer 2003).

La síntesis de compuestos orgánicos tóxicos por el hombre y su liberación en el ambiente natural, asumió proporciones de mayor significado en el siglo XX, después de la segunda guerra mundial la actividad química industrial era relativamente pequeña y el mayor impacto provenía de los compuestos cíclicos aromáticos. Sin embargo, con el progreso de la industrialización y la aparición de nuevas sustancias para el control de organismos dañinos para el hombre, la emisión de contaminantes se potenció a niveles mayores, haciendo evidentes los efectos nocivos de estos productos al hombre y a los ecosistemas (Perry y Yamamoto 1997).

El empleo del arsenito de cobre como insecticida para combatir escarabajos en Estados Unidos de America en 1900 y su amplia extensión, promovió la realización de la primera legislación sobre la aplicación y el manejo de los plaguicidas. En 1939, se demostró la actividad insecticida del dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), y utilizado desde 1942 y hasta 1972. El hexaclorociclohexano (HCH) fue sintetizado en 1925, empleado como arma en la 1ª Guerra Mundial y usado como insecticida en 1942. 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), debido a su gran efectividad contra las plagas (Ferrer 2003). En 1990, el consumo aproximado de agroquímicos fue del 43 % para herbicidas, 32 % de insecticidas, 19 % de fungicidas y un remanente de 6 % dividido entre reguladores de crecimiento y otros

compuestos. En EUA, aproximadamente 800 millones de libras de plaguicidas se asperjan anualmente en los campos agrícolas, siendo de mayor aplicación los herbicidas, seguidos por los insecticidas y fungicidas (Mense et al. 2006). En la última década se han generado diversos tipos de plaguicidas en el mercado, ocasionando diferentes problemas, los cuales van desde accidentes leves hasta muerte por toxicidad (Mense et al. 2006).

Desde que se inicia el empleo de plaguicidas en 1838 y hasta 1948, alrededor de 38 agentes químicos fueron utilizados y en 1995 su volumen ascendió a 54 000 toneladas (INEGI 1998). Para el año 2006, la producción de plaguicidas fue de 29 922 y de los cuales 14 641 toneladas corresponden a insecticidas (INEGI 2008) y su importación se elevó al 28 %. Según el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), las intoxicaciones agudas por agroquímicos han mostrado una tendencia ascendente, reportándose 3 849 casos en el año 2003, cifra que se incrementó a 3 902 en el 2005 (Hernández y Jiménez 2007). En México el estado con más casos reportados de intoxicación es Nayarit con 227, seguido por el Estado de México con 145, Michoacán con 115, Jalisco con 112, Guerrero con 99 y Morelos con 88 (SS 1993).

En los últimos 20 años la generación de plaguicidas casi se triplica y actualmente es de más de 4 millones de toneladas. Un total de 8 590 ingredientes activos están registrados como plaguicidas en EUA y conforman aproximadamente 20 700 productos de marcas registradas (Bolognesi 2003). En México, durante 1986 se aplicaron 750 g *per capita* de insecticidas (Restrepo 1992) y algunos de ellos están prohibidos en muchos países debido a sus efectos perjudiciales en la salud y en los ecosistemas, no obstante en nuestro país continúa el uso indiscriminado de varios de estos productos. Según la FAO/WHO (2001), alrededor del 30 % de los plaguicidas que se comercializan en los países en desarrollo no cumplen con las normas de calidad internacionales, adicionalmente pueden contener compuestos e impurezas peligrosas restringidas en otros países, por lo que constituyen un factor de riesgo extra para la salud (FAO/WHO 2001; Gómez-Arroyo et al. 2006). Adicionalmente los plaguicidas pueden acumularse en



tejidos de animales (que pueden ser de consumo humano) o en la leche, aumentando el factor de riesgo en el hombre (Waliszewski et al. 2003).

## 1.2 Clasificación de los plaguicidas

### Clasificación por toxicidad y estatus regulatorio

La regulación del empleo de plaguicidas se ha establecido con base en la actividad del ingrediente activo y su toxicidad, de esta forma se ha dividido a los plaguicidas en dos grupos: 1. De aplicación general (GUP, General Use Pesticide), que de acuerdo con la EPA (Environmental Protection Agency, EUA) pueden ser utilizados por el público en general, no es necesario estar certificado y son de uso no restringido; y 2. Los de uso restringido (RUP; Restricted Use Pesticide), estos son de venta y de obtención restringida a aplicadores certificados o personas bajo supervisión directa de expertos (Kamrin 1997).

Las palabras señal o de riesgo (Signal word) están basadas en la clasificación de su toxicidad según la EPA y éstas se incluyen en la legislación para los niveles de precaución hacia el ingrediente activo contenido en los productos (Tabla 1) y en la probable toxicidad aguda en los seres humanos (determinada por ensayos en animales), daño potencial en ojos y piel, además de los efectos ecológicos como impacto en suelo y agua superficial (Kamrin 1997).

## Clasificación por su naturaleza

- *Plaguicidas biológicos*

Son seres vivos o productos derivados de éstos, que han mostrado ser eficaces para combatir organismos nocivos, entre éstos se encuentran especies que se comportan como enemigos naturales o depredadores, insecticidas virales, plaguicidas bacterianos y fúngicos, feromonas, hormonas de crecimiento y de la metamorfosis de insectos (Ferrer 2003).

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas con base en la toxicidad y la señal de precaución (de acuerdo a la EPA)

<i>Clase de toxicidad</i>	<i>Rango de toxicidad</i>	<i>Palabra señal</i>	<i>Características de toxicidad aguda en animales experimentales<sup>a</sup></i>
I	Toxicidad elevada	Peligro de envenenamiento	LD <sub>50</sub> oral: 0-50 mg/kg LD <sub>50</sub> dérmica: 0-200 mg/kg LD <sub>50</sub> inhalación: 0-0.2 mg/L Irritación en piel/ojos: severa
II	Toxicidad moderada	Advertencia	LD <sub>50</sub> oral: >50-500 mg/kg LD <sub>50</sub> dérmica: >200-2000 mg/kg LD <sub>50</sub> inhalación: >0.2-2.0 mg/L Irritación en piel/ojos: moderada
III	Toxicidad leve	Precaución	LD <sub>50</sub> oral: 500-5000mg/kg LD <sub>50</sub> dérmica: >2000-20,000 mg/kg LD <sub>50</sub> inhalación: >2.0-20 mg/L Irritación en piel/ojos: leve
IV	No tóxico	No requiere	LD <sub>50</sub> oral: >5000 mg/kg LD <sub>50</sub> dérmica: >20,000 mg/kg LD <sub>50</sub> inhalación: >20 mg/L Irritación en piel/ojos: ninguna

<sup>a</sup>Con relación a la toxicidad aguda e irritación de piel y ojos (Kamrin 1997)

- *Plaguicidas químicos*

Naturales: Son extractos de plantas de tipo alcaloide (estricnina, nicotina) o no (piretrina, rotenona), aunque su uso ha sido reemplazado por productos químicos sintéticos.

Sintéticos: Son los más utilizados en la actualidad, destacan (Ferrer 2003):

- ♦ *Compuestos inorgánicos y organometálicos*: incluye compuestos de casi todos los metales. Los más importantes debido a su toxicidad son los derivados del As, Ag, Ta, Pb, P y Hg.
- ♦ *Compuestos organoclorados (O-C)*: los representantes fundamentales son: DDT, HCH, aldrín y toxafén, derivados del benceno y el fenol como el HCB, PCP, entre otros.
- ♦ *Compuestos organofosforados (O-P)*: es uno de los grupos más extensos y empleados, los más importantes son el malatión, paratión, diclorvos, diazinón y demetón.
- ♦ *Carbamatos (ditiocarbamatos, tiocarbamatos)*: en general son inhibidores de la enzima acetil colinesterasa; son fungicidas, herbicidas e insecticidas: carbaril, aldicab, molinate, propoxur, etc.
- ♦ *Compuestos nitrofenólicos y nitrocresólicos*: constituyen un grupo de fenoles substituidos, chermox PE, acetato de dinoseb, endoscan. Éstos son usados como herbicidas y muchos de los registros de éstos han sido cancelados por su impacto en la salud humana (Reigart y Roberts 1999).
- ♦ *Piretroides sintéticos*: el grupo se distingue por que causan el síndrome T (tremor) y CS (coreoatetosis/salivación) en animales, algunos ejemplos de estos insecticidas son: aletrina, cipermetrina, permetrina, resmetrina, tetrametrina, ciflutrina.
- ♦ *Neonicotinoideas*: son derivados sintéticos de la nicotina y actúan en el sistema nervioso central de insectos, los principales compuestos son el imidacloprid, acetamipid y tiacoprid.
- ♦ *Derivados bipiridílicos*: son herbicidas orgánicos de contacto; los más aplicados son: paraquat y diquat.
- ♦ *Derivados dicumarínicos*: son de tipo anticoagulante, derivados de la hidroxycumarina y sus análogos, como: difenacoum, warfarina, bromadiolona, con acción raticida.

### Clasificación por su persistencia en el ambiente

Los plaguicidas que permanecen más tiempo en el ambiente tienen mayor probabilidad de interactuar con diversos elementos del suelo, agua y aire. Si la vida media y la persistencia de los plaguicidas es mayor a la frecuencia con la que se aplican, tienden a acumularse tanto en los suelos como en la biota (Kamrin 1997).

Los plaguicidas se clasifican de acuerdo con su periodo de persistencia en el ambiente como: ligeramente persistentes (menos de cuatro semanas), poco persistentes (de cuatro a 26 semanas), moderadamente persistentes (de 26 a 52 semanas), muy persistentes (más de un año y menos de 20 semanas) y permanentes (más de 20 años) (Kamrin 1997).

### Clasificación química

Esta clasificación se basa con mayor frecuencia en sus propiedades químicas y las plagas que eliminan. En general, se tiende a hacer clasificaciones mixtas por ambos criterios.

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas por uso y grupo químico

<i>INSECTICIDAS</i>	<i>HERBICIDAS</i>
Organofosforados	Bipiridílicos
Organoclorados	Organoclorados
Carbamatos	Tiocarbamatos
Piretroides	Otros
Neonicotinoides	
<i>RATICIDAS</i>	<i>FUNGICIDAS</i>
Dicumarínicos	Organomercuriales

(Ferrer 2003)

### 1.3 Efectos tóxicos de los plaguicidas

Los plaguicidas en sí mismos son tóxicos, pero el riesgo a la salud humana y animal varía dependiendo del compuesto químico. En este rubro se pueden distinguir dos tipos de riesgo:

- 1) Envenenamiento agudo, que generalmente se da en su manejo y aplicación.
- 2) Riesgos crónicos, por exposición a largo plazo en pequeñas cantidades, ya sea por ingestión o contacto.

Los efectos tóxicos de los plaguicidas en el ser humano están dados por diversos factores tales como, tipo de compuesto químico, dosis, tiempo de exposición, ruta de entrada o absorción al cuerpo (Whitaker 2004). Los riesgos a la salud pública de los plaguicidas no dependen solo de sus compuestos activos, sino también de otros factores como el nivel socio-económico de las personas, su estado de salud, entre otros (Whitaker 2004).

Los grupos potencialmente expuestos a los plaguicidas según Mansour (2004) son:

1. Granjeros y/o agricultores.
2. Trabajadores y obreros de fábricas de plaguicidas.
3. Población que habita en áreas de aplicación intensa de agroquímicos o cercanas a su producción.
4. Población expuesta a alimentos contaminados por bioacumulación.

Datos epidemiológicos evidencian una relación entre la exposición de los plaguicidas y diversos efectos tóxicos a la salud como ceguera, enfermedades del hígado y del sistema nervioso central, alergias en niños, así como asma y jadeo (Duramad et al. 2007), inducción de malformaciones congénitas, alteraciones en la estructura del ADN como intercambios de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas, aductos, micronúcleos y mutaciones (Mansour 2004; Karabay y Oguz 2005; Bull et al.

2006). Se ha publicado que la exposición a los herbicidas ácido fenóxi y otros plaguicidas inducen linfoma de no-Hodgkin, sarcomas de tejido blando, cáncer en diversos órganos, leucemias (asociada a inmunosupresión), múltiples mielomas y tumores (Mansour 2004). Algunos son disruptores endócrinos, los cuales están relacionados con desórdenes reproductores e inmunosupresión (Engel et al. 2005). Se ha observado que algunos plaguicidas producen cáncer pulmonar y pancreático, sin embargo, son pocos los reconocidos como carcinogénicos directos por la Agencia para la Investigación sobre Cáncer (IARC), la mayoría se consideran activadores indirectos de cáncer (Caballo et al. 1992; Agarwal et al. 1994; Alavanja et al. 2004; Mansour 2004).

La población que probablemente tiene mayor riesgo a recibir los efectos de los plaguicidas es la ocupacionalmente expuesta. Según estimaciones anuales de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO por su siglas en inglés) a nivel mundial, en la década de los ochenta se presentó un millón de casos graves no intencionales; de éstos el 70 % ocurrió por exposición laboral (Hernández y Jiménez 2007). Se ha documentado que en obreros de fábricas de plaguicidas, los índices de genotoxicidad son más elevados que en poblaciones no expuestas (Bull et al. 2006). Por otro lado, los aplicadores y los floricultores tienen mayor riesgo al daño genético que los granjeros, como consecuencia de las condiciones de trabajo y manejo de los plaguicidas (Sailaja et al. 2006). En Quito, Ecuador, trabajadores de una plantación de flores expuestos a 27 plaguicidas mostraron aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas con respecto a una población testigo (20.59 % y 2.73 % respectivamente), adicionalmente el nivel de acetil colinesterasa de eritrocitos disminuyó a 88 % (Mino et al. 2002).

No solo existen casos de intoxicación por plaguicidas debido a factores ocupacionales o directos; los plaguicidas contaminan tanto los ambientes terrestres como los acuáticos. En los primeros, los suelos y la biota son más afectados cuando se aplican directamente o se precipitan de la atmósfera, como consecuencia de las aspersiones aéreas, o por el uso para riego con aguas contaminadas. Sí la persistencia es mayor a la frecuencia con la que se aplica, el compuesto químico tiende a acumularse tanto

en los suelos como en la biota, lo cual puede generar bioacumulación de agentes tóxicos en la cadena alimenticia incluyendo al ser humano (Badii et al. 2006). Ejemplos sobre la toxicidad de los plaguicidas son los casos de intoxicaciones masivas en Colombia. La primera ocurrió en Chiquinquirá (Boyacá) en 1967 e involucró a más de 500 personas, de los cuales 165 tuvieron tratamiento hospitalario y 63 murieron. En Puerto López (Meta) en 1970, hubo 190 intoxicados, de los cuales 157 requirieron tratamiento médico y 7 murieron. En Pasto (Nariño) en 1977, se detectaron más de 300 intoxicados, con 120 hospitalizados y 15 muertos. En los casos de Chiquinquirá y Pasto, los insecticidas organofosforados metil-paratión y paratión fueron los implicados en las intoxicaciones mientras que en Puerto López, solo se conoce que fue un plaguicida organofosforado. Los tres casos ocurrieron por consumo de alimentos contaminados con plaguicidas (Idrovo 1999).

En Tejupilco, Estado de México, se reportaron intoxicaciones por exposición a organofosforados, observándose que la mayoría de los intoxicados fueron los aplicadores, los cuales no contaban con la capacitación adecuada o no seguían las normas de seguridad (Hernández y Jiménez 2007).

## II ANTECEDENTES

### 2.1 Insecticidas neonicotinoides

Los neonicotinoides son la clase de insecticidas orgánicos sintéticos más importante en las últimas tres décadas, con una aplicación mundial en el 2005 del 17 % del total de insecticidas procesados. Desde su aparición en 1991 en EUA, las ventas han sido estimadas en mil millones de dólares americanos (Matsuda et al. 2001; Tomizawa y Casida 2005). Estos insecticidas fueron sintetizados a partir de nicotinoides sintéticos derivados de la nicotina, que es un alcaloide del tabaco, el cual ha sido usado como insecticida minoritario principalmente en China. Debido a su poca eficacia y selectividad se realizaron intentos de mejorar su actividad, lo que condujo al descubrimiento de los neonicotinoides. El 2-(di bromo-nitrometil)-3-metilpiridina, fue descubierto en 1970 por la Sell Development Company en California, al modificar su estructura molecular optimizaron su acción, culminando con el plaguicida Niatiazin, insecticida de gran efectividad y superior a la del metil paration para el combate de la mosca casera (*Musca domestica*). Sin embargo, su fotoinestabilidad provocó que decayera su comercialización como ingrediente activo de trampas para mosca (Tomizawa y Casida 2003).

Nihon Tokoshu Noyaku Seizo en Japón (Bayer Cropscience Japón), introdujo el grupo cloropiridinilmetileno, después de varios intentos se descubrió el insecticida neonicotinoide imidacloprid por Kabu en 1979 y fue patentado por Bayer Agrochem Japón en 1985 (Tomizawa y Casida 2005), iniciando una nueva era en la producción de insecticidas neonicotinoides.

Éstos insecticidas son utilizados principalmente como compuestos sistémicos para la protección de los cultivos agrícolas, estructuralmente similares a los insecticidas nicotinoides, la diferencia primaria radica en la sustitución de una amina básica ionizable o imina en los nicotinoides, mientras que los neonicotinoides



suelen tener sustituyentes nitrometileno ( $C=CHNO_2$ ), nitroguanidina ( $C=NNO_2$ ) y cianoamidina ( $C=NCN$ ) (Tomizawa y Casida 2005). Con base en estas diferencias los neonicotinoides se han subdividido en varios grupos: (a) Cloropiridinilos o cloronicotinilicos de primera generación, los Clorotiazolicos de segunda generación y los Tetrahidrofuranilos (Fig. 1).

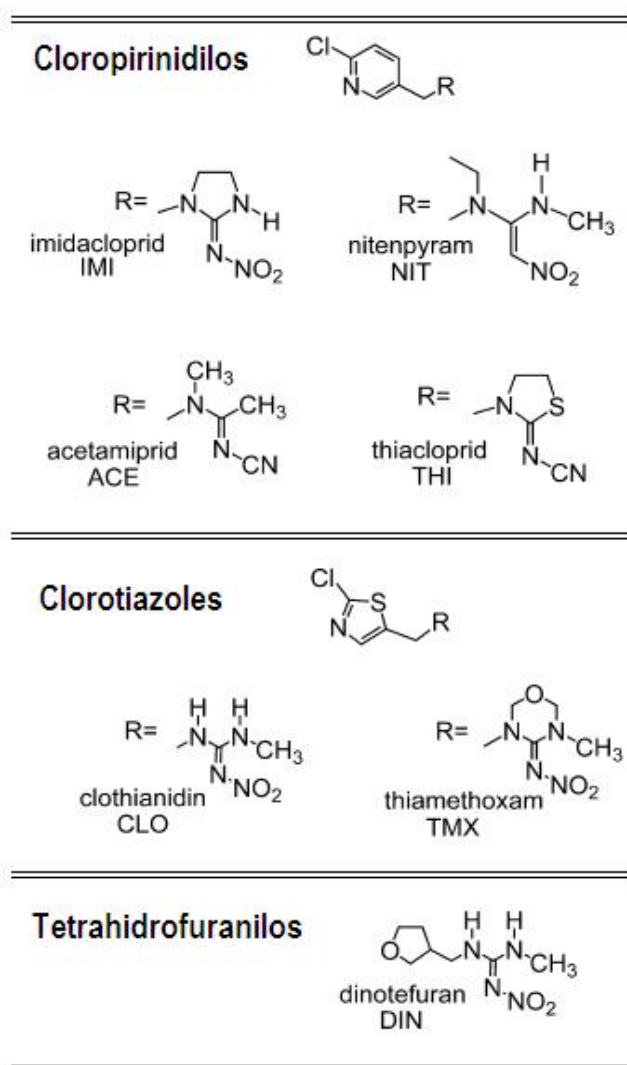


Figura 1. Grupos de insecticidas neonicotinoides: cloronicotinilicos; IMI, THI, NIT, ACE; clorotiazoles como CLO y TMX y tetrahidrofuranilos como el DIN (Ford y Casida 2008).

El grupo de los insecticidas neonicotinoide cloropiridinil o cloronicotinilicos son empleados principalmente para cultivos agrícolas y control de ectoparásitos como ácaros, áfidos, pulgas, piojos de gatos y perros. Este grupo está representado por el imidacloprid, tiacloprid y acetamidaprid, insecticidas que tienen en común el grupo pirinidilmetileno pero difieren por el grupo sustituyente nitroguanidina y cianoamidina en la porción acíclica o cíclica (Fig. 2). Los clorotiazoles, agrupan al clotianidin que es aplicado a semillas para el control del gusano trozador, la gallina ciega y el tiametoxam empleado principalmente en tratamiento foliar y en el suelo para combatir áfidos, mosca blanca, entre otros y los tetrahidrofuranilos como el dinitefuran que es un insecticida de amplio espectro usado en vegetales y en interiores, y el nitempiram es aplicado para eliminar pulgas en perros y gatos (Ford y Casida 2008).

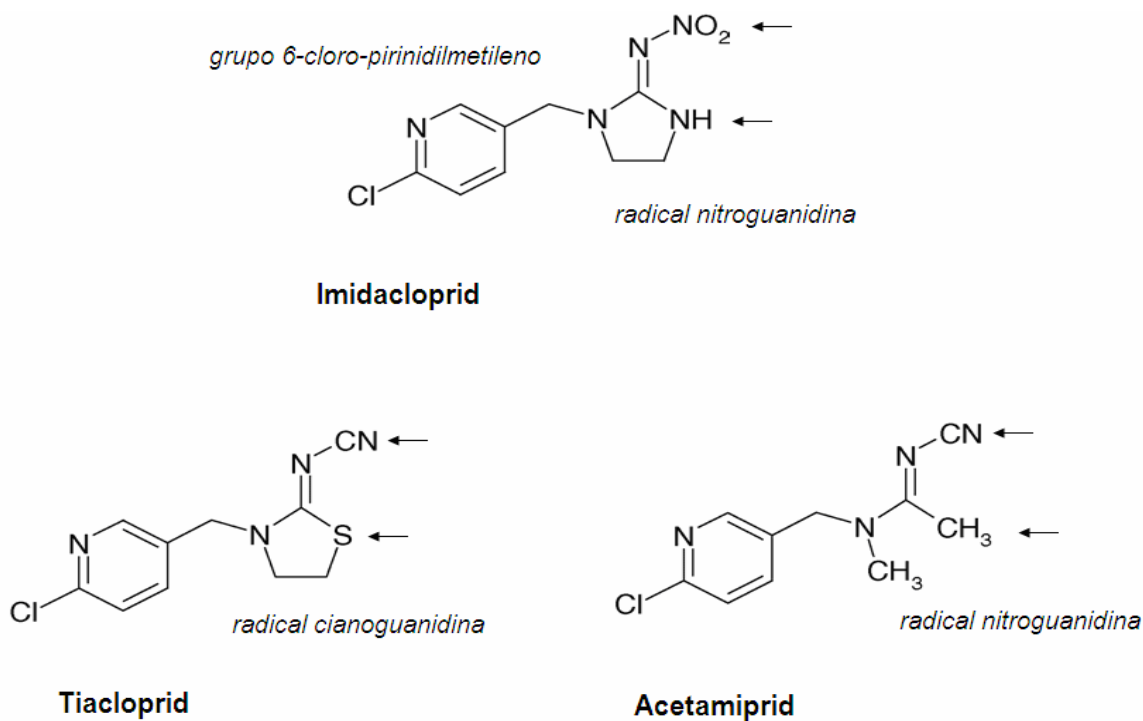


Figura 2. Estructuras químicas del imidacloprid, tiacloprid y acetamidaprid, éstos tienen en común el grupo pirinidilmetileno pero difieren por el grupo sustituyente nitroguanidina y cianoamidina en la porción acíclica o cíclica (Ford y Casida 2006).

Los neonicotinoides actualmente son la mejor clase de insecticidas, debido a su baja toxicidad en mamíferos y nula acumulación en tejidos animales, debido a esto, en los últimos años el registro de nuevos neonicotinoides en diferentes presentaciones se ha elevado (Tabla 3).

Los beneficios que tienen los insecticidas neonicotinoides son (Bolboaca y Jäntschi 2005):

- a) Pocos efectos tóxicos para los seres humanos y para el ambiente.
- b) Son asperjados sobre superficies a bajas concentraciones por acre.
- c) Son solubles en agua y altamente sistémicos en semillas.
- d) Son de gran eficacia para controlar y/o erradicar insectos.
- e) La forma de aplicación ayuda a minimizar los posibles efectos al ambiente.
- f) Son de fácil aspersión y manipulación ya que no requieren de equipo especial.
- g) Sin problemas para ser transportados y/o almacenados.
- h) No tienen olores desagradables.
- i) Son de bajo costo.

Los principales insectos blanco de los neonicotinoides son; pulgón, escarabajo, moscas blancas y otros insectos chupadores, tanto de plantas como de animales. Su eficacia es debida a su movilidad en la planta (sistémico) y a su solubilidad en el agua (Tomizawa y Casida 2003). Al aplicar un neonicotinoide a semillas, suelo o follaje, la planta es capaz de absorber y transportar el plaguicida hacia los tallos en crecimiento, produciendo mayor protección a largo plazo contra los insectos, permaneciendo en la planta hasta por 40 días (Tomizawa y Casida 2005).

Tabla 3. Neonicotinoides registrados o están por ser registrados.

Ingrediente Activo	Nombre común	Compañía	Usos
Imidacloprid	Admire	Bayer	En el surco (al sembrar)
	Gaucho	Gustafson	Tratamiento de semillas
	Génesis	Gustafson	Tratamiento de semillas
	Provado	Bayer	Foliar
	Leverage <sup>1</sup>	Bayer	Foliar
	Pasada, Alias	Makhteshim	Foliar y suelo
Tiamethoxam	Couraze	Cheminova	Foliar y suelo
	Platinum	Syngenta	En el surco (al sembrar)
	Actara	Syngenta	Foliar
Acetamiprid	Cruiser	Syngenta	Tratamiento de semillas
	Assail	Cerexagri	Foliar
Tiacloprid	Calypso	Bayer	Foliar y en suelo
Clotianidina	Poncho	Bayer	Tratamiento de semillas
	Belay <sup>2</sup>	Arvesta	En el surco (al sembrar)
	Clutch <sup>2</sup>	Arvesta	Foliar
Dinotefuran	Venom <sup>2</sup>	Valent	En el surco (al sembrar)/ foliar

<sup>1</sup> (mezcla con ciflutrina), <sup>2</sup> (aún no registrado)  
(National Potato Council 2006).

### 2.1.1 Mecanismo de acción

Los insecticidas neonicotinoides tienen acción sobre el sistema nervioso central como agonistas parciales, súper agonistas y antagonistas del receptor de la acetilcolina-nicotina (nAChR) de insectos y mamíferos. La acetilcolina (ACh) es el antagonista endógeno y neurotransmisor del sistema nervioso colinérgico. Los neonicotinoides interactúan en los receptores nicotínicos post-sinápticos a nivel del dominio extracelular del complejo nAChR y del canal iónico, posteriormente un cambio conformacional abre el canal promoviendo la entrada de Na<sup>+</sup> y la salida de K<sup>+</sup>. En los insectos el nAChR, está distribuido extensamente en el sistema nervioso central (Tomizawa y Casida 2003; Ihara et al. 2007).

La acción de los neonicotinoides en este complejo produce una respuesta bi-fásica de descarga espontánea que es seguida de un bloqueo completo en la propagación del impulso nervioso que lleva a la acumulación de acetilcolina, lo cual genera parálisis y la muerte (Karabay y Oguz 2005). Así los neonicotinoides son más afines al receptor de acetilcolina-nicotina que la misma acetilcolina y tienen mayor selectividad para los insectos que para mamíferos (Tomizawa et al. 2000; Matsuda et al. 2001; Schulz-Jander y Casida 2002; Tomizawa y Casida 2003, 2005; Ihara et al. 2007; Millar y Denholm 2007). No obstante se ha observado que algunos metabolitos resultantes del imidacloprid son menos selectivos para insectos que el compuesto original (Tomizawa et al. 2000).

### 2.1.2 Efectos tóxicos

Se ha demostrado que los insecticidas neonicotinoides tienen mayor afinidad por los insectos que por los mamíferos, sin embargo, las aves y los peces son extremadamente sensibles a los neonicotinoides, teniendo la LD<sub>50</sub> de 49 mg/kg y en peces de 31 mg/kg comparada con la LD<sub>50</sub> de 640 mg/kg en ratones. Otra desventaja es que varios neonicotinoides son extremadamente dañinos para abejas por contacto directo y por ingestión, lo que afecta tanto a la apicultura como a los ecosistemas (Tomizawa y Casida 2005). La toxicidad en mamíferos es similar a la de los insecticidas nicotinoides, su acción antagónica y afinidad a los receptores nAChR determina su órgano blanco, el cerebro. A exposiciones crónicas, los insecticidas neonicotinoides y algunos de sus metabolitos, autorregulan los niveles del nAChR, alterando los sitios de unión, además modifican las vías de traducción de señales intracelulares tales como la cascada de la proteína cinasa C (Tomizawa y Casida 2005).

Por otro lado, se ha observado que esta clase de plaguicidas causan tumores en tiroides, útero de rata y en ovarios de ratón a dosis de 1.2 mg/kg por día, por lo que se les considera como potentes carcinógenos

a exposiciones continuas, además de tener efectos genotóxicos y mutagénicos (Tomizawa y Casida 2005). El tiacloprid y el tiametoxam son clasificados como carcinógenos en humanos (Tomizawa y Casida 2005), el imidacloprid induce malformaciones espermáticas en *Eisenia fetida* (Zang et al. 2000), es potencialmente clastogénico e incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas en médula ósea de rata, intercambio de cromátidas hermanas y es positivo en la prueba de micronúcleos en cultivo de linfocitos humanos (Karabay y Oguz 2005), se ha reportado que producen micronúcleos en eritrocitos de rana y daño al ADN detectado por el ensayo cometa alcalino (Feng et al. 2004). El acetamiprid es genotóxico y citotóxico en linfocitos humanos *in vitro* (Kocaman y Topaktas 2007).

## 2.2 Calypso 480 SC (tiacloprid)

Calypso 480 SC es un insecticida que tiene como ingrediente activo el tiacloprid  $-C_{10}H_9ClN_4S-$  (Fig. 3), que fue patentado por CropScience Bayer EUA, en 1985, junto con otros neonicotinoides como el imidacloprid. El tiacloprid es un insecticida neonicotinoide comercializado también en otras presentaciones como: Alanto, Bariad, Biscaya, Monarca y Proteus. Pertenece al subgrupo de los cloroneonicotinoides, posee un grupo cloropiridil como sustituyente, además de un grupo cianoimina. Su nombre químico es N-{3-[(6-cloro-3-piridinil) metil]-1,3-tiazolan-2-iliden} cianoamida (IUP) y tiene un peso molecular de 252.7 uma (EPA 2003).

Es un insecticida foliar, sistémico, con acción antagónica y agonista del receptor de la acetilcolina-nicotina, se aplica a diversos cultivos agrícolas como: canola, arroz, algodón, papa, en cereales y otros vegetales comestibles. Se usa en diversos países como Australia, Japón, Korea, África, Europa, EUA y México. Es de amplio espectro para plagas de insectos y con diversas formulaciones como suspension,

granulado y en aceite, entre otros (NRAAVC 2001; Tomizawa y Casida 2005; Bayer CropScience México 2008).

El tiacloprid inhibe los receptores de la acetilcolina en el sistema nervioso, es un insecticida de primera generación, sin embargo, ha sido comercializado más recientemente como Calypso 480 SC en solución concentrada y lanzado al mercado por Bayer CropScience México (2008).

Este plaguicida frecuentemente se asperja en ciruelos, duraznos y otros árboles frutales; las plagas más controladas con este insecticida son las polillas de manzana, algarribo, langostino, pulgón, entre otros (Bayer CropScience México 2008).

Después de la ingestión, Calypso es rápidamente absorbido, metabolizado por el cuerpo y excretado principalmente en la orina. Es moderadamente tóxico por ingestión oral y por inhalación, poco agudo en toxicidad dérmica, no irrita la piel, pero es ligeramente dañino para los ojos (NRAAVC 2001; Tomizawa y Casida 2005). El hígado es el principal órgano blanco de Calypso en mamíferos, donde es metabolizado y produce alteraciones de la actividad de algunas hormonas esteroides. También tiene efectos en las glándulas tiroides y adrenales, como consecuencia, incrementa la actividad hepática. Se ha observado gran incidencia de tumores en útero, ovarios y tiroides en ratas y ratones expuestos al tiacloprid sin embargo, no existe información concluyente sobre su efecto genotóxico (NRAAVC 2001; Tomizawa y Casida 2005).

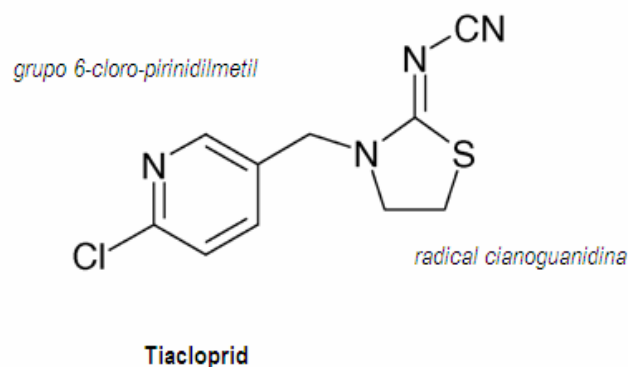


Figura 3. Estructura química del cloroneonicotinoide tiacloprid.

### 2.3 Insecticidas Piretroides

Entre los derivados vegetales con acción de insecticida, destaca el piretro, el cual se extrae principalmente del crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). A partir de este extracto vegetal se produjeron las piretrinas, grupo de compuestos químicos afines entre sí que constituyen los principios activos de la actividad insecticida del piretro, determinada por Staudinger y Ruzicka en 1924, reportando que las piretrinas de tipo I y II están constituidas por seis compuestos base. Posteriormente se desarrollaron las piretrinas sintéticas, denominadas piretroides, diseñadas y optimizadas con base en las piretrinas naturales (Barberá 1989b; Kaneko y Miyamoto 2001; Soderlund et al. 2002). Los piretroides son insecticidas ampliamente usados desde 1970, comprenden aproximadamente el 25 % del mercado mundial y en los últimos años su consumo ha aumentado considerablemente (Meacham et al. 2008). Estos insecticidas tienen pocos efectos neurotóxicos y citotóxicos en mamíferos, además de escasa persistencia en el ambiente terrestre y poca resistencia en insectos, son poco volátiles y casi insolubles en agua. Son líquidos viscosos con poca movilidad en el suelo; los vapores de baja presión les dan una rápida acción en insectos y lento movimiento sistémico al interior de hojas en plantas, son efectivos como insecticidas de contacto pero no por ingestión (Çelik et al. 2003).

Estos insecticidas son ampliamente usados en el sector agrícola, veterinario y programas de salud pública. Por otro lado, existen pocos reportes por envenenamiento, aunque en los casos reportados la farmacoterapia es difícil y el tiempo de duración de la intoxicación es incierto. Las ventajas que se han encontrado en los piretroides radica en que su vida media es del orden de 10 horas y la intoxicación por vía oral es de corto plazo, además la toxicidad dérmica es muy limitada debido a la baja absorción a través de la piel; el potencial tóxico es mayor, sin embargo, se limita debido a la rápida desintoxicación en la sangre e hígado (Ray y Forshaw 2000). A pesar de estas ventajas se observó que en 2001-2003, el número de



incidentes por exposición a piretroides ha aumentado, debido a que están sustituyendo a los insecticidas organofosforados, ya que producen pocos efectos adversos según la EPA (Sudakin 2006).

Los piretroides se clasificaron con base en su estructura química y el tipo de síntoma que generaron después de la intoxicación aguda por administración intravenosa del insecticida a ratas o intracerebral a ratones a dosis cercanas a la letal.

Las piretrinas naturales y los piretroides sintéticos fueron caracterizados, inicialmente como compuestos de tipo I, que inducen temblor involuntario en el cuerpo (síndrome T) y los piretroides de tipo II, que producen convulsiones progresivas (coreoatetosis), acompañadas con salivación (síndrome CS) y parálisis; un tercer tipo se ha considerado debido a los síntomas mixtos que generan (Fig. 4) (Ray 2001; Choi y Soderlund 2006).

La diferencia estructural entre los piretroides de tipo I y de tipo II es la ausencia o presencia, de un grupo ciano en el carbón  $\alpha$  del 3-fenoxibencil del alcohol primario de los piretroides, que causan diferentes síndromes de toxicidad (Fig. 4 y 5) (Shafer et al. 2005; Choi y Soderlund 2006). Los insecticidas que representan a los piretroides II, son cipermetrina, deltametrina, ciflutrina, los cuales comparten una estructura química base en común y son los más estudiados (Fig. 5).

### 2.3.1 Mecanismos de acción

Los piretroides son neurotoxinas que actúan principalmente en los canales de sodio y cloro, originando excitación prolongada, generan daño citotóxico indirecto. El principal sitio de acción está en los canales de sodio dependientes del voltaje, este efecto es resultado de su estereoespecificidad, ciertos isómeros son más tóxicos que otros; estos canales se encuentran en el cerebro en desarrollo de mamíferos y en el ganglio de la espina dorsal en adultos, siendo los insectos 100 veces más sensibles. Los piretroides alteran el funcionamiento del sistema nervioso central (SNC) al aumentar la permeabilidad del  $\text{Na}^+$  en la membrana nerviosa y perturbando su potencial de acción. Los de tipo I generan un amplio potencial de acción en los nervios sensoriales, motores y en las inter-neuronas dentro del SNC, adicionalmente se ha observado que algunos piretroides de este grupo también tienen efecto en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje (Soderlund et al. 2002), en contraste los de tipo II no afectan a los canales de calcio, asimismo no generan disparos repetidos, pero bloquean el potencial de acción en las membranas de los axones en la estimulación nerviosa y despolarizan el potencial de reposo, esto reduce la amplitud del potencial de acción y lleva a la pérdida de la excitabilidad eléctrica. Estas cascadas de hiperexcitación conducen a una parálisis del centro respiratorio así como de otras regiones del sistema nervioso que controlan la función “cardíaca” y del cuerpo del insecto resultando la muerte. El número de canales modificados por estos insecticidas es dependiente de la dosis y el tiempo que el canal permanece abierto es producto de la estructura del piretroide (Soderlund y Bloomquist 1989; Ray y Forshaw 2000; Ray 2001; Soderlund et al. 2002). Otro sitio blanco de los piretroides de tipo II son los canales de cloro y sodio sensibles al voltaje localizados en nervios, músculos, glándulas salivales y diferentes regiones anatómicas del sistema nervioso central y periférico,, donde generan una disminución en la apertura normal de los mismos. Éstos canales son modulados por la proteína Cinasa C y su función es controlar la excitabilidad de la célula (Ray y Forshaw 2000).

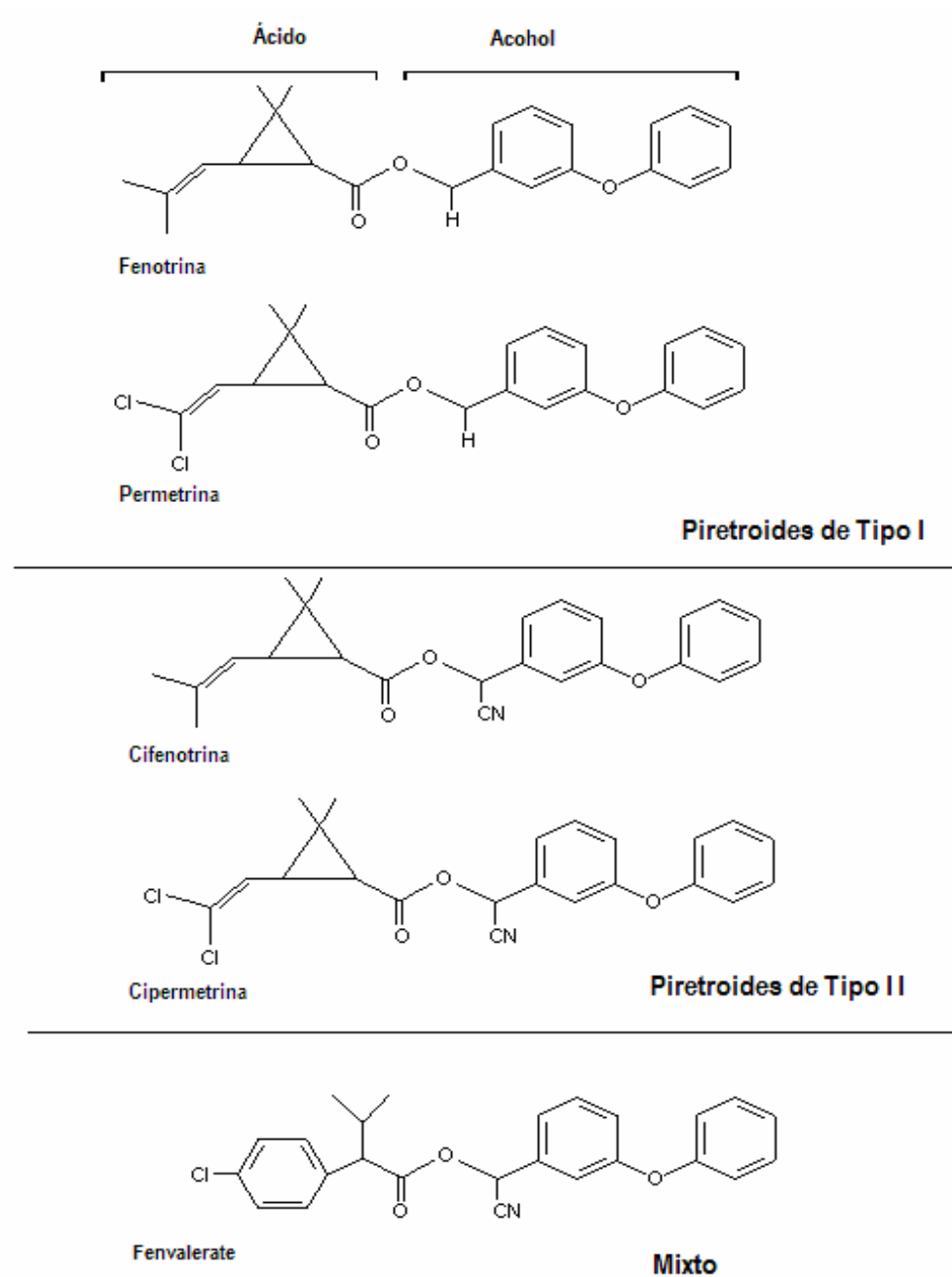


Figura 4. Estructura y clasificación de los piretroides. La ausencia del grupo ciano (CN) en los piretroides de tipo I marcan la distinción del tipo II, con respecto al piretroide fenvalerato, debido a las reacciones tóxicas que causa, se le considera de tipo III, aunque por su estructura pertenece al tipo II.

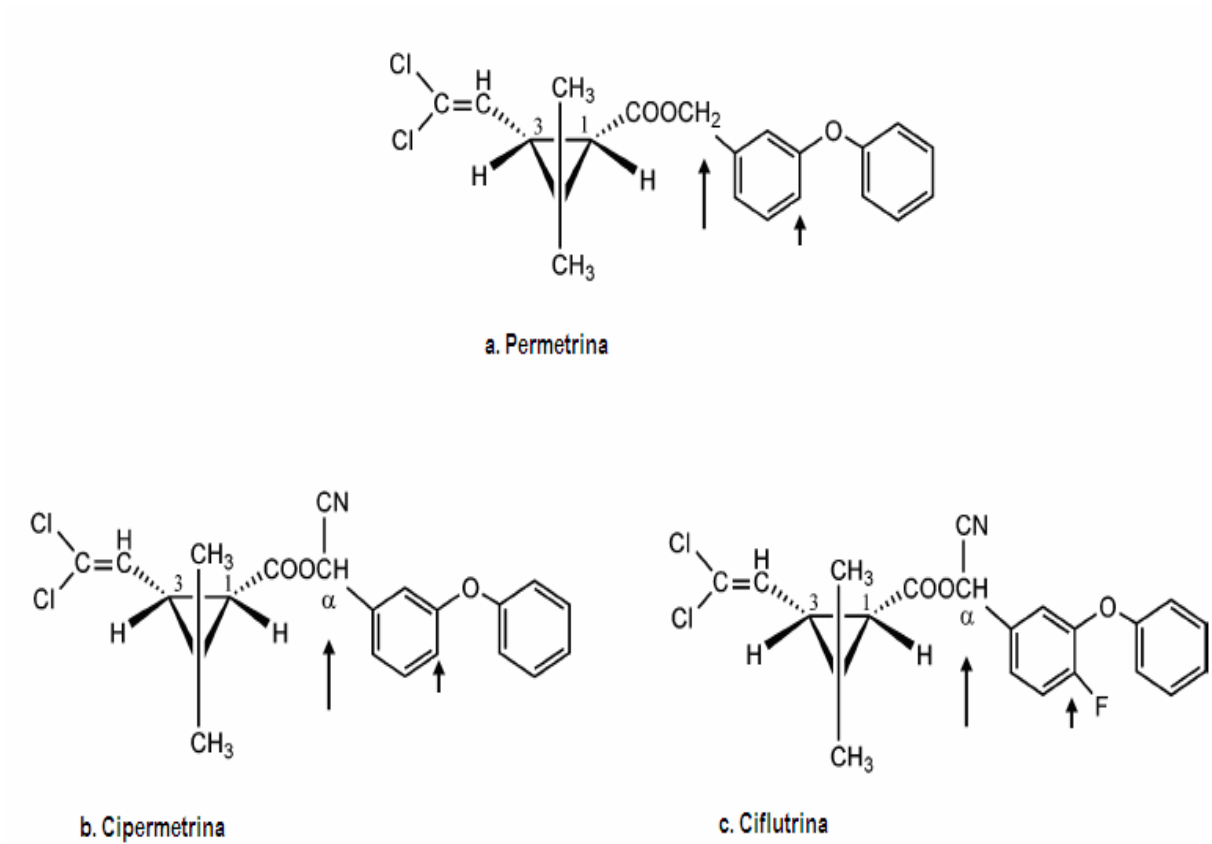


Figura 5. Los insecticidas piretroides permetrina (a), cipermetrina (b) y ciflutrina (c), poseen una estructura tridimensional similar y difieren entre sí, únicamente por los grupos químicos sustituyentes en el anillo bencílico; el grupo  $\alpha$ -ciano en el carbono bencílico de permetrina forma cipermetrina, la diferencia entre la cipermetrina y la ciflutrina es la sustitución p-fluoro (Wolansky y Harril 2008).

### 2.3.2 Efectos tóxicos

En general, los periodos largos de exposición a los insecticidas piretroides causan síntomas de envenenamiento, pero estos varían dependiendo del tipo de piretroide. Los signos típicos de intoxicación por los piretroides del tipo I: incluyen hiperexcitabilidad y convulsiones en insectos y temblores en el cuerpo de los mamíferos, reconocido como el síndrome "T"; los de tipo II, causan principalmente ataxia y descordinación en insectos, mientras que en mamíferos producen salivación y coreoatetosis (salivación sin lagrimeo, seguido de estirones en piernas, movimientos y convulsiones progresivas) y efectos directos en el esqueleto, músculo cardíaco y glándulas salivales que son moduladas por la proteína cinasa C (Forshaw y Ray 1993). El reflejo de hiperexcitabilidad es resultado de la combinación de activación y supresión de los canales de Na<sup>+</sup>, estos síntomas corresponden al llamado síndrome coreoatetosis/ salivación ó "CS" (Ray 2001). En insectos, los efectos tóxicos de los piretroides de tipo I, culminan en la caída del organismo después de 1 ó 2 min del tratamiento, es decir, con pérdida de la postura normal y de la locomoción. La exposición en los seres humanos a los dos tipos de piretroides puede causar parestesia, sensación de quemazón o picazón en la piel y pueden ser más intensos con los compuestos del tipo II (Ray y Forshaw 2000, Ray 2001). Existen piretroides que causan síntomas mixtos de los dos tipos; en todos los casos los signos motores de intoxicación son a nivel de la espina dorsal y en otros sitios del cerebro. Los reportes de intoxicación en el hombre indican que los piretroides tipo II son más tóxicos que los del tipo I (Soderlund et al. 2002; Wolansky et al. 2007).

En exposición dérmica los piretroides I y II, ocasionan parestesia con gran toxicidad debido a su actividad repetida en las terminales nerviosas de la piel. En algunos animales, se ha observado un efecto similar después de una intoxicación sistémica (Ray y Forshaw 2000; Soderlund et al. 2002). Ambas clases de piretroides (tipo I y tipo II), causan aumento en los niveles adrenalina y noradrenalina, alterando los signos motores. Se ha determinado que a concentraciones bajas del insecticida deltametrina, se eleva la

secreción de corticoesteroides; la cipermetrina aumenta la densidad de los receptores de dopamina renal en ratas y ratones jóvenes; la bioaletrina disminuye la densidad del receptor muscarínico en la neocorteza cerebral de ratas, generando cambios en la conducta de los adultos, sin embargo, en los seres humanos existe poca información sobre estos efectos (Ray y Forshaw 2000).

Con relación a la genotoxicidad; diversas investigaciones han mostrado que algunos piretroides de tipo I y II tienen efectos *in vivo* e *in vitro*. El fenvalerato incrementa la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos en cultivo, indicando actividad clastogénica y/o aneugénica (Surrallés et al. 1990), la deltametrina ocasiona micronúcleos en células de médula ósea de ratones (Gandhi et al. 1995); la cipermetrina induce genotoxicidad en el cerebro, hígado y riñón (Bhunya y Pati 1988; Chauhan et al. 2005; Patel et al. 2006). La  $\lambda$ -cialotrina produce aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y eleva la frecuencia de micronúcleos en células de médula de ratón (Çelik et al. 2003, 2005a,b).

#### 2.4 Bulldock 125 SC ( $\beta$ -Ciflutrina)

La ciflutrina (Fig. 6a), es un insecticida piretroide del grupo alfa-ciano piretroides, los cuales contienen un grupo ciano (CN) en su carbono alfa ( $\alpha$ -C). Este compuesto es empleado en el hogar, agricultura, horticultura y viticultura, debido a su gran actividad de insecticida, tiene amplio espectro y baja toxicidad en mamíferos; fue sintetizada a principios de los años 70, como uno de los primeros piretroides y fue hasta 1987 que se registró como el primer piretroide sintético para el control de saltamontes, mosquitos y para el tratamiento de vectores y ectoparásitos portadores de diversas enfermedades. Desde su aparición la ciflutrina ha aumentado su aplicación a más del 40 % en EUA (Ila et al. 2008) y recientemente se han desarrollado y comercializado estereoisómeros con mayor efectividad para el control de insectos, entre los

cuales está Bulldock 125 SC, con ingrediente activo  $\beta$ -ciflutrina, (1R-cis-3R;1R-trans-3S)-3- (2,2-diclorovinil)-2,2- di-metil-ciclopropano ácido carboxílico SR)- $\alpha$ -ciano- (4-fluoro-3-fenoxi-fenil) metil-ester (IUPAC), éste es un líquido en solución concentrada de color beige, soluble en agua, clasificado como moderadamente tóxico (categoría III) y muy tóxico para organismos y ambientes acuáticos (Kaneko y Miyamoto 2001; Bayer CropScience México 2008).

La  $\beta$ -ciflutrina (Fig. 6b) es una mezcla de dos diastereómeros de la ciflutrina (Fig. 6a), cada uno formado por un par de enantiómeros (European commission, Directorate general health for health and consumer protection 2002), que actúa al igual que la ciflutrina, por contacto y envenenamiento estomacal, genera síntomas tales como salivación, hipotermia, movimientos repetidos de la mandíbula, temblor en las manos, pérdida de coordinación, coreoatetosis, fasciculación muscular y disminución en la sensibilidad a los estímulos, como el síndrome CS correspondiente a los piretroides del tipo II. Por su gran especificidad hacia los insectos es aplicado para erradicar fitoparásitos de diversos cultivos agrícolas como el algodón, maíz, tabaco, girasol, papa y hortalizas (Kaneko y Miyamoto 2001; Soderlund et al. 2002; Zhang et al. 2008).

Se ha sugerido que los piretroides ciflutrina y  $\beta$ -ciflutrina tienen similar perfil toxicológico (FAO 1999), sin embargo, la presencia mayoritaria de los diastereómeros II y IV, potencia la acción insecticida tal que la  $\beta$ -ciflutrina tiene toxicidad aguda 2 a 5 veces más que la ciflutrina (Wolansky y Harril 2008).

La  $\beta$ -ciflutrina afecta el crecimiento y desarrollo de larvas sepia y blanca de *Drosophila melanogaster*, (Nadda et al. 2005), genera neurotoxicidad aguda por ingestión; altera la locomoción en huesos y genera postura anormal (EPA 2005); es genotóxica en células de mucosa nasal humanas en cultivo (Tisch et al. 2005). La  $\beta$ -ciflutrina y la ciflutrina son disruptores endócrinos tanto *in vitro* como *in vivo* con actividad anti-androgénica en ratas machos medida por cambios histomorfológicos de las vesículas seminales y próstata (Zhang et al. 2008).

Ila et al. (2008) reportan que la ciflutrina no es mutagénica para *Salmonella typhimurium*; no causa incrementos significativos en intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos humanos, pero induce aberraciones cromosómicas y micronúcleos en las mismas células, con disminución del índice mitótico.

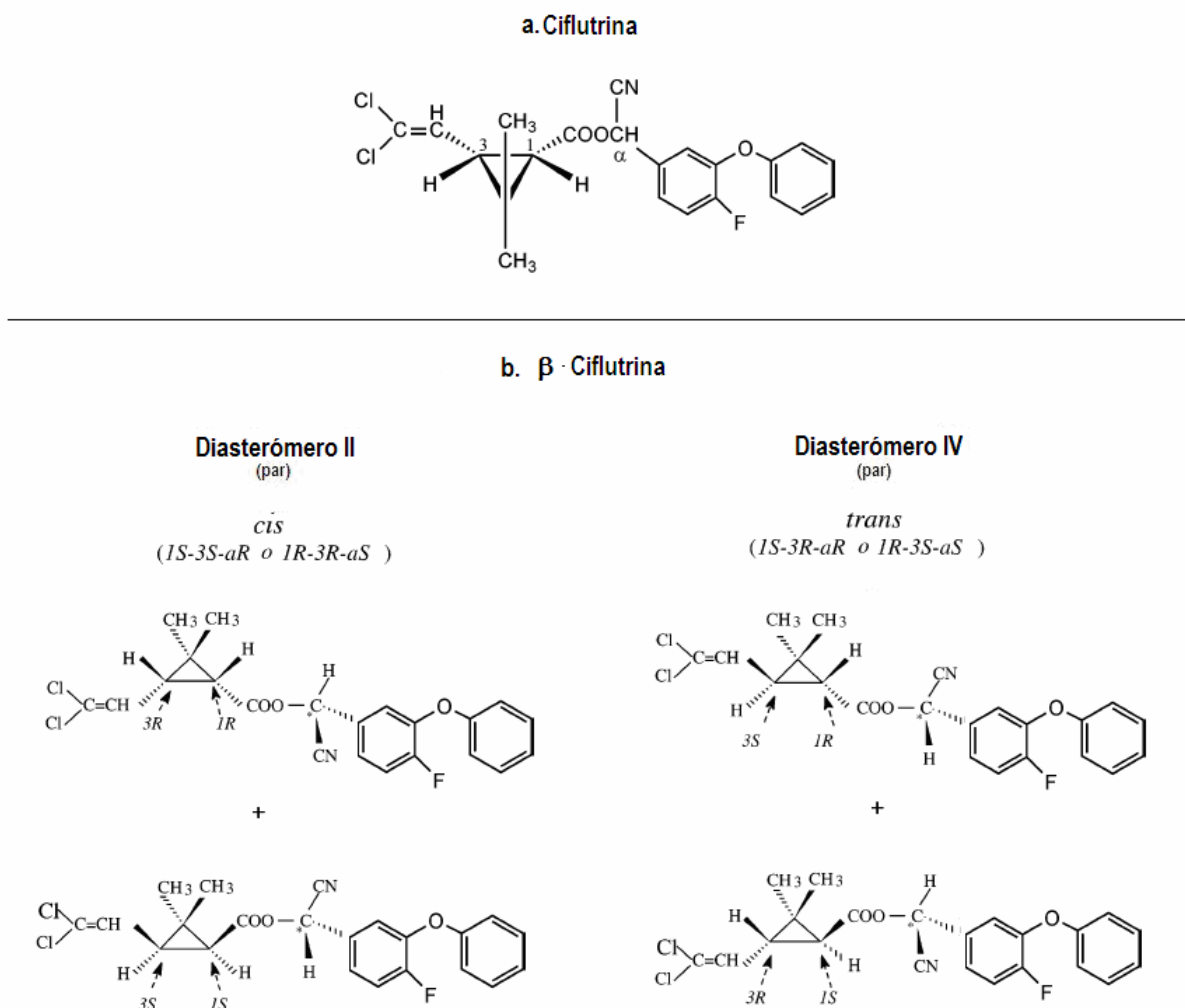


Figura 6. Estructura química de los insecticidas piretroides, (a) ciflutrina y (b)  $\beta$ -ciflutrina que consiste predominantemente de dos diasterómeros (II y IV) con un par de enantiómeros. (Liu y Gan 2004; Liu et al. 2005; Vodeb y Petanovska-Ilievska 2006)



## 2.5 Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa)

Los xenobióticos son capaces de generar rupturas en el ADN, ya sea de cadena doble o sencilla en los sitios de reparación retardada del ADN, así como en regiones álcali-lábiles. El ensayo cometa se basa en que el ADN fragmentado adquiere una carga neta que le permite migrar hacia el ánodo de un campo eléctrico y dependiendo del tamaño de los fragmentos sus velocidades serán diferentes, de esta manera se puede observar los núcleos no dañados como un círculo brillante (Fig. 7A), mientras que las células dañadas forman la figura de un cometa (Fig. 7B).

El ensayo cometa o electroforesis unicelular fue introducido originalmente por Östling y Johanson en 1984 como una técnica micro-electroforética para visualizar el daño del ADN en células individuales obtenidas de biopsias en pacientes con cáncer sometidos a terapia con radiación. Ellos suspendieron las células en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, formando un microgel que posteriormente sumergieron en una solución de lisis para romper las células y poder visualizar los núcleos, los geles se sometieron a una electroforesis neutra, para evidenciar la fragmentación de la cadena doble de ADN y posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio para observar los núcleos. Las imágenes obtenidas de estos núcleos fueron llamadas “cometas” por su semejanza a estos (Fairbairn et al. 1995). En 1988, Singh et al. mejoraron la técnica introduciendo una electroforesis alcalina ( $\text{pH}>13$ ), que a diferencia de la neutra mejora el desenrollamiento del ADN y la separación de proteínas asociadas, incrementando la movilidad y visualización de los fragmentos de ADN, debido a esto se pueden observar rupturas de cadena sencilla y doble; lesiones en los sitios sensibles al álcali y en sitios de reparación retardada del ADN; ofreciendo mayor sensibilidad para detectar agentes genotóxicos (Fairbairn et al. 1995; Rojas et al. 1999). La versión alcalina ( $\text{pH}>13$ ) de la electroforesis en el ensayo cometa, fue considerada la mejor y aceptada por el panel Internacional Workshop on Genotoxicity Test Procedures como el ensayo de genotoxicidad más sensible,

en comparación con otros y recientemente se ha usado esta técnica para detectar apoptosis y diferenciarla de la necrosis (Fairbairn et al. 1995; Rojas et al. 1999; Tice et al. 2000; Avishai et al. 2003).

Las ventajas del ensayo cometa alcalino son:

- a) Los datos son obtenidos de células individuales, lo que hace posible identificar diferentes poblaciones celulares en una misma muestra, además permite observar respuestas mixtas de cada célula en la población.
- b) Se requiere un número pequeño de células para llevar a cabo el ensayo.
- c) Se puede aplicar en cualquier célula eucariótica.
- d) Es una prueba muy sensible, reproducible, simple y de bajo costo.
- e) Los datos experimentales se obtienen en poco tiempo.
- f) No se necesitan células en proliferación o división celular.

(MacKelvey-Martin et al. 1993; Rojas et al. 1999; Woods et al. 1999; Tice et al. 2000).

Los parámetros para evaluar el daño en el ADN, pueden ser:

1. El porcentaje de células con daño al ADN (con cometa)
2. Longitud y porcentaje de ADN en la cauda (longitud y frecuencia de rompimientos de la cadena)
3. El momento de la cauda entre otros.

Los parámetros pueden usarse en conjunto o por separado, siendo más utilizados la longitud de la cauda y el porcentaje de células con cometa (Hellman et al. 1995; Tice et al. 2000).

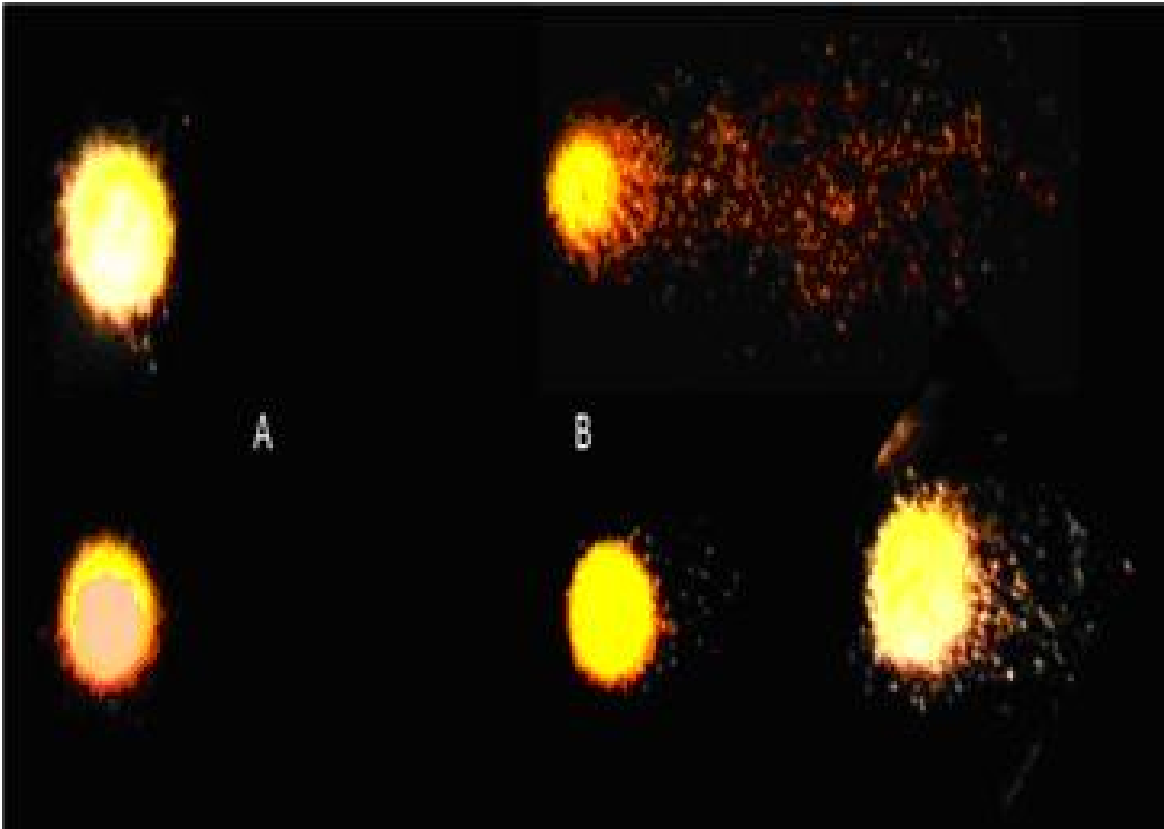


Figura 7. Núcleos de linfocitos humanos teñidos con bromuro de etidio, después del ensayo de electroforesis alcalina. A. Núcleos sin daño al ADN (sin cometas), B. Núcleos con daño al ADN (con cometa).

### III JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la población humana está expuesta a diversas fuentes de contaminación física, biológica y química. Una de las más dañinas es la exposición a plaguicidas, esta puede ser a través del uso de champus y lociones especiales para eliminar ectoparásitos del humano y de animales, mediante el consumo de alimentos contaminados con residuos de agroquímicos y/o sus metabolitos; como: leche, carne, vegetales comestibles como granos, frutas y verduras; lo cual constituye factores de riesgo para la salud humana. Además muchos de estos compuestos químicos, han mostrado dañar el ADN tanto *in vivo* como *in vitro*. Las modificaciones en la estructura del ADN pueden ser cambios en una base o pérdida de éstas (sitiosapurínicos y apirimídicos), entrecruzamiento de cadenas de ADN, cruzamientos de proteínas y ADN, y rompimientos de una o dos hebras del genoma. Si el daño al ADN no es reparado, se altera la integridad del genoma, lo cual es vital para la homeostasis y el funcionamiento celular (Kocaman y Topaktas 2007). El daño al ADN es considerado como uno de los principales eventos de iniciación de enfermedades como el cáncer lo cual puede conllevar a la tumorigénesis, metástasis y la muerte. Por tales antecedentes la presente investigación evaluó los efectos genotóxico y citotóxico de nuevos insecticidas en México, el neonicotinoide Calypso 480 SC y el piretroide Bulldock 125 SC en linfocitos periféricos humanos *in vitro*, usando el ensayo cometa alcalino y sus posibles efectos sobre la viabilidad celular mediante la tinción con azul tripano.

#### IV OBJETIVOS

1. Realizar tratamientos con cinco concentraciones de los insecticidas Bulldock 125 SC y Calypso 480 SC en linfocitos de sangre periférica humana *in vitro*.
2. Evaluar el daño sobre el ADN de los linfocitos de sangre periférica humana expuestos a los dos plaguicidas, mediante la frecuencia de células con cometa y la longitud de sus caudas (fragmentación del ADN) en microscopía de fluorescencia.
3. Determinar los efectos sobre la viabilidad de los linfocitos humanos después de los tratamientos con diferentes concentraciones de Bulldock 125 SC y Calypso 480 SC con la tinción azul tripano.

## V HIPÓTESIS

Sí algunos plaguicidas neonicotinoides y piretroides han mostrado ser agentes genotóxicos al provocar intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y citotóxicos sobre células humanas, entonces estos mismos efectos se producirán en los linfocitos de sangre periférica expuestos a los insecticidas Bulldock 125 SC y Calypso 480 SC, visualizado con el incremento en la frecuencia de células con cometas y en la longitud de sus caudas, así como su repercusión en la viabilidad celular.

## VI MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Preparación de las soluciones patrón de los insecticidas

Los insecticidas Calypso 480 SC (Registro RSCO-INAC-0191-003-014-012) y Bulldock 125 SC (Registro RSCO-INAC-0102T-301-064-040), fueron donados por Bayer CropScience México. Se realizó una dilución del producto comercial Calypso 480 SC en proporción 1:10 con agua desionizada, para Bulldock 125 SC se usó el plaguicida original (sin dilución).

### 6.2 Aislamiento de linfocitos

Se tomaron muestras de 20 mL de sangre heparinizada de un donador sano y joven, las cuales fueron transferidas a tubos estériles para ser centrifugadas a 2 500 rpm por 20 min a 37 °C. Se aislaron los linfocitos con pipeta Pasteur estéril y diluyeron 1:1 con solución de Hank's (37 °C) e inmediatamente se colocaron sobre una capa de ficol para realizar la separación de los linfocitos por centrifugación a 1 500 rpm por 10 min a 37 °C. El botón celular se lavó dos veces con medio RPMI 1640 a 1 500 rpm por 10 min. Finalmente, se tomaron 10 µl del botón celular para determinar el número de linfocitos/mL con la cámara de Neubauer, el resto del botón celular se incubó a 37 °C en medio RPMI 1640 con 1 % de penicilina/estreptomicina para posteriormente ser usado para los tratamientos con los dos insecticidas.

### 6.3 Tratamientos directos de los insecticidas Calypso 480 SC y Bulldock 125 SC en los linfocitos de sangre periférica humana y ensayo de viabilidad

En la campana de flujo laminar; se colocaron 250 000 linfocitos con una viabilidad  $\geq 98\%$ , en microtubos estériles más medio RPMI 1640 y 14.4, 24, 30.5, 33.2 y 35.2 mg/mL de Calypso 480 SC y 6.25, 25, 37.5, 50, 75 mg/mL de Bulldock 125 SC. El testigo fue el medio RPMI 1640 más los linfocitos humanos (libre de plaguicida) por duplicado a un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , durante 2 horas.

Posteriormente la viabilidad celular fue analizada de acuerdo con la técnica de tinción por exclusión con Azul tripano de Altmann et al. 1993. Se mezcló 10  $\mu\text{l}$  del botón celular más 10  $\mu\text{l}$  de azul tripano (0.4 %, Sigma), después de 3 min se cuantificó el porcentaje células vivas en 100 células consecutivas, por duplicado para cada grupo experimental incluyendo el testigo, con un microscopio fotónico a 40X.

### 6.4 Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa alcalino

Para la analizar el daño sobre el ADN en los linfocitos expuestos y no expuestos a los dos plaguicidas se realizó el ensayo cometa alcalino de la siguiente manera: una mezcla con 5 000 células de cada tratamiento con Calypso y Bulldock más 75  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA 0.5 % Gibco) a  $37^\circ\text{C}$ , se colocó en un portaobjetos esmerilado (Fisher, EUA) con una monocapa de agarosa normal (1 %, Gibco) (por duplicado). Los portaobjetos se dejaron solidificar a  $4^\circ\text{C}$  por 5 min, después los geles fueron sumergidos en una solución fresca de lisis final fría (2.5 M NaCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 1 % Triton X-100 y 10 % DMSO, 10 mM Tris, ajustada a  $\text{pH}=10$ ) por 1 h. Posteriormente, los geles fueron transferidos a una cámara de electroforesis horizontal (Bioselect) con amortiguador alcalino frío (300 mM NaOH, 1mM EDTA,  $\text{pH}=13$ ), por 20 min para desenrollar el ADN, a continuación se aplicó una corriente de 25 V, 300 mA por 20 min. Los portaobjetos fueron lavados tres veces con amortiguador neutralizante (0.4 M Tris a  $\text{pH}$  7.5) por 5



min, se fijaron en metanol absoluto frío por 10 min, fueron secados al aire en oscuridad y guardados en una caja negra para posteriormente ser analizados.

Los geles de todos los lotes experimentales, así como, los testigos, fueron reetiquetados con clave desconocida para el observador, teñidos con bromuro de etidio (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para examinar el daño sobre el ADN con un objetivo micrométrico a 40X (1 unid = 2.41  $\mu\text{m}$ ), en un microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Zeiss fluorescent), equipado con filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm.

Se analizaron tres parámetros indicadores de daño al ADN: a) la frecuencia de células con y sin daño al ADN (con y sin cometa) (50 núcleos en cada gel); b) la longitud de la cauda del cometa en micrómetros (de la región nuclear terminal hasta el final de la cauda) en 100 núcleos consecutivos y c) el daño sobre el ADN fue clasificado en cinco categorías dependiendo de la longitud de la cauda del cometa. Las categorías fueron: nivel 0: sin cauda o núcleo no dañado; Nivel 1: cauda 1-44  $\mu\text{m}$ , Nivel 2: cauda 45-88  $\mu\text{m}$ ; Nivel 3: cauda 89-132  $\mu\text{m}$  y Nivel 4: cauda 133-176  $\mu\text{m}$  (núcleo con ADN severamente dañado) (Calderón-Segura et al. 2007).

## 6.5 Análisis estadístico

Los valores promedios de la frecuencia de células con cometa y de la longitud de la cauda del cometa fueron obtenidos de tres experimentos consecutivos de los lotes experimentales y del testigo y se expresaron como promedios  $\pm$  error estándar (E.E). Se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con  $p < 0.05$  y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls para encontrar las diferencias significativas entre el testigo y los grupos experimentales. Para determinar la relación de concentración-efecto, se realizó un análisis de regresión a los promedios de los dos parámetros genotóxicos, estableciendo un intervalo de confianza de  $\alpha = 0.05$ , con el programa estadístico SPSS Statistics 17.0.

## VII RESULTADOS

Los resultados de los tratamientos directos con los insecticidas neonicotinoide Calypso 480 SC (tiacloprid) y piretroide Bulldock 125 SC ( $\beta$ -ciflutrina) a los linfocitos humanos *in vitro*, muestran que los dos plaguicidas son agentes genotóxicos (Tablas 4 y 5, Gráficas I-VI).

La Tabla 4, muestra que las concentraciones de 14.4 y 24 mg/mL de Calypso 480 SC, no causan daño significativo en el ADN de los linfocitos humanos *in vitro*, pero a partir de 30.5-35.2 mg/mL del insecticida, aumentan significativamente los promedios de la frecuencia de linfocitos con daño al ADN (con cometa) y la longitud de las caudas del cometa (fragmentación del ADN), con relación al testigo (linfocitos sin plaguicida) (Gráficas I y II). Los linfocitos humanos a concentraciones elevadas de Calypso muestran mayor fragmentación del ADN comparados con el testigo. El grado de daño sobre el ADN está dentro de las categorías 1-4 (Tabla 4).

El análisis de regresión de los promedios de la frecuencia de células con daño al ADN y la longitud de la cauda del cometa evidencia que existe una correlación de tipo exponencial entre la concentración del insecticida Calypso y el aumento del daño sobre el ADN de las células sanguíneas humanas ( $r^2= 0.9$ ), es decir, una respuesta de concentración-efecto (Gráfica III).

La viabilidad de los linfocitos periféricos humanos expuestos a las diferentes concentraciones del neonicotinoide Calypso 480 SC no fue modificada con relación al valor testigo (Tabla 4).

Los linfocitos periféricos humanos coincubados con 6.25-75 mg/mL del insecticida piretroide Bulldock 125 SC ( $\beta$ -ciflutrina), muestran inducción significativa en la frecuencia de células con cometa y en la longitud de sus caudas al ser comparados con los valores del testigo (Tabla 5, Gráficas IV y V).

El análisis de regresión aplicados a los promedio de ambos parámetros genotóxicos del insecticida piretroide Bulldock mostró que existe una relación de concentración-efecto ( $r^2= 0.8$ ) con un comportamiento parabólico, es decir a partir de 25 a 50 mg/mL de Bulldock aumenta significativamente el daño sobre el

ADN de las células humanas y disminuye significativamente con 75 mg/mL con respecto al testigo (Tabla 5, Gráfica VI).

La viabilidad de los linfocitos expuestos a 6.25 y hasta 50 mg/mL de Bulldock no fue alterada con relación al valor testigo, sin embargo, a partir 75 mg/mL de plaguicida éste es citotóxico hasta ocasionar muerte celular (Tabla 5).

## VIII DISCUSIÓN

Desde la formación de Bayer CropScience en el año 2002 y su llegada a México, es una empresa líder en nuestro país y está al frente en la producción y venta de nuevos insecticidas neonicotinoides y piretroides, (Bayer CropScience México 2008). Los neonicotinoides representan el 17 % del total de los insecticidas procesados (Ford y Casida 2008) y los piretroides el 25 % del mercado mundial (Meacham et al. 2008). Según la Organización Internacional de las Uniones de Consumidores, cada 4 horas muere un trabajador agrícola en los países en desarrollo, debido a intoxicaciones con plaguicidas, que equivale a más de 10 000 defunciones al año, además de 375 000 intoxicaciones (García 1998). La Organización Mundial de la Salud estima 3 millones de casos de envenenamiento agudo y severo (incluyendo suicidios), más los no reportados de media y moderada intoxicación, con alrededor de 2 200 000 muertes (González et al. 2001; WHO 2003).

Actualmente, la población está expuesta a los plaguicidas neonicotinoides y piretroides principalmente por el consumo de alimentos, los cuales son asperjados en los cultivos agrícolas, como papa, maíz, soya, girasol y canola; en hortalizas como lechuga y brócoli; en árboles frutales como manzana, pera y pistache; algunos piretroides se aplican en el hogar, en centros comerciales, en construcciones, invernaderos, jardines públicos y privados, en campañas contra insectos vectores de enfermedades del ser humano y de animales de importancia económica. En EUA, los insecticidas piretroides cipermetrina, permetrina, resmetrina y sumitrina están registrados exclusivamente para programas de control de mosquitos. Se calcula que la producción de ciflutrina y cipermetrina es de 175 000 toneladas y de la permetrina de 1000 000 toneladas (Ford y Casida 2008). Con base en estos antecedentes es necesario realizar estudios genotóxicos sobre estos nuevos plaguicidas, ya que trabajos epidemiológicos han relacionado la inducción de daño al material genético por exposición con insecticidas con el desarrollo de diferentes enfermedades

como el cáncer de pulmón, de páncreas, de vejiga, de mama y leucemias (Caballo et al. 1992; Agarwal et al. 1994; Alvanja et al. 2004; Mansour 2004).

En el presente trabajo se analizó los efectos genotóxico y citotóxico de los insecticidas neonicotinoide Calypso 480 SC (tiacloprid) y el piretroide Bulldock 125 SC ( $\beta$ -ciflutrina) en linfocitos periféricos humanos *in vitro* mediante el ensayo cometa alcalino y la tinción por exclusión con azul tripano, respectivamente. El ensayo cometa alcalino es eficaz para detectar fragmentación del ADN y en comparación con otras pruebas citogenéticas como, el intercambio de cromátidas hermanas, los micronúcleos y las aberraciones cromosómicas, es una prueba más sensible para evaluar agentes genotóxicos ambientales, no requiere de células en proliferación, es aplicable a cualquier célula eucariota, en poco tiempo se obtienen resultados y es reproducible (Tice et al. 2000; Speit y Hartmann 2005).

Los resultados de los tratamientos directos con el insecticida neonicotinoide comercial Calypso 480 SC (con principio activo tiacloprid) a los linfocitos humanos *in vitro*, muestran que este compuesto es un agente genotóxico al producir fragmentación significativa del genoma a bajas concentraciones (30.5-35.2 mg/mL), con relación al testigo y con un comportamiento de concentración-efecto. La viabilidad de las células humanas expuestas a las diferentes concentraciones de tiacloprid no fue modificada en comparación con el valor testigo. Estos resultados concuerdan con los pocos estudios genotóxicos realizados para otros insecticidas neonicotinoideos. Zang et al. (2000), publican alteraciones espermáticas en *Eisenia fetida* expuestas con 0.2 y 0.5 mg/kg de suelo seco del insecticida neonicotinoide imidacloprid por 14 días y daño al ADN de celomocitos de la lombriz expuestas con 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5 mg/L de imidacloprid por 2 h.

Feng et al. (2004), reportan elevada frecuencia de micronúcleos en eritrocitos del ajolote de *Rana nigromaculata* Hallowell expuestas por 7 días con 8 y 32 mg/L<sup>-1</sup> de imidacloprid. Con 0.05, 0.1, 0.2, y 0.5 mg/L<sup>-1</sup> del plaguicida aumenta el número de eritrocitos con daño al ADN (con cometa) y la longitud de la cauda de los cometas, mediante la electroforesis unicelular alcalina. Feng et al. (2005), muestran producción significativa de intercambio de cromátidas hermanas y de micronúcleos en cultivo de linfocitos

periféricos humanos coincubados con 0.1 y 0.5 mg/L de imidacloprid por 48 h y mayor fragmentación del ADN de los linfocitos humanos expuestos con 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5 mg/L<sup>-1</sup> de imidacloprid por 24 h.

Green et al. (2005a, 2005b) publican incidencia significativa de tumores en hígado de ratones hembras y machos tratadas con el insecticida neonicotinoide tiametoxam y dos de sus metabolitos.

Karabay y Oguz (2005), muestran incremento significativo en la tasa de mutación reversa de las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella thyphymurium* a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 µg/lplaca de imidacloprid con y sin activación metabólica con la mezcla S9 y aumento significativo de aberraciones cromosómicas y micronúcleos, en células de médula ósea y eritrocitos, respectivamente, de rata Winstar alimentadas diariamente con croquetas tratadas con 50 y 100 mg/kg peso corporal del mismo insecticida.

Demsia et al. (2007) corroboran que el imidacloprid es positivo para micronúcleos en eritrocitos policromáticos de ratas tratadas con 300 mg/kg de peso corporal y en linfocitos humanos en cultivo expuestos a 0.1, 1, 5, 50 y 100 µg/mL de insecticida, sin embargo en el caso de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas la prueba es negativa con relación al testigo a las mismas concentraciones.

Kocaman y Topaktas (2007) encontraron producción significativa de intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos y aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos humanos coincubados por 24 y 48 h con 30, 35 y 45 µg/mL del insecticida neonicotinoide acetamiprid. La viabilidad celular no fue alterada con ninguna concentración del insecticida.

Costa et al. (2009), evidencian que el insecticida neonicotinoide imidacloprid puro y comercial (Confidor 200SL), incrementan significativamente la frecuencia de micronúcleos en los linfocitos humanos en cultivo coincubados con 20 µM de imidacloprid comercial con y sin activación metabólica S9 por 24 h y generan daño en el ADN evidenciado por el ensayo cometa en leucocitos incubados con las mismas concentración del imidacloprid comercial (Confidor 200 SL) y del producto puro. Al comparar el efecto genético *in vitro* de ambas presentaciones del imidacloprid se observa que el insecticida comercial Confidor induce mayor

aumento de MN, siendo más genotóxico que la sustancia pura, pero ninguno de los compuestos son agentes citotóxicos en ambos sistemas de prueba.

Gómez-Eyles et al. (2009) encuentran disminución en la reproducción de *Caenorhabditis elegans* y de *Eisenia fetida* expuestos por 14 días a concentraciones de 20 y 50 mg/kg<sup>-1</sup> de los insecticidas neonicotinoides imidacloprid y tiacloprid.

El mecanismo molecular de genotoxicidad de los insecticidas cloropiridinil-neonicotinoides, como el imidacloprid, acetamiprid y tiacloprid, es desconocido. Sin embargo, este grupo de insecticidas tienen en común el grupo 6-cloro-piridinilmetil y difieren en el radical nitroguanidina y cianoguanidina en la porción acíclica o cíclica (Fig. 2). Se sugiere entonces, que el tiacloprid interactúa con el ADN, ocasionado su fragmentación como ha sido observado para los insecticidas imidacloprid y acetamiprid en células humanas *in vitro*.

Por otra parte, en las últimas décadas se han reportado grandes abusos en el empleo de los piretroides hacia el hombre y en animales domésticos, esto por su rápida degradación en el ambiente, poca persistencia, rápido metabolismo en los animales y por ser menos tóxicos para mamíferos, esta clase de plaguicidas están sustituyendo a los organofosforados, organoclorados y carbamatos. Por ejemplo, el insecticida permetrina es constituyente de champus y lociones para el combate de piojos, pulgas y otros ectoparásitos. Por cromatografía líquida de alta resolución, se han cuantificado residuos de insecticidas piretroides en miel de abeja, en agua de consumo humano y en diferentes vegetales comestibles, así como en orina de niños y adultos que viven en diferentes ciudades de EUA se han identificado metabolitos de los piretroides ciflutrina, deltametrina y cipermetrina (Heudorf y Angerer 2001) y en trabajadores agrícolas se han observado síntomas clínicos de toxicidad vía inhalación y exposición dérmica (Laskoswky 2002).

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro*, evidencian que los piretroides son neurotóxicos (Wolansky y Harrill 2008), inmunosupresores (Duramad et al. 2007), disruptores endócrinos (Chen et al. 2002; Mani et al. 2002; Xu et al. 2006; Pine et al. 2008), alteran la fertilidad animal (Bian et al. 2004; Xia et al. 2004; 2008), entre

otros. Numerosos estudios han demostrado sus acciones genotóxica y carcinógena (Ishmael y Litchfield 1988; Cabral y Galendo 1990; Shukla et al. 2002). El fenvalerato, la deltametrina, la cipermetrina y la  $\lambda$ -cialotrina aumentan significativamente la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de rata y ratón. (Bhunya y Pati 1988; Benova et al. 1989; Ghosh et al. 1992; Amer et al. 1993; Gandhi et al 1995; Çelik et al. 2003, 2005a,b); en eritrocitos del pez *Cheiroden interruptus interruptus* (Campana et al. 1999); en eritrocitos de ajolotes de *Rana temporaria* y *Xenopus leavis* (Rudek y Rosek 1992), además inducen aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas en diferentes líneas celulares humanas *in vivo* e *in vitro* (Puig et al. 1988; Caballo et al 1992; Amer et al. 1993; Naravaneni y Jamil 2005; Undeđer y Başaran 2005; Suman et al. 2006; Chauhan et al. 1997; 1999; 2007) y en plantas (Chauhan et al. 1986; Saxena et al. 2005; Chauhan et al. 2005). La  $\alpha$ -cipermetrina y supermetrina son positivas para micronúcleos en cultivo de linfocitos humanos (Surrallés et al. 1995; Kocaman y Topaktas 2009); la permetrina induce genotoxicidad en células primarias de mucosa nasal humanas (Tisch et al. 2002), el fenvalerato disminuye la mitosis en linfocitos humanos (Carbonell et al. 1989; Chauhan et al. 2007), en células CHO en cultivo (Hadnagy et al. 1999) y en células de meristemos apicales de *Allium cepa*, *Hordeum vulgare* y *Vicia faba* (Saxena et al. 2005; Singh et al. 2008); la deltametrina es positiva para la inducción de micronúcleos en células de médula ósea de ratón (Gandhi et al. 1995). El clorpirifos y la cipermetrina forman adúctos en el ADN de hepatocitos de ratón (Cui et al. 2006). La cipermetrina aumenta significativamente la fragmentación del ADN en cerebro, hígado, riñón, pulmón, médula ósea y en linfocitos periféricos de ratón (Patel et al. 2006) y en células CHO *in vitro* (Patel et al. 2007). El bifentrin, piretroide de recién producción, es citotóxico y genotóxico en la línea celular FL de amniocitos humanos *in vitro* (Liu et al. 2008).

Para el caso del insecticida piretroide ciflutrina son escasos los ensayos genéticos y no hay investigaciones para los diasterómeros de la  $\beta$ -ciflutrina. Nadda et al. (2005) reportan reducción en el



desarrollo y el crecimiento de las larvas mutantes sepia y blanca de *Drosophila melanogaster* expuestas al insecticida comercial Bulldock 025 SC ( $\beta$ -ciflutrina). Tisch et al. (2005), muestran aumento significativo de daño en el ADN de células epiteliales de la mucosa nasal humana coincubadas con 0.05, 0.1, 0.5, 0.75 y 1.0 mM del isómero transfluthrin y de ciflutrina por 1 h mediante el ensayo cometa alcalino. Ila et al. (2008), encuentran que la ciflutrina no es mutagénica en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* a concentraciones de 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000  $\mu\text{g/mL}$  de placa de compuesto sintético puro (CAS no. 8359-37-5), con y sin activación metabólica con la mezcla S9 y no modifica la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos periféricos humanos *in vitro*. Sin embargo, aumenta significativamente las aberraciones cromosómicas y los micronúcleos en cultivo de linfocitos humanos coincubados con 500, 1000 y 2000  $\mu\text{g/mL}$  y con 1000-5000  $\mu\text{g/mL}$  del compuesto por 48 h respectivamente. Estos datos apoyan los resultados obtenidos en este trabajo, en el cual se evidencia que el insecticida comercial Bulldock 125 SC con el estereoisómero  $\beta$ -ciflutrina, que a concentraciones de 6.25-75 mg/mL induce daño al ADN de las células humanas *in vitro* y a concentraciones mayores de 75 mg/mL, disminuye significativamente la viabilidad de los linfocitos humanos hasta ocasionar muerte celular por toxicidad, estos resultados concuerdan con los reportados para la ciflutrina que a concentraciones mayores de 0.1 mM disminuye el índice mitótico y la viabilidad de células de mucosa nasal humana en cultivo (Tisch et al. 2005) y para otros piretroides en diferentes líneas celulares *in vitro* (Carbonell et al. 1989; Puig et al. 1988; Caballo 1992; Ghosh et al. 1992; Dianovsky y Sivikova 1995; Hadnagy et al. 1999; Agarwal et al. 1994; Liu et al. 2008).

Al comparar la actividad genotóxica de los dos insecticidas, el neonicotinoide Calypso y el piretroide Bulldock, observamos que Calypso produce mayor fragmentación del genoma humano y no es citotóxico, mientras que el piretroide Bulldock es genotóxico y citotóxico para los linfocitos humanos *in vitro*. La composición de los componentes de la mezcla comercial de cada clase de insecticida, así como, la concentración de los principios activos  $\beta$ -ciflutrina y tiacloprid, determinan sus actividades tóxicas sobre las

células humanas *in vitro*, reflejándose en la sensibilidad y grado de daño sobre el ADN y su repercusión sobre la viabilidad celular.

El análisis de regresión de los datos promedios de la frecuencia de células con cometa y de la longitud de sus caudas revela curvas distintas para los dos insecticidas, para Calypso 480 SC la pendiente de la curva es exponencial, con una relación de concentración-efecto, mientras que para Bulldock 125 SC es parabólica, comportamiento similar al piretroide ciflutrina (Ila et al. 2008).

Algunos estudios reportan un mecanismo molecular similar de genotoxicidad de los insecticidas piretroides deltametrina, cipermetrina, permetrina y ciflutrina, los cuales tienen una estructura química en común y difieren solamente en el grupo químico sustituyente en el carbón bencílico (Figs. 4 y 5), por otra parte los enantiómeros han resultado ser más genotóxicos que sus moléculas originales, asimismo todos estos piretroides inducen estrés oxidante y formación de especies reactivas al oxígeno (EROs), implicados en la inducción del daño genético en células de mamífero *in vivo* e *in vitro* (Kale et al. 1999; Giray et al. 2001; El-Demerdash et al. 2004; Prasad et al. 2005; Yousef et al. 2006). Además está documentada la relación entre la formación de EROs y las alteraciones del genoma, lo cual puede ocasionar rompimientos en sus cadenas y mutaciones (Zegura et al. 2004). Los insecticidas permetrina, cipermetrina y ciflutrina son químicamente similares (Fig. 5) y se ha sugerido que interaccionan con las bases citosina y timina del ADN, lo cual está relacionado con la producción de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos en plantas y en células de mamífero *in vitro* (Giray et al. 2001; Saxena et al. 2005). Para el caso de la  $\beta$ -ciflutrina, esteroisómeros de la ciflutrina, no hay investigaciones sobre sus efectos genéticos, sin embargo, hipotetizamos que al igual que la ciflutrina, el mecanismo primario de inducción del daño sobre el ADN en los linfocitos humanos *in vitro* por la  $\beta$ -ciflutrina, sea a través de la producción de EROs, ya que recientemente se ha observado que la ciflutrina genera estrés oxidante medido por la presencia de lípidos peroxidados, entre otros factores, en la carpa *Cyprinus carpio* L (Das et al. 2009) ó vía interacción con el ADN, lo cual debe investigarse y comprobarse.

Por otro lado, cabe mencionar que recientemente se ha comprobado que los insecticidas neonicotinoides y piretroides son absorbidos por las raíces de las plantas y transportado a otros órganos, lo cual representa una ruta importante de exposición a genotoxinas vía cadena alimenticia. Ford y Casida (2008), muestran el mecanismo de biotransformación vegetal *in vivo* de diversos neonicotinoides entre los que se encuentran el imidacloprid y tiacloprid, siendo las principales reacciones metabólicas nitrorreducción, desmetilación, sulfoxidación, hidroxilación, muy similares al metabolismo animal *in vivo* (Ford y Casida 2006a; 2006b). Los sulfóxidos-tiacloprid y ureas son los metabolitos primarios más abundantes. Varias investigaciones han mostrado que los sulfóxidos de plaguicidas pueden interactuar con macromoléculas celulares como el ADN ocasionando daño al genoma humano (Calderón-Segura et al. 1999, 2007; Sandermann 1992), considerado como otro factor de riesgo adicional para la salud humana y animal. Ya que se ha sugerido que al consumir carne, leche y vegetales comestibles con residuos de plaguicidas y/o sus metabolitos podrían ser biotransformados y/o activados por las enzimas del tracto digestivo, interaccionando con macromoléculas celulares como el ADN y ARN ocasionando alteraciones moleculares, celulares y diversas enfermedades.

En resumen, esta investigación revela los efectos genotóxico y citotóxico de nuevos insecticidas comerciales piretroide Bulldock 125 SC ( $\beta$ -ciflutrina) y neonicotinoide Calypso 480 SC (tiacloprid) y su repercusión en la viabilidad de los linfocitos humanos *in vitro* a concentraciones menores comparadas con las aplicadas en los campos agrícolas, los cuales son de gran relevancia científica ya que contribuye con el conocimiento sobre la toxicidad de estos compuestos químicos.

## IX CONCLUSION

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

1. El neonicotinoide Calypso 480 SC (tiacloprid) y el piretroide Bulldock 125 SC ( $\beta$ -ciflutrina), son agentes genotóxicos para los linfocitos humanos *in vitro* con una relación de concentración-efecto.
2. El insecticida neonicotinoide Calypso 480 SC, induce mayor daño al ADN que el piretroide Bulldock 125 SC, observado por la frecuencia de cometas y la longitud de la cauda.
3. La viabilidad de los linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de Calypso no se modifica, sin embargo, a concentraciones mayores de 75 mg/mL del piretroide Bulldock 125 SC la viabilidad disminuye significativamente hasta ocasionar muerte celular por toxicidad.
4. Este trabajo aporta evidencias de la producción del daño sobre el ADN en los linfocitos periféricos humanos *in vitro* por nuevos insecticidas comerciales como el neonicotinoide Calypso 480 SC y el piretroide Bulldock 125 SC.

## X REFERENCIAS

- Agarwal DK, Chauhan LKS, Gupta SK, Sundararaman V. (1994). Cytogenetic effects of deltamethrin on rat bone marrow. *Mutat. Res.* 311: 133-138.
- Alavanja M, Dosemeci M, Samanic C, Lubin J, Lynch C, Knott C, Barker J, Hoppin JA, Sandler DP, Coble J, Thomas K, Blair A. (2004). Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. *Am. J. Epidemiol.* 160: 876-885.
- Altman SA, Randers L, Rao G. (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol. Prog.* 9: 671-674.
- Amer SM, Ibrahim A, El-Sherbeny KM. (1993). Induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in vivo and in vitro by the insecticide cypermethrin. *J. App. Toxicol.* 13: 341-345.
- Avishai N, Rabinowitz C, Rinkevich B. (2003). Use of the comet assay for studying environmental genotoxicity: comparisons between visual and image analyses. *Environ. Mol. Mutagen.* 42: 155-165.
- Badii M, Garza V, Landeros J. (2006). Efecto de los plaguicidas en la fauna silvestre. *CUICYT.* 14-15: 22-44.
- Barberá C. (1989a). Los pesticidas agrícolas y su formulación. En: Pesticidas agrícolas. Cap.1. Omega, Barcelona, pp. 9- 26.
- Barberá C. (1989b). Insecticidas piretroides. En: Pesticidas agrícolas. Cap. 10. Omega, Barcelona, pp. 202-216.
- Bayer CropScience México. (2008). <http://www.bayercropscience.com.mx/>.(2008).
- Benova DK, Rupova IM, Iagova AKh, Bineva MV. (1989). Mutagenic effect of pesticides fastac 10 EK and durs ban 4E studied in a micronucleus test in mouse bone marrow cells. *Genetika* 25: 2266-2268.

- Bhunya SP, Pati PC. (1988). Genotoxic effects of a synthetic pyrethroid insecticide, cypermethrin, in mice in vivo. *Toxicol. Lett.* 41: 223-230.
- Bian Q, Xu LC, Wang SL, Xia YK, Tan LF, Chen JF. (2004). Study on the relationship between occupational fenvalerate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occup. Environ. Med.* 61: 999-1005.
- Bolboaca SD, Jäntschi L. (2005). Molecular descriptors family on structure activity relationships 2. insecticidal activity of neonicotinoid compounds. *Leonardo J. Sci.* 4: 78-85.
- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543: 251-272.
- Bull S, Fletcher K, Boobis AR, Battershill JM. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis* 21:93-103.
- Caballo C, Herrera A, Barrueco C, Santa-Maria A, Sanz F, De La Peña E. (1992). Analysis of cytogenetic damage induced in CHO cells by the pyrethroid insecticide fenvalerate. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 12: 243-249.
- Cabral JRP, Galendo D. (1990). Carcinogenicity study of the pesticide fenvalerate in mice. *Cancer. Lett.* 49: 13-18.
- Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Espinosa-Ramírez M. (1999). In vivo and in vitro promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 13: 438:81-88
- Calderón-Segura ME, López L, Zúñiga R, Sanchez J, Gómez S, Villalobos R, Molina B, Frías S. (2007). Metabolic activation of herbicides products by *Vicia faba* detected in human peripheral lymphocytes using alkaline single cell gel electrophoresis. *Toxicol. In Vitro* 19: 243-251.

- Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ, Dulout FN. (1999). Genotoxic evaluation of the prethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of fish *Cheirodon interruptus*. *Mutat. Res.* 438: 155-161.
- Carbonell E, Puig M, Xamena N, Creus A, Marcos R. (1989). Mitotic arrest induced by fenvalerate in human lymphocyte cultures. *Toxicol. Lett.* 48: 45-48.
- Çelik A, Mazmanci B, ÇamLica Y, Askin A, Çömelekoglu U. (2003). Cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. *Mutat. Res.* 539: 91-97.
- Çelik A, Mazmanci B, ÇamLica Y, Çömelekoglu U, Askin A. (2005a). Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow by gavage administration. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61: 128-133.
- Çelik A, Mazmanci B, CamLica Y, Askin A, Cömelekoglu U. (2005b). Induction of micronuclei by lambda-cyhalothrin in Wistar rat bone marrow and gut epithelial cells. *Mutagenesis* 20:125-129.
- Chauhan LKS, Agarwal DK, Sundararaman V. (1997). In vivo induction of sister chromatid exchanges in mouse bone marrow following oral exposure to commercial formulations of alpha-cyano pyrethroids. *Toxicol. Lett.* 93:153-157.
- Chahuan LKS, Chandra S, Saxena PN, Gupta SK. (2005). In vivo cytogenetic effects of a commercially formulated mixture of cypermethrin and quinalphos in mice. *Mutat. Res.* 587: 120-125.
- Chauhan LKS, Dikshith TSS, Sundararaman V. (1986). Effect of deltamethrin on plant cells. I. Cytological effects of Deltamethrin on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Mutat. Res.* 171: 25-30.
- Chauhan LKS, Kumar M, Paul BN, Goel SK, Gupta SK. (2007). Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoproturon on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 48: 636-643.
- Chauhan LKS, Saxena PN, Gupta SK. (1999). Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environ. Exp. Bot.* 42: 181-189.

- Chen HY, Xiao JG, Hu G, Zhou JW, Xiao H, Wang XR. (2002). Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 65:1419-1435.
- Choi JS, Soderlund DM. (2006). Structure-activity relationships for the actions of 11 pyrethroids insecticides on rat Nav1.8 sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211: 233-244.
- Costa C, Silvari V, Melchioni A, Cataniab S, Heffronc JJ, Trovato A, De Pasquale R. (2009). Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat. Res.* 672: 40-44.
- Cui Y, Guob J, Xua B, Chena Z. (2006). Potential of chlorpyrifos and cypermethrin forming DNA adducts. *Mutat. Res.* 604: 36-41.
- Demsia G, Vlastos D, Goumenou M, Matthopoulos DP. (2007). Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. *Mutat. Res.* 634: 32-39.
- Dianovsky J, Sivikova K. (1995). In vivo and in vitro cytogenetic effect of supermethrin. *Biomed. Environ. Sci.* 8: 359-366.
- Duramad P, Tager IB, Holland NT. (2007). Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. *Toxicol. Lett.* 172: 48-59.
- El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. (2004). Role of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hematobiochemical parameters and semen quality of male rats. *J. Environ. Sci. Health B.* 39: 443-459.
- Engel LS, Hill DA, Hoppin JA, Lubin JH, Lynch CF, Pierce J, Samanic C, Sandler DP, Blair A, Alavanja MC. (2005). Pesticide use and breast cancer risk among farmer's wives in the agricultural health study. *Am. J. Epidemiol.* 161: 121-135.



EPA (Environmental Protection Agency, USA). (2003). Tiacloprid; pesticide tolerance. Fed.Reg. 68: 55503-55513.

EPA (Environmental Protection Agency, USA). (2005). Cyfluthrin; pesticide tolerance. Fed.Reg. 70: 53944-53953.

European commission Directorate general health for health and consumer protection (2002). Review report for the active substance *beta*-cyfluthrin. [http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/ph\\_ps/pro/eva/existing/list1\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/ph_ps/pro/eva/existing/list1_en.htm). (2009).

FAO (Food and agriculture organization of the united nations). (1999). FAO specifications and evaluations for plant protection products: beta-cyfluthrin, pp. 19.

FAO/WHO (2001). Amount of poor-quality pesticides sold in developing countries alarmingly high, press release, 1 February. <http://www.who.int/inf-pr-2001/en/pr2001-04.html>. (2009).

Fairbairn W, Olive P, O'Neill K. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339: 37-45.

Feng S, Kong Z, Wang X, Zhao L, Peng P. (2004). Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana n. hallowell*. *Chemosphere* 56: 457-463.

Feng S, Kong Z, Wang X, Peng P, Zeng EY. (2005). Assessing the genotoxicity of imdacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic test. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 61: 239-246.

Ferrer A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales. Sis. San Navarra* 26: 155-171.

Ford KA, Casida JE. (2006a). Chloropyridinyl neonicotinoid insecticides: diverse molecular substituents contribute to facile metabolism in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 944-951.

Ford KA, Casida JE. (2006b). Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 1549-1556.

Ford KA, Casida JE. (2008). Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10168-10175.

- Forshaw PJ, Ray DE. (1993). A voltage-dependent chloride channel in niel 15 neuroblastoma cells is inactivated by protein kinase C and also by the pyrethroid deltamethrin. *J Physiol.* 467: 252.
- Gandhi G, Chowdhury J, Sareen P, Dhillon V. (1995). Genotoxic effects of deltamethrin in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat. Res.* 346: 203-206.
- García JE. (1998). Intoxicaciones agudas con plaguicidas: costos humanos y económicos. *Pan. Am. J. Pub. Health* 4: 383-387.
- Giray B, Gurbay A, Hincal F. (2001). Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicol. Lett.* 118: 139-146.
- Ghosh AK, Sharma A, Talukder G. (1992). Cytotoxic effects of sumicidin, a type II synthetic pyrethroid, on mice in vivo at 6, 12 and 24 h after exposure. *Cytobios* 71: 85-91.
- Gómez-Arroyo S, Calderón ME, Cortés J, Villalobos R, Flores S. (2006). Contribución del metabolismo vegetal sobre el efecto genotóxico de plaguicidas. En: Tópicos de Genética. Sociedad Mexicana de Genética y la Universidad Autónoma del Estado de México, pp. 95-118.
- Gomez-Eyles JL, Svendsen C, Lister L, Martin H, Hodson ME, Spurgeon DJ. (2009). Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and tiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 71–79.
- González M, Capote B, Rodríguez E. (2001). Mortalidad por intoxicaciones agudas causadas por plaguicidas. *Rev. Cubana Higiene Epidemiol.* 39: 136-43.
- Green T, Toghil A, Lee R, Waechter F, Weber E, Noakes J. (2005a). Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 1: mode of action studies in the mouse. *Toxicol. Sci.* 86: 36-47.
- Green T, Toghil A, Lee R, Waechter F, Weber E, Peffer R, Noakes J, Robinson M. (2005b). Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 2: species differences in response. *Toxicol. Sci.* 86: 48-55.

- Hadnagy W, Seemayer NH, Kuhn KH, Leng G, Idel H. (1999). Induction of mitotic cell division disturbances and mitotic arrest by pyrethroids in V79 cell cultures. *Toxicol. Lett.* 107: 81-87.
- Hellman B, Vaghef H, Boström B. (1995). The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 336:123-131.
- Hernández M, Jiménez C. (2007). Caracterización de las intoxicaciones agudas por plaguicidas: perfil ocupacional y conductas de uso de agroquímicos en una zona agrícola del estado de México, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23: 159-167.
- Heudorf U, Angerer J. (2001). Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environ. Health. Perspect.* 109: 213-217.
- Idrovo AJ. (1999). Intoxicaciones masivas con plaguicidas en Colombia. *Biomédica (Bogota)* 19: 67-76.
- Ihara M, Shimomura M, Ishida C, Nishiwaki H, Akamatsu M, Sattelle DB, Matsuda K. (2007). A hypothesis to account for the selective and diverse actions of neonicotinoid insecticides at their molecular targets, nicotinic acetylcholine receptors: catch and release in hydrogen bond networks. *Invert. Neurosci.* 1: 47-51.
- Ila H, Topaktas M, Rencuzogullari E, Kayraldiz A, Donbak L, Kenan Y. (2008). Genotoxic potential of cyfluthrin. *Mutat. Res./ Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* 656: 49-54.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). (1998). Informe 1997. Estadística del medio ambiente. México.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). (2008). <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mamb91&c=6102>. (2009)
- Ishmael J, Litchfield MH. (1988). Chronic toxicity and carcinogenic evaluation of permethrin in rats and mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 11: 308-322.

- Kale M, Rathore N, Jone S, Bhatnagar D. (1999). Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen specie. *Toxicol. Lett.* 105: 197-205.
- Kamrin MA. (1997). Introduction and profile description. En: Pesticide profiles: toxicity, environmental impact, and fate. Cap. 1. Lewis, pp: 3-11.
- Kaneko H, Miyamoto J. (2001). Pyrethroids Chemistry and Metabolism. En: Handbook of Pesticide Toxicology, Agents. Vol. 2. Cap. 58. Academ. Press, pp. 1263-1288.
- Karabay UN, Oguz MG. (2005). Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides imidacloprid and methamidophos. *Genet. Mol. Res.* 4: 653-662.
- Kocaman AY, Topaktas M. (2007). In vitro evaluation or the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 48: 483-490.
- Kocaman A. Topaktas M. (2009). The in vitro genotoxic effects of a commercial formulation of  $\alpha$ -cypermethrin in human peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 50: 27-36.
- Laskowski DA. (2002). Physical and chemical properties of pyrethroids. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 174: 49-170.
- Liu W, Gan J. (2004). Separation and analysis of diastereomers and enantiomers of cypermethrin and cyfluthrin by gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 52: 755-761.
- Liu W, Quin S, Gan J. (2005). Chiral stability of synthetic pyrethroid insecticides. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3814-3820.
- Liu H, Zhao M, Zhang C, Ma Y, Liu W. (2008). Enantioselective cytotoxicity of the insecticide bifenthrin on a human amnion epithelial (FL) cell line. *Toxicology* 253: 89-96.
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 573-580.

- Mani U, Islam F, Prasad AK, Kumar P, Suresh Kumar V, Maji BK. (2002). Steroidogenic alterations in testes and sera of rats exposed to formulated fenvalerate by inhalation. *Hum. Expl. Toxicol.* 21: 593-597.
- Mansour SA. (2004). Pesticide exposure- egyptian scene. *Toxicology* 198: 91-115.
- McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a european review. *Mutat. Res.* 288: 47-63.
- Meacham C, Brodfuehrer P, Watkins J, Shafer T. (2008). Developmentally-regulated sodium channel subunits are differentially sensitive to  $\alpha$ -cyano containing pyrethroids. *Tox. App. Pharm.* 231: 273-281.
- Mense SM, Sengupta A, Lan C, Zhou M, Bentsman G, Volsky DJ, Whyatt RM, Perera FP, Zhang L. (2006). The common insecticides cyfluthrin and chlorpyrifos alter the expression of a subset of genes with diverse functions in primary human astrocytes. *Toxicol. Sci.* 93: 125-135.
- Millar NS, Denholm I. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert. Neurosci.* 1: 53-66.
- Mino CP, Bustamante G, Sanchez ME, Leone P. (2002). Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environ. Health Perspect.* 110: 1077-1080.
- Nadda G, Saxena PN, Srivastava G. (2005). Effects of beta-cyfluthrin on white and sepia mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Environ. Biol.* 26: 363-367.
- National Potato Council. (2006). [www.nationalpotatocouncil.org/NPC/p\\_documents/document\\_280607084102.pdf](http://www.nationalpotatocouncil.org/NPC/p_documents/document_280607084102.pdf). (2009)
- NRAAVC (National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals). (2001). Evaluation of the new active tiacloprid in the new product Calypso 480 SC insecticide. NRA, Canberra.
- Naravaneni R, Jamil K. (2005). Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on human lymphocytes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19: 304-310.

- Östling O y Johanson KJ. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 291-298.
- Patel S, Bajpayee M, Pandey A, Parmar D, Dhawan A. (2007). In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicol. in Vitro* 21: 1409-1418.
- Patel S, Pandey A, Bajpayee M, Parmar D, Dhawan A. (2006). Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. *Mutat. Res.* 607: 176-183.
- Pine MD, Hiney JK, Lee B, Les Dees W. (2008). The pyrethroid pesticide esfenvalerate suppresses the afternoon rise of luteinizing hormone and delays puberty in female rats. *Environ. Health Perspect.* 116: 1243-1247.
- Perry AS, Yamamoto I. (1997). Introduction. En: Insecticides in agriculture and environment: retrospects and prospects. Cap. 1. Springer, Berlín, pp.1-3.
- Prasamthi K, Muralidhara-Rajini PS. (2005). Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food Chem. Toxicol.* 43: 299-306.
- Puig M, Carbonell E, Xamena N, Creus A, Marcos R. (1988). Analysis of cytogenetic damage induced in cultured human lymphocytes by the pyrethroid insecticides cypermethrin and fenvalerate. *Mutagenesis* 4: 72-74.
- Ray D. (2001). Pyrethroids insecticides: mechanisms of toxicity , systemic poisoning syndromes, paresthesia and therapy. En: Handbook of pesticide toxicology, agents. Vol 2. Cap. 59. Academic Press, pp. 1281-1303.
- Ray D, Forshaw PJ. (2000). Pyrethroid insecticides: poisoning syndromes, synergies, and therapy. *Clin. Toxicol.* 38: 95-101.
- Reigart RJ, Roberts RJ. (1999). Herbicidas Nitrofenólicos y Nitrocresólicos. En: Reconocimiento y Manejo de los Envenenamientos por Pesticidas. Cap. 11. EPA, pp. 118-121.

- Restrepo I. (1992). Algunos impactos de los plaguicidas en el ser humano y el ambiente. En: Los plaguicidas en México. Comisión Nacional de Derechos Humanos México. Amanuense, pp. 35-74.
- Rojas E, Lopez MC, Valverde M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J. Chromatogr. B. 722: 225-254.
- Rudek Z, Rozek M. (1992). Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* and *Xenopus laevis* by the pyrethroid fastac 10 EC. Mutat. Res. 298: 25-29.
- SS (Secretaría de Salud). (1993). Anuario estadístico. Dirección general de estadística, informática y evaluación. Octubre.
- Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Vuyyuri SB, Danadevi K, Hussain S, Grover P. (2006). Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. Mutat. Res. 609: 74-80.
- Sandermann H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. Trends Biochem. Sci. 17: 82-84.
- Saxena PN, Chauhan LKS, Gupta SK. (2005). Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. Toxicology 216: 244-252.
- Schulz-Jander D, Casida J. (2002). Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. Toxicol. Lett. 132: 65-70.
- Sepici-Dinçel A, Çağlan K, Selvi M, Sarikaya R, Sahin D, Ayhan O, Erkoç F. (2009). Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72:1433-1439.
- Shafer T, Meyer D, Crofton K. (2005). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. Environ. Health. Perspect. 113: 123-136.
- Shukla Y, Yadav A, Arora A. (2002). Carcinogenic and cocarcinogenic potential of cypermethrin on mouse skin. Cancer Lett. 182: 33-41.

- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Singh NP, Srivastava AK, Singh AK. (2008). Cell cycle stage specific application of cypermethrin and carbendazim to assess the genotoxicity in somatic cells of *hordeum vulgare l.* *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81: 258-261.
- Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargen D, Stevens JT, Weiner ML. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicol.* 171: 3-59.
- Soderlund DM, Bloomquist JR. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroids insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 77-96.
- Speit G, Hartmann A. (2005). The comet assay (single-cell gel test). a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 113: 203-212.
- Sudakin DL. (2006). Pyrethroid insecticides: advances and challenges in biomonitoring. *Clin. Toxicol.* 44: 31-37.
- Suman G, Naravaneni R, Jamil K. (2006). In vitro cytogenetic studies of cypermethrin on human lymphocytes. *Indian. J. Exp. Biol.* 44: 233-239.
- Surrallés J, Carbonell E, Puig M, Xamena N, Creus A, Marcos R. (1990). Induction of mitotic micronuclei by the pyrethroid insecticide fenvalerate in cultured human lymphocytes. *Toxicol. Lett.* 54: 151-155.
- Surrallés J, Xamena N, Creus A, Catalan J, Norppa H, Marcos R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in wholeblood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 341: 169-184.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221.



- Tisch M, Faulde M, Maier H. (2005). Genotoxic effects of pentachlorophenol, lindane, transfluthrin, cyfluthrin, and natural pyrethrum on human mucosal cells of the inferior and middle nasal conchae. *Am. J. Rhino.* 19: 141-151.
- Tisch M, Schmezer P, Faulde M, Groh A, Maier H. (2002). Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 259: 150-153.
- Tomizawa M, Casida JE. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 339-364.
- Tomizawa M, Casida JE. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanism of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 247-268.
- Tomizawa M, Lee D, Casida JE. (2000). Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 6016-6024.
- Undeğer U, Başaran N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch. Toxicol.* 79: 169-176.
- Vodeb L, Petanovska-Ilievska B. (2006). HPLC–DAD with different types of column for determination of  $\beta$ -cyfluthrin in pesticide formulations. *Acta Chromatograp.* 17:188-201.
- Waliszewski SM, Villalobos-Pietrini R, Gómez-Arroyo S, Infazón RM. (2003). Persistent organochlorine pesticide levels in cow's milk samples from tropical regions of Mexico. *Food Adit. Contam.* 20: 270-275.
- Whitaker G. (2004). Toxicity and Hazards of Pesticides. En: The Pesticide Book. Cap. 21. WH Freeman (ed.), pp. 233-256.
- WHO. (2003). Intensifies Commitment to Reduce Poisoning from Acute Toxic Pesticides - Closing Press Release. En: Forum IV: Global Chemicals Meeting. [http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum4/en/clos\\_pres.pdf](http://www.who.int/ifcs/documents/forums/forum4/en/clos_pres.pdf). (2009).

- Wolansky MJ, Harrill JA, (2008). Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. *Neurotoxicol. Teratol.* 30: 55-78.
- Wolansky MJ, McDaniel KL, Moser VC, Crofton KM. (2007). Influence of dosing volume, on the neurotoxicity of bifenthrin. *Neurotoxicol. Teratol.* 29: 377-384.
- Woods JA, O'Leary KA, McCarthy RP, O'Brien NM. (1999). Preservation of comets assay slides: comparison with fresh slides. *Mutat. Res.* 429: 181-187.
- Xia YK, Bian Q, Xu LC, Cheng SP, Song L, Liu JY. (2004). Genotoxic effects on human spermatozoa among pesticide factory workers exposed to fenvalerate. *Toxicology* 203: 49-60.
- Xia Y, HanY, Wu B, Wang S, Gu A, Lu N, Bo J, Song L, Jin N, Wang X. (2008). The relation between urinary metabolite of pyrethroid insecticides and semen quality in humans. *Fert. Ster.* 89: 1743-1750.
- Xu LC, Sun H, Chen JF, Bian Q, Song L, Wang XR. (2006). Androgen receptor activities of p,p 0-DDE, fenvalerate and phoxim by androgen receptor reporter gene assay. *Toxicol. Lett.* 160: 151-157.
- Yousef MI, Awad TI, Mohamed EH. (2006). Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology* 227: 240-252.
- Zang Y, Luo Y, Kong ZM. (2000). Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.* 108: 271-278.
- Zhang J, Zhu W, Zheng Y, Yang J, Zhu X. (2008). The antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides cyfluthrin and  $\beta$ -cyfluthrin. *Reprod. Toxicol.* 25:491-496.
- Zegura B, Lah TT, Filipic M. (2004). The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology* 200: 59-68.

XI TABLAS Y GRÁFICAS.

Tabla 4. Daño al ADN inducido por el insecticida neonicotinoide Calypso 480 SC en linfocitos periféricos humanos *in vitro*.<sup>a</sup>

Insecticida [mg/mL]	Porcentaje promedio de viabilidad celular <sup>a</sup>	Frecuencia promedio de células con daño al ADN (%) <sup>a</sup>	Longitud promedio de la cauda del cometa ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	Niveles de daño al ADN ( $\mu\text{m}$ ) <sup>b</sup> .				
				0	1	2	3	4
	$\bar{X} \pm E.E$	$\bar{X} \pm E.E$	$\bar{X} \pm E.E$					
00.0	98.0 $\pm$ 0.0	1 $\pm$ 0.3	0.12 $\pm$ 0.1	99	1	0	0	0
14.4	99.0 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 0.6	0.20 $\pm$ 0.1	99	1	0	0	0
24.0	99.8 $\pm$ 0.2	5 $\pm$ 1.2	2.20 $\pm$ 0.6	95	4	1	0	0
30.5	99.0 $\pm$ 0.2	46 $\pm$ 6.1**	25.50 $\pm$ 1.9*	54	17	25	3	1
33.2	98.0 $\pm$ 0.4	61 $\pm$ 0.7**	37.12 $\pm$ 1.9*	39	13	45	3	0
35.2	99.0 $\pm$ 0.5	79 $\pm$ 4.5**	50.30 $\pm$ 1.8*	21	11	64	3	1

<sup>a</sup> Promedio de tres experimentos.

<sup>b</sup> Niveles promedio de daño definidos de acuerdo con el tamaño de la cauda designados desde: 0= sin daño; 1= 1-44  $\mu\text{m}$ ; 2= 45-88  $\mu\text{m}$ ; 3= 89-132  $\mu\text{m}$ ; 4 = 133-176 (máximo daño) en 100 células consecutivas (medidas arbitrarias).

\* Diferencias significativas con respecto al testigo con F= 262.261 y p<0.05.

\*\* Diferencia significativas con respecto al testigo F= 122.73 y p<0.05.

Tabla 5. Daño al ADN inducido por el insecticida piretroide Bulldock 125 SC en linfocitos periféricos humanos *in vitro*.<sup>a</sup>

Insecticida [mg/mL]	Porcentaje promedio de viabilidad celular <sup>a</sup>	Frecuencia promedio de células con daño al ADN (%) <sup>a</sup>	Longitud promedio de la cauda del cometa ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	Niveles de daño al ADN ( $\mu\text{m}$ ) <sup>b</sup> .				
				0	1	2	3	4
	$\bar{X} \pm \text{E.E}$	$\bar{X} \pm \text{E.E}$	$\bar{X} \pm \text{E.E}$					
0.0	98 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 1.2	0.3 $\pm$ 0.2	99	1	0	0	0
6.2	98 $\pm$ 0.9	18 $\pm$ 3.8*	8.5 $\pm$ 1.2**	82	7	10	1	0
25.0	97 $\pm$ 1.0	28 $\pm$ 2.3 *	13.5 $\pm$ 1.5**	72	14	13	1	0
37.5	96 $\pm$ 1.3	30 $\pm$ 4.6*	20.4 $\pm$ 2.0**	70	6	17	7	0
50.0	96 $\pm$ 1.4	29 $\pm$ 3.8*	20.9 $\pm$ 2.1**	71	6	17	5	1
75.0	94 $\pm$ 1.1***	23 $\pm$ 0.9*	15.6 $\pm$ 1.9**	77	8	10	4	1

Muerte celular

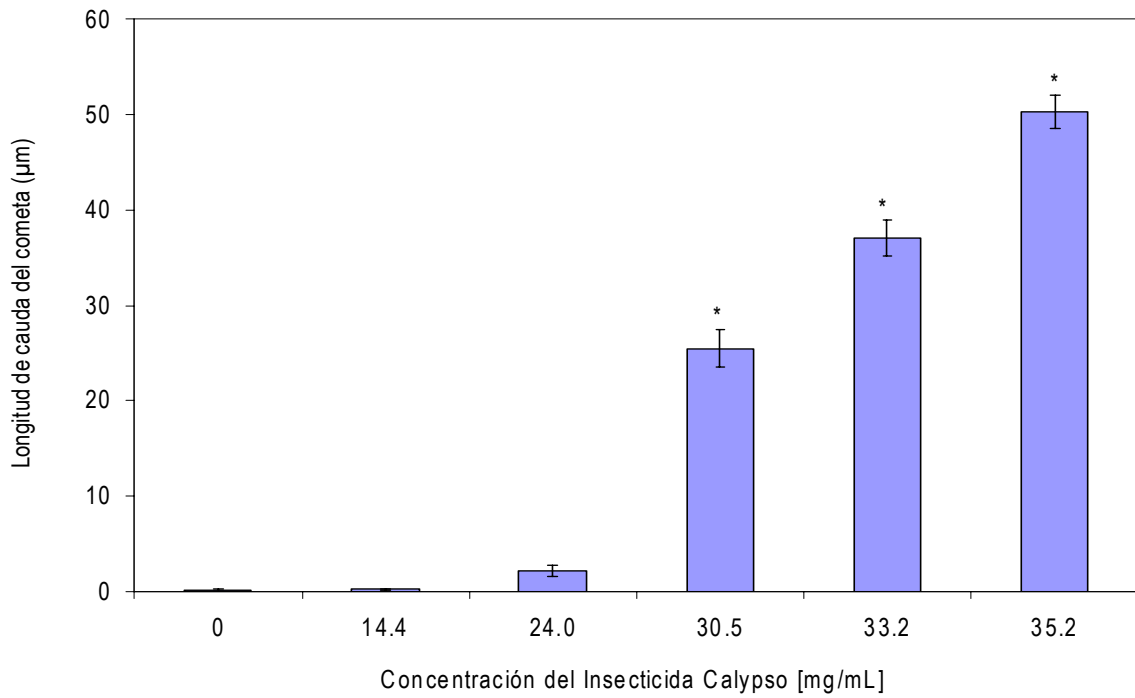
<sup>a</sup> Promedio de tres experimentos.

<sup>b</sup> Niveles promedio de daño definidos de acuerdo con el tamaño de la cauda designados desde 0= sin daño; 1= 1-44  $\mu\text{m}$ ; 2= 45-88  $\mu\text{m}$ ; 3= 89-132  $\mu\text{m}$ ; 4 = 133-176  $\mu\text{m}$  (máximo daño) en 100 células consecutivas (medidas arbitrarias).

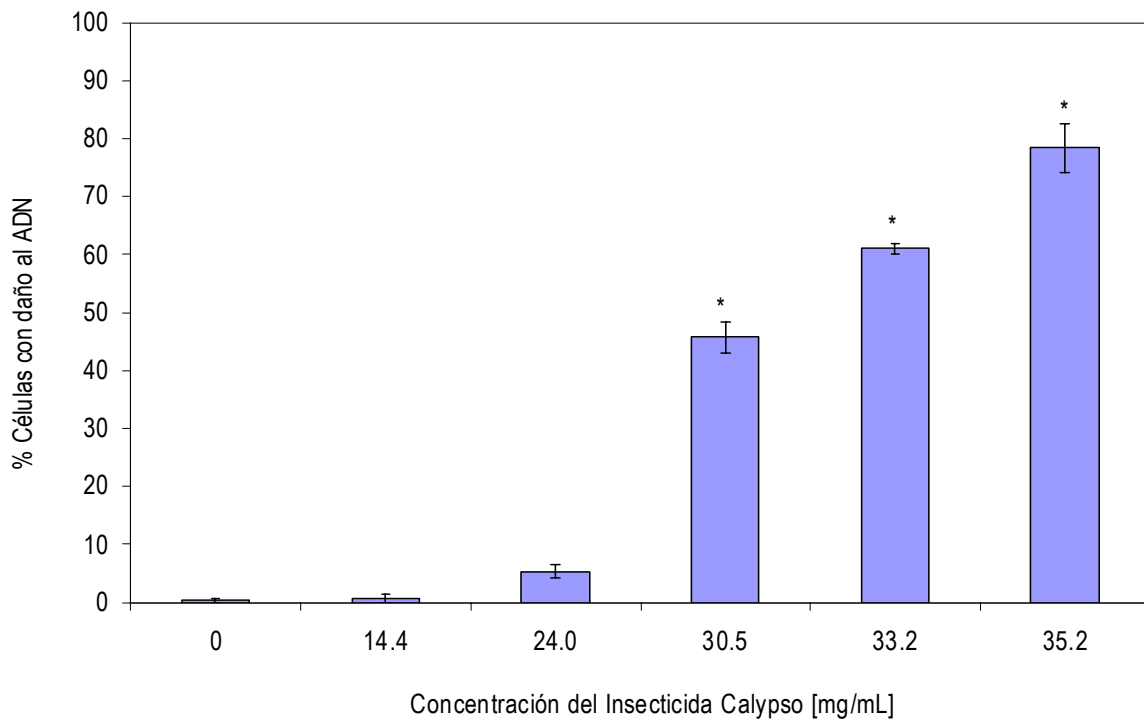
\* Diferencias significativas con respecto al testigo con F= 20.80 y p<0.05.

\*\* Diferencias significativas con respecto al testigo con F= 10.37 y p<0.05.

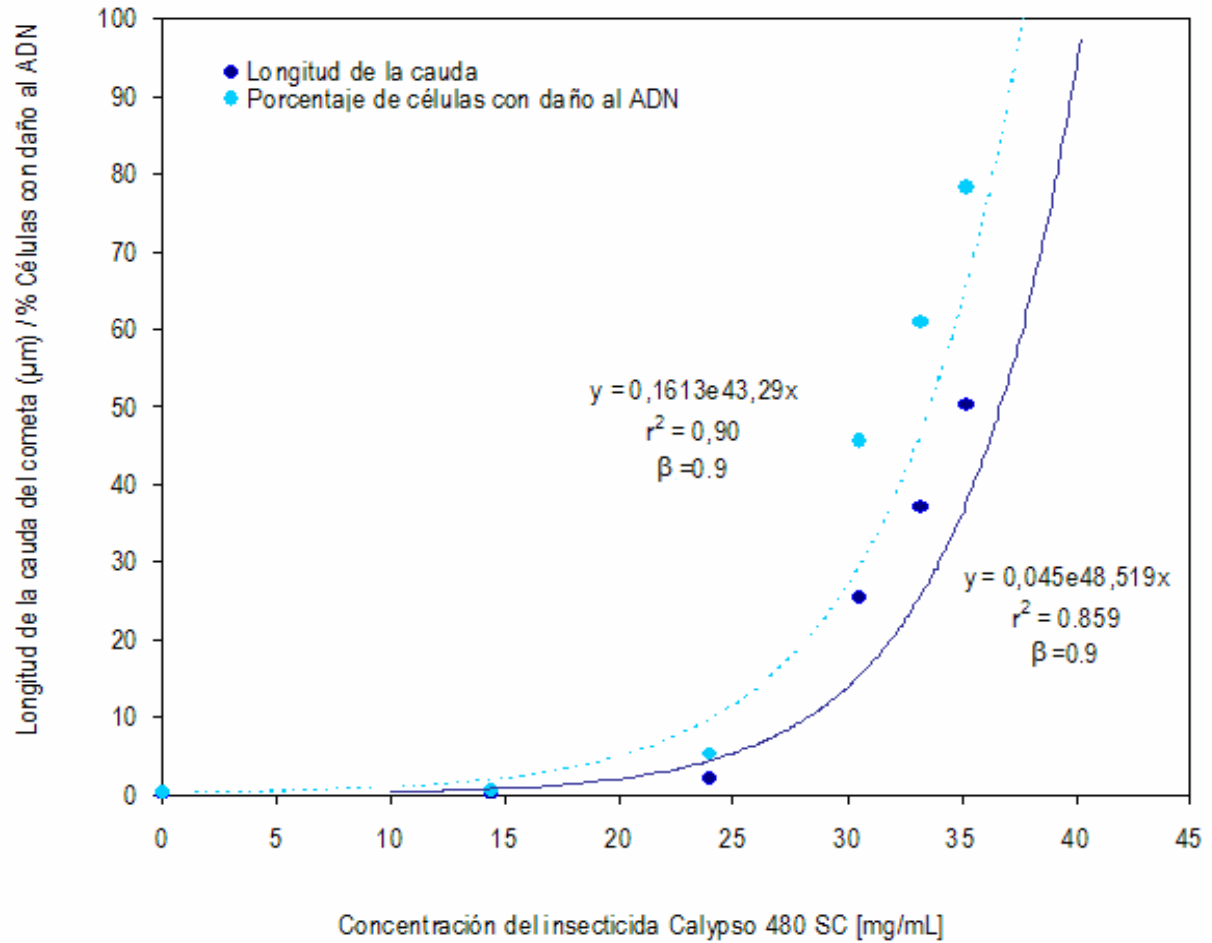
\*\*\* Diferencias significativas con respecto al testigo con F= 3.2 y p<0.05.



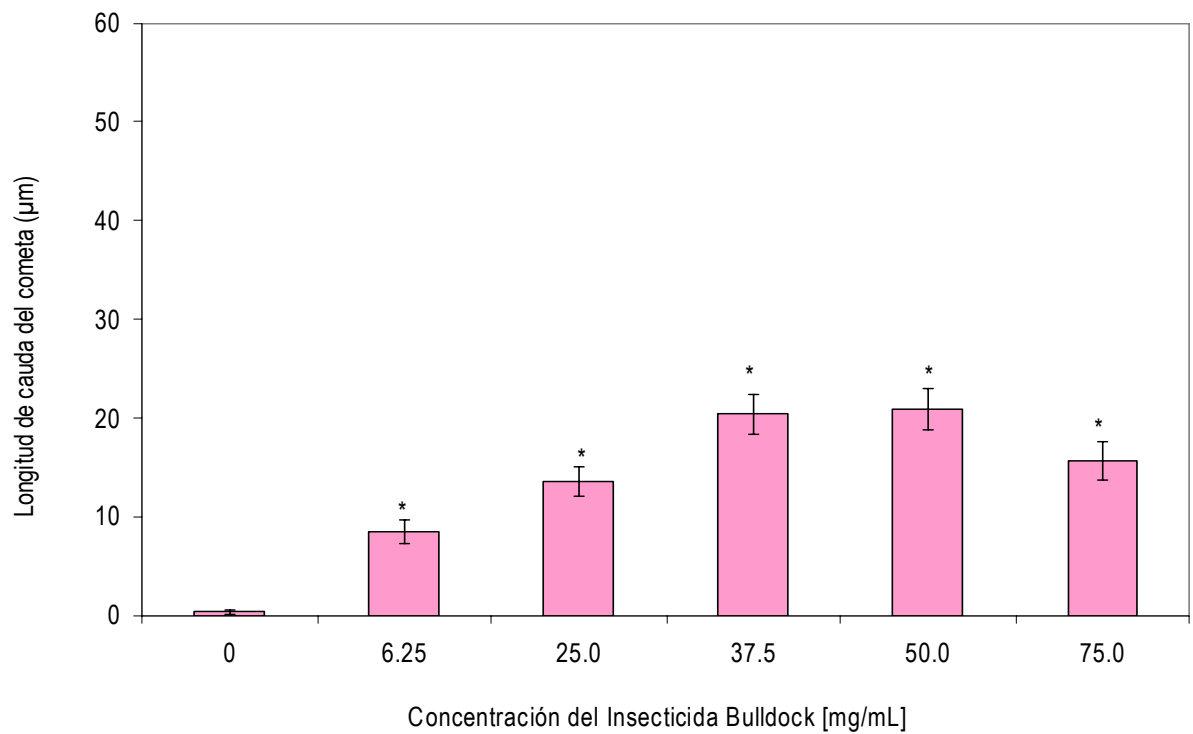
Gráfica I. Longitudes promedio de la cauda del cometa en linfocitos periféricos humanos expuestos al insecticida neonicotinoide Calypso 480 SC *in vitro*.



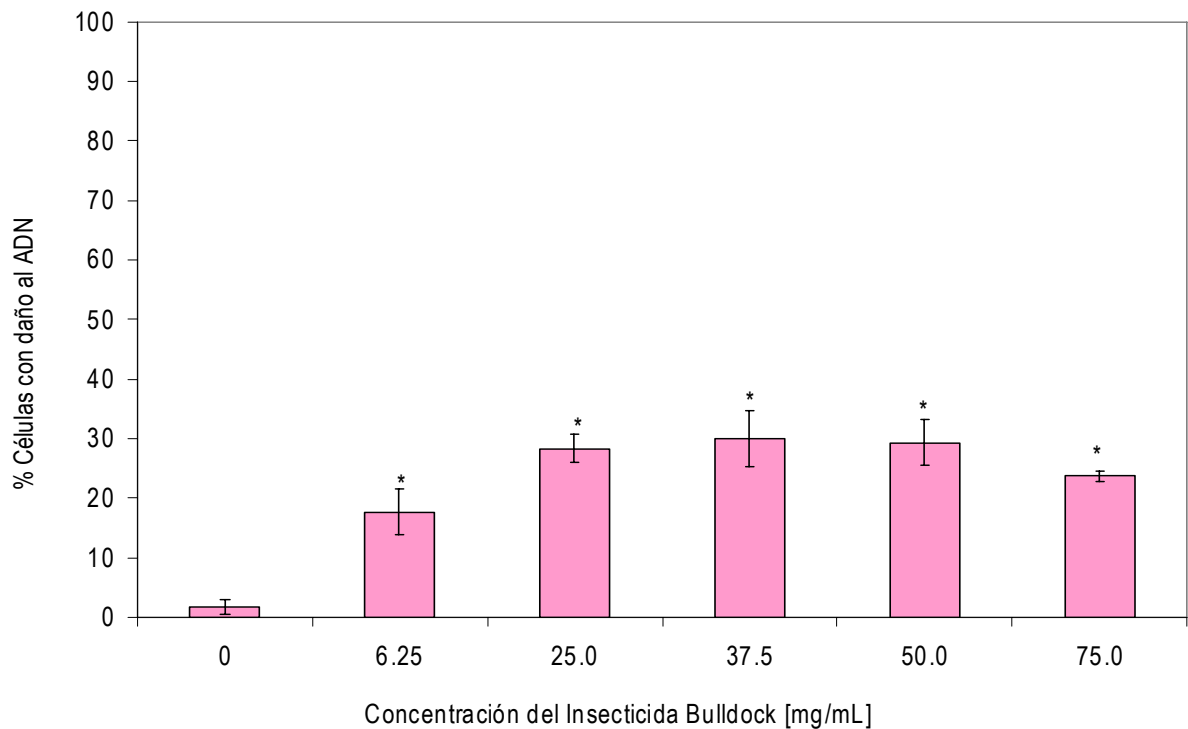
Gráfica II. Frecuencias promedio de células con daño al ADN en linfocitos periféricos humanos expuestos al insecticida neonicotinoide Calypso 480 SC *in vitro*.



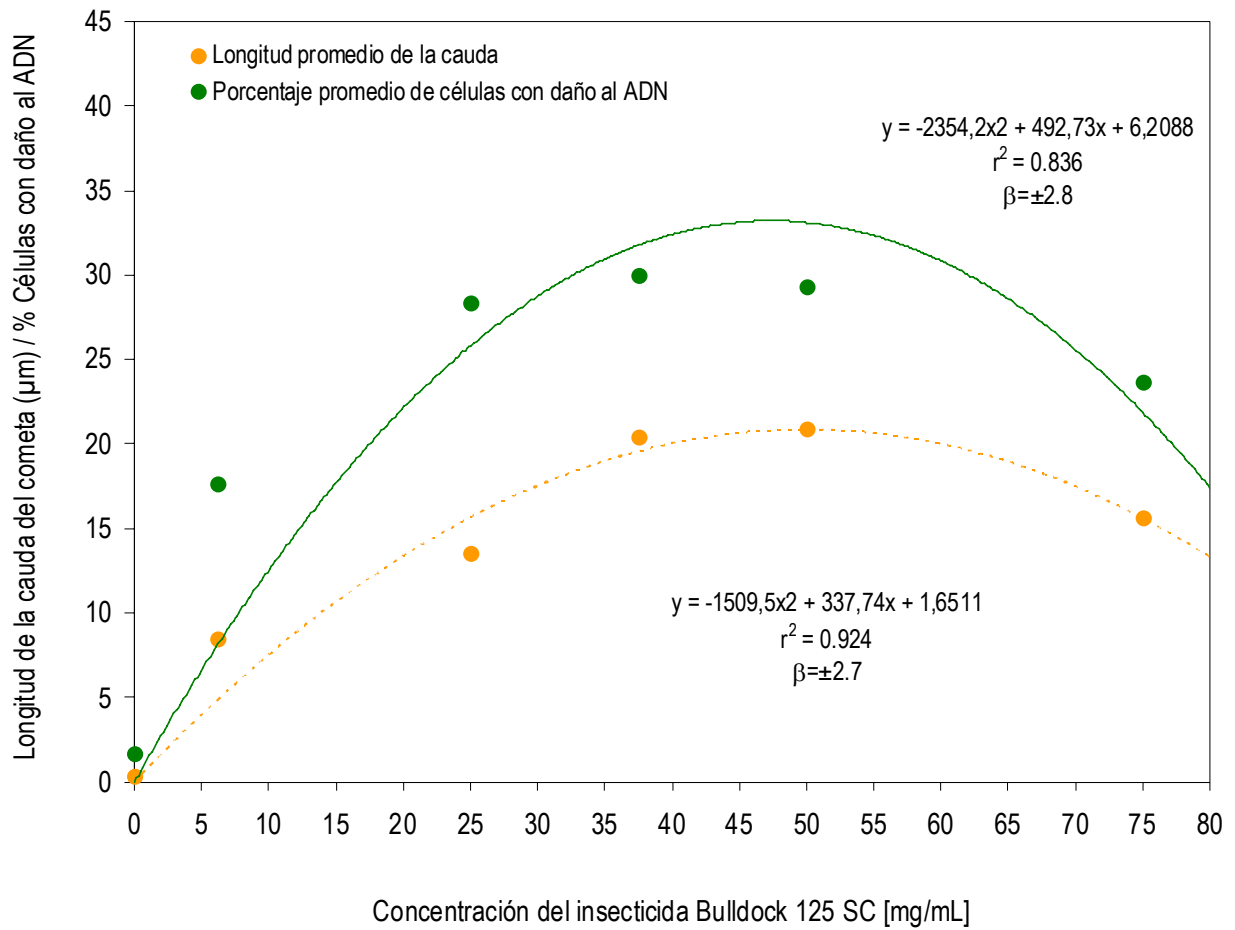
Gráfica III. Análisis de regresión de los valores promedio de la longitud de la cauda del cometa y porcentaje de células con daño al ADN en linfocitos periféricos humanos *in vitro*. expuestos al insecticida Calypso 480 SC ( $p < 0.05$ ).



Gráfica IV. Longitudes promedio de la cauda del cometa en linfocitos periféricos humanos expuestos al insecticida piretroide Bulldock 125 SC *in vitro*.



Gráfica V. Frecuencias promedio de células con daño al ADN en linfocitos periféricos humanos expuestos al insecticida piretroide Bulldock 125 SC *in vitro*.



Gráfica VI. Análisis de regresión de los valores promedio de la longitud de la cauda del cometa y porcentaje de células con daño al ADN en linfocitos periféricos humanos *in vitro*, expuestos al insecticida Bulldock 125 SC ( $p < 0.05$ ).