



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO DE LOS
PLAGUICIDAS MANCOZEB, MONOCROTOFÓS,
PIRIMICARB Y PERMETRINA EN LINFOCITOS *in
vitro* DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA POR
MEDIO DEL ENSAYO COMETA Y LA PRUEBA DE
MICRONÚCLEOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CYNTHIA ALEJANDRA PAZ TREJO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
2016**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno

Paz

Trejo

Cynthia Alejandra

5532438251

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de ciencias

Biología

308536607

2. Datos del tutor

Dra.

Gómez

Arroyo

Sandra Luz

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Jiménez

García

Luis Felipe

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Flores

Márquez

Ana Rosa

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Valencia

Quintana

Pedro Rafael

6. Datos del sinodal 4

Biólogo

Rivas

Martínez

Hugo

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de daño genotóxico de los plaguicidas mancozeb, monocrotofós, pirimicarb y permetrina en linfocitos *in vitro* de sangre periférica humana por medio del ensayo cometa y la prueba de micronúcleos

69 p

2016

Agradecimientos

La culminación y éxito de éste trabajo se debió a un esfuerzo conjunto de múltiples personas que me han apoyado a lo largo del camino y a las cuales estaré eternamente agradecida.

Gracias Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Por darme una oportunidad al entrar en su laboratorio y ser parte de su equipo de trabajo, por su apoyo constante, su dedicación, sus palabras de aliento y gran ejemplo. Por enseñarme no sólo a ser profesional sino también a ser parte de una familia de investigación.

A la M. en C. Ana Rosa Flores Márquez

Por su sincera disposición en brindarme el apoyo técnico para el desarrollo del ensayo cometa, así como por sus consejos.

A la Dra. Josefina por su apoyo técnico en el laboratorio y por siempre estar dispuesta a proporcionar ayuda

A mis sinodales

Dr. Luis Felipe Jiménez García

M. en C. Ana Rosa Flores Márquez

Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana

Biólogo Hugo Rivas Martínez

Por su valiosa aportación a este trabajo, por sus preguntas, consejos y tiempo.

A Victoria Carrillo (Vicky!) por todo el apoyo invaluable que siempre me has proporcionado, tu tiempo y tus consejos.

A las chicas del laboratorio: Adri, Pao y Zel, gracias por su constante ayuda, ustedes hacen que el laboratorio se sienta como familia.

Gracias a todos mis maestros que a lo largo del tiempo con su ejemplo desde primaria hasta ahora han dejado marca en mi pasión por el aprendizaje continuo.

Y sobre todo, gracias a la UNAM porque me forjó como individuo profesional y me proporcionó múltiples herramientas y oportunidades para desarrollarme como persona. ¡¡¡Gracias a la máxima casa de estudios!!!

Dedicatoria

Ésta tesis se la dedico principalmente a mi madre María Judith Trejo Caballero, porque juntas hemos recorrido un largo y arduo camino, porque no ha sido fácil pero cada que volteo estás a mi lado.

Porque tú me has hecho una mejor persona, porque siempre me das tu opinión y aunque no concordemos me apoyas, me levantas, me abrazas y me dices: vas para adelante.

Porque todos mis logros han sido gracias a ti, te AMO.

A mi hermana, Gans eres la mejor hermana del planeta. No pude haber pedido nada mejor, eres mi amiga, mi cómplice, mi maestra, mi cojín de llanto, mi domi de box y mucho más. Siempre cuento con tu sincera opinión y con tu mano cuando me caigo, juntas por siempre.

A mi familia: Hugosssss, Eduardo, Mabue, tío Carlos, tía Chayo. Ustedes han sido un gran apoyo y escalón en mi vida, los quiero profundamente; y a mi adorado abuelito que donde quiera que ande le mando un beso enorme.

A mis adoradas amigas de la vida Mari y Arito, casi 20 años juntas y todos los que nos faltan, porque ustedes me han ayudado con cada viaje, plática, skype, carta, noches cantando, risas incontrolables y una vida juntas. Señoras por siempre.

A todos mis amigos, porque a lo largo de los años seguimos juntos y sin ellos no podría haber tenido tantas perspectivas, experiencias y caminos a lo largo de mi vida: Ilo, Cesar, Ray, Vazqz, Fer, Nat y todos los que me han ayudado a sonreír y a hacer de mi vida más feliz.

A mis colegas y hermanos de la universidad Fer, Gonzalo, Karen, Jesús, Tetsu y todos mis compadres porque crecimos juntos y seguiremos creciendo juntos.

“El éxito no es definitivo, el fracaso no es fatídico. Lo que cuenta es el valor para continuar”

(Winston Churchill)

“No entiendes realmente algo hasta eres capaz de explicárselo a tu abuela”

(Albert Einstein)

Índice

Resumen	5
I. Introducción	6
I.I. Historia e impacto de los plaguicidas en la sociedad	6
I.II. Asociaciones y convenios con mayor impacto en México, encargados de regular el uso y producción de plaguicidas	9
I.III. Genotoxicidad y biomarcadores	10
I.IV. Ensayo cometa	13
I.V. Prueba de micronúcleos	16
I.VI. Plaguicidas	20
I.VI.I. Carbamatos	21
I.VI. II. Organofosforados	22
I.VI.III. Piretroides	23
II. Antecedentes	25
III. Justificación	28
IV. Objetivos	31
V. Hipótesis	32
V.I. Hipótesis general	32
V.II. Hipótesis particulares	
VI. Materiales y Métodos	33
VI.I. Obtención de muestra	33
VI.II. Preparación de plaguicidas	33
VI.III. Ensayo cometa	34
VI.IV. Prueba de micronúcleos	36
VI.V. Análisis estadístico	38
VII. Resultados	30
VIII. Discusión	50
IX. Conclusiones	58
X. Prospectivas	59
XI. Referencias	59

Resumen

Los problemas de salud, ecológicos y sociales en torno a los plaguicidas se deben a la venta accesible, distribución, existencia de múltiples presentaciones y alternativas poco probadas clínicamente, así como la poca regularización del uso de éstos.

Considerando el riesgo que implica la exposición a estos compuestos el objetivo de este trabajo fue evaluar el posible daño genotóxico causado por la exposición directa a diferentes concentraciones del fungicida mancozeb en su forma comercial Vital (0.5, 1 y 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y de los insecticidas monocrotofós como Monocrón (0.25, 0.5 y 0.75 mg/mL), permetrina en su presentación Presto (50, 100, 150 y 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y pirimicarb como Pirimor 50WG (50, 100 y 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$) en linfocitos de sangre periférica humana *in vitro*, mediante el ensayo cometa y la prueba de micronúcleos en células binucleadas, así como a través del análisis de puentes nucleoplásmicos, yemas o brotes nucleares, células apoptóticas y células necróticas. Los tratamientos aplicados en ambos casos fueron de 24 h, y se usó como testigo positivo a la bleomicina.

Para el ensayo cometa se montaron las células mezcladas con agarosa de punto bajo de fusión al 0.5%, se dejaron una hora en solución de lisis, se corrió una electroforesis a 25 V, 300 mA por 20 minutos, se neutralizaron y fijaron.

Para la prueba de micronúcleos se agregaron 375 μL de citocalasina B (Cyt-b) a las 48 h para inhibir la citocinesis y finalmente se centrifugaron 10 min a 1500 rpm para separar las células. Se fijaron y tiñeron en un portaobjetos con colorante Giemsa. El análisis estadístico se hizo con un ANOVA múltiple de un factor y un análisis post-hoc Newman-Keuls con un intervalo de confianza $p > 0.05$ para comparar los tratamientos contra el testigo negativo.

Tanto los resultado del ensayo cometa como la prueba de micronúcleos demostraron que todos los plaguicidas generan daño genotóxico manifestando comportamientos diferentes y ninguno tiene un efecto citostático aparente. De todos ellos, mancozeb y monocrotofós son los plaguicidas que más daño causan al ADN, permetrina el que mayor muerte celular provoca y pirimicarb el que menor efecto tuvo.

I. Introducción

I.1 Historia e impacto de los plaguicidas en la sociedad

El auge de los plaguicidas se dio a mediados de la segunda guerra mundial en la década de los 40 con el propósito de mejorar y aumentar la producción de alimentos y gracias al desarrollo de la industria química destinada a armas.

Los controles de su producción y legalización eran carentes así como las medidas de seguridad en torno a su aplicación y manejo, lo cual derivó en un sin número de muertes, enfermedades y daño ecológico (FAO, 2015). Mucho de ese efecto se atribuyó a que los plaguicidas no eran completamente específicos a su blanco (Aprea *et al.*, 2002) y a la falta de una relación directa entre el daño y la exposición a la sustancia de manera inmediata (Titenko-Holland *et al.*, 1997).

Con el paso del tiempo la producción de éstos aumentó en todos los continentes siendo Asia y África los más afectados debido a su uso desmedido y como tóxico en casos de auto envenenamiento; tan solo en el año 2000 se registraron cerca de 500 000 suicidios en el sudeste de Asia (Eddleston *et al.*, 2002) siendo Paraquat el empleado en 70% de los casos. El problema fue tan grave que en 1980 a pesar de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) había publicado su lista de drogas (incluyendo plaguicidas) en 1977, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) decidió crear un código de conducta con tal de asegurar que su utilización y beneficio obtenidos por el empleo de plaguicidas no fuese mayor al costo en la salud (Eddleston *et al.*, 2002; CCPB, 2009-2010); como ejemplo el artículo 3.5 estipula que “aquéllos plaguicidas que requieran manipulación y aplicación con equipo incómodo y costoso, debe ser evitado especialmente en casos de escala menor en climas tropicales”; requerimiento que ha sido ignorado en cultivos de café en selvas tropicales de Centroamérica.

A pesar de esto, actualmente el tema de los plaguicidas sigue siendo controvertido debido a la gran industria creciente alrededor de ellos, tan solo del 2006 al 2007 se invirtieron 11.4 billones de dólares en su producción (EPA, 2011) y para el 2011 se registró un incremento a 30 billones de dólares en E.U.A. con un aproximado de 2267.962 millones de kg de plaguicida usados a nivel mundial (US-EPA, 2015).

Los mayores productores de plaguicidas son Alemania, EUA, Inglaterra, Suiza, Francia, Japón e Italia. Sin embargo, los mayores importadores son países en vías de desarrollo como algunos de Asia oriental, África, Centro y Sudamericanos, y por supuesto México; éstos países mantienen un alto porcentaje de uso de suelo destinado a la agricultura, tienen climas tropicales y cálidos, y lamentablemente son los que más carecen de asociaciones y regulación en el uso de estos (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo *et al.*, 2007).

La venta libre y el poco control de su empleo siguen generando tanto problemas de salud para la gente expuesta a ellos, como de índole social y ecológica ya que llegan a bioacumularse y ser muy persistentes en el ambiente, propagándose como contaminantes (Bolognesi *et al.*, 2011).

El desarrollo y existencia de presentaciones múltiples y alternativas poco confiables, no avaladas por alguna asociación involucrada en la aprobación de plaguicidas, pero accesibles económicamente así como la falta de educación en torno a su empleo y aplicación, que hasta el 2011 eran más de 2600 (Bolognesi, 2011; US-EPA, 2015), han y siguen siendo las principales causas de riesgos a la salud en el sector agrícola principalmente, siendo afectados no sólo los trabajadores en contacto directo, sino también todos aquéllos individuos expuestos indirectamente.

I.II. Asociaciones y convenios con mayor impacto en México, encargados de regular el uso y producción de plaguicidas

Por el hecho de ser una industria tan grande y con tanto impacto a nivel mundial, fue necesario generar convenios, asociaciones y organizaciones que clasificaran y regularan el uso y producción de éstos en todos los sectores (agrícola, salud, social y ambiental); destacando OMS, FAO, PAN (Listado de Plaguicidas Altamente Peligrosos) (RAPAM, 2014; PAN International, 2015), EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) (EPA, 2015), IARC (Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer) (IARC, 2015) y en México específicamente La Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST, 2013). Todas ellas mantienen un control y clasificación específica de plaguicidas y reglamentos basados en diferentes convenios y tratados (Estocolmo, Rotterdam y Montreal), apoyados por investigaciones experimentales químicas, biológicas y clínicas toxicológicas.

Uno de los problemas más importantes con estas clasificaciones actuales radica en que la mayoría de los estudios hechos buscan toxicidad inmediata o aguda dejando de lado el daño a largo plazo o crónico, entre ellos el genotóxico (Bolognesi, 2003), que es aquél capaz de aumentar la probabilidad de desarrollar problemas teratogénicos, en la reproducción, desordenes neurodegenerativos como Parkinson y Alzheimer, e inclusive cáncer (Dosenmu *et al.*, 2007; Costellos *et al.*, 2009).

Los principales criterios usados para clasificar los plaguicidas son amplios y cubren desde la mezcla de productos químicos y su naturaleza o composición, hasta los riesgos que implican para la salud, incluyendo su exposición; de este último punto se toman en cuenta varios factores como el consumo, cantidad de sustancia usada, número de catálogo, extensión de área de contacto y condiciones de trabajo, ya que la exposición es muy variable (Albert, 2005).

El análisis de daño a la salud se hace a través de pruebas o ensayos en animales de laboratorio principalmente mediante la dosis letal media (LD₅₀) principalmente, que es una prueba toxicológica de resultado inmediato.

El avance de la tecnología y los descubrimientos en el campo de la salud, han permitido ir mejorando en manejo, producción y control de plaguicidas; hoy en día, dependiendo del país al que se desee exportar, es necesario seguir ciertos estándares de calidad que engloban: la cantidad de ingrediente activo presente en el producto y por ende el tipo de producción que se llevó a cabo; un ejemplo de ello en México es la miel ya que la siembra de flores necesarias para la apicultura requiere del uso de plaguicidas que son capaces de permanecer en el néctar y evadir los procesos de transformación dentro de la abeja (Rodríguez *et al.*, 2013). Esto ha llamado la atención del público en el desarrollo de nuevas alternativas menos nocivas y motivado su regulación en algunas compañías privadas.

Sin embargo los plaguicidas son un grupo heterogéneo de sustancias químicas con presentaciones, comportamientos y blancos diferentes que a pesar de haber modificado su síntesis y producción, siguen generando complicaciones en la salud y el ambiente.

I.III. Genotoxicidad y biomarcadores

Como se mencionó anteriormente, el estudio de la genotoxicidad permite conocer el daño a largo plazo ya que se enfoca en las propiedades mutagénicas, clastogénicas o carcinogénicas de los contaminantes, es decir, su capacidad para generar un daño al genoma (López-Montoya, 2011). Por ende, se puede decir que una sustancia genotóxica tiene la capacidad de unirse al ADN directamente o actuar de manera indirecta mediante la afectación de enzimas

causando alteraciones en el ADN (Menzie *et al.*, 1992). Este tipo de daño por lo general, es amortiguado por los sistemas de reparación y no suele ser evidente de manera inmediata, si no que requiere la acumulación de daño para manifestarse o debe producirse en secuencias de alta transcripción que usualmente están más protegidas, ésta es una de las razones por las cuales es difícil vincular a un agente genotóxico como causa inmediata de un daño crónico. El problema se puede presentar cuando escapan a las maquinarias de reparación o se reparan mal dando paso a efectos adversos en el ciclo celular, la expresión génica, la comunicación citoplasma-mitocondria y podrá servir como sustrato para desencadenar un proceso carcinogénico (Wiseman *et al.*, 1996). A pesar de que las consecuencias suelen ser graves, también pueden ser reversibles si se detectan a tiempo.

La genotoxicidad se mide por medio de biomarcadores a partir de ensayos.

Los biomarcadores son indicadores de eventos celulares, bioquímicos y moleculares en sistemas biológicos que revelan la relación entre el ambiente y sus efectos en la salud, dando una idea del proceso que conllevó la exposición del agente al desarrollo de una enfermedad en el organismo y la magnitud de su respuesta ante dicho estrés (Dusinská y Collins, 2004).

El objetivo ideal de los biomarcadores es que permita el monitoreo genotóxico tanto en poblaciones naturales, como en organismos expuestos *in vitro*, que tengan una alta sensibilidad, sean de bajo costo y fácil manipulación, se visualice el daño rápidamente y pueda aplicarse en diferentes muestras o poblaciones celulares (López-Montoya, 2011).

Asimismo, es importante el uso de biomonitores para la detección del daño genotóxico, uno de los más utilizados son los linfocitos, los cuales son un tipo de leucocito perteneciente al sistema inmune que se encargan de la inmunidad específica o adquirida. En promedio una persona sana de entre los 14-99 años debe tener entre 1000 y 4000 linfocitos por microlitro, pudiéndose encontrar 3

tipos principalmente: linfocitos B (20-45% del total), linfocitos T (50-70% del total) y células asesinas o NK (5-10% del total). Éstos presentan diferencias morfológicas muy sutiles entre ellos, pero comparten la presencia de un núcleo de gran tamaño con una relación nucleoplasmática que varía entre 5:1 y 3:1 (Maya, 2008); ésta característica permite la fácil visualización de daño al núcleo.

Las ventajas del uso de este biomonitor son varias: por un lado ha sido usado para múltiples ensayos experimentales en la prueba de diferentes agentes por lo cual existe basta información sobre ellos y su morfología, función, desarrollo y maduración están bien descritas. Al estar en circulación se puede considerar que su estado celular, nuclear y metabólico refleja la exposición global del organismo (Stocker y Ames, 1987; Zúñiga 2009), son de fácil obtención y cultivo ya que pueden aislarse o usarse en sangre completa, mantienen una sincronía relativa y la mayoría se encuentra en G₀ mientras no entren en contacto con un antígeno o sean estimulados para división *in vitro*, además de que tienen un ciclo celular corto y bien establecido (Surrallés, 1997; Zuñiga, 2009).

Entre las principales desventajas se puede mencionar que tienen una capacidad metabólica limitada y no son una población homogénea. Sin embargo es posible utilizarlos en diferentes ensayos y pruebas genotóxicas como el ensayo cometa y la prueba de micronúcleos.

I. IV. Ensayo cometa

El ensayo cometa o electroforesis alcalina de células individuales permite visualizar daño genético en células individuales y la heterogeneidad de respuesta en poblaciones celulares, es decir, detecta diferencias intercelulares (Speit y Hartmann, 2006)

El análisis se hace mediante fluorescencia con microscopios que permiten analizar diferentes parámetros del cometa (Figura 1) que representan al ADN fragmentado migrando (cauda) del núcleo (cabeza) a distintas velocidades; esta forma depende principalmente de dos factores: el tamaño de ADN (organismo usado) y el número de terminaciones rotas que pueden estar unidas a piezas largas de ADN, ya que serán éstas las que mantendrán la continuidad de la cauda del cometa (Fairbairn *et al.*, 1995).

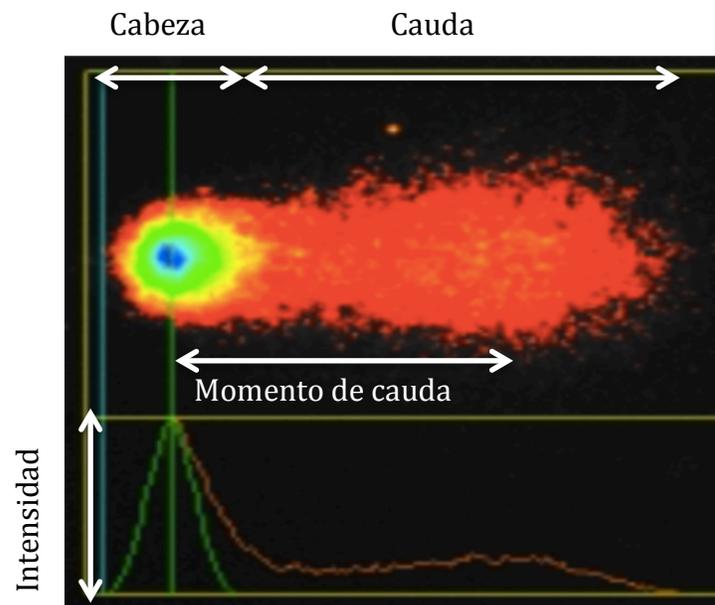


Figura 1. Elementos de una célula sometida ensayo cometa.

El ensayo tuvo sus antecedentes en 1976 con Cook quien desarrolló la lisis celular con la intención de dilucidar la estructura nuclear, con ello encontró la estructura del nucleoide (andamiaje compuesto de ADN, ARN y proteínas) que mantiene un superenrollamiento negativo importante para comprender las bases de la estructura del cometa (Mickelvey-Martin *et al.*, 1993; Zuñiga, 2009).

Posteriormente Rydberg y Johanson (1978) desarrollaron una técnica que se basó en embeber las células en agarosa seguida de una lisis alcalina, esto permitió relajar el superenrollamiento del nucleoide y dar paso a la expansión de hebras en forma de halo ancladas a una matriz de proteínas (Zuñiga, 2009; López-Montoya, 2011).

Finalmente, en 1984 Östling y Jonhanson complementaron la técnica añadiendo la electroforesis a las células embebidas en agarosa sobre un portaobjetos, usando desnaturalización ligeramente alcalina (pH 9.5) permitieron la migración del material que había sido expulsado del nucleoide (el halo) de manera que los fragmentos cargados negativamente migraban al ánodo mostrando daño, esto se pudo revelar gracias al uso de tinción con naranja de acridina que dio pie al abandono de etiquetas radioactivas como antes se acostumbraba y dando paso al primer ensayo formal de cometa (Östling y Jonhanson, 1984; Collins, 2004; Zuñiga, 2009).

Durante mucho tiempo la técnica se desarrolló a pHs neutros o ligeramente alcalinos lo cual permitía ver rupturas de doble cadena solamente ya que para revelar roturas sencillas es necesario desnaturalizar (separar) las hebras, y eso solo se logra sometiendo la muestra a condiciones alcalinas (pH>13).

Fue hasta que Singh *et al.* (1988) optimizaron la técnica usando una lisis alcalina mayor a un pH de 13, con lo cual fueron capaces de detectar rupturas de cadena simple, sitios álcali lábiles provocados por posibles sitiosapurínicos-apirimidínicos o AP (Collins, 2004), rupturas sencillas asociadas a procesos de

reparación incompleta por escisión de bases, más los rompimientos de cadena doble y “crosslinking” entre proteínas y ADN (Tice *et al.*, 2000; Zuñiga, 2009).

Entre los parámetros usados para medir el daño se encuentran la longitud de la cauda, el porcentaje o densidad de ADN en cauda y el momento de la misma.

Para este trabajo se usó el momento de cauda ya que el porcentaje de ADN indica el número de roturas de éste y la longitud de la cola está determinada por la cantidad de lazos y no por la migración de supuestos fragmentos, el cometa al estar formado de lazos relajados y del número de éstos en la cauda (intensidad) requiere un análisis de ambos parámetros, que son considerados por el momento de la cauda, por lo que es una medida más completa que incorpora los fragmentos más pequeños fuera del núcleo y la cantidad de los mismos (Olive y Banfith, 1993; Rundel *et al.*, 2003), además de ser una medida cuantificable objetiva que puede analizarse mediante sistemas computarizados.

El desarrollo de este ensayo abrió una ventana a nuevas posibilidades para diagnosticar y detectar daño genético ya que es rápido, sencillo, sensible y requiere poca muestra para trabajar (Mickelvey-Martin *et al.*, 1993).

Puede utilizarse para probar genotoxicidad, para monitoreos ecológicos, detección de enfermedades como el síndrome Nymegen (que es una enfermedad autosómica recesiva) y para determinar tasas de reparación (Collins, 2004).

I.V. Prueba de Micronúcleos (MN)

El estudio de daño en ADN es esencial en genotoxicología ya que las alteraciones cromosómicas dan pie a eventos importantes en el desarrollo de cáncer y otras enfermedades. La prueba de MN permite explorar este tipo de efecto.

Comenzó con el descubrimiento de los cuerpos Howell-Jolly en eritrocitos por William Howell y Justin Jolly en 1923 (Fenech 2011), que son remanentes nucleares posteriores a la maduración de los glóbulos rojos que permanecen en sangre periférica.

Posteriormente, se desarrolló la técnica con otros tipos celulares, sin embargo los primeros intentos no contemplan la dependencia de MN a la cinética de la división celular y el estatus de división nuclear, es decir, se ven MN generados después del tratamiento *in vitro* (Fenech *et al.*, 1997).

Para resolver ese problema y dado que sólo se requiere una división para que se muestren los MN, Fenech *et al.* (1985) modificaron la técnica añadiendo citocalasina B (CytB) que funciona como inhibidor de la polimerización de actina y no genera MN por sí mismo. Este bloqueo en la citocinesis permitió distinguir células con una sola división en estado binucleado del resto de la población de linfocitos (Fenech y Morley, 1985; Bolognesi *et al.*, 2011).

Con esta prueba es posible identificar daño de doble cadena en forma de fragmentación cromosómica acéntrica, fragmentación cromatídica acéntrica, cromosomas completos que fallaron en la inclusión de células hijas durante la división, puentes nucleoplásmicos, yemas o brotes nucleares, células apoptóticas y necróticas, entre otros múltiples procesos moleculares (Tabla 1) (Fenech *et al.*, 2011; Goldoni *et al.*, 2014).

Tabla 1.	Eventos moleculares asociados al biomarcador
MN	Retraso de fragmentos acéntricos cromosómicos o cromatídicos en anafase Reparación incompleta de rupturas de ADN Falta de reparación en rupturas de ADN Retraso de cromosomas completos en anafase Hipometilación de secuencias repetidas en ADN centromérico y pericentromérico Defectos en el ensamble del cinetocoro o sus proteínas Uso cromatídico disfuncional Fallo en genes "check point" de anafase Problemas con los intermediarios de estrés para la replicación
NPB	Cromosomas dicéntricos o multicéntricos con centrómeros jalados a polos opuestos de la célula en anafase Falla en la reparación de rupturas de ADN Fusión de las terminaciones teloméricas debido al acortamientos de éstos, disfunción de telómeros o falta de ellos. Defecto en la separación de cromátidas hermanas por falla en la separación de hebras.
BN	Proceso activo de eliminación de material nuclear. Eliminación de ADN amplificado provocado por el ciclo de ruptura-fusión-puente. Supresión de complejos proteicos de reparación de ADN Descarte de exceso de cromosomas (posible en células poliploides) Contracción de la ruptura de un puente nucleoplásmico entre dos células, dando paso a un brote temporal.

Información obtenida de Fenech *et al.* (2011)

Las alteraciones más importantes son los micronúcleos que se forman principalmente a partir de un retraso en la anafase por fragmentos acéntricos cromosómicos o cromatídicos causados por reparación incompleta de las rupturas de cadenas de ADN o fallas en la reparación a causa del daño genotóxico, por ende no se incluyen en el núcleo principal (Fenech *et al.*, 1997, 2003; Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007). Una vez sucedida la falla, en telofase se forma una membrana nuclear alrededor de ellos adquiriendo gradualmente la morfología de un núcleo pero más pequeño (no más grande que un tercio del tamaño del núcleo original) (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2003).

De acuerdo con Fenech y Morley (1985), la formación y frecuencia de MN observados en un número determinado de linfocitos depende de:

- la proporción de células que respondieron al mitógeno
- la cantidad de células que se dividieron
- el destino de MN en células que se han dividido más de una vez

Otro resultado importante son los puentes nucleoplásmicos (PN) que son cromosomas dicéntricos que se originan posiblemente por diferentes mecanismos: mala reparación de ruptura de ADN, fusión final de telómeros o falla en la separación de cromátidas hermanas durante anafase, es decir, los centrómeros son jalados a lados opuestos durante anafase, pero no se rompe la conexión permitiendo que se forme una membrana a su alrededor que sólo podrá ser vista con la técnica de bloqueo de citocinesis (Randa *et al.*, 2008).

Yemas o brotes nucleares (BN): se originan por eliminación de ADN amplificado (en fase S) que se ubica en la periferia del núcleo, complejos de reparación aglomerados, evento posterior a un puente nucleosómico y posible exceso de cromosomas por células aneuploides (Randa *et al.*, 2008; Fenech *et al.*, 2011).

Se pueden observar en la figura 2 algunos de los mecanismos que producen los diferentes daños.

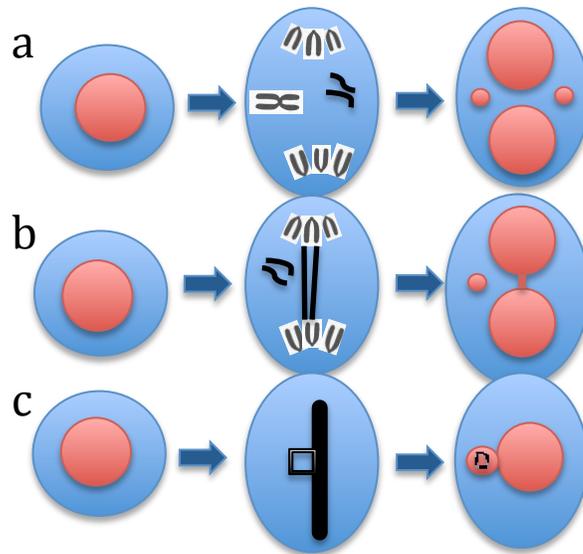


Figura 2. De manera esquemática se muestran los procesos más comunes de formación de (a) micronúcleos (MN) por la falla de inclusión de fragmentos cromatídicos o cromosómicos en anafase. (b) puentes nucleoplásmicos (NP) la elongación de material genético que se rodea de membrana uniendo dos núcleos y (c) yemas o brotes nucleares (BN) que pueden formarse por la eliminación de ADN amplificado. Información obtenida de Fenech *et al.* (2011).

Con ésta técnica también es posible obtener el índice de división nuclear (IND) mediante la fórmula:

$$IND = (M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)) / N$$

Y el índice de proliferación por bloqueo de citocinesis (IPBC) por la fórmula:

$$IPBC = (M1 + 2(M2) + 3(M3 + M4)) / N$$

Donde M1-M4 representan la presencia de células con 1 a 4 núcleos y N es el número total de células viables contadas.

El primer índice provee el promedio de núcleos por célula, mientras que el

segundo proporciona el promedio de divisiones mitóticas por célula. Ambos parámetros son útiles para conocer el posible efecto citostático sobre la respuesta mitógena de los linfocitos, además de tener un control sobre la población binucleada del cultivo y el correcto funcionamiento de la citocalasina (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2003).

Esta prueba permite de manera simple determinar el mecanismo de acción del componente por la presencia o ausencia de cinetocoro o centrómero en los micronúcleos, diferente a lo que se puede observar en clastogenicidad o aneugenicidad. Se puede usar como alternativa a la prueba de aberraciones cromosómicas y abre la posibilidad de ir adelante en el conocimiento del riesgo genotóxico asociado a exposición por plaguicidas (Bolognesi *et al.*, 2011). Requiere relativamente poca muestra sanguínea, es barato, no invasivo, permite comparar tejidos y muestra un amplio espectro de daño genético.

I.VI. Plaguicidas

La clasificación de plaguicidas varía y depende de diversos factores. Sin embargo coinciden en agruparlos por composición o naturaleza química. Entre los grupos más usados en México se encuentran los carbamatos, piretroides y organofosforados (entre otros) que son los grupos trabajados en esta tesis (Figura 3).

I.VI.I Carbamatos

Son sustancias orgánicas de síntesis conformadas por un átomo de nitrógeno unido a un grupo lábil (carbámico) que genera una carbamitación de enzimas por medio de la unión covalente de grupos electrofílicos en sitios estéricos de la enzima, lo cual le confiere propiedades neurotóxicas y es capaz de inactivar de

manera reversible la acetilcolina (Moutschen–Dahmen, 1984; SEMARNAT, 2004).

De los grupos estudiados en el presente trabajo, éste suele ser el menos persistente en el ambiente ya que dependiendo de las condiciones ambientales pueden durar de 1-7 días en el ecosistema, sin embargo son de acción rápida.

Mancozeb

Es un fungicida de amplio espectro (multisistémico) que pertenece a la familia de los carbamatos en la clase ditiocarbamatos, que se caracteriza por presentar un sitio metálico de zinc que le permite ser absorbido por los sistemas digestivo, respiratorio y por la piel pudiendo impedir la acción de enzimas sulhídricas y de la cisteína al formar complejos con enzimas que contengan metales; puede ser degradado a disulfuro de carbono en pequeñas cantidades por los ácidos gástricos y no inhibe la colinesterasa (CICOPLAFEST, 2013).

Impide la producción de ATP en la célula fúngica provocando su muerte, la molécula se descompone en un gas denominado etileno diisotiocinato que se expande por el cultivo permitiendo cubrir aproximadamente una superficie 12 veces mayor al área tratada aproximadamente (EXTOXNET, 2008).

En México existen cerca de 83 presentaciones (BVSDE, 2011) que contienen un 80% de ingrediente activo.

Pirimicarb

Es un insecticida de la familia de los carbamatos con acción de contacto similar al de mancozeb principalmente neurotóxico y capaz de inhibir la acetilcolina. Mantiene una vida media de 2 h antes de degradarse a radicales hidroxilo y puede permanecer en el suelo hasta 200 días (SEMARNAT, 2008; Syngenta, 2011).

En México su principal productor y distribuidor es Syngenta y lo presenta con un 50% de ingrediente activo.

I.VI.II. Organofosforados

Son sustancias orgánicas derivadas de la estructura química del fósforo, específicamente del ácido fosfórico (Sorgob y Vilanova, 2002). Son liposolubles por lo que pueden transportarse en los tejidos, acumularse y tener una prolongada liberación en sangre. Son de los plaguicidas más utilizados y de acuerdo a la FAO existen cerca de 70 000 productos disponibles en el mercado y se introducen 1500 nuevos anualmente (Fest y Schmidt, 1973; FAO, 2015).

Su método de acción es amplio dependiendo de las variaciones químicas y estéricas que se le hagan artificialmente. Pueden inhibir la colinesterasa produciendo una sobre estimulación colinérgica que en seres humanos tienen un efecto adverso inhibiendo a la acetilcolinesterasa (Keith, 2011). Tienen una acción tóxica en tejidos, generando una disfunción en la placa neuromuscular postsináptica e inhibiendo la enzima esterasa neurotóxica produciendo una neuropatía retardada; además se ha llegado a documentar acción mutagénica (Wild, 1975; SEMARNAT, 2008).

Monocrotofós

De acuerdo con PAN International, WHO y UTZ, es el más tóxico, ya que mimetiza la acción de la acetilcolina, tiene una acción inmediata por contacto y un prolongado efecto residual (SEMARNAT, 2008).

México cuenta con 33 presentaciones en el comercio con un 56% de ingrediente activo. Puede mantenerse por 7 días en suelo, hasta 3 días en plantas y desplazarse por aire y evaporación por horas.

I.VI.III. Piretroides

Son un grupo de plaguicidas artificiales diseñados a partir de las piretrinas (moléculas insecticidas naturales presentes en las flores de plantas del género *Chrysanthemum*), con anillos aromáticos que actúan a nivel de sistema nervioso central alterando la vía del sodio en la transferencia de impulsos eléctricos de célula a célula por la modificación en la dinámica de membranas nerviosas, y son capaces de permanecer en tejido graso (He, 1994; SEMARNAT, 2008).

Permetrina

Insecticida común entre los piretroides de acción inmediata, que dependiendo de la presentación del plaguicida puede permitir una liberación lenta a manera de que la cobertura y efectos sean prolongados. A diferencia de los organofosforados y carbamatos, se requieren bajas cantidades para generar su efecto principalmente neurotóxico alterando la vía del sodio en la transferencia de los impulsos eléctricos de célula a célula (SEMARNAT, 2008; EPA, 2015).

Existen aproximadamente más de 150 presentaciones con porcentajes que van desde los 5% a los 35% de ingrediente activo. Aunque suele degradarse rápidamente, puede llegar a permanecer en el follaje hasta 58 días.

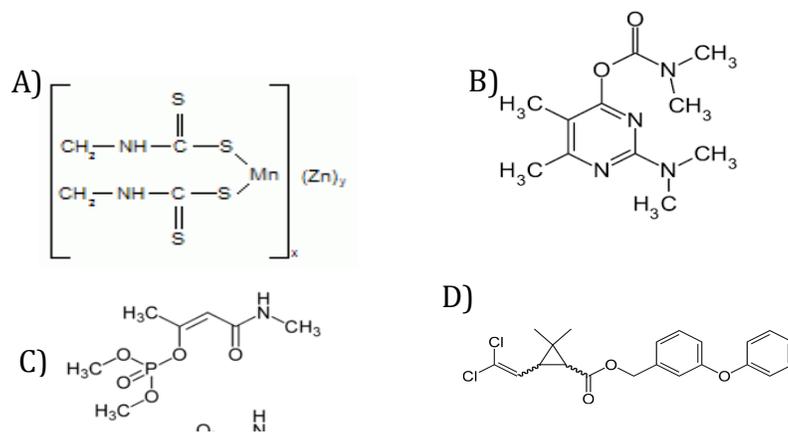


Figura 3. Representaciones de las estructuras químicas de (A) mancozeb ($\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_4\text{Mn} + \text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_4\text{Zn}$), (B) pirimicarb ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$) (C) monocrotopós ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}_5\text{P}$) y (D) permetrina ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{O}_3$)

La bleomicina es un agente antineoplásico glicopeptídico con alto potencial para generar daño al ADN por lo que se utiliza en tratamientos quimioterapéuticos.

Este agente presenta un dominio de unión al ADN conformado por una pirimidina y un grupo bitazol, éste último tiene cargas positivas que favorecen la unión electrostática de la bleomicina con el ADN por intercalación o a través de interacciones con el surco menor (Östling *et al.*, 1987; Cabrera, 2006).

Esta interacción puede provocar el corte directo de ADN en cadena doble o sencilla generando cambios en la morfología de los cromosomas y deterioro oxidante, este daño tiene una relación de dosis-efecto y dependen del ciclo celular causando mayor daño en fases G1, G2 y mitosis por lo que es un agente ideal para uso como testigo positivo en cultivo de linfocitos (Olive y Banfith, 1993; Fairbairn *et al.*, 1994).

II. Antecedentes

La relación entre los plaguicidas y el daño genotóxico tuvo un gran avance durante la década de los 90 y actualmente es un tema muy estudiado. El desarrollo y optimización de pruebas y ensayos ha sido prioridad para poder identificar enfermedades y exposición de manera rápida y eficaz, sin embargo aún queda mucho trabajo por delante.

El uso del ensayo cometa se extendió más allá de poblaciones celulares humanas, hoy en día se aplica en diferentes especies de laboratorio (roedores principalmente), ictios, plantas e incluso algas (López Montoya, 2011) y ha permitido demostrar la relación entre plaguicidas y daño genotóxico.

En el caso de los micronúcleos se comenzó a establecer una relación entre su expresión y agentes ambientales, específicamente con plaguicidas a mediados de los 80 (Fenech *et al.*, 2011), siendo en 1993 el primer estudio formal de biomonitoreo a gran escala de poblaciones expuestas a plaguicidas (Bolognesi *et al.*, 2011). También se ha utilizado para análisis de genética de poblaciones en grupos mexicanos que muestran aumento de MN por exposición a paraoxón debido a que su genotipo es incapaz de hidrolizar a este compuesto (Rojas-García *et al.*, 2009).

Ambas pruebas se han sometido a múltiples revisiones y talleres mundiales con la finalidad de estandarizar la técnica y su análisis. La de ensayo cometa se dio en 1999 bajo el nombre de “International Workshop of Genotoxicity Test Procedures”, concluyendo que la versión óptima para identificar agentes con actividad genotóxica es la alcalina (pH>13) (Tice *et al.*, 2000), aunque se han ido desarrollando modificaciones o complementado con otras técnicas dependiendo del objetivo de estudio.

En el caso de MN, se hizo una convención en 2003 denominada “HUMN Project”, donde 30 laboratorios en el mundo se reunieron para mejorar la técnica identificando variables metodológicas importantes (Fenech *et al.*, 2003)

También se han utilizado en biomonitoreos de salud de poblaciones trabajadoras con diferentes contaminantes buscando correlaciones entre varios marcadores genotóxicos e inmunológicos (Somorovska *et al.*, 1999). Se llevó a cabo un estudio en el que compararon diferentes ensayos genotoxicológicos hechos hasta la fecha, demostrando y justificando el uso de éstos como biomarcadores para detectar daño, ya que todos muestran elevación de daño en personas expuestas (Eddleston, 2002).

En el caso de los plaguicidas, la mayoría de los estudios hechos para mancozeb, monocrotofós, permetrina y pirimicarb se han realizado en líneas celulares no humanas o humanas *in vitro*.

Mancozeb se ha catalogado como posible carcinógeno en mamíferos por su estudio en ratas y roedores (Belpoggi, 2002; Srivastava, 2012; Goldoni, 2014). Aunque en México se encuentra catalogado como ligeramente tóxico (CICOPLAFEST, 2013) existen estudios que demuestran que su principal metabolito, la tiourea de etileno, actúa como carcinogénico y teratógeno (Hanumantharaju, 2004).

Monocrotofós es uno de los plaguicidas más tóxicos, siendo sus pruebas LD₅₀ las más bajas en dosis (Jamil *et al.*, 2004; Das *et al.*: 2007). Aunque se encuentra clasificado con toxicidad aguda (WHO, 2009; RAPAM, 2014; UTZ, 2015), las investigaciones alrededor de éste se centran en catalogar sus metabolitos, daño a nivel sistémico o metabólico y persistencia en cultivos (Santosh *et al.*, 2010; Soohie *et al.*, 2015).

Permetrina y pirimicarb a pesar de tener una naturaleza química diferente, están catalogados de manera similar por WHO y PAN International (moderadamente peligroso). Las investigaciones para permetrina se enfocan en daño citotóxico más que genotóxico (Turkez *et al.*, 2012; Surrallés *et al.*, 1995); la información en torno a pirimicarb es muy restringida y los estudios se hacen en peces o insectos principalmente (Vera-Candioti *et al.*, 2015), la mayoría enfocados en la optimización del producto.

III. Justificación

Si bien es cierto que los plaguicidas son un tema de controversia que puede discutirse desde múltiples perspectivas y que a simple vista parece estar muy estudiado, también es verdad que en México se carece de información e investigaciones relevantes al respecto para su restricción y control de uso, así como una conciliación en su clasificación (Marrs, 2004).

La COFEPRIS creó la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) encargada de generar una clasificación de plaguicidas en México para un uso más seguro de los mismos; sin embargo su actualización más reciente fue en 2013 por lo que no considera varios ingredientes activos prohibidos por distintas comisiones internacionales de acuerdo a PAN International (Pesticide Action Network International, por sus siglas en inglés) y declarado a través de RAPAM en 2014, como mancozeb, monocrotofós, permetrina y pirimicarb.

A raíz de esta información se realizó una selección de plaguicidas con base en las clasificaciones y asociaciones con mayor impacto en México: PAN, WHO, IARC, EPA, UTZ y por supuesto CICLOPAFEST. Cada una de ellas tiene diferentes criterios de categorización (Tabla 2) pero mantienen a estos plaguicidas con un estatus de probables carcinógenos (exceptuando a monocrotofós).

Tabla 2. Recopilación de distintas clasificaciones en torno a Mancozeb, Monocrotofós, Permetrina y Pirimicarb.

Plaguicidas					
Clasificaciones actuales		Mancozeb	Monocrotofós	Permetrina	Pirimicarb
	PAN International (2014)	Efectos tóxicos a largo plazo	Toxicidad aguda	Efectos tóxicos a largo plazo	Efectos tóxicos a largo plazo
	WHO (2009, presente en su página actual)	Difícilmente causa daño en uso regular	Ib (Altamente peligroso)	II (Moderadamente peligroso)	II (Moderadamente peligroso)
	IARC (2014)	Sin información	Sin información	Grupo 3 (No clasificado como carcinógeno humano)	Sin información
	EPA (2014)	Probable carcinógeno (grupo B1)	Sin información	Probable carcinógeno (grupo B1)	Probable carcinógeno (grupo B1)
	COFEPRIS/ CICOPLAFE ST (2013)	Ligeramente tóxico (autorizado)	Sin información	Sin información existente	Moderadamente tóxico (autorizado)
	UTZ (2014)	Sin información	Toxicidad aguda (SGA como H330-mortal por inhalación y prohibidos por convenciones internacionales)	Prohibidos por convenciones internacionales	Sin información

*Convenciones de Estocolmo y de Rotterdam y Protocolo de Montreal

La mayor cantidad de información en torno a plaguicidas deja de lado el daño crónico y genotóxico, Bolognesi (2003) hizo una revisión de artículos de 10 años anteriores a esta fecha, donde presentó que la mayoría de los estudios para probar el daño generado por plaguicidas es de tipo agudo o a corto plazo, no crónico; por esta razón es importante generar este tipo de información que permita regular o restringir su uso y generar alternativas.

La elección de los plaguicidas se hizo en torno a varios criterios: ser de uso común, ser de fácil adquisición (venta en distribuidoras públicas y bajo costo) y con potencial para generar daño al ADN. En el caso de monocrotofós, llamó la atención que a pesar de estar catalogado como altamente nocivo por varias comisiones es de empleo común y no existen investigaciones recientes ni extensas al respecto (en comparación con los demás plaguicidas).

Las pruebas usadas son complementarias ya que proporcionan diferente información respecto al mecanismo de acción. Por un lado, el ensayo cometa es una técnica relativamente rápida, sensible, versátil y económica que permite examinar de forma individual el daño en ADN y ya que la mayoría de los agentes genotóxicos producen daño de cadena sencilla o álcali lábiles, éste ensayo es ideal para su estudio.

La prueba de MN detecta otro tipo de daño más específico que es posible observarse a nivel cromosómico, numérico o estructural, mediante la frecuencia de MN y otras alteraciones (puentes nucleoplásmicos, brotes, apoptosis y necrosis).

El estudio *in vitro* quita ruido de fondo que se podría tener al evaluar una persona en población (factores que no son plaguicidas en este caso) como la interacción con el ambiente y el sistema mismo, permite analizar daño específico y tener una aproximación rápida del riesgo que implica para una persona o población.

El propósito de esta investigación es evaluar *in vitro* algunos de los plaguicidas aún permitidos en México para detectar el posible daño que genere al ADN. Ya que eso podría, a futuro, permitir su eventual prohibición y relacionarlos con enfermedades incidentes en poblaciones expuestas a estos productos.

IV. Objetivo

IV.I. Objetivo general

Evaluar el posible daño genotóxico causado en linfocitos de sangre periférica humana *in vitro* por la exposición directa al fungicida mancozeb en su forma comercial Vital y de los insecticidas monocrotofós como Monocrón, permetrina en su presentación de Presto y pirimicarb como Pirimor 50 WG, mediante el ensayo cometa y la prueba de micronúcleos en células binucleadas, así como a través del análisis de puentes nucleoplásmicos, yemas o brotes nucleares, células apoptóticas y células necróticas.

V. Hipótesis

V.I. Hipótesis general

Los plaguicidas seleccionados mancozeb (Vital 80 pH), monocrotofós (Monocrón), permetrina (Presto®) y pirimicarb (Pirimor 50 WG) en sus formas comerciales tienen potencial genotóxico. Por lo tanto se espera que la exposición de linfocitos de sangre periférica humana a tres diferentes concentraciones de estos compuestos, inducirán mayor daño al material genético en comparación con el testigo negativo.

V.II. Hipótesis particulares

Al tener potencial genotóxico, los linfocitos expuestos a estos plaguicidas presentarán un momento de cauda mayor a aquellos que no estuvieron expuestos; así como una mayor proporción de células con mayor daño (proporción de cometas).

Los compuestos generarán daño a nivel cromosómico en los linfocitos visible a través de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos, yemas nucleares y un aumento en células apoptóticas y necróticas.

VI. Materiales y Métodos

VI.I. Obtención de muestra

La obtención de sangre para ambas pruebas se hizo de los mismos 3 sujetos de entre 20-25 años, no fumadores, clínicamente sanos y en ayuno. Se obtuvieron de 3 a 5 mL de sangre periférica mediante punción venosa con una jeringa previamente heparinizada.

Posteriormente, cada muestra fue repartida entre los diferentes tratamientos.

VI.II. Preparación de plaguicidas

Se utilizaron los siguientes plaguicidas de uso común obtenidos en casas de distribución dentro de la Ciudad de México:

Vital 80 pH (mancozeb) con un 80% de ingrediente activo (I.A.), en presentación polvo humectable. Registro: RSCO-FUNG-367-002-080

Monocrón (monocrotofós) con un 56% de I.A., en presentación líquido miscible. Registro: RSCO-INAC-0149-322-012-056

Presto® (permetrina) con un 5% de I.A., en presentación gránulos dispersables. Registro: RSCO-JAR-INAC-156-351-005-0.500

Pirimor 50 WG (pirimicarb) con un 50% de I.A., en presentación gránulos dispersables. Registro: RSCO-INAC-0157-304-034-050

Se utilizó agua destilada para la preparación de las concentraciones requeridas las cuales fueron establecidas con base en experimentos preliminares: mancozeb (0.5, 1 y 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), monocrotofós (0.25, 0.5 y 0.75 mg/mL), permetrina (50, 100, 150 y 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y pirimicarb (50, 100 y 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Como testigo positivo se utilizaron 200 μl de sulfato de bleomicina (Bleolem 15 U) y como negativo medio RMPI 1640.

V.III. Ensayo cometa

Tratamiento y montaje de laminillas

En campana de flujo laminar se prepararon tubos estériles eppendorf con 500 μ L de medio RMPI 1640, se les añadieron 10 μ L de sangre completa y posteriormente las concentraciones de plaguicidas anteriormente mencionadas, más los testigos positivo y negativo. Se dejaron incubar por 24 h en una estufa a 37 °C.

Pasado el tiempo de tratamiento, se centrifugaron los tubos a 2000 rpm por 5 minutos.

Se desechó el sobrenadante y del sedimento se tomaron 10 μ L que se mezclaron con 75 μ L de agarosa de punto de fusión bajo (Sigma) al 0.5%.

Posteriormente, se tomaron 80 μ L de la mezcla y se colocaron en un cubreobjetos que se empalmó con un portaobjetos previamente cubierto con agarosa de punto de fusión normal 0.5% (Sigma). Se dejaron enfriar hasta que fue posible remover el cubreobjetos deslizando y se agregó una tercera capa de agarosa de punto bajo de fusión bajo.

Lisis

En una caja plástica se colocaron las laminillas y se cubrieron con 30 mL de solución de lisis fría (NaCl, EDTA, Tris, NaOH, DMSO, Tritón X-100 y agua desionizada), se cubrió con aluminio para evitar el contacto con la luz y se dejó una hora.

Electroforesis

Pasado el tiempo se retiraron las laminillas de la solución de lisis y se colocaron en una cámara de electroforesis con amortiguador frío (NaOH 10 N, EDTA 200 mM 10 pH y agua desionizada) $\text{pH} \geq 13$. Se dejaron por 25 minutos en el refrigerador y posteriormente se corrió la electroforesis a 25 V, 300 mA por 20 minutos con el propósito de separar las hebras de ADN. Todo este procedimiento se realizó en obscuridad para evitar la desnaturalización del ADN.

Una vez terminado, se retiraron las laminillas y se neutralizaron con 3 lavados de 5 minutos con Tris 0.4M de pH 7.5 (BioRad), eliminando así la alcalinidad del amortiguador y posibles restos de detergente que pudieran interferir en el proceso de tinción y observación, además de renaturalizar el ADN no dañado.

Fijación y tinción

Se fijaron con etanol al 99% por 15 minutos y se dejaron secar para su posterior observación.

Para teñir fue necesario rehidratar las laminillas con agua desionizada estéril y filtrada por 5 minutos, se secaron y se colocaron 50 μL de Bromuro de etidio 0.04 mg/mL 1x en un cubreobjetos que después se puso sobre el portaobjetos con la muestra, este colorante funge como intercalante del ADN por lo que permite su observación completa.

Una vez teñidas se protegieron de la evaporación en una cámara húmeda oscura y se llevó a cabo la observación en un microscopio de fluorescencia Zeiss.

Lectura de laminillas

Se examinaron 50 células por laminilla por triplicado aleatoriamente tratando de cubrir toda el área del portaobjetos, evitando las orillas de éste. Se usó un microscopio de fluorescencia a 400 aumentos con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm.

Para el análisis del momento de cauda se empleó un programa de análisis de imágenes Comet assay IV.

VI.IV. Prueba de micronúcleos

Cultivo de linfocitos

En el caso de micronúcleos es necesario cultivar los linfocitos con la finalidad de estimular su división y salida de G0 de manera que los plaguicidas puedan interactuar con ellos y ver el resultado tras la primera división.

En campana de flujo laminar se colocaron tubos cónicos para centrifuga con 4.5 mL de medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 0.2 mL de fitohemaglutinina (Sigma). A cada uno se le agregaron de 8-10 gotas de sangre (400 µL aproximadamente) y se mantuvieron en incubación a 37 °C por 24 h.

Tratamiento y bloqueo de citocinesis

Pasadas las 24 h se añadieron los plaguicidas en sus respectivas concentraciones, la bleomicina para el testigo positivo y únicamente el medio de cultivo en el caso del testigo negativo; se dejó interactuar por 24 h a 37 °C.

A las 48 h se agregaron 375 μ L de citocalasina B (Cyt-b) (Gibco) a cada tubo para inhibir la citocinesis y se dejó actuar por 24 h a 37 °C.

Cosecha y tinción

Transcurridas las 72 h de cultivo óptimo se procedió a la prefijación de las células. Se añadió un mililitro de fijador (metanol-ácido acético 3:1, Sigma) lentamente por las paredes del tubo hasta mezclar. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 1500 rpm.

Se descartó el sobrenadante y se volvieron a añadir 5 mL de fijador hasta deshacer el botón. Nuevamente se centrifugó 10 minutos a 1500 rpm y se repitió el proceso hasta que el sobrenadante estuviese transparente.

Preparación de laminillas y tinción

Tras la última centrifugación, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el botón. En un portaobjetos limpio se deslizaron 3 gotas de muestra tratando de abarcar toda el área y se dejaron secar al aire libre.

Una vez secas se sumergieron en colorante Giemsa previamente filtrado en amortiguador (1:30) entre 3-5 minutos. Se enjuagaron con agua de la llave y se dejaron secar.

Análisis de laminillas

El experimento se repitió 3 veces.

De cada laminilla se obtuvo el índice de división nuclear (IDN) que provee el promedio de núcleos por célula y el índice de proliferación por bloqueo de citocinesis (IPBC) que provee el promedio de divisiones celulares. Para ello, se contaron las primeras 500 células, registrando su estado mononucleado, binucleado, trinucleado o tetranucleado.

Para el análisis genotóxico se observaron 1000 células binucleadas al azar a 40 y 100 aumentos registrando su estado micronucleado (independientemente de cuántos tenía), así como la presencia de puentes nucleoplásicos, brotes nucleares y células apoptóticas o necróticas.

VI.V. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos y las gráficas se utilizó el programa Sigma Plot 11.0, para complementar gráficos y tablas se usó Microsoft Excel y Microsoft PowerPoint 2011.

En el caso del ensayo cometa se analizó el momento de cauda por promedio y desviación entre los tratamientos contra los testigos, mediante un ANOVA múltiple de un factor y un análisis post-hoc Newman-Keuls con un intervalo de confianza $p > 0.05$.

Para micronúcleos se obtuvieron los índices de división nuclear (IND) y de proliferación por bloqueo de citocinesis (IPBC) para comparar la respuesta mitogénica de los linfocitos a los efectos citostáticos de los plaguicidas.

Todos los parámetros se sometieron por categoría separada a un ANOVA multifactorial de un factor con una prueba post-hoc Newman-Keuls a un intervalo de confianza $p > 0.05$, a manera de distinguir diferencias significativas entre el testigo negativo y deducir si el daño provocado fue mayor o menor al testigo positivo.

Para permetrina se realizó una gráfica concentración-respuesta predictiva con comportamiento sigmoideal a manera de tener una idea sobre el posible valor numérico donde se encuentra el umbral de reacción.

V.II. Resultados

Ensayo cometa

El análisis del momento de cauda relaciona el producto de longitud de cauda e intensidad de ésta en cada tratamiento; en la tabla 3 se presentan los promedio de 150 datos por concentración de plaguicida más su desviación estándar así como los correspondientes a los testigos negativo (medio RPMI 1640) y positivo (bleomicina a 200 μ L).

Tabla 3. Efecto de los plaguicidas mancozeb (Vital 80 pH), monocrotofós (Monocrón), permetrina (Presto®) y pirimicarb (Pirimor 50 WG) en linfocitos de sangre periférica humana evaluados por el momento de cauda a través del ensayo cometa.

Plaguicida	Tratamiento (μ L/mL)	Momento de cauda Media \pm D.E.
Mancozeb	Testigo negativo	0.8892558 \pm 0.33
	Testigo positivo	3.2174150 \pm 3.26*
	0.5	1.9591605 \pm 4.95 *
	1	2.4595752 \pm 2.69 *
	1.5	3.7708654 \pm 7.09 *
Monocrotofós	Testigo negativo	0.22171724 \pm 0.28
	Testigo positivo	3.57723213 \pm 3.06 *
	250	3.43725632 \pm 3.26 *
	500	0.85226674 \pm 1.51
	750	2.55519771 \pm 3.86 *
Permetrina	Testigo negativo	0.25103835 \pm 3.38
	Testigo positivo	3.38560738 \pm 3.24 *
	50	0.42226688 \pm 0.57
	100	1.13038607 \pm 1.25
	200	3.58706769 \pm 5.56 *
Pirimicarb	Testigo negativo	0.18084156 \pm 0.25
	Testigo positivo	3.51817561 \pm 2.82 *
	50	0.21716572 \pm 0.32
	100	2.60794561 \pm 3.07 *
	150	1.19724633 \pm 1.83 *

ANOVA con una $p > 0.001$; post-hoc Newman-Keuls con una $p > 0.05$.

*Diferencias significativas entre el testigo negativo y los tratamientos

Todos los tratamientos marcados con (*) y testigos positivos presentan diferencias significativas contra el testigo negativo.

Mancozeb induce un incremento significativo en el momento de cauda respecto al testigo negativo desde la primera concentración. Se puede observar un aumento en el daño conforme se incrementa la concentración. Entre todos los plaguicidas éste y permetrina son los únicos que sobrepasan el valor de daño del testigo positivo.

En el caso de monocrotofós hubo diferencias de todas las concentraciones contra el testigo negativo, siendo la más baja la que presenta mayor daño.

Permetrina tuvo un comportamiento distinto, pues a pesar de que se observa un efecto concentración-respuesta, únicamente la concentración más alta generó daño significativamente diferente al testigo negativo.

Pirimicarb presenta un comportamiento inesperado ya que entre 50 y 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ hay un aumento del daño y entre 100 y 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ disminuye; es el único plaguicida que mantiene sus valores por debajo de los obtenidos por el testigo positivo.

Todos los tratamientos muestran una homogeneidad entre los valores del testigo positivo, comprobando la acción de la bleomicina como agente genotóxico y dando así validez a los resultados observados.

Las imágenes de la figura 5 muestran ejemplos de tipos celulares encontrados en cada tratamiento captadas con el microscopio de fluorescencia.

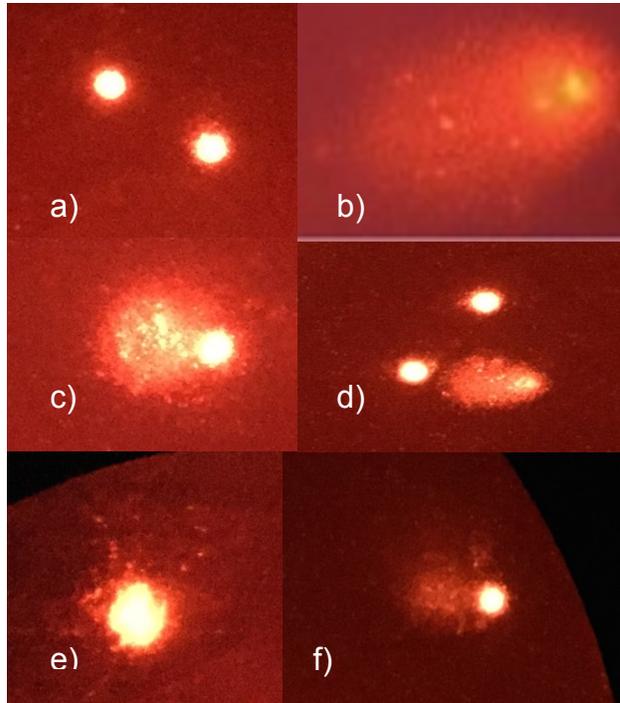


Figura 5. Núcleos de linfocitos de sangre periférica humana sometidos a la metodología cometa con diferentes plaguicidas; (a) testigo negativo, (b) testigo positivo (bleomicina), (c) ejemplos de cometas observados en tratamientos con mancozeb, (d) permetrina, (e) monocrotofós y (f) pirimicarb. Observación con aumento de 400x.

Micronúcleos

La tabla 4 muestra la frecuencia promedio de MN, PN, BN y su desviación estándar en 3000 células para cada concentración de plaguicida y en la tabla 5 se presenta el daño por muerte celular (apoptosis y necrosis).

Tabla 4. Daño genotóxico provocado por los plaguicidas mancozeb (Vital 80 pH), monocrotofós (Monocrón), permetrina (Presto®) y pirimicarb (Pirimor 50 WG) en linfocitos de sangre periférica humana, evaluado en células binucleadas.

Plaguicida	Tratamiento ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Frecuencia	Frecuencia	Frecuencia
		Binucleadas con MN	Binucleadas con Puentes	Binucleadas con Brotos
		Media \pm D.E.	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
Mancozeb	Testigo negativo	0.50 \pm 0.7	0 \pm 0	0 \pm 0
	Testigo positivo	27.5 \pm 0.7 *	5.5 \pm 0.7 *	2.5 \pm 0.7 *
	0.5	3.5 \pm 0.7 *	2 \pm 0.1 *	0 \pm 0
	1	15 \pm 1.41 *	18.5 \pm 0.7 *	11 \pm 1.41 *
	1.5	12 \pm 0.11 *	19 \pm 1.41 *	0 \pm 0
Monocrotofós	Testigo negativo	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	Testigo positivo	24.5 \pm 0.7 *	3.5 \pm 0.7 *	0.5 \pm 0.7 *
	250	4.5 \pm 0.7 *	1 \pm 0.01 *	0 \pm 0
	500	29 \pm 0.1 *	0 \pm 0	0 \pm 0
	750	31.5 \pm 2.12 *	0.5 \pm 0.7 *	0 \pm 0
Permetrina	Testigo negativo	1 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	Testigo positivo	24 \pm 1.41 *	4 \pm 1.43 *	1 \pm 0.01 *
	50	1 \pm 0.01	0 \pm 0	2.5 \pm 0.7 *
	100	16.5 \pm 0.73*	0 \pm 0	0.5 \pm 0.7 *
	150	12.5 \pm 0.7*	1 \pm 0.01 *	1 \pm 0.1 *
	200	2.5 \pm 0.7*	0 \pm 0	0 \pm 0
Pirimicarb	Testigo negativo	1 \pm 0	1 \pm 0	0 \pm 0
	Testigo positivo	23.5 \pm 2.11 *	2.5 \pm 0.7 *	0.5 \pm 0.7 *
	50	2 \pm 0.11 *	0 \pm 0.01*	0 \pm 0
	100	3 \pm 0.012 *	1 \pm 0.122	0 \pm 0
	150	0 \pm 0 *	0 \pm 0 *	0.5 \pm 0.7 *

ANOVA con una $p > 0.001$; un post-hoc Newman-Keuls con una $p > 0.05$.

*Diferencias significativas entre el testigo negativo y los tratamientos

Tabla 5. Muerte celular provocada por 3 concentraciones diferentes de plaguicidas mancozeb (Vital 80 pH), monocrotofós (Monocrón), permetrina (Presto®) y pirimicarb (Pirimor 50 WG) en linfocitos de sangre periférica humana.

Plaguicida	Tratamiento ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Frecuencia Binucleadas apoptóticas	Frecuencia Binucleadas necróticas
		Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
Mancozeb	Testigo negativo	0 \pm 0	0 \pm 0
	Testigo positivo	27.5 \pm 2.12 *	112.5 \pm 2.12 *
	0.5	0.5 \pm 0.7 *	0.5 \pm 0.71 *
	1	5.5 \pm 2.13 *	24.5 \pm 2.12 *
	1.5	33.5 \pm 2.12 *	54.5 \pm 2.13 *
Monocrotofós	Testigo negativo	0 \pm 0	0 \pm 0
	Testigo positivo	23 \pm 1.41 *	114 \pm 1.41 *
	250	3 \pm 1.41 *	8.5 \pm 1.90 *
	500	0 \pm 0	12 \pm 1.41 *
	750	16 \pm 1.43 *	53.5 \pm 1.01 *
Permetrina	Testigo negativo	0.5 \pm 0.7	0 \pm 0
	Testigo positivo	23 \pm 1.41 *	114 \pm 1.41 *
	50	0.5 \pm 0.7	24 \pm 1.43 *
	100	5 \pm 0.12 *	32.5 \pm 0.7 *
	150	1.5 \pm 0.7 *	35.5 \pm 2.12 *
	200	4.5 \pm 0.73 *	151.5 \pm 4.94 *
Pirimicarb	Testigo negativo	0 \pm 0	0 \pm 0
	Testigo positivo	31 \pm 2.82 *	112 \pm 1.41 *
	50	5 \pm 1.41 *	13.5 \pm 0.73 *
	100	0 \pm 0	103.5 \pm 0.7 *
	150	0 \pm 0	99 \pm 1.4 *

ANOVA con una $p > 0.001$; un post-hoc Newman-Keuls con una $p > 0.05$.

*Diferencias significativas entre el testigo negativo y los tratamientos

Mancozeb mantiene diferencias significativas para MN y PN contra el testigo negativo sin superar el valor del testigo positivo en ninguna momento para el caso de MN, ambos presentan comportamientos similares aumentando conforme la concentración pero con una elevación considerable a partir de la segunda y disminuyendo ligeramente en la tercera para MN. En cuando a brotes, únicamente se observan con 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Tanto las células apoptóticas como las necróticas aumentan conforme la concentración se incrementa, siendo las necróticas las más frecuentes.

Monocrotofós aumenta la frecuencia de MN conforme la concentración siendo el único plaguicida que excede las 20 células micronucleadas. Genera puentes con frecuencia baja aunque significativamente diferente contra el negativo, y no induce brotes en ningún momento.

Tanto las células apoptóticas como las necróticas disparan su frecuencia a partir de la tercera concentración, aunque se presentan desde la primera.

En permetrina se observa un aumento de MN con 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y posteriormente comienza a descender con 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para finalmente bajar radicalmente en la última concentración. Únicamente se generan escasos puentes en 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y algunos brotes que desaparecen conforme aumenta la concentración.

No se observa un patrón claro en cuanto a células apoptóticas ya que de 50 a 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ disminuyen y vuelven a incrementar de 100 a 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$, en el caso de las necróticas se alcanza un umbral posterior a los 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ya que aumentan considerablemente.

Pirimicarb fue el que menos MN, PN y brotes produjo y cuya frecuencia fue disminuyendo conforme la concentración aumentaba. Presenta una mínima incidencia de células apoptóticas en la concentración más baja y las células necróticas parecen alcanzar su máxima frecuencia en la concentración media para posteriormente ir disminuir.

Las figuras 6, 7, 8 y 9 muestran ejemplos de células encontradas en los tratamientos, representando las principales formas celulares con daño genotóxico consideradas en esta tesis y seleccionadas bajo los criterios de clasificación utilizados en "HUMN Project" (Fenech *et al.*, 2003), observación a 40 y 100 aumentos.

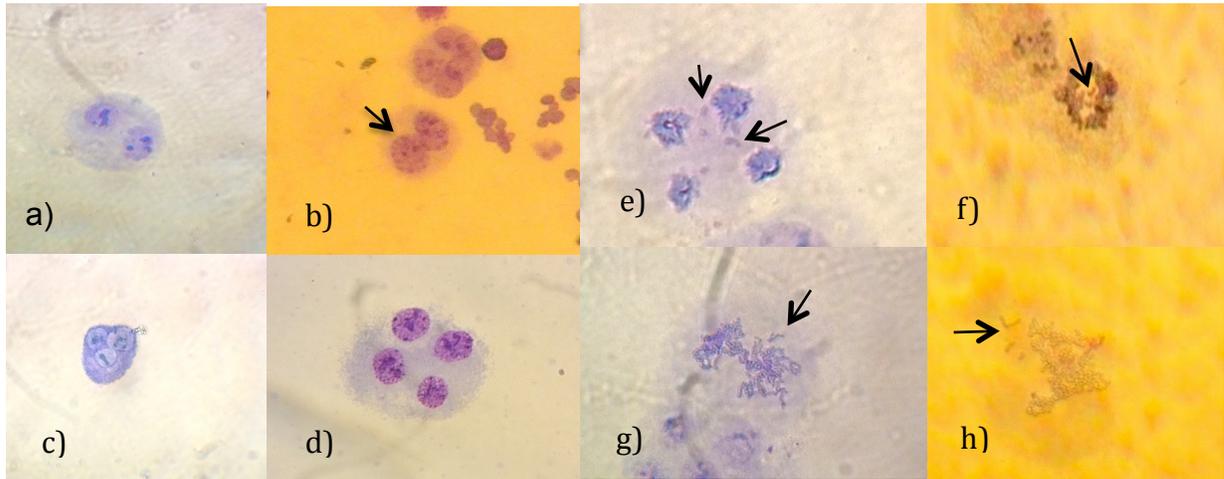


Figura 6. (a, b) Células binucleadas sin daño, (c) célula trinucleada y (d) célula tetranucleada. Imágenes de la formación previa de MN. (e, f) se muestran fragmentos que no se incluyeron en anafase, (g, h) Fragmentos previos a metafase (no tomados en cuenta para el análisis)

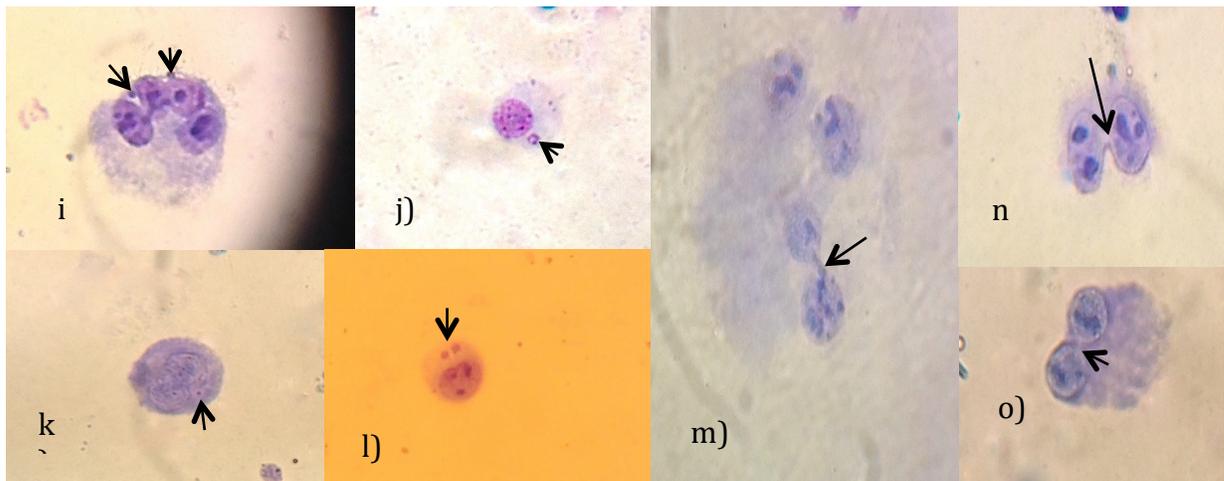


Figura 7. Imágenes con células micronucleadas. (i) tetranucleada con 2 MN, (j) mononucleada con MN, (k) binucleada con MN y (l) binucleada con 2 MN. Derecha, células con ejemplos de PN (m, n, o).

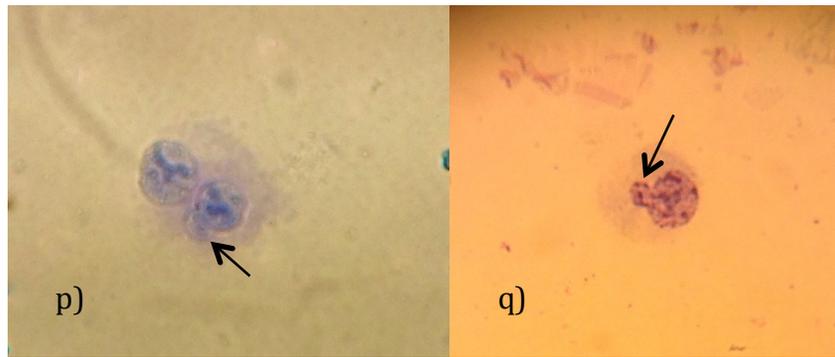


Figura 8. Células con brotes nucleares, (p) binucleada con brotes y (q) mononucleada con brotes.



Figura 9. (t, u) ejemplos de células en estado apoptótico, se puede ver la segregación del núcleo previo al citoplasma. Derecha, (r) comienzo de vacuolización del citoplasma previo a los núcleos, característica de células necróticas y (s) avance de vacuolización a núcleos en estado avanzado de necrosis.

La tabla 6 muestra los resultados de índices IDN y IPBC para cada tratamiento.

Tabla 6. Índice de división nuclear (IDN) e índice de proliferación por bloqueo de citocinesis (IPBC) en linfocitos de sangre periférica humana con los distintos tratamientos.

Plaguicida	Tratamiento (μL/mL)	IND	IPBC
		Media ± D.E.	Media ± D.E.
Mancozeb	Testigo negativo	1.997 ± 0.27	1.995 ± 0.33
	Testigo positivo	1.969 ± 0.45	1.814 ± 0.27
	0.5	2.009 ± 0.3	1.999 ± 0.43
	1	2.193 ± 0.32	2.07 ± 0.66
	1.5	2.167 ± 0.33	2.01 ± 0.77
Monocrotofós	Testigo negativo	2.008 ± 0.35	2 ± 0.47
	Testigo positivo	1.974 ± 0.46	1.821 ± 0.28
	250	2.082 ± 0.42	2.028 ± 0.65
	500	2.175 ± 0.22	2.049 ± 0.48
	750	2.153 ± 0.35	1.982 ± 0.43
Permetrina	Testigo negativo	1.991 ± 0.34	1.991 ± 0.66
	Testigo positivo	1.964 ± 0.48	1.812 ± 0.45
	50	1.999 ± 0.37	1.969 ± 0.23
	100	2.186 ± 0.33	2.081 ± 0.71
	150	2.174 ± 0.43	2.058 ± 0.65
	200	1.968 ± 0.36	1.804 ± 0.22
Pirimicarb	Testigo negativo	1.987 ± 0.32	1.985 ± 0.32
	Testigo positivo	1.978 ± 0.43	1.842 ± 0.21
	50	2.071 ± 0.78	2.047 ± 0.22
	100	2.097 ± 0.44	1.944 ± 0.22
	150	2.135 ± 0.41	1.986 ± 0.35

ANOVA con una $p > 0.001$; un post-hoc Newman-Keuls con una $p > 0.05$.

*Diferencias significativas entre el testigo negativo y los tratamientos

Los rangos en resultantes varían entre 1.8 y 2.2 lo cual implica que hubo al menos una división por lo cual casi todas las células fueron binucleadas.

Finalmente en la figura 10 se muestra la gráfica concentración-respuesta predictiva con comportamiento sigmoideal donde se observa la respuesta de permetrina, y el umbral aproximado a partir del cual se esperaría un cambio significativo en el efecto del plaguicida sobre las células.

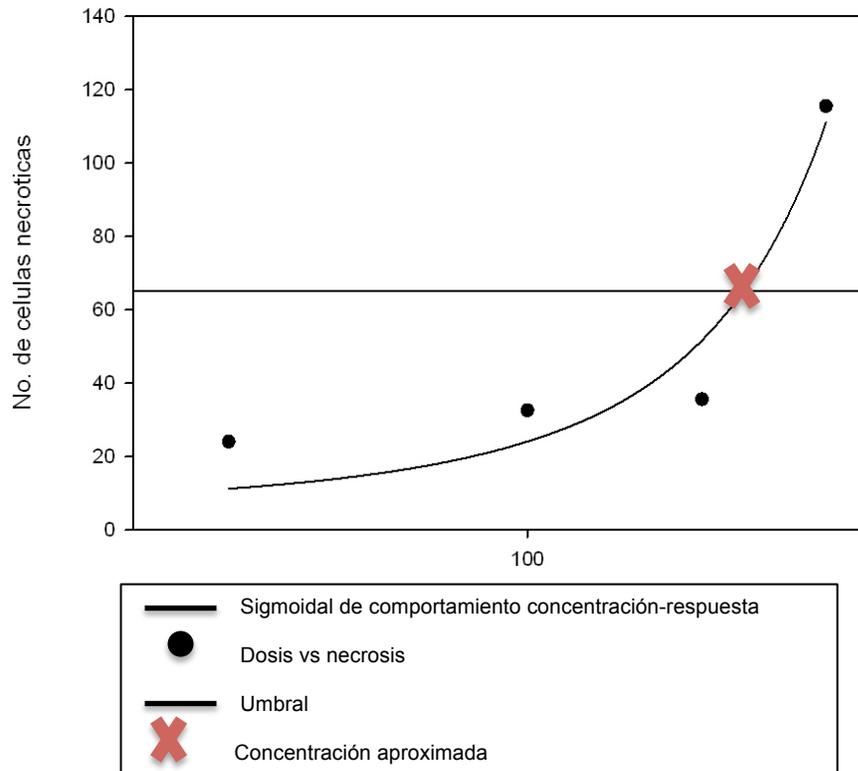


Figura 10. Gráfica concentración-respuesta de comportamiento sigmoideal donde se muestra el efecto de la permetrina a diferentes concentraciones y una predicción aproximada del umbral donde se incrementará la necrosis y daño (la X muestra un valor aproximado de 170 µL/mL).

V.III. Discusión

El estudio *in vitro* permite tener una visión aproximada y predictiva sobre el comportamiento de un sistema ante un tratamiento. En este caso los plaguicidas mostraron comportamientos diversos al ser aplicados en linfocitos de sangre periférica que serán analizados a continuación.

Mancozeb

Tanto el ensayo cometa como la prueba de MN coinciden al mostrar un efecto dependiente con la concentración. La cauda aumenta conforme se incrementa la concentración, así como los MN, puentes, células apoptóticas y necróticas; por ende es posible decir que el plaguicida generó daño genotóxico y muerte celular al mismo tiempo.

Esto coincide con los estudios hechos en médula ósea y sangre completa de ratas Wistar donde se observó un aumento en la frecuencia de células con MN en aquellas tratadas con mancozeb (Goldoni *et al.*, 2014); de igual forma con anterioridad se había demostrado una elevación en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos (Deruccio *et al.*, 1989; Jablonická *et al.*, 1989) probando que mancozeb era capaz de afectar y modificar al ADN de diversas maneras, no sólo induciendo muerte.

Este comportamiento dual podría explicarse debido a su naturaleza electrofílica y de asociación con metales, ya que en estudios previos se ha mostrado que este compuesto tiene capacidad genotóxica por inducción de estrés oxidante, que *in vitro* se genera por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mahboob *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2012).

Pero el estrés oxidante no sólo tiene potencial de generar daño genotóxico si no también apoptosis y necrosis dependiendo de la concentración o mecanismo de

acción. Por ende, ésta podría ser la razón por la cual fue posible observar tanto MN, PN y aumento en la cauda a la par de muerte celular por apoptosis y necrosis.

Sin embargo el patrón entre necróticas y apoptóticas difiere, por un lado, se puede observar necrosis constante desde la primera concentración pudiendo reflejar un daño citotóxico general. En cuanto a las apoptóticas se observa un patrón más concordante con lo observado en cometa, es decir, la frecuencia de apoptóticas se mantiene baja hasta la tercera concentración en la que posteriormente se dispara y los MN y puentes aumentan hasta la tercera concentración donde posteriormente se mantienen. Esto podría significar que las células fueron capaces de mantener el daño en el genoma y una vez superado ese nivel, éstas se programaron para morir.

A este respecto, ShyYan *et al.* (2014) demostraron que el gen represor RTP801 encargado de proteger a la célula de condiciones adversas mediante apoptosis, en presencia de maneb y mancozeb es capaz de regular la inducción de daño citotóxico por la vía NF- κ B en líneas celulares de ratas. Esto podría dar una idea de la vía que se activa para producir muerte celular programada, ya que los productos de ROS probablemente generados por mancozeb pueden activar múltiples vías que generen apoptosis.

Otro resultado obtenido fue el de brotes presentes únicamente en la segunda concentración, la cual coincide con la presencia de PN por lo que se podría intuir un mecanismo de contracción por la ruptura de un puente entre dos células, dando paso a brotes temporales (Fenech *et al.*, 2011), ya que para la tercera concentración desaparecen.

Monocrotofós

En el caso de monocrotofós se observó incremento considerable en la frecuencia de células con MN superando a todos los demás plaguicidas de manera dosis dependiente de la concentración; a diferencia de mancozeb este plaguicida no generó puentes ni brotes, pero su proporción de células apoptóticas y necróticas es similar.

El ensayo cometa aparentemente no muestra un patrón coherente con los resultados encontrados en MN, ya que a partir de la primera concentración se observa el mayor daño, posteriormente desaparece y vuelve a aparecer para la tercera concentración.

Monocrotofós es considerado altamente tóxico (PAN International, 2014; WHO 2009; UTZ, 2014) por lo que, aunque la proporción de necróticas es mayor a las apoptóticas el resultado observado en muerte celular no es tan alto como se debería esperar y el genotóxico sí, esto podría deberse a sus propiedades alquilantes ya que añade principalmente grupos etilo y metilo (Fest *et al.*, 1982) fáciles de integrar al momento de separarse las cadenas de ADN en replicación (fase S) o transcripción de proteínas requeridas en G1 y G2 (Jamil *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2006).

Esto concuerda con las investigaciones de Rupa *et al.* (1988) quienes encontraron daño concentración-dependiente a través de la observación de “gaps” y rupturas cromatídicas; de la misma forma Das *et al.* (2007) corroboraron el mismo daño con ensayo cometa, comprobando que éste incrementaba conforme la concentración en linfocitos aislados, hipotetizando que su poder de acción se da principalmente en fase S y G2 (concordante con su poder alquilante).

Se puede entonces considerar que monocrotofós mantiene un alto grado de daño genotóxico conforme la concentración se incrementa, sin aumentar considerablemente la muerte celular; probablemente daña desde la primera concentración pudiendo observarse mediante cometa ya que se da a nivel de cadena sencilla y ese daño podría deberse a oxidación, pues recientemente se han estado haciendo estudios que demuestran que también es posible que genere peroxidación de lípidos y liberación de ROS (Santosh *et al.*, 2010; Yaduvanshi *et al.*, 2010). Conforme aumenta la concentración se eleva la producción de rupturas de doble cadena pudiendo ser vistas como MN.

Lo importante a destacar es el potencial genotóxico que tiene monocrotofós, ya que no sólo lo genera puesto que también lo mantiene y lo aumenta; aunado a su potencial citotóxico.

Permetrina

Permetrina tuvo un comportamiento interesante y diferente al de los dos anteriores. Para todos los plaguicidas se habían considerado 3 concentraciones únicamente que fuesen concordantes entre sí (que hubiese equidistancia entre ellas), sin embargo para MN las concentraciones medias (100 y 150 µg/mL) mostradas en los resultados tuvieron comportamientos diversos a los observados en ensayo cometa, pero relacionados entre sí, ya que ambos análisis coinciden en un incremento radical de daño al aumentarse la concentración a 200 µg/mL, probando que existe un umbral de acción.

El ensayo cometa no muestra diferencias significativas con el testigo negativo con las primeras 2 concentraciones, sin embargo para la tercera y más alta, ese daño aumenta superando al del testigo positivo aunque casi son iguales.

En cambio, la prueba de MN muestra un aumento en la frecuencia de células con éstos a 100 y 150 µg/mL, pero disminuyendo considerablemente a 200 µg/mL, en cambio la frecuencia de células necróticas aumenta considerablemente a 151.5 ± 4.94 . Esta relación concuerda con estudios realizados en linfocitos donde el daño significativo encontrado se da a partir de la concentración más alta (Undergër y Basaran, 2005; Turkez *et al.*, 2012; Ramos-Chávez, 2015).

Por lo que es posible considerar que hasta 100 y 150 µg/mL se está generando daño que se puede visualizar por medio de MN y (aunque débilmente) también por ensayo cometa, una vez superado ese nivel los MN disminuyen considerablemente ya que son reemplazados por muerte celular (apoptosis y necrosis) y ese daño se ve uniforme como cauda en los cometas y aumentando notablemente a 200 µg/mL.

A partir de estos datos se realizó la gráfica observada en la figura 10 que permite predecir aproximadamente la concentración umbral (170 µg/ml) a la cual se disparará el efecto máximo del plaguicida; a pesar de que el modelo matemático permite tener una aproximación a ese daño, es necesario comprobarlo experimentalmente; sin embargo es importante remarcar la importancia de haber encontrado este comportamiento a partir de las concentraciones probadas.

Es importante mencionar que debido a la naturaleza de la permetrina, su efecto suele ser inmediato (He, 1994). Sin embargo las industrias dedicadas a producir plaguicidas han buscado la eficacia del producto a través de la modificación de su presentación comercial sin alterar su efecto como ingrediente activo, sólo su propagación.

Actualmente, en la industria de los insecticidas como la permetrina se busca que su acción inmediata permanezca en el ambiente más tiempo a manera de proteger el área tratada por períodos más largos con un menor número de aplicaciones (Ar, 2015). El producto comercial usado en esta tesis (Presto®) tiene la característica de ser granulado y de liberación prolongada, y a pesar de que únicamente se aplicó un tratamiento de 24 h, los resultados obtenidos en ésta tesis muestran de manera más fidedigna el riesgo al que están expuestas las personas que trabajan con este plaguicida ya que puede acumularse en el sistema y alcanzar el umbral de acción más rápido, por ende presentar consecuencias en la salud a una etapa más temprana.

La ventaja que proporcionan los resultados de permetrina son la comprobación de que un plaguicida es capaz de generar daño genotóxico, pero que sólo será “visible” y de alto riesgo hasta que se alcanza un umbral.

Pirimicarb

Del último plaguicida se esperaba un comportamiento similar al de mancozeb ya que pertenecen al mismo grupo químico, sin embargo los resultados observados difieren considerablemente.

La información sobre daño genotóxico disponible alrededor de éste plaguicida es muy limitada, y como se mencionó en los antecedentes está enfocada en la optimización del mismo o del daño a las plagas que contrarresta (Surrallés *et al.*, 1995). Sin embargo, de todos los plaguicidas evaluados en esta tesis, fue el que menor daño genotóxico generó a las células aunque indujo MN y muerte celular. Se observó efecto concordante con MN y cometa, probablemente causado por eventos de cadena sencilla.

Varios estudios hechos en poblaciones *in vivo* con trabajadores expuestos a

pirimicarb, demostraron incrementar aberraciones cromosómicas (Pilinskaia, 1982) y daño por cometa (Undergër y Basaran, 2005).

En otros ensayos como en ovario de criceto chino a concentraciones altas, se encontró daño genético por MN pero también muy bajo (Vera-Candioti *et al.*, 2015).

La diferencia en este caso fue un comportamiento opuesto a la permetrina, el poco daño que se generó fue disminuyendo conforme la concentración se incrementó, el resultado más evidente fue en células necróticas ya que éstas disminuyen su frecuencia en la concentración más alta.

Existe evidencia de que una vez que hubo daño por radiación o agentes químicos, puede haber hasta un 50% de reparación en rupturas de cadena sencilla una vez que se expuso al tratamiento (Östling y Jonhanson, 1984; Rundell *et al.*, 2003, Collins, 2004). Pirimicarb provocó muerte necrótica desde un inicio, sin embargo es probable que mucho de ese daño fuese reparado ya que el sistema soportó o notó que se podía reparar, disminuyendo de esa forma la cantidad de células que se iban a necrosis y explicando la disminución de valores observados en los resultados.

Existen trabajos en los que se prueba la reparación en ADN posterior a la exposición por plaguicidas en peces a partir de la concentración más alta (Mohanty *et al.*, 2010) y de decremento de daño en eritrocitos de tilapia expuesta a monocrotofós (Banu *et al.*, 2001). Lamentablemente no existen estudios alrededor de pirimicarb al respecto, sin embargo se ha descrito una teoría llamada Teoría de Reparación Dependiente de un Umbral, la cual plantea que las enzimas del sistema de reparación del ADN se activan y su tasa de acción incrementa cuando se acumula suficiente daño tóxico por encima de un umbral determinado, bajo del cual el sistema de reparación opera a un nivel enzimático

basal (Ching, 2001) y se ha probado en organismos acuáticos expuestos a plaguicidas (Siu *et al.*, 2003, 2004).

Esto podría apoyar los resultados obtenidos, ya que no se ve disminución de valores hasta que se alcanza el mayor daño en 100 µg/mL. Probablemente pirimicarb genera alteraciones capaces de repararse paulatinamente, sin embargo no es hasta que ese daño es grande cuando se activan las enzimas de reparación y se ve un cambio, aunque los resultados realmente no muestran un momento de cauda considerable sí hubo daño que podría ser notado por el sistema.

Explicando así una posible reparación de ADN dañado provocado por pirimicarb y que se observa en los resultados de esta tesis.

Como era de esperarse cada plaguicida evaluado mantiene un comportamiento diferente de los demás, los resultados demuestran daño al ADN en todos ellos, sin embargo no es posible determinar el mecanismo por el cual se generó pues pertenecen a grupos químicos distintos.

Los MN observados en todas las muestras pueden deberse a múltiples causas como por retraso de fragmentos acéntrico cromosómicos o cromatídicos en anafase, reparación incompleta de rupturas de ADN, retraso de cromosomas completos en anafase, huso acromático disfuncional, entre otros y cometas por rupturas de cadena sencilla, sitios álcali-lábiles y procesos de reparación incorrecta, como se mencionó en la introducción. Por otro lado, la frecuencia de puentes y brotes fue muy baja o nula en la mayoría de ellos; aquellos que presentaron brotes pudo deberse a la elongación y fractura de los puentes nucleoplásmicos en telofase ya que coinciden en aparición con éstos (Fenech, 2011); en el caso de PN la causa más común es la fusión de telómeros, ya sea por el inapropiado ensamblaje de proteínas que protegen al telómero o por uso de telómeros para reparación en algún daño al ADN (joining-mechanisms) (Longhese, 2008), relacionado principalmente con daño oxidante.

El IND e IPBC no muestran diferencias significativas para ningún tratamiento y sus valores se encuentran en el rango óptimo según HUMN Project que va desde 1.3 a 2 (Fenech, 2007), lo cual implica que hubo al menos una división celular y que la mayoría de las células encontradas son binucleadas. Esto permite decir que ninguno de los plaguicidas tiene efecto citostático aparente.

Y cabe mencionar que en este experimento se evaluó principalmente al ingrediente activo pero a través de su presentación comercial.

IX. Conclusiones

Los resultados demuestran y comprueban que todos los plaguicidas probados generan daño al ADN.

El ensayo cometa y la prueba de micronúcleos mostraron ser herramientas útiles, eficientes y sensibles para detectar los diferentes comportamientos de cada plaguicida, así como su complementariedad al momento de evaluar daño genotóxico.

Todos los plaguicidas generaron una cauda mayor a los testigos negativos, y por lo menos una concentración con cauda similar a la del testigo positivo en ensayo cometa.

Todos los plaguicidas indujeron MN, células apoptóticas, necróticas y sólo mancozeb presentó una alta frecuencia de puentes y brotes.

El testigo positivo se comportó de acuerdo a lo esperado, por lo que se tuvo seguridad en la metodología utilizada para el análisis de los ensayos.

Genotóxicamente se puede decir que mancozeb y monocrotofós son los

plaguicidas que más daño causan al ADN, permetrina el que mayor muerte celular provoca y pirimicarb el que menor efecto tuvo.

X. Prospectivas

El presente estudio abre una ventana para profundizar en el estudio de estos plaguicidas, es importante ahondar en ello ya que entendiendo su comportamiento y método de acción genotóxica se puede avanzar en su regulación, clasificación e incluso en la búsqueda de alternativas de uso y desarrollo de medicamentos.

Cada plaguicida, a partir del comportamiento mostrado en esta tesis, puede ser abordado de manera diferente en futuros estudios utilizando variantes de las mismas pruebas usadas aquí.

Para mancozeb se puede emplear la variante de ensayo cometa con enzimas de restricción que permitirían probar que el daño visto se debe a oxidación y análisis moleculares, para saber qué tipo de oxidación.

Monocrotófos fue el que presentó mayor daño genotóxico y presencia de MN por lo que se podría usar la variante de micronúcleos-FISH para determinar dónde se está haciendo la ruptura de los cromosomas y añadir los tratamientos en diferentes tiempos para saber si tiene un efecto en S, G1, G2 o incluso G0.

Para permetrina se podría corroborar la concentración umbral que se predice en esta tesis o encontrarla y trabajar con tejidos grasos a tiempos más prolongados con diferentes presentaciones comerciales, a manera de probar si esto acelera o no el alcance del umbral.

Finalmente para pirimicarb se puede utilizar el mismo ensayo cometa con lavados para demostrar si verdaderamente existe reparación.

XI. Referencias

- Albert L. Panorama de los plaguicidas en México [en línea] 2005 [fecha de consulta 22/11/15]. Disponible en: <http://www.sertox.com.ar/retel/n08/01.pdf>.
- Ar. Vérur: Ficha técnica Presto [en línea] 2015 [fecha de consulta 22/11/15]. Disponible en: http://www.verur.com.mx/sistemas/wwwroot/images/PRESTO5G_FT.pdf
- Banu B., Danadevi K., Rahman M., Ahuja Y. y Kaiser J. (2001) Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 361–366
- Belpoggi (2002) Results of long term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bisdithiocarbamate Mancozeb in rats. *Annals of New York Academy of Sciences*, 982, 123-136
- Bolognesi C. (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research* 543(3), 251-272
- Bolognesi C., Creus A., Ostrosky-Wegman P. y Marcos R. (2011) Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*, 26(1), 19-26
- British Crop Protection Council (2009-2010) The e-Pesticide Manual. *British Crop Protection Council*, Hampshire, UK, update version 5.
- BVSDE. Plaguicidas [en línea] 2007 [fecha de consulta: 9/09/15]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/sde/ops-sde/bvsde.shtml>
- Cabrera Benitez S. (2006). Bleomicina: Un modelo de fibrosis pulmonar. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 9(1), 53-61
- Candioti, J., Soloneski, S. y Larramendy, M. (2015) Carbamates: a genotoxic, cytotoxic and apoptotic effects induced in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 834-844.
- Ching E., Siu QW., Lam P., Xu L., Zhang Y., Richardson B. y Wu R. (2001) DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo[a]pyrene: dose- and time-dependent relationships. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 603–610
- CICOPLAFEST. Catálogo de plaguicidas [en línea] 2013 [fecha de consulta: 4/08/14]. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>

- COFEPRIS. Plaguicidas [en línea] 2010 [fecha de consulta: 19/12/15/]. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/PlaguicidasYFertilizantes.aspx>
- Collins A. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249-261
- Costellos S., Cockburn M., Bronstein J., Zhang X. y Rhz B. (2009) Parkinsons disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *A Journal of Epidemiology*, 109, 919-926
- CureFFI. Molecular Biology 12: Base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER) [en línea] 2014 [fecha de consulta: 9/09/15]. Disponible en: <http://www.cureffi.org/2014/10/03/molecular-biology-12/>
- Das, G. Prabhavathy., Shaik, Abjal Pasha y Jamil, Kaiser (2006). Estimation of Apoptosis and Necrosis Caused by Pesticides In Vitro on Human Lymphocytes Using DNA Diffusion Assay. *Drug and Chemical Toxicology*, 29(2), 147-156.
- Das P.P., Shaik A.P. y Jamil K. (2007) Genotoxicity induced by pesticide mixtures: In vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology and Industrial Health*, 23(8), 449-458
- Dawson D. W., Bury H. (1961) The significance of Howell-Jolly bodies and giant metamielogtes in marrow smears. *Journal of Clinical Pathology*, 14, 374-378.
- Deruccio Paolo, Santucci A., Gasperi A. (1989) Toxic and DNA damaging activities of the fungicides mancozeb and thivam (TMTD) on human lymphocytes in vitro. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 9(2), 75-81.
- Dosonmu R., Wu J., Busha M. y Zawaia N. (2007) Environmental and dietary risk factors in Alzheimers disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 7, 887-900.
- Dusinská M, Collins A, Kazimírová A, Barancoková M, Harrington V, Volkovová K, Staruchová M, Horská A, Wsólová L, Kocan A, Petřík J, Machata M, Ratcliffe B, Kyrtopoulos S. (2004) Genotoxic effects of asbestos in humans. *Mutagenic Research*, 553(1-2), 91-102

- Eddleston M., Karalliedde L., Buckley N., Fernando R., Hutchinson G., Isbister G., Konradsen F., Murray D., Piola J., Senanayake N., Sheriff R., Singh S., Siwach S. y Smith L. (2002). Pesticide poisoning in the developing world-a minimum pesticide list. *The Lancet*, 360(9340), 1163-1167
- EPA. Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates [en línea] 2011 [fecha de consulta 19/12/15]. Disponible en: http://www.panna.org/sites/default/files/EPA%20market_estimates2007.pdf
- EPA. Pesticide chemical research: Conventional Antimicrobial and Biopesticides active ingredients [en línea] 2015 [fecha de consulta: 20/01/15]. Disponible en: <http://iaspub.epa.gov/apex/pesticides/f?p=CHEMICALSEARCH:1:>
- EXTOXNET. Mancozeb [en línea] 2008 [fecha de consulta: 9/09/15]. Disponible en: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/haloxyp-methylparathion/mancozeb-ext.html#9>
- Fairbairn D., Olive P. y O'Neill K. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59
- FAO. Plaguicidas [en línea] 2015 [fecha de consulta: 9/09/15]. Disponible en: <http://www.fao.org/agriculture/crops/mapa-tematica-del-sitio/theme/pests/jmps/es/>
- Fenech M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455(1-2), 81-95.
- Fenech M. y Morley A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147, 29-36
- Fenech M., Perepetskaya G. y Mikhalevich L. (1997) A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations-experiences from chernobyl catastrophe. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30, 112-118.
- Fenech M., Chang W., Kirsch-Volders, Holland N., Bonassi S. y Zenger E., (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. *Mutation Research*, 534(1), 67-75
- Fenech M., Kirsch-volders M., Natarajan A.T., Surralles J., Crott J.W., Parry J., Norppa H., Eastmond D.A., Tucker J.D. y Thomas P. (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1). 125-132

- Franklin A., Schrif V., Shing H. y Demeler B. (2006). Solution formation of Holliday Junctions in inverted-repeat DNA sequences. *Biochemistry*, 45(8), 2467-2471.
- Fest C. y Schmidt K.J. (1982) General. En: *The chemistry of organo- phosphorus pesticides*. Springer-Verlag, Munich, pp. 122-135.
- Goldoni A., C.R.Klauck, S.T. Da silva, M.D. Da Silva, P.G. Ardenghi, L.B. Da Silva (2014) DNA damage in Wistar rats exposed to Dithiocarbamate Pesticide Mancozeb. *Folia Biologica*, 60, 202-204.
- Hanumantharaju T. y Awathi M. (2004) Persistence and degradation of metalaxyl, mancozeb fungicides and its metabolite ethylenethiourea in soils. *Journal of Environmental Science Engineer*, 46(4), 312-321
- He F. (1994) Synthetic pyrethroids. *Toxicology*, 91, 43- 49.
- Heaton P., Ransley R., Charlton C., Mann S., Stevenson J., Brigitte H., Smith H., Rawlings J y Harper E. (2002) Applications of single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. *American Society for Nutritional Sciences*, 22(2), 1598-1603
- IARC. Agents classified by the IARC monographs, volumes 1-113 [en línea] 2015 [Fecha de consulta: 20/01/15]. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- Jamil K., Shaik A.P., Mahboob M. y Krishna D. (2004) Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chlorpyriphos, dimethoate, and endosulfan) on human lymphocytes in-vitro. *Drug and Chemical Toxicology*, 27(2), 133-44
- Joblonická A., Poláková H., Karellová J., Vargová M. (1998) Analysis of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of workers with occupational exposure to the mancozeb-containing fungicide Novozir Mn80. *Mutational Research*, 224(2), 143-146.
- Keith R.S. (2001) Ecotoxicological risk assessment of pesticides in the environment. En: *Handbook of pesticides. Toxicology principles* (R. Krieger, Ed.), Academic Press, Nueva York, pp. 353-374.
- Liberi G. y Foiani M. (2010) The double life of holliday junctions. *Cell Research* 20(6), 611-613
- Longhese M. (2008) DNA damage response at functional and dysfunctional telomers. *Genes Development*, 22, 125-140

- Lopez Montoya Cynthia (2011) Aplicación del ensayo cometa en la asignación del daño genómico por benzo [a]pireno en *Dunaliella tertiulecta*. Tesis de Maestría en Ciencias en Ecología Molecular y Biotecnología de: *Universidad Autónoma de Baja California*, México.
- Mahboob M., Rahman M., Danadevi K., Banu B., Grover P. (2002) Detection of DNA damage in mouse peripheral blood leucocytes by the comet assay after oral administration of monocrotophos. *Drug Chemistry and Toxicology*, 25, 65-74
- Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S. (2007) Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(4), 185-200
- Marrs T. (2004) *Pesticide toxicology and international regulation*. Inglaterra, John Wiley and sons.
- Maya G. (2008) Utilidad del extendido de sangre periférica: los leucocitos. *Medicina y Laboratorio*, 14(9-10), 411-455
- Menzie CA, Potocki BB, Santodonato J. (1992) Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science and Technology*, 26, 1278–1284
- Mckelvey-Martin V.J., Green M., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meò M. y Collins A. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a european review. *Mutation Research*, 288(1), 47-60
- Mohanty G., Monhanty J., Nayak K., Monhanty S. y Dutta S. (2010) Application of comet assay in the study of DNA damage and the recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, and organophosphate pesticide. *Ecotoxicology*, 20, 283-292.
- Moutschen–Dahmen J., Moutschen–Dahmen H. y Degraeve N. (1984). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of insecticides. En: *Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Industrial Pollutants* (M. Kirsch–Volders, Ed.). Plenum Press, Nueva York, pp. 127–203.
- Olive, P.L. and J.P. Banfith (1993) Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125I dUrd. *International Journal of Radiation Biology*, 64(4), 349-358.
- Östling O. y Johanson K. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-8.
- Ostling, O. y Johanson K. (1987) Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell,

International Journal of Radiation Biology, 52 (1), 683-686.

PAN. RED DE ACCIÓN EN PLAGUICIDAS DE EUROPA (PAN EU) [en línea] 2015 [fecha de consulta: 4/08/14]. Disponible en: <http://pan-international.org/es/acerca-de-pan-2/>

Pilinskaia M.A. (1982) Cytogenetic effect of the pesticide pirimor in a lymphocyte culture of human peripheral blood in vivo and in vitro. *Cytology and Genetics*, 16(2), 38-42

Ramos-Chavez LA; Sordo M; Calderon-Aranda E; Castañeda-Saucedo E; Ostrosky-Wegman P; Moreno-Godinez M. (2015) A permethrin/allethrin mixture induces genotoxicity and cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Journal Of Toxicology And Environmental Health*, 78(1), 7-14.

Randa A., Fenech M., López M., Spitz M. y Etzel C. (2008) Cytokinesis-Blocked Micronucleus Cytome Assay Biomarkers Identify Lung Cancer Cases Among Smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 17(5), 1111-1119

RAPAM. Lista de plaguicidas altamente peligrosos y la necesidad de su prohibición [en línea] 2014 [fecha de consulta: 4/08/14]. Disponible en: http://www.rap-al.org/news_files/FOLLETO%20HHP%20mini.pdf

Rodriguez L., Díaz M., Amanda C., Ahumada D. y Guerrero J. (2013). Desarrollo y optimización de una metodología multiresiduo por método simplex para el análisis de plaguicidas en miel de abejas. *Revista Colombiana de Química*, 42(1), 12-38.

Rojas-García A., Sordo M., Vega L., Quintanilla B., Solis-Heredia M., Ostrosky-Wegman P. (2009) The role of Paraoxonase Polymorphisms in the Induction of Micronucleus in Paraoxon-Treated human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 823-829

Rudenil M., Wagner E. y Plewa M. (2003) The comet assay: Genotoxic damage or nuclear fragmentation? *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42(6), 61-67

Rupa D., Lakshman Rao P., Reddy P. y Reddy O. (1988) In vitro effect of monocrotophos on human lymphocytes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(5), 737-41

Santosh K. Yaduvanshi, Anupama Ojha, Satish C. Pant, Vinay Lomash, Nalini Srivastava (2010) Monocrotophos induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in rat tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(3), 214-222

SEMARNAT. Fichas técnicas de los plaguicidas incluidos en el catálogo CICOPLAFEST 2004. [en línea] 2004 [fecha de consulta: 9/09/15]. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/busquedas.html>

ShyYan C., Seon O., Velasco M., Ta C., Montalvo J. y Calderon A. (2014) *Journal of biochemistry and Molecular Toxicology*, 28(7). 302-311.

Singh N., McCoy M., Tice R. y Schneider E. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.

Siu W., Hung C., Wong H., Richardson B., Lam P. (2003) Exposure and time dependent DNA strand breakage in hepato- pancreas of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to Aroclor 1254, and mixtures of B[a]P and Aroclor 1254. *Marine Pollution Bulletin*, 46,1285–1293

Siu W., Cao J., Jack R., Wu R., Richardson B., Xu L., Lam P. (2004) Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology*, 66, 381–392

Soohee Kim, Mi-Young Park, Hyo-Jin Kim, Jin Young Shin, Kyung Yuk Ko, Dong-Gyu Kim, MeeKyung Kim, Hwan-Goo Kang, ByungJae So, Sung-Won P. (2015). Analysis of Insecticides in Dead Wild Birds in Korea from 2010 to 2013. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(1), 25-30.

Somorovská M., Szabová E., Vodíčka P., Tulinská J., Baravícková M., Fábry R., Lísková A., Petrovská H., Kubová J., Rausová K., Dosinská and Collins A. (1999) Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutation Research*, 445(2), 181-192

Sorgob M. A. y Vilanova E. (2002) Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters* 128, 215–228

Speit G. y Hartmann A. (2006) The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods of Molecular Biology*, 314, 275–286

- Srivastava A., Wahid A., Singh R., Bhui K., Tyagi S., Al-Khedhairy A., Srivastava P., Musarrat J. and Shukla Y. (2011) Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. *Life Science*, 9(6). 815-824
- Stocker, R., B.N. Ames. (1987) Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipids peroxides in bile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 84(22), 8130-8134.
- Surrallés J., Xemená N., Creus A., Catalán J., Norppa H. y Marcos R. (1995) Introduction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 341, 169-184
- Surrallés J. and Natarajan A. (1997) Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutation Research*, 392(1), 165-174
- Syngenta. Pirimor [en línea] 2011 [fecha de consulta: 9/09/15]. Disponible en: <http://www3.syngenta.com/country/cl/cl/soluciones/proteccioncultivos/Documents/Etiquetas/Pirimor.pdf>
- Titenko-Holland N., Windham G., Kolachana P., Reinisch F., Parialham S., Osorio A., Smith M. (1997) Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo, a study of malathion-exposed workers. *Mutational Research*, 388(1), 85-95
- Tice, R.R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 35 (1), 206-221.
- Turkez, H., Aydin, E. (2012) The effects of taurine on permethrin-induced cytogenetic and oxidative damage in cultured human lymphocytes. *Archives of Industrial Hygiene & Toxicology*, 63(1), 27-34.
- Undegör U. and Basaran N. (2005) Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology*, 79(3), 169-176
- US-EPA. Pesticides Industry Sales and usage [En línea] 2015 [fecha de consulta 19/12/15]. Disponible en: <http://www.epa.gov/oppbead1/pestsales/97pestsales>
- UTZ Certified. Lista de pesticidas prohibidos y lista de vigilancia de pesticidas [en línea] 2015 [Fecha de consulta 20/01/15]. Disponible en: <https://www.utzcertified.org/attachments/article/26584902/SP%20-%20List%20of%20Banned%20Pesticides%20v1.0.pdf>

- Vera-Candiotti, Josefina; Soloneski, Sonia; Larramendy, Marcelo L. (2015). pirimicarb-based formulation-induced genotoxicity and cytotoxicity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Toxicology & Industrial Health*, 31(11), 1051-1060.
- Wild D. (1975). Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutation Research*, 32, 133-150.
- Wiseman H.y Halliwell B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemistry Journal*, 313(1), 17-29
- WHO. The WHO recommended classification of pesticides by hazard, and guidelines for classification [en línea] 2009 [fecha de consulta: 20/01/15]. Disponible en:
http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf
- Yaduvanshi, SK; Ojha, A; Pant, SC; Lomash, V; Srivastava, N. (2010) Monocrotophos induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in rat tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97 (3), 214-p222
- Zúñiga Liliana A. (2009) Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y sus aplicaciones en biomonitorización humana. Tesis Doctoral de la Facultad de Biociencias en: *Universidad Autónoma de Barcelona*, UNAM.

