



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y CITOTÓXICA DE UNA NUEVA CLASE DE  
INSECTICIDAS CETOENOLAS, EN LINFOCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**GABRIELA ZALDIVAR MENDOZA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA**

**CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO**

**HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**COMITÉ TUTOR: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ**

**INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**MÉXICO, CD. MX. SEPTIEMBRE, 2016**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la formación profesional que obtuve en el programa de maestría.

Al programa de becas de estudio de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para realizar esta investigación (CVU: 545274).

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Apoyo al Personal Académico [DGAPA-UNAM-IN205613].

Un gran y sincero agradecimiento a mi tutora principal la Dra. María Elena Calderón Segura y a los integrantes de mi comité tutorial el Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero y el Dr. Mariano Martínez Vázquez por su tiempo y apoyo, por las asesorías, enseñanzas y observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 20 de junio de 2016, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ZALDIVAR MENDOZA GABRIELA**, con número de cuenta **304184574**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y CITOTÓXICA DE UNA NUEVA CLASE DE INSECTICIDAS CETOENOLAS EN LINFOCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS."**, realizada bajo la dirección de la DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO  
Vocal: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ  
Secretario: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO  
Suplente: DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA  
Suplente: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 05 de septiembre de 2016.

*M. del Coro Arizmendi*  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## ÍNDICE DE CONTENIDOS.

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABLAS.....	II
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN .....	3
II. ANTECEDENTES.....	5
<b>2.1 PLAGUICIDAS.....</b>	<b>5</b>
2.1.2 PERSPECTIVA HISTÓRICA.....	5
2.1.3 CLASIFICACIÓN .....	7
2.1.4 EFECTOS TÓXICOS DEL USO DE PLAGUICIDAS .....	9
<b>2.2 INSECTICIDAS CETOENÓLES.....</b>	<b>11</b>
2.2.1 MODO DE ACCIÓN.....	12
2.2.2 EFECTOS TÓXICOS.....	13
2.2.3 OBERON .....	14
2.2.4 MOVIMENTO .....	14
<b>2.3 BIOMARCADORES .....</b>	<b>14</b>
2.3.1 BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN .....	15
2.3.2 BIOMARCADORES DE EFECTO.....	15
2.3.3 BIOMARCADORES DE SUCEPTIBILIDAD.....	16
2.3.4 ALTERACIONES CITOGÉNÉTICAS COMO BIOMARCADORES DE EFECTO .....	17

<b>2.4 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS .....</b>	<b>17</b>
2.4.1 ORIGEN Y DESARROLLO. ....	19
2.4.2 MNBC EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	21
2.4.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO .....	22
2.4.4 FACTORES DE VARIABILIDAD .....	23
2.4.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	23
<b>2.5 CICLO CELULAR.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.1 PUNTOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR Y DAÑO AL ADN .....</b>	<b>26</b>
2.5.3 PUNTO DE CONTROL G1/S. ....	28
2.5.4 PUNTO DE CONTROL INTRA-S. ....	29
2.5.5 PUNTO DE CONTROL G2. ....	29
2.6.6 PUNTO DE CONTROL DEL HUSO MITÓTICO. ....	29
<b>2.6 INMUNOTOXICIDAD. ....</b>	<b>30</b>
2.6.1 CITOCINAS .....	31
2.6.2 TNF-ALFA.....	32
2.6.3 TGF-BETA.....	35
<b>2.7 NF-<math>\kappa</math>B.....</b>	<b>38</b>
<b>III JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>IV OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>42</b>
<b>V HIPÓTESIS.....</b>	<b>43</b>

<b>VI MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>44</b>
<b>6.1 INSECTICIDAS CETOENOLES COMERCIALES OBERON Y MOVENTO.....</b>	<b>44</b>
<b>6.2 TRATAMIENTOS <i>IN VITRO</i> CON LOS INSECTICIDAS CETOENOLES OBERON Y MOVENTO EN LOS LINFOCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS.....</b>	<b>44</b>
<b>6.3 CITOTOXICIDAD DE LOS INSECTICIDAS OBERON Y MOVENTO .....</b>	<b>45</b>
<b>6.4 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS .....</b>	<b>45</b>
<b>6.5 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TNF-ALFA, NF-κB Y TGF-BETA POR RT-QPCR.....</b>	<b>46</b>
6.4.1 EXTRACCIÓN DE RNA .....	46
6.4.2 CUANTIFICACIÓN DE RNA .....	46
6.4.3 SÍNTESIS DE CADN .....	46
6.4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-QPCR).....	47
<b>6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>48</b>
<b>VII RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>7.1 GENOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL INSECTICIDA MOVENTO EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>7.2 CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL INSECTICIDA MOVENTO EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>7.3 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE TNF-ALPHA, TGF-BETA Y RELA INDUCIDOS POR EL INSECTICIDA MOVENTO EN CULTIVOS <i>IN VITRO</i> DE LINFOCITOS HUMANOS. ....</b>	<b>53</b>
<b>7.4 GENOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL INSECTICIDA OBERON EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA <i>IN VITRO</i>. ....</b>	<b>55</b>
<b>7.5 CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL INSECTICIDA OBERON EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>57</b>

<b>7.6 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE TNF-ALFA, TGF-BETA Y RELA INDUCIDOS POR EL INSECTICIDA OBERON <i>IN VITRO</i> EN LINFOCITOS HUMANOS.....</b>	<b>59</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
<b>IX. CONCLUSIONES .....</b>	<b>68</b>
<b>X. REFERENCIAS .....</b>	<b>69</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los insecticidas cetoenoles derivados de los ácidos tetrónicos/tetrámicos. ....	12
Figura 2. Formación de micronúcleos (MN) en células en división con citocalasina-B. .	20
Figura 3. Ensayo de Micronúcleos. Células cultivadas y teñidas. ....	23
Figura. 4 Ciclo celular y los puntos de control de respuesta al ADN dañado. ....	28
Figura 5. Representación esquemática de los componentes de la vía de señalización del TNF- $\alpha$ . ....	34
Figura 6. Vía de señalización del TGF- $\beta$ . Dependiente e independiente de Smad .....	37
Figura 7. Vía de señalización canónica y no canónica de NF $\kappa$ B. ....	40
Figura 8. Frecuencia promedio de micronúcleos en el cultivo de linfocitos de sangre periférica humana expuestos <i>in vitro</i> a diferentes concentraciones del plaguicida Movento. ....	50
Figura 9. Cambios de expresión de las citocinas (A) TNF- $\alpha$ (B) TGF- $\beta$ y (C) la subunidad RelA del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana expuestos <i>in vitro</i> a distintas concentraciones del compuesto Movento. ....	54
Figura 10. Inducción de genotoxicidad del insecticida Oberon en cultivos de linfocitos humanos expuestos <i>in vitro</i> . ....	56
Figura 11. Cambios de expresión de citocinas (A) TNF- $\alpha$ (B) TGF- $\beta$ y (C) la subunidad RelA del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana expuestos <i>in vitro</i> a distintas concentraciones del compuesto Oberon. ....	60
Figura 12. Posible mecanismo de acción de los plaguicidas Oberon y Movento .....	66

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales clasificaciones de los plaguicidas. Catálogo de Plaguicidas.....	7
Tabla 2. Clasificación Toxicológica de los plaguicidas y banda de color de las etiquetas según su categoría .....	8
Tabla 3. Criterios definidos por el proyecto HUMN para la selección de células en las que se realizará el conteo de MN y las características de éstos. ....	24
Tabla 4. Características definidas por el proyecto HUMN de células apoptóticas y células necróticas. ....	25
Tabla 5. Mezcla para la síntesis de cADN. ....	47
Tabla 6. Secuencia de los iniciadores utilizados para los genes TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ y RelA. ....	48
Tabla 7. Mezcla de reacción para el ensayo de amplificación.....	48
Tabla 8. Efecto citotóxico en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana expuestos <i>in vitro</i> al plaguicida Movento. ....	52
Tabla 9. Efecto citotóxico en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana expuestos <i>in vitro</i> al plaguicida Oberon .....	58

## RESUMEN

Se estima que cada año se aplican millones de litros de plaguicidas en todo el mundo. En México se ha incrementado cada vez más la producción y empleo de nuevas clases de agroquímicos, provocando muchos de ellos efectos asociados con problemas reproductores y de desarrollo, con alteraciones neurológicas, metabólicas y del sistema inmune, así como, con la incidencia de diversos tipos de cáncer. Los riesgos genotóxicos de la nueva clase de insecticidas cetoenoles aún no se han comprobado. En este trabajo se utilizó el ensayo de micronúcleos para evaluar la citotoxicidad y la genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* a  $2 \times 10^{-6}$ ,  $4 \times 10^{-6}$ ,  $8 \times 10^{-6}$ ,  $12 \times 10^{-6}$  y  $16 \times 10^{-6}$  mM de Movento y  $5.2 \times 10^{-5}$ ,  $7.8 \times 10^{-5}$ ,  $10.4 \times 10^{-5}$ ,  $12.9 \times 10^{-5}$ ,  $25.9 \times 10^{-5}$  de Oberon. Se obtuvieron los índices de división nuclear (IDN), los índices de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) y la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos (BNMN). A la par se realizó la detección de la expresión de las citocinas TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  así como del factor de transcripción NF- $\kappa$ B por RT-qPCR para evaluar la inducción de citocinas inflamatorias por estos plaguicidas.

Los cultivos de linfocitos expuestos a Movento presentaron, en todas las concentraciones empleadas, un aumento significativo en la frecuencia de BNMN, las concentraciones más altas ( $12 \times 10^{-6}$  y  $16 \times 10^{-6}$  mM) además disminuyeron de forma significativa el IDN y el IPBC al compararlos con el testigo. Así mismo la expresión de las citocinas se ve modificada tras la exposición a Movento, la concentración mayor ( $16 \times 10^{-6}$  mM) eleva la expresión relativa de TNF- $\alpha$  (hasta 80 veces) y NF- $\kappa$ B (casi 20 veces).

En el caso de los cultivos de linfocitos expuestos a Oberon se observa un incremento significativo en la frecuencia de BNMN en todas las concentraciones utilizadas, sin embargo a ninguna de ellas existe un aumento o disminución significativa de los índices calculados. Finalmente se observa un cambio en la expresión de las citocinas, intensifica la expresión de NF- $\kappa$ B (hasta 40 veces), se aprecia una sobreexpresión de TGF- $\beta$  en todas las concentraciones evaluadas y una expresión potenciada (>300) de TNF- $\alpha$  a la concentración más baja ( $7.8 \times 10^{-5}$ ).

## **ABSTRACT**

It is estimated that each year millions of litres of pesticides are used all around the world. In Mexico the production and use of new kinds of agroquímicos has increased, most of them provoke effects associated with reproductive, neurologic, metabolic and immune alterations and also with the development of different types of cancer. The genotoxic risk of the new type of ketoenol pesticides has not yet been proved. In this work the micronucleus assay was used in order to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to  $2 \times 10^{-6}$ ,  $4 \times 10^{-6}$ ,  $8 \times 10^{-6}$ ,  $12 \times 10^{-6}$  y  $16 \times 10^{-6}$  mM of Movento and  $5.2 \times 10^{-5}$ ,  $7.8 \times 10^{-5}$ ,  $10.4 \times 10^{-5}$ ,  $12.9 \times 10^{-5}$ ,  $25.9 \times 10^{-5}$  of Oberon. The nuclear division index (NDI), the cytokinesis block proliferation index (CBPI) and the frequency of binucleated cells with micronucleus (BNMN) were determined and also the expression of the cytokines TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  and the transcription factor NF- $\kappa$ B by RT-qPCR in order to evaluate the inflammatory cytokines induction.

The lymphocyte cultures exposed to Movento showed a significative increase in the frequency of BNMN at all concentrations tested, the higher concentrations ( $12 \times 10^{-6}$  y  $16 \times 10^{-6}$  mM) also showed a significative decrease in the NDI and the CPBI in comparison to the control. The expression of the cytokines is affected after exposure to Movento, the higher concentration ( $16 \times 10^{-6}$  mM) increases the relative expression of TNF- $\alpha$  (80 times) and NF- $\kappa$ B (almost 20 times).

On the other hand the lymphocyte cultures exposed to Oberon showed a significative increase in the frequency of BNMN at all concentrations used, nonetheless there is no evidence of any increase or decrease in the NDI or the CPBI in any of the concentrations used. Finally a change in the expression of the cytokines was observed, an increase of the NF- $\kappa$ B expression (40 times), a TGF- $\beta$  overexpression (>500) at all concentrations, and an increase of TNF- $\alpha$  expression (>300) at the lowest concentration ( $7.8 \times 10^{-5}$ ).

## I. INTRODUCCIÓN

Durante la última década el uso de plaguicidas ha incrementado constantemente, especialmente en ciudades en desarrollo, en un esfuerzo para elevar la producción agrícola, obtener una mayor calidad y controlar las enfermedades en los cultivos (Macdad *et al.* 2011). Se calcula que el 85 % de los plaguicidas que se emplean en el mundo se dedica al sector agrario (Albert 2005). Su aplicación es altamente efectiva para asegurar estos fines, por esta razón, diariamente grandes cantidades de estos productos son liberados al ambiente, muchos de éstos afectan a organismos no blanco, esto ha resultado en efectos negativos a la salud humana y a los ecosistemas, debido a su persistencia en el ambiente, al aumento en la mortalidad de flora y fauna, a que crean resistencia en los organismos plaga y contaminan suelos, ríos, mantos acuíferos y la atmósfera (Al-Saleh 1994, Hamilton *et al.* 2004, Macdad *et al.* 2011).

En 1998 la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos mantenía registrados 620 ingredientes activos, la mayoría sustancias orgánicas con las que se formulan aproximadamente 20 000 productos diferentes (Goldman 1998). Para el 2011 Macdad y colaboradores mencionan que existen 65 000 sustancias clasificadas como plaguicidas. En México se ha incrementado cada vez más la producción y empleo de nuevas clases de agroquímicos. Según datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) recopilados en la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera (EMIM), durante el primer semestre de 2010 en México se elaboraron 25 546 toneladas de insecticidas, 25 862 de fungicidas y 18 980 de herbicidas, sumando un total de 58 451 toneladas de plaguicidas de uso agrícola (INEGI 2011), mientras que para 2012, en el Boletín de información oportuna del sector alimentario se reportaron 37 501 toneladas de insecticidas de aplicación agrícola y 37 684 toneladas de herbicidas y defoliantes (INEGI 2013). Datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura muestran que para el 2013 el uso de plaguicidas en México fue de 110 873 toneladas, de las cuales 37 455 toneladas (33.78 %) corresponden a insecticidas, 42 223 toneladas (38.08 %) a fungicidas y bactericidas y 31 195 toneladas (28.14 %) a herbicidas (FAO 2013). Las regiones con mayor consumo de plaguicidas son: Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de

México y Puebla-Oaxaca. En ellas se aplica aproximadamente el 80% del total de plaguicidas empleados en el país (Albert 2005). En nuestro país los cultivos a los que se les dedica la mayor cantidad de plaguicidas son: maíz, algodón, hortalizas, papa, chile, jitomate, frijol, aguacate, café y tabaco (AMIPFAC 2001).

La exposición de seres humanos a los plaguicidas ocurre principalmente en el caso de los trabajadores agrícolas y exterminadores de plagas caseras, estos individuos están en constante riesgo, además la población en general esta en contacto a través del consumo de alimentos contaminados con estos productos (Bolognesi 2003, Martínez-Valenzuela *et al.* 2009). Resulta de vital importancia ya que en México no están implementados los programas adecuados para el control y monitoreo de los residuos de plaguicidas en alimentos y sus efectos tóxicos (Albert 2007, Mohammad y Varela 2008). Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año entre 500 mil y 1 millón de personas se intoxican con plaguicidas, de estos caso entre 5 000 y 20 000 son mortales. Al menos el 50 % de los intoxicados y el 75% de los que fallecen son trabajadores agrícolas, el resto se debe a envenenamientos por consumo de alimentos contaminados (OMS 1990, Eddleston *et al.* 2002). En México en 1993 se inició el registro de intoxicaciones agudas con plaguicidas, para 2001 se habían cuantificado 4 606 casos anuales en promedio (COFEPRIS 2002). Además de las intoxicaciones, entre el amplio espectro de efectos que tienen en la salud humana se encuentran el daño al sistema nervioso, respiratorio, endocrino e inmune y daño a los órganos reproductores (Martínez-Valenzuela *et al.* 2009).

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 PLAGUICIDAS**

El Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas define a un plaguicida como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos y productos agrícolas, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos” (FAO 2006). El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte (FAO 2006).

#### **2.1.2 PERSPECTIVA HISTÓRICA**

El uso de los plaguicidas es tan antiguo como la agricultura misma, desde épocas remotas el hombre los ha empleado para combatir a cierto grupo de animales, especialmente insectos y roedores que han sido plagas para los productos agrícolas, tanto en el campo como en su almacenamiento (Restrepo 1992, Albert 2004).

Se puede dividir la historia de los plaguicidas en tres grandes etapas. La primera abarcó desde antes de cristo hasta mediados del siglo XIX y se le conoce como la “Era de los productos naturales”, ésta marca el descubrimiento de la acción plaguicida de algunos compuestos naturales (Albert 2004). Los primeros plaguicidas reportados fueron compuestos a base de sulfuro, empleados por los sumerios, los chinos comenzaron a usar en el siglo XV el mercurio y el arsénico para controlar a los insectos y algunos compuestos de fósforo para el control de roedores, ya hacia el siglo XVII el uso del tabaco ganó popularidad (Albert 2004). La segunda etapa, de mediados del siglo XIX hasta principios del siglo XX, ligada con los adelantos de la industria química, es conocida como la “Era de los fumigantes y derivados del petróleo”. Comienza con la

introducción de aceites insecticidas en Holanda, progresa a la par del inicio de la Revolución Industrial y al desarrollo de la química como ciencia, con lo cual la agricultura mejora y adquiere un carácter más industrial, aumentando la necesidad de protección de los cultivos y la subsecuente entrada al mercado de una serie de sustancias tóxicas, no específicas y baratas (Albert 2004). Esta etapa ve su fin a principios del siglo XX y da paso a La “Era de los productos sintéticos”, que corresponde a la tercera y última etapa. Inicia en Estados Unidos con la síntesis y el uso de los dinitroderivados (Restrepo 1992, Albert 2004). El empleo de estos productos se popularizó después de la Segunda Guerra Mundial, el ejemplo clásico es el del DDT, destinado a combatir los piojos que afectaban a los soldados en el campo de batalla. Al finalizar la guerra, el DDT se empezó a utilizar ampliamente en la agricultura. Debido a su éxito se sintetizaron varios plaguicidas análogos, es en esta etapa en la que se desarrollan la mayoría de los plaguicidas sintéticos empleados en la actualidad. La pujante industrialización, los intereses económicos de los grandes productores de plaguicidas, así como la necesidad de controlar químicamente las plagas, favoreció su fabricación y consumo a escala mundial. Sin embargo, en esta etapa ocurrieron gran número de intoxicaciones agudas y de problemas ambientales derivados del uso de estos xenobióticos (OMS 1993, Albert 2004).

En México el empleo de plaguicidas se inició a finales del siglo XIX. En 1898 ya se utilizaban 38 compuestos químicos, entre ellos, arseniato de plomo, arsénico blanco, ácido cianhídrico, aceto-arsenito de cobre (verde de París), ácido carbólico, ácido fénico y sulfato de cobre con cal viva (mezcla de Burdeos) (Restrepo 1992, Albert 2007). La aplicación intensa de plaguicidas sintéticos se inició en el país hacia 1948, con la introducción del DDT y posteriormente de otros plaguicidas organoclorados. Después se agregaron diversos organofosforados, carbamatos y una gran variedad de herbicidas y fungicidas, derivado de la llegada de la Revolución Verde, de la cual México fue de los primeros países en adoptar. Se originó, a su vez, una carrera incesante en la búsqueda de compuestos análogos menos tóxicos al ser humano y más efectivos y selectivos con las plagas (OMS 1993, Albert 2005).



### 2.1.3 CLASIFICACIÓN

Los plaguicidas se clasifican de acuerdo a una gran variedad de criterios, según la CICOPLAFEST (2004) los principales son: su concentración, por los organismos que controlan, su modo de acción, su composición química, su persistencia, de acuerdo a la formulación comercial en la que se presentan y el uso al que se destinan (Tabla 1).

Tabla 1. Principales clasificaciones de los plaguicidas. Catálogo de Plaguicidas (CICOPLAFEST 2004).

Concentración	<ul style="list-style-type: none"><li>• Plaguicida Técnico</li><li>• Plaguicida Formulado</li></ul>
Organismos que controlan	<ul style="list-style-type: none"><li>• Insecticida</li><li>• Acaricida</li><li>• Fungicida</li><li>• Bactericida</li><li>• Herbicida</li><li>• Rodenticida</li><li>• Molusquicida</li></ul>
Modo de acción	<ul style="list-style-type: none"><li>• De contacto</li><li>• De ingestión</li><li>• Sistémico</li><li>• Fumigante</li><li>• Repelente</li><li>• Defoliante</li></ul>
Composición química	<ul style="list-style-type: none"><li>• Compuestos inorgánicos</li><li>• Compuestos orgánicos</li><li>• Plaguicidas biológicos</li></ul>
Formulación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Solida</li><li>• Líquida</li><li>• Gaseosa</li></ul>
Uso al que se destina	<ul style="list-style-type: none"><li>• Agrícola</li><li>• Forestal</li><li>• Urbano</li><li>• Jardinería</li><li>• Pecuario</li><li>• Doméstico</li><li>• Industrial</li></ul>

La OMS estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un periodo de tiempo relativamente corto (Tabla 2). La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) o de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), varía conforme a múltiples factores como la presentación del producto, la vía de entrada, la temperatura, la edad, el sexo, entre otras (OMS 1993, Ramírez y Lacasaña 2001, Corra 2009).

Tabla 2. Clasificación Toxicológica de los plaguicidas y banda de color de las etiquetas según su categoría (Corra 2009).

<b>Clasificación Toxicológica de los Plaguicidas</b>				
Clasificación de la OMS según los riesgos	Formulación Líquida DL <sub>50</sub> Aguda		Formulación Sólida DL <sub>50</sub> Aguda	
	Oral	Dérmica	Oral	Dérmica
Clase Ia Producto Sumamente Peligroso	< 20	< 40	< 5	< 10
Clase Ib Producto Muy Peligroso	20 a 200	40 a 400	5 a 50	10 a 100
Clase II Producto Moderadamente Peligroso	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	10 a 1000
Clase III Producto Poco Peligroso	2000 a 3000	> 4000	500 a 200	> 1000
Clase IV Producto que Normalmente No Ofrece Peligro	> 3000		> 2000	

<b>Banda de color de las etiquetas según la categoría toxicológica</b>		
Color de la Banda	Clasificación de la OMS según los riesgos	Clasificación del Peligro
Rojo (PMS 199 C)	Ia Producto Sumamente Peligroso	MUY TÓXICO
Rojo (PMS 199 C)	Ib Producto Muy Peligroso	TÓXICO
Amarillo (PMS Amarillo C)	II Producto Moderadamente Peligroso	NOCIVO
Azul (PMS 293 C)	III Producto Poco Peligroso	CAUTELADO
Verde (PMS 347 C)	IV Producto que Normalmente No Ofrece Peligro	CAUTELADO

#### 2.1.4 EFECTOS TÓXICOS DEL USO DE PLAGUICIDAS

Los plaguicidas difieren con otros agentes químicos en que son esparcidos deliberadamente al ambiente y como están diseñados para interferir con ciertos organismos, inevitablemente los caracteriza un nivel de toxicidad variable (Corsini *et al.* 2013). Pueden ser tóxicos para organismos no blanco como plantas, animales y seres humanos. Esto aunado al mal uso, causa secuelas negativas en las personas y en el ambiente (García 1997).

Antes de que un plaguicida pueda ocasionar algún efecto negativo sobre los individuos, es necesario que entre en contacto con el organismo. La exposición se puede dar por varias vías: oral (aparato digestivo), dérmica (piel) o por inhalación (pulmones). En el ámbito laboral la vía dérmica es de gran importancia, a través de ella y en función a la superficie expuesta se absorben cantidades significativas de diversos plaguicidas, en segundo lugar se encuentra la inhalación, por la aplicación de fumigantes en forma de gases (Al-Saleh 1994). Por otra parte, la principal vía de exposición de la población en general es la oral, a partir de la ingesta de alimentos contaminados, la inhalación también es otra ruta importante de absorción, ya que el producto puede encontrarse presente en el ambiente de forma continua en pequeñas cantidades (Al-Saleh 1994). De acuerdo con el Sistema de Información Toxicológica (SINTOX) mantenido por la Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria (AMIFAC) con la finalidad de aportar asesoría especializada en los casos de intoxicación por plaguicidas, las frecuencias de intoxicaciones en relación con la vía de ingreso son del 30 % por inhalación, 29 % cutánea, 40 % oral y 1 % ocular (AMIFAC 2012). En la mayoría de los casos las personas afectadas son trabajadores agrícolas y se debe a accidentes laborales o al uso inadecuado del producto (Falck *et al.* 1999).

Las formulaciones de plaguicidas son mezclas complejas que contienen, además del ingrediente activo, otros compuestos como disolventes, agentes emulsificantes, aditivos, esto hace que la exposición a éstos sea compleja (Falck *et al.* 1999; Cortés-Genchi *et al.* 2008).

La toxicidad de un plaguicida se refiere a la capacidad de producir un efecto adverso y se divide usualmente en dos tipos, aguda y crónica. La aguda se refiere a una exposición a corto plazo y sucede en un periodo de tiempo relativamente corto, mientras que la crónica es debida a una exposición repetida y sucede en un periodo de tiempo largo. Los efectos a corto plazo o agudos varían dependiendo del compuesto químico, la dosis y la susceptibilidad individual (Cortés-Genchi *et al.* 2008). La Organización Internacional de las Uniones de Consumidores refiere que cada cuatro horas muere un trabajador agrícola por intoxicación aguda (aproximadamente 10 000 defunciones por año), y que 375 000 individuos se intoxican anualmente (García 1998). De igual manera la OMS (1992) señala que durante la primera mitad de la década del ochenta ocurrieron alrededor de 1,000,000 casos de intoxicación no intencionada con plaguicidas, de los cuales el 70 % fueron originados en el ambiente laboral; durante el mismo periodo se estima que ocurrieron cerca de 2,000,000 de intoxicaciones con fines suicidas, y de todas las intoxicaciones el 7,3 % fueron casos letales. Según Levine y Doull (1992), entre 1951 y 1990 se habían registrado 148 brotes epidémicos por causa de los plaguicidas en todo el mundo, ocasionando 24,731 intoxicaciones y 1,065 muertes.

Los plaguicidas además de las intoxicaciones agudas son responsables de diversos efectos adversos en la salud humana (Al Saeh 1994, Remor *et al.* 2009). Se sabe que la exposición a bajos niveles de estos compuestos produce gran variedad de cambios bioquímicos, algunos de los cuales pueden ser responsables de los efectos adversos reportados en estudios experimentales (Gupta *et al.* 1988, Hernández *et al.* 2005; Macdad 2011). Muchos trabajos derallan la asociación entre la exposición a plaguicidas y varios efectos desfavorables para la salud, entre los que se incluye el cáncer y enfermedades degenerativas (Khuder y Mutgi 1997; Zahm y Ward, 1998). También se han descrito efectos en efectos sobre el sistema inmune, hematológico, nervioso, endócrino y reproductor (Ritz y Yu 2000, Mourad 2005, Van Maele-Fabry *et al.* 2006, Bassil *et al.* 2007). Los plaguicidas también pueden inducir estrés oxidante ya sea por una sobreproducción de radicales libres o por la alteración de los mecanismos de defensa antioxidantes (Abdollahi *et al.* 2004).

En general, los plaguicidas como los organofosforados, organoclorados, entre otros, se acumulan en el tejido adiposo y la leche materna, y provocan efectos adversos en el

cuerpo y se ha asociado con el desarrollo de malformaciones congénitas y cáncer (Mansour 2004, Jaga y Dharmani 2006). Los mecanismos asociados a alteraciones congénitas pueden atribuirse a daños en la estructura del ADN, fragmentación del genoma, micronúcleos, aberraciones cromosómicas y mutaciones. Diversos estudios han mostrado que la exposición *in vitro* a plaguicidas piretroides en células de ovario de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), producen aberraciones cromosómicas (AC) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) así como alteraciones en el ciclo celular (Mansour 2004, Karabay y Oguz 2005). Así mismo los plaguicidas carbámicos como propoxur, molinate y butilate (Gómez-Arroyo *et al.* 1995; Calderón Segura *et al.* 1999), o neonicotinoides como el imidacloprid y acetamidaprid incrementan significativamente la frecuencia de ICH y de micronúcleos (Feng *et al.* 2004, 2005, Calderón-Segura *et al.* 2012). Diversos insecticidas piretroides inducen aberraciones cromosómicas e ICH en diferentes líneas celulares humanas *in vivo* e *in vitro* (Amer *et al.* 1993, Navarareni y Jamil 2005, Undeğer y Başaran 2005).

Se ha publicado que la exposición al herbicida ácido fenóxiacético y otros plaguicidas inducen sarcomas, cáncer en diversos órganos, leucemias, múltiples, mielomas y tumores (Mansour 2004). Algunos son perturbadores endócrinos, los cuales están relacionados con desórdenes reproductores e inmunosupresión (Engel *et al.* 2001). La alteración de la respuesta inmune se demostró en un estudio descrito por Corsini y colaboradores (2013), en el cual observaron incremento en la respuesta proliferativa celular y liberación de lipopolisacáridos (LPS) inducida por el TNF- $\alpha$ , en pacientes expuestos a Mancozeb (Corsini *et al.* 2013).

## **2.2 INSECTICIDAS CETOENOLES**

Los insecticidas cetoenoles cíclicos son una nueva clase de plaguicidas que pertenecen a la familia química de los derivados de ácidos tetrónico o tetrámico. Desarrollados por Bayer, a este grupo pertenecen tres formulaciones químicas (Fig. 1). En el 2002 se lanzó al mercado la primera el spiridiclofen (3-(2,4-Diclorofenil)-2-oxo-1-oxaspirol[4,5]dec-3-en-il 2,2-dimetilbutanoato), poco después, en el 2005, se introdujo el spiromesifen (2-Mesitil-2-oxo-1-oxaspirol[4,4]non-3-en-4-il-3,3-dimetilbutirato) y recientemente (2009) el tercer miembro del grupo, el spirotetramat (cis-4-

(etoxicarboniloxi)-8-metoxi-3-(2,5-xilil)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-ona) (Bayer 2013). Los tres insecticidas son derivados de la tiolactomicina natural, inicialmente aislada de la bacteria *Nocardia sp.* (Sakyas *et al.* 2001). Por su nuevo modo de acción y como no presentan resistencia cruzada con otros productos, están sustituyendo a los insecticidas organofosforados, organoclorados y a los piretroides sintéticos (Bayer 2013).

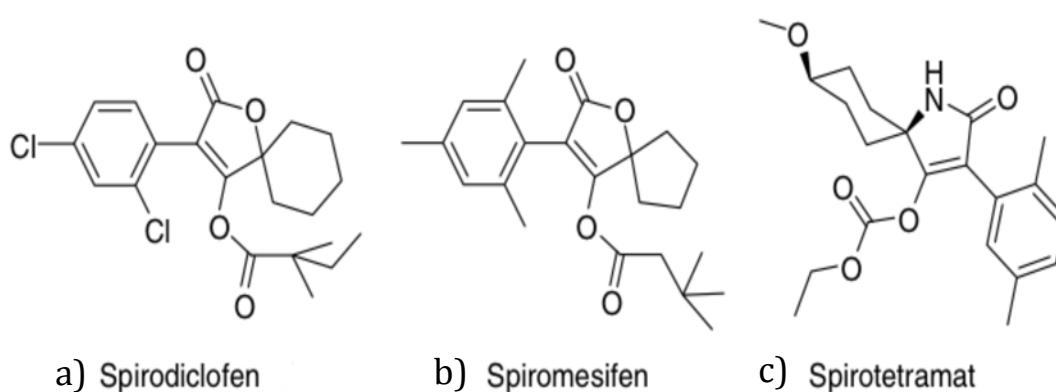


Figura 1. Estructura de los insecticidas cetoenoles derivados de los ácidos tetrónicos/tetramicos. a) Spirodiclofen b) Spiromesifen c) Spirotetramat (Cheng *et al.* 2012).

### 2.2.1 MODO DE ACCIÓN.

El modo de acción de los insecticidas cetoenoles ha sido caracterizado por la inhibición de la síntesis de lípidos precisamente análisis enzimáticos muestran que tienen una potente y selectiva inhibición de la enzima acetil coenzima A carboxilasa (Bretschneider *et al.* 2003, Pottelberge *et al.* 2009), su actividad biológica se correlaciona con la inhibición de la lipogénesis especialmente de triglicéridos y ácidos grasos libres (Bayer 2013).

La biosíntesis de ácidos grasos se efectúa en el citoplasma a partir de acetil-CoA, ATP y NADPH, una vez que los requerimientos energéticos de la célula han sido satisfechos,

los ácidos grasos son almacenados en forma de triacilglicéridos, que son la reserva energética a largo plazo más importante de las células y los organismos en general (Vázquez-Contreras 2003).

Como inhibidores de la síntesis de lípidos, actúan por ingestión especialmente en los estadios juveniles de las plagas. Se reporta además un efecto importante sobre la fecundidad de hembras adultas y sobre la fertilidad de machos de ácaro (*Tetranychus urticae*). Disminuye significativamente la ovipostura y parición debido a que huevos y ninfas se acumulan dentro de la hembra grávida y disminuye en forma importante la eclosión de los huevos (Marcic *et al.* 2012, Bayer 2013).

### 2.2.2 EFECTOS TÓXICOS

En experimentos realizados con ratas tratadas con spirodiclofen se vio que tiene poca o nula toxicidad a nivel oral, dérmico o inhalación, no es irritante para los ojos, pero sí para la piel. No es considerado un agente mutagénico ni genotóxico, es negativo para las pruebas de aberraciones cromosómicas y de micronúcleos (VKM 2011). En estudios realizados en perros, ratas y ratones se inducen alteraciones en glándulas adrenales y en órganos reproductores con reducción en los niveles de colesterol y triglicéridos. El spirodiclofen se clasifica como un agente carcinogénico ya que induce tumores de células de Leydig y adenocarcinomas en el útero de ratas, así como tumores en el hígado de ratones (VKM 2011).

El spiromesifen tiene una toxicidad aguda, oral, dérmica e inhalatoria en ratas. No es irritante para piel ni ojos. Es un sensibilizador de la piel. Los hallazgos histológicos muestran niveles bajos de colesterol en glándulas adrenales en estudios a corto y largo plazo en roedores, así como la inducción de enzimas hepáticas microsómicas, también presentes en perros. No es considerado un agente mutagénico, ni carcinógeno (Bayer 2013).

El spirotetramat tiene una toxicidad aguda baja, la LD<sub>50</sub> oral y dérmica en ratas es >2000 mg/kg. No es un irritante de piel en conejos pero si de ojos. El spirotetramat exhibe potencial de sensibilización en conejillos de indias y ratones. No hay órganos blanco o efectos que sean comunes para todas las especies, sin embargo, existen

efectos relacionados con el sistema inmune en muchas especies. Se considera que no es genotóxico ni carcinógeno para ratas y ratones (Bayer 2013).

### 2.2.3 OBERON

Es un insecticida-acaricida de contacto cuyo ingrediente activo, el spiromesifen (Fig. 1b), tiene acción contra mosquita blanca *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes spp.* También es altamente eficaz contra ácaros, incluyendo ácaro blanco (*Tetranychus spp.*), araña roja (*Panonychus spp.*) y pulgón saltador (*Paratrioza cockerelli*) (Kodandaram 2010 *et al.*, Bayer 2013). Es capaz de combatir ninfas y todos los estadios juveniles, y tiene efecto significativo en las pupas. Se utiliza en cultivos de jitomate, chile, cucurbitáceas (pepino, melón, calabacita), papa, algodón y fresa. (Kodandaram 2010, Bayer 2013).

### 2.2.4 MOVENTO

Es un insecticida sistémico de dos vías que químicamente pertenece a la clase de los derivados de ácido tetrámico, cuenta con tolerancias EPA en los cultivos de solanáceas (chile, tomate, papa, tomate de cáscara y berenjena), cucurbitáceas (calabaza, calabacita, melón, pepino y sandía), crucíferas (brócoli, col, coliflor y col de Bruselas) cebolla, ornamentales y vid. Su efectividad varía de buena a excelente en un amplio espectro de plagas, incluyendo los insectos chupadores de hortalizas y vid, como son el pulgón (*Aphis gossypii*), pulgón saltador (*Paratrioza cockerelli*), mosquita blanca y trips (*Thrips palmi* y *Thrips tabaci*). Los estadios juveniles son especialmente susceptibles (Kodandaram 2010, Bayer 2013).

## 2.3 BIOMARCADORES

La presencia de xenobióticos en el ambiente siempre representa un riesgo para los seres vivos, por lo tanto, es necesario contar con métodos para evaluar y cuantificar la exposición a los xenobióticos, así como el impacto potencial que puedan tener sobre los organismos. Uno de estos métodos es el uso de biomarcadores (Gil y Hernández 2011). Un biomarcador se define como la sustancia empleada como indicadora de un estado biológicos y/o como una alteración en los componentes o procesos bioquímicos



celulares, estructura o función inducidos por un xenobiótico que va a reflejar la exposición a éstos y que puede medirse en una muestra o sistema biológico. Éstos suelen utilizarse como indicadores del estado de salud o del riesgo a enfermedades, se emplean en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que pueden incluir a seres humanos (Martínez-Valenzuela *et al.* 2009). Los biomarcadores se clasifican generalmente en tres grupos: de exposición, efecto y susceptibilidad (Gil y Pla 2001).

### 2.3.1 BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN

Son utilizados para evaluar y confirmar la exposición de los organismos a una sustancia en particular. Permiten medir la dosis interna por un análisis químico del compuesto tóxico o sus metabolitos en los fluidos corporales o excreciones como son sangre, orina, aire exhalado, saliva y heces (Van Cauteren *et al.* 1996, Repetto 1997).

Bernard y Lauwerys (1986) los dividen en dos subgrupos basados en las pruebas de detección:

a) Los marcadores de dosis interna (selectivos), indican que el agente tóxico ha entrado al organismo, miden directamente la concentración del xenobiótico o sus metabolitos en fluidos biológicos mediante análisis químicos (Van Cauteren *et al.* 1996, Sorensen *et al.* 2003).

b) Los biomarcadores de dosis biológicamente efectiva (no selectivos) indican que el agente tóxico ya ha producido daño en el organismo. Son moléculas sencillas o complejas que forma el agente tóxico o sus metabolitos con los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos, reflejan acciones mutagénicas y/o carcinogénicas (Rodríguez-Romero *et al.* 2012).

### 2.3.2 BIOMARCADORES DE EFECTO

También conocidos como de respuesta, estos biomarcadores son indicadores de cambios bioquímicos dentro de un organismo como resultado de la exposición a un xenobiótico. No identifican al xenobiotico, solo miden la respuesta tóxica en el organismo (Gil y Pla 2001). Son los más estudiados e incluyen modificaciones en algún parámetro de la sangre, las alteraciones de actividades enzimáticas, aparición de aductos de ADN y proteínas, incremento de proteínas y aparición de anticuerpos

específicos contra el xenobiótico (Repetto y Baliga 1996). Se pueden considerar dos tipos: a) Los marcadores de efecto temprano, que representan alteraciones genéticas como mutaciones, intercambios de cromátidas hermanas, micronúcleos, entre otros y b) Los marcadores de enfermedades que son manifestaciones preclínicas o de un estado inicial de la enfermedad (Rodríguez-Romero *et al.* 2012).

No siempre es fácil distinguir entre un biomarcador de exposición y uno de efecto. Moller (2006) y Györfy y colaboradores (2008), clasificaron como biomarcadores de exposición a los aductos de proteínas y de ADN e incluyen lesiones del ADN detectadas por medio del ensayo cometa, mientras que clasifican a las aberraciones cromosómicas y micronúcleos como biomarcadores de efecto biológico temprano, debido a que detectan un estado posterior al mostrado por los biomarcadores de exposición. Tice y colaboradores (2000) también consideran las aberraciones cromosómicas y micronúcleos como biomarcadores de efecto.

### 2.3.3 BIOMARCADORES DE SUCEPTIBILIDAD

Estos son útiles como indicadores de la sensibilidad particular de los individuos a un xenobiótico en específico o a un grupo de éstos. Pueden ser marcadores genéticos que incluyen alteraciones en la estructura cromosómica como polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción, o polimorfismos de actividad enzimática (Sanz 1995).

Después de la exposición de un organismo a un xenobiotico, este sufre un proceso de biotransformación en dos fases: la de activación por la acción específica del complejo enzimático citocromo P450 (CYP450) y la de transformación (Gil y Pla 2001). De esta forma se pueden distinguir dos tipos de biomarcadores de susceptibilidad (Van Cauteren 1996):

- a) Polimorfismos del sistema de activación. Miden la actividad del CYP450.
- b) Polimorfismos de los sistemas de desintoxicación. Miden la actividad de enzimas de conjugación, implicadas en la segunda fase del metabolismo de xenobióticos.

#### 2.3.4 ALTERACIONES CITOGENÉTICAS COMO BIOMARCADORES DE EFECTO

Muchas de las alteraciones espontáneas o inducidas que se producen en el ADN se traducen en rompimientos y pérdidas cromosómicas. El daño genotóxico en los seres humanos por exposición a agentes tóxicos consiste en modificaciones en la estructura del ADN que ocurren durante la división celular (Fenech 2000). La célula puede reparar algunos de los daños de manera natural al activar los mecanismos de necrosis o apoptosis, pero si el daño al ADN no es reparado ocurren modificaciones en las células que puede derivar en consecuencias como alteraciones en las funciones metabólicas o fisiológicas, o puede darse un crecimiento celular desordenado y desmesurado. Si el daño se presenta en células germinales estos cambios pueden generar problemas reproductores o ser heredados a la siguiente generación y son causa de padecimientos genéticos (Countryman y Heddle 1976, Bagci *et al.* 2006, Sişman y Türkez 2010). Algunas de estas anomalías son detectables mediante diferentes técnica citogenéticas y/o moleculares. La evidencia toxicológica de la acción mutagénica y carcinogénica de varios plaguicidas ha merecido la atención de muchos estudios citogenéticos. En la actualidad se utilizan diferentes biomarcadores *in vivo* e *in vitro* en sistemas celulares procarióticos y eucarióticos, para medir diversos tipos de daños del ADN (Hagmar *et al.* 2001). Las técnicas más utilizadas para detectar cambios cromosómicos estructurales y numéricos son el análisis de aberraciones cromosómicas y el ensayo de micronúcleos (Pastor *et al.* 2001, Pastor-Benito 2002, Garaj-Vrhovac y Zeljezic 2002, Bolognesi 2003).

#### **2.4 ENSAYO DE MICRONÚCLEOS**

El ensayo de micronúcleos es una prueba que se emplea para la detección de las propiedades tóxicas potenciales de un compuesto, se ha convertido en uno de los métodos más utilizados para medir los cambios cromosómicos y estructurales en las células humanas *in vitro* e *in vivo* (Pastor-Benito 2002, Arencibia y Rosario 2003). Como su nombre lo indica los micronúcleos (MN) son estructuras con las mismas características morfológicas que el núcleo celular pero de menor tamaño, consisten en pequeños fragmentos de ADN rodeados de membrana nuclear, originados de fragmentos de cromosomas acéntricos ó cromosomas enteros de manera espontánea

o como respuesta a la acción de determinados agentes (Fenech 2000, Zalacain *et al.* 2005). Estos fragmentos acéntricos se originan por rompimientos de cadena de ADN que son mal reparados o no son reparados y al no disponer de centrómero quedan rezagados y no migran de forma adecuada durante la transición metafase/anafase. Los MN también se pueden formar cuando los cromosomas dicéntricos se rompen en más de un sitio durante la anafase (Kirsch-Volders *et al.* 2003; Fenech 2007). Si el daño genotóxico ha afectado a proteínas del cinetocoro, al centrómero o si alteran el huso mitótico o los centrosomas se puede inducir una mala segregación de cromosomas completos, estos quedan rezagados y son rodeados por membrana como ocurre con los fragmentos acéntricos y necesitan de la división celular para ser expresados como MN (OECD 2004, Kirsch-Volders *et al.* 2003, Fenech 2007).

Este ensayo tiene la capacidad de identificar efectos producidos por agentes clastogénicos y aneugénicos, por lo cual, permite detectar diferentes tipos de lesiones, entre las que se encuentran:

- a) Rompimientos de doble cadena de ADN.
- b) Rompimientos de cadena simple de ADN, mal reparadas o sin reparar (la mayoría de los micronúcleos derivan de la mala reparación de diferentes lesiones). Por lo que el ensayo también se puede usar para evaluar la eficacia de la reparación.
- c) Alteraciones en las proteínas involucradas en la segregación cromosómica.
- d) Diferentes aberraciones cromosómicas que pueden dar origen a los micronúcleos.
- e) Apoptosis, mediante la frecuencia de núcleos condensados (Kirsch-Volders *et al.* 1997, Bonassi *et al.* 2007).

El ensayo es práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por los agentes genotóxicos fácil, rápido y de bajo costo (Zalacain *et al.* 2005). Se puede usar para estudios *in vitro* e *in vivo*, en diversas especies (animales y vegetales) y tejidos (sanguíneo, epiteliales, germinales, entre otros) obteniendo las muestras por métodos no invasivos (Fenech 2000). Además, por su confiabilidad y reproducibilidad es uno de los ensayos estándar para

evaluar el riesgo genotóxico de algún agente químico, lo que llevó al desarrollo de una guía de la OECD (Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo) para este propósito (Fenech 2000; Minozzo *et al.* 2010).

#### 2.4.1 ORIGEN Y DESARROLLO.

Heddle (1973) y Schmid (1975) fueron los primeros investigadores que de manera independiente propusieron el conteo de micronúcleos (MN) en poblaciones celulares en división como un ensayo alternativo y simple para determinar el daño cromosómico. Uno de los requisitos de este ensayo consiste en la necesidad de que ocurra la división celular, por esta razón se requería contar con un método que pudiera distinguir dentro de una población celular, las células que no se dividen de las que están en mitosis, y dentro de estas últimas las que hayan completado una división nuclear (Pastor-Benito 2002, Arencibia y Rosario 2003). En respuesta a esta problemática numerosos métodos fueron propuestos, el que ha encontrado mayor aceptación debido a su simplicidad y confiabilidad respecto a sus efectos sobre el daño genético en la línea germinal es el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC) propuesto por Fenech y Morley (1989).

El MNBC consiste en utilizar la citocalasina B, sustancia que proviene del hongo *Helminthosporium dematoideum* que impide la polimerización de las fibras de actina, y por lo tanto, el anillo microfilamentoso requerido para la división del citoplasma, esto le dará a las células una apariencia binucleada (los dos núcleos hijos quedan englobados dentro de una misma membrana citoplasmática) permitiendo así su reconocimiento (Fig. 2) (Fenech 1993, Kirsch-Volders *et al.* 2003).

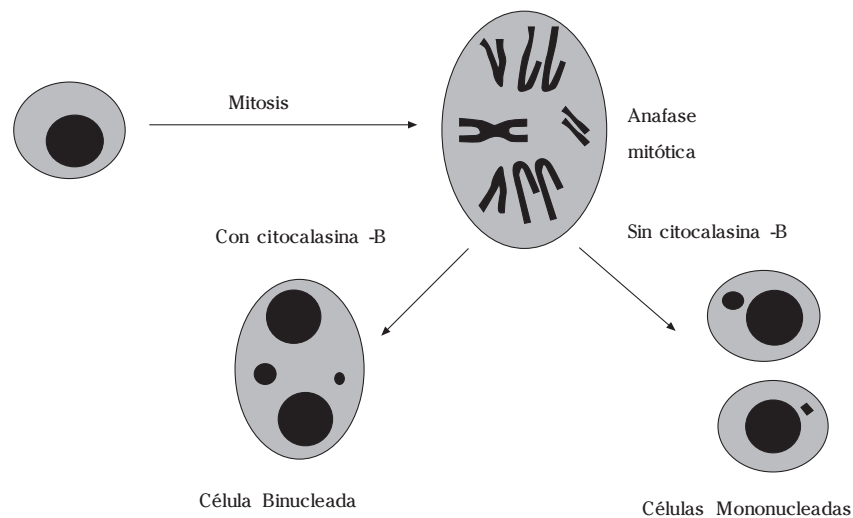


Figura 2. Formación de micronúcleos (MN) en células en división (anafase mitótica) debido a la pérdida de un cromosoma entero y/o fragmentos cromosómicos acéntricos que se quedan rezagados durante la división. El esquema muestra el bloqueo con citocalasina-B y la consecuente obtención de células binucleadas, sin el cual se observarían células mononucleadas (Zalacain *et al.* 2005).

Con el transcurso del tiempo se han ido introduciendo una serie de modificaciones para mejorar el ensayo y detectar daño más específico, En el MNBC además de evaluar la tasa de daño genético mediante los micronúcleos se puede estimar paralelamente el retraso mitótico, que se traduce en información citotóxica, calculando el índice de división nuclear (IDN) y el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC), éstos cuantifican el número de células que no se han dividido (mononucleadas), las que se han dividido una vez (binucleadas) y más de una vez (polinucleadas) (Surrallés *et al.* 1995).

En 1999 la técnica fue validada a nivel mundial como biomarcador efectivo de daño en el ADN, para lo cual se creó el programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: HUmAn MicroNucleus Project) diseñado por Michael Fenech y Stefano Bonassi. El HUMN es un proyecto de colaboración internacional que actualmente involucra más de 35 laboratorios de todo el mundo cuya meta es mejorar la aplicación y el entendimiento del ensayo MNBC (Bonassi *et al.* 2001). Está validado internacionalmente como bioensayo para evaluar la genotoxicidad de contaminantes ambientales, en exposiciones agudas y crónicas y es uno de los más usados para identificar agentes cancerígenos (Murli 2003, Zalacain *et al.* 2005, Abrevaya *et al.* 2007).

#### 2.4.2 MNBC EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

La utilización de linfocitos de sangre periférica en estudios para evaluar el daño genotóxico provocado por mutágenos/carcinógenos está ampliamente extendido (Pastor-Benito 2002). Desde 1976 en que Countryman y Heddle utilizaron el ensayo de micronúcleos *in vitro* en cultivos de linfocitos de sangre periférica, se han realizado multitud de estudios con esta técnica. Su gran popularidad reside sobre todo en que son un tipo celular fácil de estimular, para su obtención se requiere un método poco invasivo y reflejan una exposición global del organismo a los agentes genotóxicos, ya que la sangre está en contacto directo con los distintos tejidos corporales (Pastor-Benito 2002). Sólo una pequeña proporción de los linfocitos circula por el torrente sanguíneo, estando el resto almacenado en los órganos linfoides. Se diferencian dos subpoblaciones de linfocitos en función de su vida media. Los de vida corta, que duran solo unos días, y los de vida larga o de memoria, que pueden alcanzar varios años (Celada 1994). El hecho de que entre el 10 y el 25% de los linfocitos de sangre periférica se consideren de vida larga y que generalmente estén en fase G<sub>0</sub>, los hace un blanco ideal de estudio para que las alteraciones producidas no se pierdan y se puedan detectar. Al encontrarse generalmente en estado no proliferativo, los linfocitos necesitan de una estimulación durante el cultivo. Ésta hace que éstos empiecen su ciclo de división, pasando de la fase G<sub>1</sub>, y generalmente se realiza mediante la adición del mitógeno fitohemaglutinina. La frecuencia basal de

micronúcleos en linfocitos de sangre periférica oscila entre 0% y 2.5% (Surrallés y Natarajan 1997).

El daño genético inducido por los plaguicidas ha sido ampliamente evaluado mediante esta técnica en estudios *in vitro*, y también en estudios de biomonitorización de poblaciones expuestas y en estudios con animales como indicadores de exposición (Backer *et al.* 2001).

#### 2.4.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El protocolo básico para el recuento de MN en sangre periférica consiste en exponer los cultivos celulares a las sustancias a probar, someterlas a la acción de la citocalasina B para el bloqueo de la citocinesis, los cultivos celulares se dejan crecer el tiempo suficiente para permitir que el daño a los cromosomas lleve a la formación de micronúcleos en células binucleadas en interfase. Aproximadamente 72 horas tras la siembra se lleva a cabo la cosecha celular, la cual consiste en el aislamiento de los linfocitos mediante centrifugación en gradientes. Las células cultivadas se fijan, se tiñen y son entonces analizadas en el microscopio en busca de la formación de MN (Fig. 3). Los micronúcleos son contados solo en aquellas células que han completado una división nuclear después de la exposición a la sustancia a probar. Si una sustancia induce un incremento en el número de células conteniendo MN en relación a su concentración, se considera un resultado positivo, lo que indica que la sustancia probada es genotóxica (OECD 2004, Zalacain *et al.* 2005).

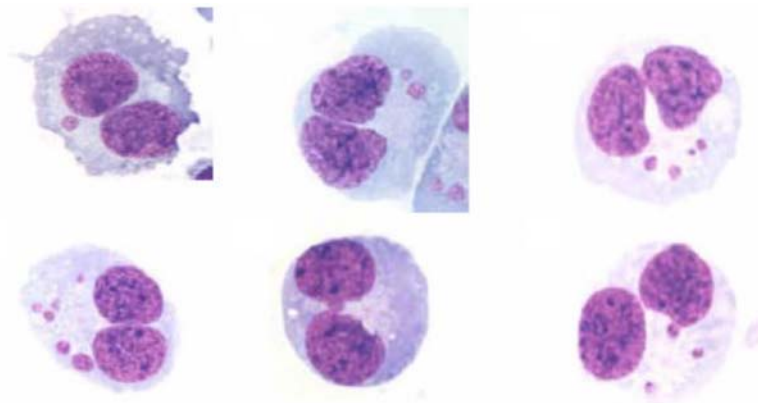




Figura 3. Ensayo de Micronúcleos. Células cultivadas y teñidas. Se observan células binucleadas portadoras de micronúcleos (OECD 2004).

#### 2.4.4 FACTORES DE VARIABILIDAD

Existen diversos factores que pueden influir en la frecuencia basal de MN; la edad ha sido ampliamente estudiada, relacionándose mayor edad con mayor índice de MN (Bonassi *et al.* 2001, Zalacain *et al.* 2005). En el caso del análisis del género, las mujeres presentan una frecuencia basal superior a la de los hombres y el número de MN incrementa cuando se superan los 35 años de edad. También en las mujeres la entrada en la menopausia y el posible desarrollo de osteoporosis se relaciona con un mayor índice de MN. La presencia de homocisteína en plasma, la adicción al tabaco, el déficit de folato y vitamina B12 conducen a un aumento en la frecuencia basal de MN (Bonassi *et al.* 2001).

#### 2.4.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Uno de los principales objetivos del proyecto HUMN es el identificar variables metodológicas y de registro de micronúcleos importantes para minimizar las confusiones que pudieran surgir de las diferencias. Por esta razón, se han descrito criterios de selección para reconocer tanto las células en las que se realizará el conteo de MN, así como criterios para seleccionar los MN que presenten las características necesarias para ser reconocidos como tales y de esta forma el análisis sea viable y objetivo, permitiendo una mayor precisión del ensayo para detectar eventos genotóxicos (Tabla 3) (Fenech 2000, Zalacain *et al.* 2005). En la práctica los linfocitos no se dividen de forma idéntica en todas las células y se pueden encontrar en un mismo cultivo células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas así como células en vías de apoptosis y necrosis, es necesario conocer las características de estas últimas para que sean eliminadas del registro (Tabla 4) (Fenech 2000, Zalacain *et al.* 2005).

Tabla 3. Criterios definidos por el proyecto HUMN para la selección de células en las que se realizará el conteo de MN y las características de éstos.

<b>Criterios para células en las que se realizará el conteo de MN</b>	<b>Criterios para micronúcleos</b>
Las células deben ser binucleadas	El diámetro de los MN en linfocitos varía entre 1/16 y 1/3 del diámetro del núcleo principal
Los núcleos deben tener su membrana intacta y estar dentro del mismo límite citoplásmico	Forma similar a los núcleos de la célula (redonda u oval)
Deben ser de aproximadamente el mismo tamaño, y con el mismo patrón e intensidad de tinción	No son refractiles por lo tanto pueden ser diferenciados de partículas de tinción
Pueden estar unidos por puente citoplásmico (no mayor a ¼ del diámetro nuclear más grande)	No deben encontrarse unidos o conectados al núcleo principal y sus membranas deben distinguirse
Los núcleos pueden tocarse pero no solaparse	Pueden tocar los núcleos de la célula pero no solaparse con ellos
Los límites citoplásmicos de la célula binucleada deben estar intactos y distinguirse claramente de los de la célula adyacente	Similar intensidad de tinción que los núcleos principales, a veces más intensa

Tabla 4. Características definidas por el proyecto HUMN de células apoptóticas y células necróticas.

<b>Células apoptóticas</b>	<b>Células necróticas</b>
En estado temprano de apoptosis presentan cromatina en el núcleo. Membrana nuclear y citoplásmica intactas	En estado temprano presentan citoplasma pálido con numerosas vacuolas (principalmente en el citoplasma y algunas en el núcleo) y una membrana citoplasmática dañada con un núcleo casi intacto
En estado tardío exhiben fragmentación nuclear en cuerpos nucleares más pequeños dentro de una membrana citoplásmica intacta.	En estado tardío exhiben pérdida de citoplasma y una membrana nuclear dañada o irregular. Con material nuclear saliendo de la membrana nuclear
La intensidad de tinción en el núcleo, los fragmentos nucleares y el citoplasma usualmente es mayor que en las células viables	La intensidad de tinción del núcleo y el citoplasma es usualmente menor a la observada en células viables

## 2.5 CICLO CELULAR

Los dos sucesos fundamentales de la proliferación celular son la replicación del ADN y la división celular, cuyo resultado es la formación de dos células nuevas a partir de una progenitora. Estos sucesos se realizan con una serie de eventos que en conjunto se conocen como ciclo celular (Lodish *et al.* 2002, Cuddihy y O'Connell 2003).

El ciclo celular se divide en cuatro fases:

- Fase G1 o "gap 1". En esta primera fase de crecimiento la célula se prepara para la replicación del ADN, se capacita para crecer y producir todas las proteínas necesarias para la síntesis de ADN.
- Fase S o de síntesis. Es el periodo en el que tiene lugar la replicación del ADN, se genera una copia de todo el genoma, al terminar el núcleo contiene el doble de ADN y proteínas nucleares.

- Fase G2 o “*gap 2*”. Segunda fase de crecimiento en la cual la célula se prepara para entrar en división, se sigue sintetizando RNA y proteínas, se incrementan las proteínas citoplásmicas y orgánulos, la célula aumenta de tamaño.
- Fase M. Es el periodo en el que las dos copias del ADN se segregan y la célula se divide en dos células genéticamente iguales (Rodríguez-Fragoso *et al.* 2004).

El inicio y el término del ciclo celular ocurren mientras las células pasan de un estado de proliferación a uno quiescente, también conocido como estado o fase G0, en el cual el metabolismo fundamental de la célula es bajo, incluidas muchas de las funciones habitualmente activas, como la transcripción y la síntesis de proteínas (Alberts *et al.* 2004).

La inestabilidad cromosómica clásicamente se define como la tasa de ganancias y pérdidas completas de cromosomas, las cuales se pueden detectar con el ensayo de MN. Esta elevada tasa de mutaciones está relacionada con errores de reparación del ADN, errores en la segregación mitótica y errores de regulación de los puntos de control del ciclo celular (Rodríguez-Fragoso *et al.* 2004).

### **2.5.1 PUNTOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR Y DAÑO AL ADN**

Una división exacta de la célula requiere que estas fases y su secuencia estén coordinadas. La progresión del ciclo celular en eucariotas se asocia con la expresión de un conjunto de genes específicos que codifican para proteínas que controlan la progresión del ciclo celular o procesos metabólicos unidos a él (Alberts *et al.* 2004, Rodríguez-Fragoso *et al.* 2004). Para asegurar una división apropiada, las proteínas que están íntimamente involucradas en su regulación deben ser expresadas dentro de una ventana de tiempo en el ciclo celular. El avance a lo largo del ciclo es verificado por puntos de control estratégicos que comprueban el estado de la célula, cuando se cumplen ciertas condiciones, la célula progresa hacia el próximo punto de control (Fig. 4) (Lodish *et al.* 2002, Rodríguez-Fragoso *et al.* 2004, Weitzman y Wang 2013).

Los elementos responsables de los puntos de control del ciclo celular son las proteínas conocidas como quinasas heterodiméricas. Las concentraciones de las subunidades

reguladoras de estas quinasas, llamadas ciclinas, aumentan y disminuyen en fase con el ciclo celular. Sus subunidades catalíticas se denominan quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) (Lodish *et al.* 2002, Alberts *et al.* 2004). Cada Cdk puede asociarse con diferentes ciclinas y la ciclina asociada determina qué proteínas serán fosforiladas por el complejo Cdk-ciclina. Múltiples eventos de fosforilación y desfosforilación ocurren tanto en las ciclinas como en las quinasas (Weitzman y Wang 2013). La fosforilación controla la actividad de quinasas tanto positiva como negativamente, dependiendo del sitio de fosforilación; la adición o eliminación de un grupo fosfato puede dar estabilidad al complejo ciclina-quinasa, con lo que aumenta su actividad y vida media. Además de la fosforilación, la presencia de inhibidores de quinasas puede regular también su actividad (Cuddihy y O'Connell 2003, Alberts *et al.* 2004).

La función de estos puntos de control es proporcionar el tiempo necesario para que la célula termine alguna función, sin embargo, algunas lesiones del ADN pueden inducir o activar un punto de vigilancia (Weitzman y Wang 2013). El genoma de todas las células está expuesto a multitud de agentes derivados exógenamente o endógenamente que pueden dañarlo, para llevar a cabo la reparación los puntos de control proveen a la célula de tiempo, en el cual el ciclo celular puede pausarse para facilitar la adecuada coordinación temporal del proceso, asegurando así, que cada etapa ocurra de manera secuencial para dar tiempo a la reparación del ADN (Cuddihy y O'Connell 2003; Weitzman y Wang 2013).

Si las células progresan hacia la siguiente fase del ciclo celular antes de que la fase previa se complete de manera adecuada, puede producirse un daño genético importante, que lleva a la inestabilidad genómica. Para reducir al mínimo la aparición de estos errores durante el ciclo celular, el progreso de una célula a través de él se verifica en cuatro puntos de control fundamentales (Fig. 4). Las vías de señalización de estos puntos de control tienen como blancos clave de inhibición las proteínas Cdk (Lodish *et al.* 2002, Cuddihy y O'Connell 2003).

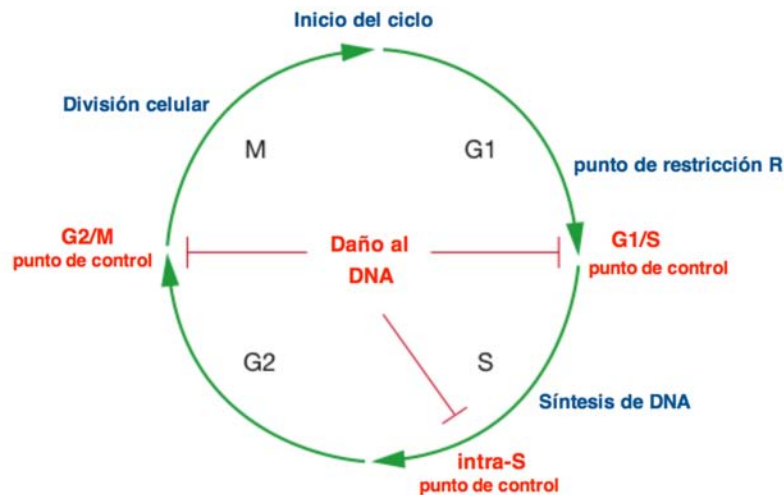


Figura. 4 Ciclo celular y los puntos de control de respuesta al ADN dañado. El ciclo consiste en cuatro fases: G1, S (Síntesis), G2 y M (mitosis). La activación de cada fase depende de la progresión y termino adecuado de la anterior. La progresión secuencial del ciclo es regulada por las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) (Weitzman y Wang 2013).

### 2.5.3 PUNTO DE CONTROL G1/S.

Las células en la fase G1 del ciclo celular se comprometen a entrar a la fase S en una etapa conocida en mamíferos como punto de restricción (R). Este punto sirve para prevenir que las células entren a la fase S cuando existe daño al ADN y funciona al inhibir la iniciación de la replicación. El paro en G<sub>1</sub> impide el copiado de bases dañadas, impidiendo así la fijación de mutaciones en el genoma y los reordenamientos cromosómicos (Weitzman y Wang 2013).

Cuando hay rompimientos de doble cadena (DSBs), la quinasa que se describió como mutada de ataxia telangectasia (ATM) es activada y fosforila muchos efectores debajo de la vía, entre ellos p53 y la quinasa del punto de control 2 (Chk2). La activación de estas vías de transducción de señales sirve para iniciar y mantener el arresto G1/S (Blagosklommy y Pardee 2002, Weitzman y Wang 2013).

#### 2.5.4 PUNTO DE CONTROL INTRA-S.

En células que pasaron el punto de restricción, el daño al ADN inhibe temporalmente la síntesis de ADN. La inducción de este punto depende de la activación de la quinasa ATM, la cual depende de la fosforilación de componentes del complejo de cohesinas que regulan el apareamiento de cromátidas hermanas. También se ha encontrado una supresión de la actividad del complejo ciclina A/Cdk2 en células tratadas con radiación ionizante (Weitzman y Wang 2013).

#### 2.5.5 PUNTO DE CONTROL G2.

Este punto previene que las células lleven a cabo la mitosis en presencia de daño al ADN. Dependiendo del tipo de lesión la vía ATM-Chk2 o la ATR-Chk1 son activadas para arrestar el ciclo en la fase G2. La detención en G2, permite que los rompimientos del ADN bicatenario se reparen antes de la mitosis. Si un rompimiento no se repara, no existe una adecuada distribución cromosómica, ya que el fragmento cromosómico, al no estar unido a un centrómero, no migra a ningún polo del huso durante la anafase (Lodish *et al.* 2002, Weitzman y Wang 2013).

#### 2.6.6 PUNTO DE CONTROL DEL HUSO MITÓTICO.

Este detiene la evolución del ciclo celular en la mitosis hasta que todos los cromosomas están unidos apropiadamente al huso. De alguna manera percibe cuando el huso mitótico no se ha formado de modo adecuado e impide la activación del sistema de poliubiquitinización del complejo promotor de la anafase (APC), que normalmente da inicio a la anafase, y más tarde a la degradación de las ciclinas mitóticas, que se requieren para la salida de la mitosis. Agentes que dañan el ADN,

además de alterar el aparato mitótico, pueden activar el mecanismo de sobrevivencia del punto de control del huso mitótico (Lodish *et al.* 2002, Alberts *et al.* 2004).

La red de vigilancia de los puntos de control comienza con sensores proteicos que reconocen lesiones específicas en el ADN. Algunos sensores se unen a bases modificadas mientras que otros responden a cortes en el ADN, regiones de ADN de una sola cadena o a rompimientos de doble cadena. Esta red de vigilancia del daño puede estimular activamente la muerte celular programada (apoptosis), que contrae y rompe una célula dañada o en la forma de senescencia prematura que causa que las células dañadas sean retiradas irremediabilmente del ciclo celular (Weitzman y Wang 2013). Uno de los efectores clave, en la inducción de apoptosis, es p53 un factor de transcripción activado por ATM y Chk2. La señalización persistente de p53 por lesiones de ADN sin reparar puede llevar tanto a la apoptosis o la senescencia, la intensidad y la duración de las señales, así como el contexto celular son los determinantes críticos que controlan el destino celular (Lodish *et al.* 2002, Alberts *et al.* 2004, Rodríguez-Fragoso *et al.* 2004, Weitzman y Wang 2013).

Es probable que los inhibidores de las quinasas y de las fosfatasas estén involucrados en la progresión del ciclo celular una vez reparado el daño al ADN, sin embargo, algún punto de las vías de señalización involucradas en los puntos de control puede ser inactivado para restaurar la progresión del ciclo celular a pesar del daño al ADN no reparado. La adaptación al daño al ADN restauraría la división celular a expensas de la integridad genómica, promoviendo así la progresión de células dañadas (Weitzman y Wang 2013).

## **2.6 INMUNOTOXICIDAD.**

En algunos casos las sustancias químicas como los plaguicidas tienen la capacidad de alterar una o más funciones inmunológicas resultando en un efecto nocivo, lo que se conoce como inmunotoxicidad (Colosio *et al.* 1999, Corsini *et al.* 2013). Esta alteración de la función inmune normal tiene dos tipos de consecuencias.

- a) Inmunosupresión
- b) Inmunoestimulación.



La primera es la reducción de la actividad inmune, lo que puede llevar a un déficit inmunológico y un incremento en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y neoplasmas; la segunda es un incremento en la respuesta inmune, que puede ocasionar alergias y autoinmunidad (Colosio *et al.* 1999, Corsini *et al.* 2013). Además Los agentes químicos pueden interferir con varias vías de señalización generales o específicas del sistema inmune, resultando en cambios en la producción de citocinas, expresión de marcadores de superficie, diferenciación y activación celular (Esser y Jeux 2009, Corsini *et al.* 2011, Fukuyama *et al.* 2011). Esto los hace compuestos inmunotóxicos ya que tienen la capacidad de alterar una o más funciones inmunológicas resultando en un efecto nocivo para el hospedero (Corsini *et al.* 2013)

Diversos datos sugieren que el sistema inmune puede ser un blanco importante para los efectos tóxicos de los plaguicidas, las alteraciones que ocasionan varían de una leve modulación de la respuesta inmune hasta el desarrollo de alguna enfermedad inmune, siendo los niños particularmente susceptibles a estos daños (Wigle *et al.* 2008, Corsini *et al.* 2007). Además se ha propuesto que una función alterada del sistema inmune podría ser indicadora de un incremento en el potencial de desarrollar enfermedades como el cáncer (Esser and Jux, 2009). Para entender de una mejor manera el riesgo inmunotóxico que supone el uso de diferentes compuestos químicos, incluidos los plaguicidas, es necesario el uso de marcadores inmunotóxicos. Entre éstos los mas usados comúnmente para estudiar la función inmune en los seres humanos incluyen conteos celulares, marcadores de activación de superficie celular, niveles de inmunoglobulinas y expresión y secreción de citocinas (Duramad 2007).

#### 2.6.1 CITOCINAS

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular o glicoproteínas secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa que median muchas de las funciones de estas células. Se producen en respuesta a los microorganismos y otros antígenos de modo que distintas citocinas estimulan diferentes respuestas en las células que participan en la inmunidad y la inflamación. En la fase de activación de las respuestas inmunitarias adaptativas, las citocinas estimulan el crecimiento y proliferación de

linfocitos y en las fases efectoras de la respuesta innata y adaptativa activan diferentes células efectoras para la eliminación de los microorganismos y antígenos (Abbas 2008).

### 2.6.2 TNF-ALFA

El factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) es una de las principales citocinas pro-inflamatorias que juega un papel central en el inicio y regulación de la cascada de citocinas durante la respuesta inflamatoria (Gruen y Weissman 1997, Makhatadze 1998). Es el miembro representativo de la superfamilia del TNF de citocinas triméricas y proteínas de superficie celular (Locksley 2001).

El TNF- $\alpha$  es una proteína de bajo peso molecular (17 kDa) que consta de 157 aminoácidos, producida por varios tipos celulares, entre los que se incluyen macrófagos, monocitos, linfocitos, queratinocitos y células “*natural killers*” (NK) (Atzeni *et al.* 2013). Su expresión se da en respuesta a inflamación, infección, heridas, estímulos ambientales externos y puede ser inducida por lipopolisacáridos bacterianos (LPS), mitógenos y virus (Locksley 2001). El TNF- $\alpha$  exhibe un amplio espectro de respuestas celulares incluyendo la activación y migración de linfocitos y leucocitos, fiebre, respuestas inflamatorias, proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Atzeni *et al.* 2013). Su acción varía con la concentración, cuando es cumple funciones homeostáticas, mientras que a niveles elevados, en infecciones graves, causa alteraciones clínicas y patológicas sistémicas (Jones y Selby 1989, Abbas 2008). El TNF- $\alpha$  parece tener un papel doble, en la primera fase de la respuesta a la infección es pro-inflamatorio y en la fase tardía de la respuesta es anti-inflamatorio para limitar la extensión y duración de la inflamación y promover la reparación (Marino *et al.* 1997, Makhatadze 1998).

Los efectos del TNF- $\alpha$  están mediados por dos receptores estructuralmente relacionados pero que difieren funcionalmente, TNRF1 (p55), que es expresado de forma ubicua y TNRF2 (p75) el cual se encuentra restringido a los linfocitos y es activado de manera más eficiente por el TNF transmembranal (Grell 1995, Vandenabeele *et al.* 1995, Xanthoulea *et al.* 2004). El receptor TNRF1 con sus dominios muerte (DD) es el receptor primario de las señales de la mayoría de los tipos celulares y es el responsable de la mayoría de los efectos pro-inflamatorios, citotóxicos y

apoptóticos atribuidos TNF- $\alpha$  (Chen y Goeddel 2002, Wajant *et al.* 2003). En contraste el TNRF2 no cuenta con estos dominios y predominantemente media señales que promueven la activación y proliferación de linfocitos (Grell *et al.* 1998, Arnett *et al.* 2001).

En las células la expresión de TNF- $\alpha$  puede resultar en la activación de una cascada de caspasas que culmine en la apoptosis (Chang y Yang 2000). Más comúnmente la unión de ésta citocina a sus receptores causa la activación de dos factores de transcripción, AP-1 y NF- $\kappa$ B, que inducen genes involucrados en respuesta inflamatoria crónica y aguda (Fig. 5 ) (Barnes y Karin 1997). Una vez que el TNF- $\alpha$  se une a su receptor, recluta una primera proteína llamada TRADD (*TNRF1 associated death domain protein*), que servirá como plataforma para la unión de otras proteínas como son RIP (*Receptor interacting protein*), FADD (*Fas-associated death domain protein*) y TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor 2*) (Baud y Karin 2001). El reclutamiento de FADD inducirá la activación de caspasas, dirigiendo la célula a apoptosis. Mientras que la interacción TRADD-TRAF2-RIP incita la formación de un complejo con actividad quinasa (IKK), que fosforilará el inhibidor del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), liberando a NF- $\kappa$ B, que se translocará al núcleo activando genes tanto pro-inflamatorios como implicados en la supervivencia celular (Fig. 5) (Hallenbeck 2002).

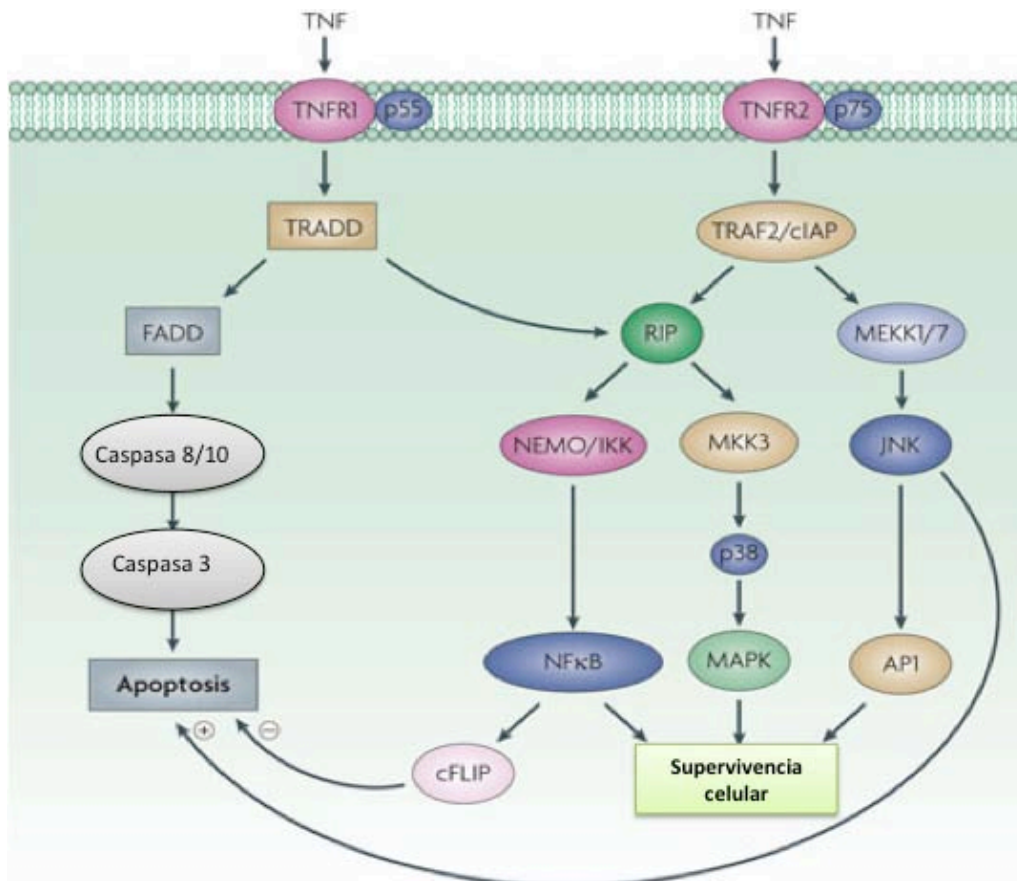


Figura 5. Representación esquemática de los componentes de la vía de señalización del TNF- $\alpha$  a partir de sus receptorer TNFR1 y TNRF2 hacia los factores de transcripción AP-1, NF- $\kappa$ B y la apoptosis (Fautsman y Davis 2010).

Tanto la inhibición como un aumento desmedido del TNF- $\alpha$  son motivo de cuidado ya que en ambos casos pueden llegar a generar diversas enfermedades (Balkwill 2006). Existe evidencia que implica el cambio de la expresión y/o señalización del TNF- $\alpha$  en la patología de muchas enfermedades entre las que se incluyen la de Crohn, la artritis reumatoide y neuropatologías como los infartos, esclerosis múltiple y Alzheimer (Balkwill 2006). El papel pro-inflamatorio así como pro-apoptótico del TNFR1 se ha observado en múltiples patologías, como en la esclerosis múltiple (Suvannavejh *et al.* 2000). Algunos estudios han revelado la relación entre la exposición a plaguicidas y la disminución o aumento en los niveles de algunas citocinas, entre las cuales está el TNF- $\alpha$  (Hooghe *et al.* 2000).

### 2.6.3 TGF-BETA

Es una citocina pleiotrópica que juega un papel importante en la supresión de la respuesta inmune para prevenir la autoinmunidad. Es una molécula reguladora con numerosos efectos en la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular que afecta procesos biológicos como el desarrollo, la carcinogénesis, fibrosis, curación de heridas y la respuesta inmune (Li *et al.* 2006).

Pertenece a la superfamilia del TGF- $\beta$  que consiste en un gran grupo de factores de crecimiento que controlan varios aspectos del desarrollo. Comprende más de 60 diferentes proteínas identificadas en diversos organismos. Los miembros de esta superfamilia se unen y activan receptores serina/treonina quinasa lo que resulta en una señalización intracelular (Chang *et al.* 2002).

Las funciones fisiológicas y fisiopatológicas del TGF- $\beta$  son extensas, ya que casi todos los tipos celulares pueden secretarlo y además expresar sus receptores. En la mayoría de las células de mamífero, existe una expresión constitutiva de esta citocina. La regulación de la activación se puede dar en dos diferentes puntos: 1) a nivel de transcripción o traducción dentro de la célula ó 2) controlando los niveles de activación del TGF- $\beta$  latente en el ambiente extracelular (Chang *et al.* 2002). Los blancos celulares del TGF- $\beta$  no se limitan a una línea o tipo celular específico (Massagué *et al.* 1994). Tiene la habilidad para inhibir la proliferación celular, regula la diferenciación celular (especialmente de las células de la respuesta inmune), controla la diferenciación celular, la apoptosis y la producción de matriz extracelular, así como la estimulación de la quimiotaxis de fibroblastos, linfocitos, macrófagos y neutrófilos (Sosa-Garrocho y Macía-Silva 2004).

En mamíferos se han identificado tres isoformas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, éstas tienen una función biológica similar pero se expresan en diferentes tejidos (Govinden y Bhoola 2003). La isoforma TGF- $\beta$ 1 se encuentra de forma predominante en la mayoría de los tejidos, especialmente en el sistema inmune donde es producida por varios tipos celulares del linaje de los leucocitos (Monteón y Ligonio 2008).

A diferencia de la mayoría de las citocinas el TGF- $\beta$  es sintetizado como una molécula precursora inactiva, por procesos proteolíticos se forma un pequeño complejo heterodimérico latente (SLC) de 392 aminoácidos, que contiene la forma activa del TGF- $\beta$  maduro de 112 aminoácidos, y una proteína asociada de latencia (LAP), que lo mantiene inactivo e impide su unión a los receptores (Dubois *et al.* 1995, Roberts 1998). Bajo condiciones fisiológicas, en respuesta a un estímulo el TGF- $\beta$  activo es liberado de estas proteínas de latencia, lo que le permite unirse a su receptor (Annes *et al.* 2003). Las señales del TGF- $\beta$  son mediadas por un receptor tipo II (TBR-II) y un receptor tipo I (TBR-I o ALK-5), ambos receptores presentan un dominio extracelular de unión a ligando, una región transmembranal y un dominio citoplásmico con actividad quinasa en residuos de serina o treonina (Massagué *et al.* 1994, Chang *et al.* 2002). El tipo II es una quinasa constitutivamente activada, mientras que el receptor tipo I es activado por el receptor II por medio de una fosforilación y en respuesta a la unión del ligando a ambos receptores (Massagué *et al.* 1994).

La transducción de señales posterior a la unión del TGF- $\beta$  al receptor tipo II permite que el ligando pueda interactuar con el tipo I. El receptor TBR-II transfosforila al receptor tipo I en un dominio GS (rico en glicinas y serinas). La transducción de señales intracelular es mediada por la fosforilación de muchos factores de transcripción conocidos como Smad (vía de señalización dependiente de Smad), inicia cuando el receptor ALK-5 fosforila Smad2 y Smad3 que se trasloca al núcleo como un complejo (R-Smad) con Smad4. Éste se une a un promotor blanco y regula la expresión de genes a través del reclutamiento de acetiltransferasas de histonas y deacetilasas de histonas (Fig. 6) (Derynck y Zhang 2003, Massagué y Gomis 2006). Los reguladores negativos de esta vía incluyen Smad 7 que compite con Smad2 y Smad3 por la unión al receptor tipo I y degrada la quinasa de éste (Thomas y Massagué 2005, Massagué y Gomis 2006). Hay evidencia de que el TGF- $\beta$  es capaz de activar otras vías de transducción paralelamente a las Smad, como son la vía clásica de las MAPKs y la vía de PI3K, entre otras. Estas vías independientes de Smad involucran cascadas de quinasas (Huse *et al.* 2001, Derynck y Zhang 2003).

Esta citocina es un importante regulador de la inflamación ya que posee propiedades pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, lo cual dependerá tanto del ambiente en el que se encuentre como de su concentración. Cuando el TGF- $\beta$  es liberado en

concentraciones bajas, tiene propiedades pro-inflamatorias e incluye su capacidad para reclutar monocitos, células T y neutrófilos al sitio de inflamación durante una infección, a través de la modulación de la expresión de moléculas de adhesión celular. Sin embargo, a altas concentraciones es anti-inflamatorio, suprimiendo la producción del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) y del óxido nítrico (ON) producido por los macrófagos también inhibe la producción de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) e indirectamente disminuye la expresión de antígenos clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (Omer *et al.* 2000).

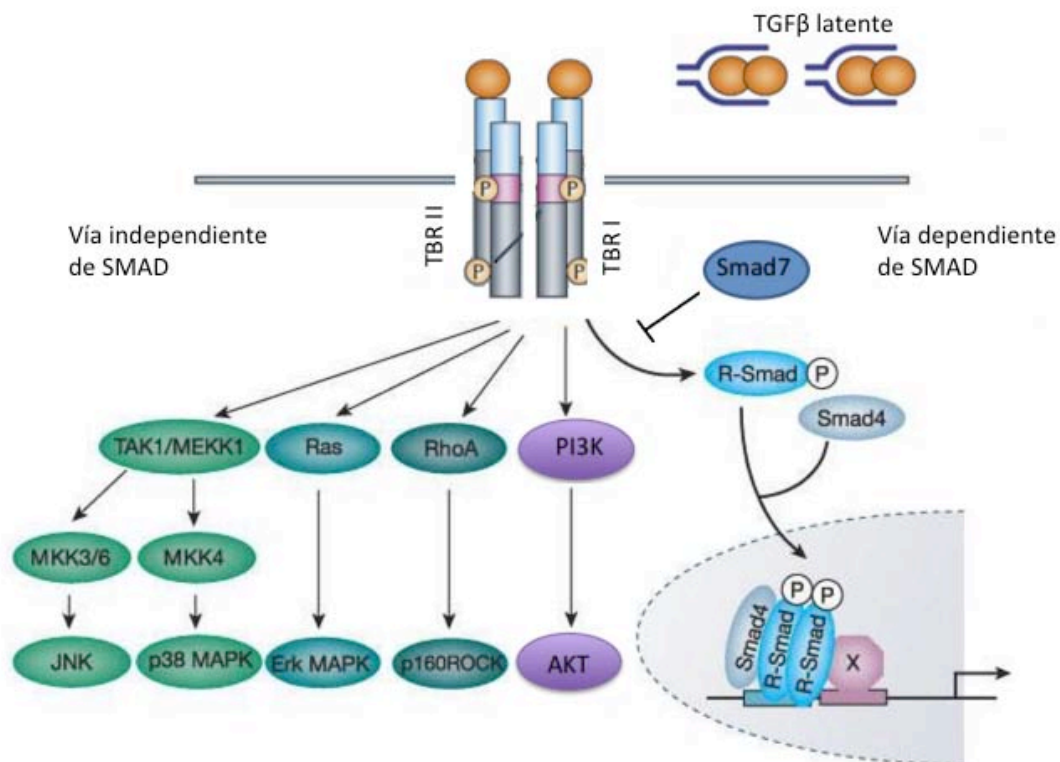


Figura 6. Vía de señalización del TGF- $\beta$ . Dependiente e independiente de Smad (Derync *et al.* 2003).

La señalización del TGF- $\beta$  esta involucrada en el balance de la homeostasis en los tejidos saludables y en la supresión de la progresión de tumores en tejidos pre-malignos (Massagué 2008). Alteraciones en sus señales pueden contribuir a la patogenia de enfermedades muy diversas como las autoinmunes, la fibrosis y el cáncer (Josso y Di Clementi 1997). Altos niveles de TGF- $\beta$  son producidos por muchos tipos de tumores entre los que se incluyen melanomas y cáncer de pecho, colon, esófago, estómago, hígado, pulmón, páncreas y próstata (Teicher 2001, Dong y Blobe 2006).

## **2.7 NF- $\kappa$ B**

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción descubierto en 1986 en la cadena ligera kappa de la inmunoglobulina de las células B. Es un factor de transcripción inducible que participa en las respuestas inmune e inflamatoria, se encuentra de forma ubicua en genes relacionados en la supervivencia celular, adhesión celular, diferenciación y crecimiento, así como el desarrollo, formación, progresión y apoptosis de tumores (Chen *et al.* 2000, Hayden *et al.* 2014, Shishodia *et al.* 2006). Los complejos activos de NF- $\kappa$ B son dímeros de combinaciones de diferentes polipéptidos de la familia Rel, que consisten en p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), c-Rel, Rel A (p65), y Rel B. De éstas solo las tres últimas tienen el dominio transactivador, indispensable para reconocer el promotor de los genes blanco o diana (Bharti y Aggarwal 2002). La formación del homodímero o heterodímero es determinante en la actividad transcripcional en los promotores de los genes diana. El heterodímero p50/RelA es el más común y su actividad transcripcional ocurre gracias a la proteína RelA (Hayden y Ghosh 2014).

El NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma en forma inactiva unido a I $\kappa$ Bs, las cuales después de un estímulo adecuado son fosforiladas, ubiquitinadas y degradadas por el proteosoma, permitiendo así la liberación de los dímeros de NF- $\kappa$ B que se translocan al núcleo donde regulan la transcripción de genes blanco que codifican para citocinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular y proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas (Barnes y Karin 1997, Karin y Lin 2002, Beinke y Ley 2004). Dependiendo del estímulo, diferentes proteínas inician la señal desde la membrana citoplasmática hacia el núcleo. Además se ha observado que estímulos como el estrés



genotóxico, el daño en el ADN y estrés oxidante desencadenan vías de señalización que comprometen al complejo de activación de NF- $\kappa$ B (Beinke y Ley 2004).

La señalización por NF- $\kappa$ B ocurre a través de 2 vías principales: la clásica o canónica y la vía alternativa o no canónica (Fig. 7). La primera es activada por muchos tipos de receptores entre los que se incluyen los del TNF (TNFRs), los tipo Toll (TLRs), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y los receptores de antígenos (TCR y BCR) (Martin y Fresno 2000, Weil e Israel 2004). Esta vía depende de las proteínas quinasas de los inhibidores de NF- $\kappa$ B (IKKs) para su activación. IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  dimerizan y se unen a IKK $\gamma$  (también llamada NEMO) para formar el complejo quinasa I $\kappa$ B (IKK). Este complejo fosforila I $\kappa$ B $\alpha$ , el principal inhibidor de p50/RelA, marcando así a la proteína para su poliubiquitinación y degradación vía proteosoma. Este proceso permite la liberación de NF- $\kappa$ B su translocación al núcleo y la consiguiente modulación de transcripción de genes (Zandi *et al.* 1997, Gloire *et al.* 2006, Hayden y Ghosh 2014). La ruta alternativa, por su parte, es inducida en respuesta al factor activador de células B (BAFF) (Baud y Karin 2001), LT $\beta$ , ligando CD40, virus de leucemia humana tipo I de células T (HTLV) y virus de Epstein-Barr (EBV) . En ella participa la quinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK), ésta fosforila al homodímero IKK $\alpha$  desencadenando su interacción con la proteína p100 que está unida a RelB. La fosforilación de p100 es seguida por su procesamiento en proteosoma a p52 y por la translocación del complejo RelB/ p52 al núcleo (Gloire *et al.* 2006).

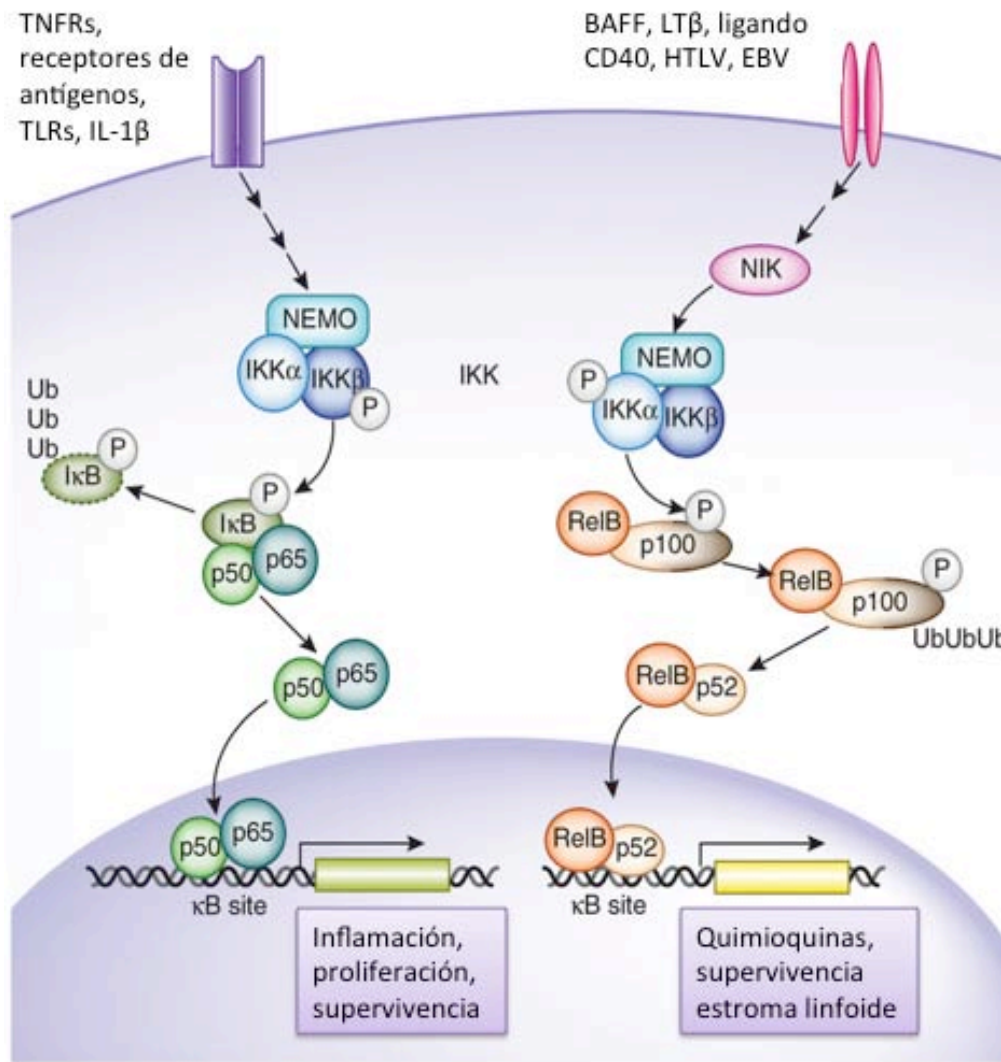


Figura 7. Vía de señalización canónica y no canónica de NFκB (Gerondakis *et al.* 2014).

Además de la vía canónica y no canónica el NF-κB puede ser activado en respuesta a daño al ADN y estrés oxidante. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) activan al NF-κB mediante un proceso en el cual NEMO desempeña un papel importante, en esta vía ocurre una modificación característica en el dominio de dedos de Zn (ZF) de NEMO, uniéndose una molécula pequeña similar a la ubiquitina (SUMO), provocando la translocación de NEMO al núcleo, sin alterar su estabilidad. Esta modificación de NEMO es desencadenada exclusivamente por compuestos que dañan el ADN o por rompimientos de doble cadena de ADN, pero no en respuesta a citocinas (Huang *et al.* 2003).

### **III JUSTIFICACIÓN**

Los plaguicidas son ampliamente utilizados en la agricultura para obtener la mejor calidad y producción de los cultivos. En México se ha incrementado cada vez más la producción y el empleo de nuevas clases de agroquímicos. Diversos estudios epidemiológicos han relacionado la exposición a los plaguicidas con el daño sobre el ADN y el desarrollo de enfermedades en el sistema nervioso, respiratorio e inmunológico. Sin embargo no existen reportes de los efectos adversos de plaguicidas de reciente creación y comercialización en nuestro país como lo son los cetoenoles, por lo tanto, es necesario iniciar ensayos *in vitro* con esta clase de agroquímicos, que evalúen sus posibles efectos genotóxicos y alteraciones de la respuesta inmune. Los resultados de estos estudios además aportarán información para dilucidar los mecanismos moleculares de genotoxicidad de estos plaguicidas.

Tomando en cuenta el riesgo que representan los plaguicidas para la salud de los organismos, el presente trabajo evaluarán los efectos citotóxico, genotóxico e inmunotóxico de la nueva clase de insecticidas cetoenoles Oberon y Movento en linfocitos de sangre periférica humana *in vitro*.

## **IV OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto citotóxico, genotóxico e inmunotóxico de los insecticidas cetoenoles Oberon® y Movento® en linfocitos humanos de sangre periférica expuestos *in vitro*.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

Analizar el efecto citotóxico en los linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* a las diferentes concentraciones de los plaguicidas cetoenoles

Analizar el efecto genotóxico en cultivos *in vitro* de linfocitos de sangre periférica humana expuestos a Oberon y Movento.

Cuantificar la expresión de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y NF- $\kappa$ B en linfocitos periféricos expuestos y no expuestos *in vitro* a los insecticidas.

## **V HIPÓTESIS**

Muchos plaguicidas, entre ellos los carbámicos, neonicotinoides y piretroides han mostrado ser agentes genotóxicos *in vivo* e *in vitro*, al inducir significativamente daño en el ADN (medido por diversos ensayos tales como: ensayo cometa, intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y micronúcleos) se espera que los plaguicidas cetoenoles Oberon y Movento también sean genotóxicos, lo cual se verá reflejado en un incremento en la frecuencia de micronúcleos y modificaciones en la expresión de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , NF- $\kappa$ B.

## **VI MATERIAL Y MÉTODO**

### **6.1 INSECTICIDAS CETOENOLES COMERCIALES OBERON Y MOVENTO**

Los insecticidas cetoenoles Oberon<sup>®</sup> y Movento<sup>®</sup> fueron donados por Bayer Crop Science, México:

Oberon<sup>®</sup> 240 SC, 2-Mesitil-2-oxo-1-oxaspiro[4,4]non-3-en-4-il 3,3-dimetilbutirato. Suspensión concentrada (240 g de i.a./L). No. De registro: RSCO-INAC-0103-301-064-023.

Movento<sup>®</sup>, cis-4-(etoxicarboniloxi)-8-metoxi-3-(2,5-xilil)-1 azaspiro[4,5] dec-3-en-2-ona. Dispersión en aceite "OD" (150 g de i.a./L). No. De registro: RSCO-INAC-0103Z-301-409-015.

### **6.2 TRATAMIENTOS *IN VITRO* CON LOS INSECTICIDAS CETOENOLES OBERON Y MOVENTO EN LOS LINFOCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS.**

Se coincubaron 500 µL de sangre periférica heparinizada de un donador joven y sano con medio RPMI 1640 suplementado con fitohemaglutinina (2 %) y penicilina-estreptomicina (0.5 %) a un volumen final de 2.5 mL con las diferentes concentraciones de Oberon<sup>®</sup> ( $1.29 \times 10^{-6}$  mM,  $2.59 \times 10^{-6}$  mM,  $5.18 \times 10^{-6}$  mM,  $7.56 \times 10^{-6}$  mM,  $10.37 \times 10^{-6}$  mM) y de Movento<sup>®</sup> ( $2 \times 10^{-6}$  mM,  $4 \times 10^{-6}$  mM,  $8 \times 10^{-6}$  mM,  $12 \times 10^{-6}$  mM,  $16 \times 10^{-6}$  mM) a 37°C, así como los testigos positivo (Bleomicina, 3.2 µg/mL) y el testigo negativo (linfocitos sin plaguicidas), en las mismas condiciones. A las 44 h, a todos los cultivos se les adicionó citocalasina B (4.5 µg/mL), a las 72 h se cosecharon los linfocitos mediante centrifugación a 1500 rpm por 10 min. El botón celular se dividió en dos partes, una para realizar la prueba de micronúcleos y la otra se mantuvo en PBS (pH 7.5) a -80 °C para realizar las pruebas de RT-qPCR (Calderón-Segura *et al.* 2007, 2012, Rodríguez-Romero *et al.* 2012).

### 6.3 CITOTOXICIDAD DE LOS INSECTICIDAS OBERON Y MOVENTO

Se calcularon índices empleados en el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (Kirsch-Volders 2003), el índice de división nuclear (IDN):

$$IDN = \frac{1(\text{células mononucleadas}) + 2(\text{células binucleadas}) + 3(\text{células trinucleadas}) + 4(\text{células tetranucleadas})}{\text{Número total de células}}$$

y el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC)

$$IPBC = \frac{\text{No. de células mononucleadas} + 2(\text{No. de células binucleadas}) + 3(\text{No. de células multinucleadas})}{\text{Número total de células}}$$

Finalmente se determinó la citotoxicidad inducida por los plaguicidas empleando el IPBC del testigo (IPBC<sub>c</sub>) y el de los tratamientos (IPBC<sub>T</sub>) con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 100 - 100 \left[ \frac{IPBC_T - 1}{IPBC_c - 1} \right]$$

### 6.4 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

El botón celular (del punto 6.2) se fijó con 1 mL de fijador Carnoy (3:1) y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular. Se agregaron 5 mL de fijador Carnoy y se volvió a centrifugar a 1500 rpm por 10 min. Este paso se repitió dos veces más. Se realizaron laminillas en portaobjetos por la técnica de goteo y se dejaron secar al aire. Las muestras se tiñeron en colorante Giemsa al 5% y se analizaron en el microscopio óptico a 40X para determinar en 1000 células (por duplicado) la frecuencia de micronúcleos.

## **6.5 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TNF-ALFA, NF-KB Y TGF-BETA POR RT-qPCR**

### 6.4.1 EXTRACCIÓN DE RNA

Se extrajo el RNA total de linfocitos periféricos humanos expuestos previamente a las cinco concentraciones de los dos insecticidas mediante el reactivo de Trizol. A cada botón celular se le agregaron 100 µL de Trizol y se dejaron reposar por 5 min a temperatura ambiente. Se le añadieron 60 µL de cloroformo, se agitó y dejó incubar 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron las muestras. La fase acuosa se transfirió a un tubo con 150 µL de isopropanol y 1 µL de glucógeno. Se incubó durante 24 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se realizó un lavado con 100 µL de etanol (75%) centrifugando 5 min a 7500 rpm. Se decantó el sobrenadante y las muestras se dejaron secar en baño seco a 40 °C. Finalmente, se resuspendió el botón en 10 µL de agua libre de nucleasas y se guardó a -80 °C hasta su uso.

### 6.4.2 CUANTIFICACIÓN DE RNA

Una vez extraído el RNA, se cuantificó en 1 µL de cada muestra la concentración de RNA en un espectrofotómetro NanoDrop ND-100 Genova Nano JANWAY® utilizando los cocientes 260/280 y 260/230 nm de la absorbancia para obtener la pureza. Posteriormente, se realizaron los cálculos para tener 200 ng de RNA en cada 3 µL de muestra.

### 6.4.3 SÍNTESIS DE CADN

La síntesis de cADN se realizó a partir de 200 ng de RNA total en un volumen final de 20µL (Tabla 5) siguiendo el protocolo del Kit Thermo Scientific en un termociclador "Thermal cycler MJ mini" BIORAD® con las siguientes condiciones: 37 °C por 60 minutos, 70 °C por 10 minutos y 20 °C por un minuto.



Tabla 5. Mezcla para la síntesis de cADN.

<b>Templado de ARN</b>	3 µL
<b>Oligo (dT)</b>	1 µL
<b>Agua libre de nucleasas (DEPC)</b>	8 µL
<b>Amortiguador de reacción 5X</b>	4 µL
<b>Inhibidor de RNAsas</b>	1 µL
<b>RiboLock</b>	
<b>Mezcla de dNTPs</b>	2 µL
<b>Transcriptasa reversa</b>	1 µL
<b>ReverAid M-MuLV</b>	

#### 6.4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-QPCR)

El PCR en tiempo real se realizó con el kit en un equipo de la marca Stratagen Mx300SP Agilent Technologies, siguiendo el protocolo del Kit Maxima SYBR Green qPCR Master mix de Thermo Scientific®, utilizando SYBR Green como fluorocromo principal y ROX como colorante pasivo de referencia. Se emplearon los iniciadores específicos para cada gen (Tabla 6) para preparar las mezclas de reacción (Tabla 7) para el ensayo de amplificación llevado a cabo en un termociclador Stratagen MX300SP Agilent Technologies®, utilizando el siguiente perfil de temperatura: 95 °C por 10 minutos, 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 58 °C por 1 minuto. Para finalizar con un ciclo de 95 °C por un minuto, 58 °C por 30 segundos y 95 °C por 30 segundos. Cada muestra se realizó por triplicado, incluyendo un testigo sin templado (NTC) y se analizaron los niveles de expresión relativa con el algoritmo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizando como gen endógeno la expresión de la  $\beta$ -actina.

Tabla 6. Secuencia de los iniciadores utilizados para los genes TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y RelA.

<b>Gen</b>	<b>Secuencia 5' <math>\rightarrow</math> 3'</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	AGGCGGTGCTTGTCCTCA
	GCCGATCACTCCAAAGTGC
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	TGCTAATGGTGGAAACCCAC
	GAAGCTCTGATGTGTTGAAG
<b>RelA</b>	AGAACCTGGGAATCCAGTGT
	GAACTTGGAAGGGGTTGTTG

Tabla 7. Mezcla de reacción para el ensayo de amplificación.

<b>SYBR Green</b>	10 $\mu$ L
<b>Primer sentido</b>	0.3 $\mu$ M
<b>Primer antisentido</b>	0.3 $\mu$ M
<b>ROX</b>	0.04 $\mu$ L
<b>Agua DEPC</b>	6.76 $\mu$ L
<b>cADN</b>	2.0 $\mu$ L

## **6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los valores promedio de tres experimentos independientes se compararon entre sí, mediante las pruebas de análisis de varianza (ANOVA), de comparación múltiple de Newman-Keuls para las diferencias estadísticas entre los promedios de los grupos experimentales y los testigos positivo y negativo, y un análisis de regresión lineal para establecer la relación de concentración-efecto (Calderón-Segura *et al.* 2007, 2012, Rodríguez-Romero *et al.* 2012).

## VII RESULTADOS

### 7.1 GENOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL INSECTICIDA MOVENTO EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA *IN VITRO*

En la figura 8A, se muestran los resultados del ensayo de micronúcleos en el cultivo de linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* a diferentes concentraciones del plaguicida Movento. Las concentraciones de  $2 \times 10^{-6}$ ,  $4 \times 10^{-6}$ ,  $8 \times 10^{-6}$ ,  $12 \times 10^{-6}$  y  $16 \times 10^{-6}$  mM del insecticida incrementaron significativamente la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos (BNMN) al compararlos con el testigo negativo ( $p < 0.05$ ). Así como también, la bleomicina (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) usada como testigo positivo, aumentó significativamente la frecuencia de MN ( $p < 0.05$ ). El incremento de MN en el cultivo de linfocitos de sangre periférica humana fue mayor a las concentraciones de  $12 \times 10^{-6}$  y  $16 \times 10^{-6}$  mM de Movento. Los resultados del análisis de regresión lineal mostraron que existe una relación positiva ( $r^2 = 0.919$ ) entre la frecuencia de células con MN y la concentración del plaguicida, es decir el plaguicida tiene un efecto concentración respuesta (Figura 8B).

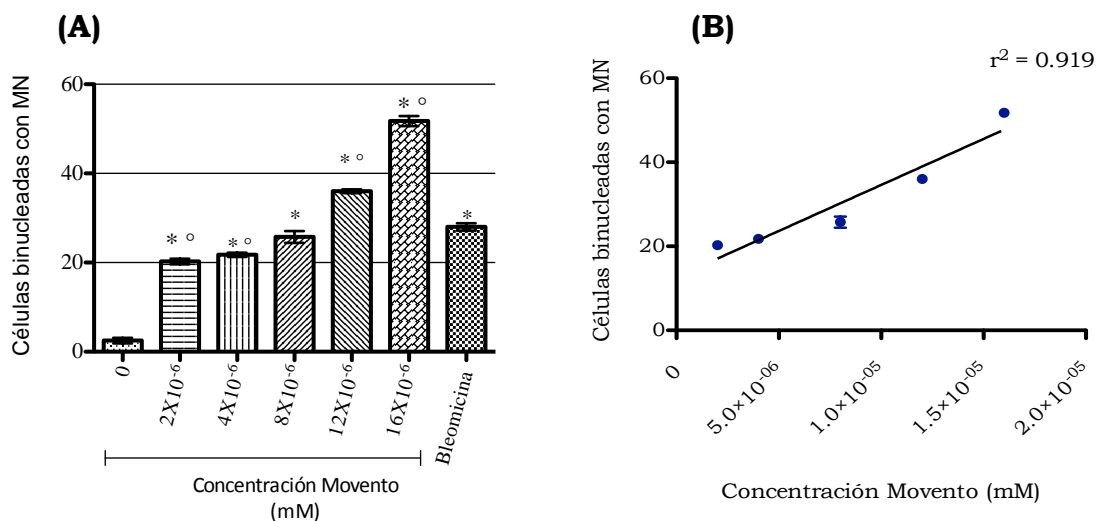


Figura 8. Frecuencia promedio de micronúcleos en el cultivo de linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* a diferentes concentraciones del plaguicida Movento. (A) Frecuencia de células binucleadas con micronúcleos por cada 1000 células. (B) Análisis de regresión lineal entre la inducción de MN en linfocitos de sangre periférica humana y las concentraciones del plaguicida a las que fueron expuestos.

Cada barra representa la media  $\pm$  E.E de tres experimentos independientes. \* Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ) con respecto al Testigo. ° Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ) con respecto a la Bleomicina.

## **7.2 CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL INSECTICIDA MOVENTO EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA *IN VITRO*.**

En la tabla 8 se muestran los promedios de los índices de división nuclear (IDN) y de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) así como el porcentaje de citotoxicidad relativa, calculados a partir del ensayo de Micronúcleos para los cultivos de linfocitos expuestos a diferentes concentraciones del insecticida Movento. Ambos índices IDN e IPBC de los linfocitos en cultivo expuestos a  $2 \times 10^{-6}$ ,  $4 \times 10^{-6}$  y  $8 \times 10^{-6}$  mM del agroquímico presentaron modificaciones discretas al compararse con los valores del testigo negativo. Pero en las concentraciones elevadas,  $12 \times 10^{-6}$ ,  $16 \times 10^{-6}$  mM el IDN y el IPBC de los linfocitos disminuyeron significativamente con relación a los valores del testigo negativo ( $p < 0.05$ ). Este efecto sobre ambos índices es similar en los linfocitos expuestos *in vitro* a la bleomicina comparados con el testigo negativo ( $p < 0.05$ ). La concentración más alta de movento exhibe mayor citotoxicidad (51%) con relación a los valores del testigo negativo.

Tabla 8. Efecto citotóxico en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* al plaguicida Movento.

	IDN <sup>a</sup>	IPBC <sup>b</sup>	Citotoxicidad relativa (%)
<b>Movento [mM]</b>			
0	1.86 ± 0.02	1.85 ± 0.03	
2×10 <sup>-6</sup>	1.88 ± 0.04	1.81 ± 0.04	4.91
4×10 <sup>-6</sup>	1.79 ± 0.05	1.75 ± 0.03	12.39
8×10 <sup>-6</sup>	1.70 ± 0.24	1.69 ± 0.08	18.94
12×10 <sup>-6</sup>	1.43 ± 0.09*	1.43 ± 0.03*	49.82
16×10 <sup>-6</sup>	1.41 ± 0.01*	1.41 ± 0.01*	51.69
<b>Bleomicina</b>			
3.2 µg/mL	1.60 ± 0.06*	1.56 ± 0.05*	34.50

Resultados de tres experimentos independientes

<sup>a</sup> Índice de División Nuclear (IDN)

<sup>b</sup> Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis (IPBC)

\* Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Newman-Keuls (p<0.05) entre los tratamientos y el testigo.

### **7.3 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE TNF-ALPHA, TGF-BETA Y RELA INDUCIDOS POR EL INSECTICIDA MOVENTO EN CULTIVOS *IN VITRO* DE LINFOCITOS HUMANOS.**

La figura 9A muestra los promedios de la expresión de TNF- $\alpha$  en los cultivos de linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* a diferentes concentraciones del compuesto Movento. La expresión del TNF- $\alpha$  no cambió en los linfocitos periféricos humanos expuestos a  $4 \times 10^{-6}$  mM de Movento, con relación a valor del testigo negativo (Figura 9A). Sin embargo, en los linfocitos expuestos *in vitro* a concentraciones de  $8 \times 10^{-6}$  y  $16 \times 10^{-6}$  mM aumentaron significativamente la expresión del TNF- $\alpha$  con relación al valor del testigo negativo ( $p < 0.05$ ). La expresión del TGF- $\beta$  y RelA en los linfocitos humanos expuestos *in vitro* a bajas concentraciones de Movento,  $4 \times 10^{-6}$  y  $8 \times 10^{-6}$  mM, aumenta levemente pero no existe diferencia significativa al compararse con los valores del testigo negativo (Figuras 9 B y C). En los linfocitos humanos expuestos *in vitro* a  $16 \times 10^{-6}$  mM del compuesto, asciende significativamente la expresión de RelA ( $>15$ ) con relación al valor del testigo ( $p < 0.05$ ) (Figura 9-B).

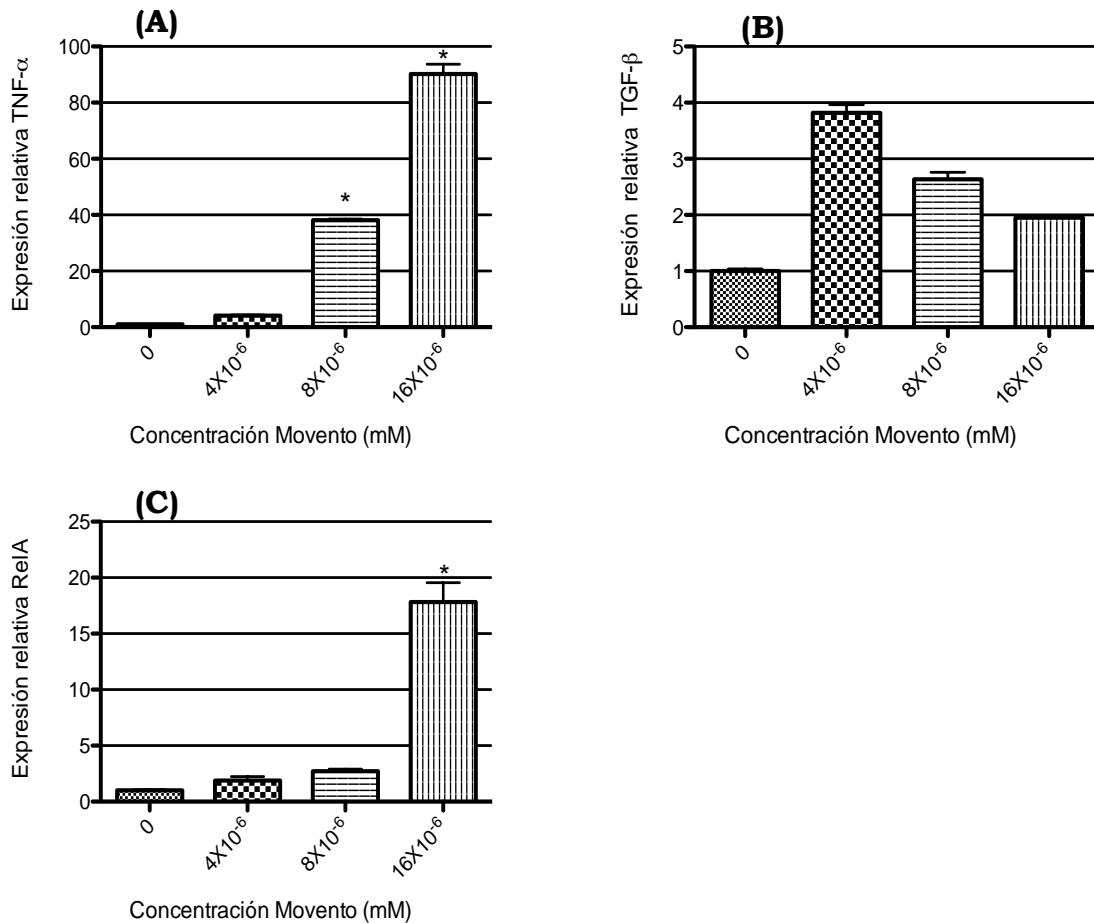


Figura 9. Cambios de expresión de las citocinas (A) TNF- $\alpha$  (B) TGF- $\beta$  y (C) la subunidad RelA del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* a distintas concentraciones del compuesto Movento.

Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. de tres experimentos independientes.\* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) ANOVA *post-hoc* Newman Keuls comparado con el testigo.



#### **7.4 GENOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL INSECTICIDA OBERON EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA IN VITRO.**

La figura 10 muestra los resultados para el ensayo de micronúcleos en cultivos de linfocitos expuestos a diferentes concentraciones del compuesto Oberon y el análisis de regresión lineal entre la frecuencia de micronúcleos y la concentración de plaguicida empleada. Los cultivos de linfocitos periféricos humanos expuestos a todas las concentraciones de Oberon,  $5.2 \times 10^{-5}$ ,  $7.8 \times 10^{-5}$ ,  $10.4 \times 10^{-5}$ ,  $12.9 \times 10^{-5}$ ,  $25.9 \times 10^{-5}$  mM, aumentaron significativamente el número de BNMN comparado con el testigo ( $p < 0.05$ ). La bleomicina, también induce incremento significativo de la frecuencia de MN ( $p < 0.05$ ) comparado con el valor del testigo negativo. Los cultivos expuestos a la máxima concentración del compuesto Oberon ( $25.9 \times 10^{-5}$  mM), producen mayor frecuencia de BNMN ( $p < 0.05$ ) con relación al testigo negativo. El análisis de regresión lineal muestra relación positiva ( $r^2 = 0.888$ ) entre la frecuencia de MN y la concentración del insecticida evaluada (Figura 10B).

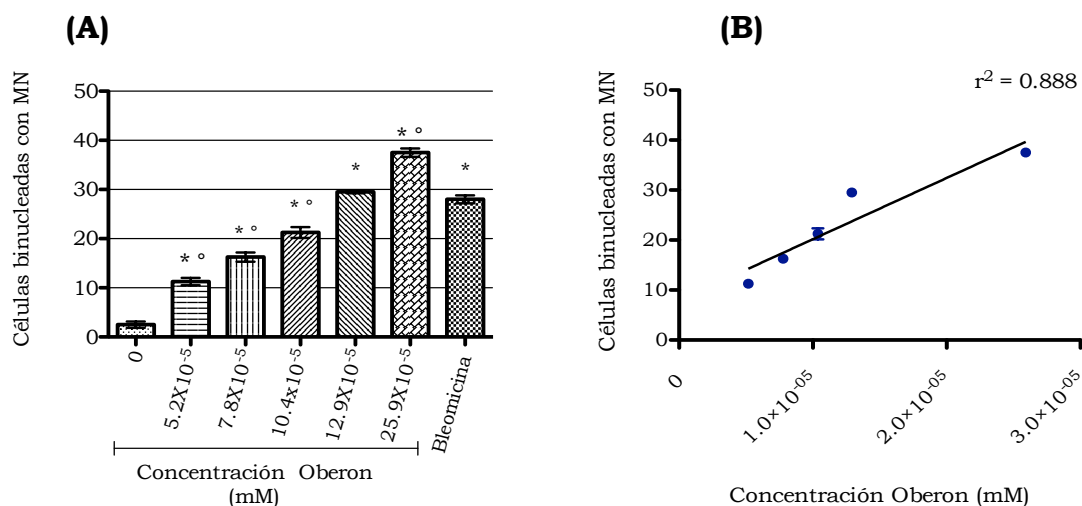


Figura 10. Inducción de genotoxicidad del insecticida Oberon en cultivos de linfocitos humanos expuestos *in vitro*. (A) Frecuencia de células binucleadas con micronúcleos por cada 1000 células. (B) Análisis de regresión lineal entre la inducción de MN en linfocitos de sangre periférica humana y las concentraciones de plaguicida a las que fueron expuestos.

Cada barra representa la media  $\pm$  E.E de tres experimentos independientes.

\* Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ) con respecto al Testigo.

° Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ) con respecto a la Bleomicina.

### **7.5 CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL INSECTICIDA OBERON EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA *IN VITRO*.**

Los índices de división nuclear (IDN) y de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) así como el porcentaje de citotoxicidad relativa obtenidos a partir del ensayo de micronúcleos para los cultivos de linfocitos expuestos a diferentes concentraciones del insecticida Oberon se muestran en la tabla 9. Las concentraciones de  $5.2 \times 10^{-5}$ ,  $7.8 \times 10^{-5}$ ,  $10.4 \times 10^{-5}$ ,  $12.9 \times 10^{-5}$ ,  $25.9 \times 10^{-5}$  mM de Oberon coincubadas con los linfocitos periféricos humanos no mostraron diferencias significativas con respecto al testigo. Pero, los cultivos expuestos a Bleomicina disminuyeron significativamente sus índices IDN e IPBC al compararlos con los valores del testigo negativo ( $p < 0.05$ ).

Tabla 9. Efecto citotóxico en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* al plaguicida Oberon.

	IDN <sup>a</sup>	IPBC <sup>b</sup>	Citotoxicidad relativa (%)
<b>Oberon [mM]</b>			
0	1.86 ± 0.02	1.85 ± 0.03	
5.2×10 <sup>-5</sup>	1.93 ± 0.22	1.85 ± 0.06	0
7.8×10 <sup>-5</sup>	1.88 ± 0.10	1.81 ± 0.02	4.21
10.4×10 <sup>-5</sup>	1.86 ± 0.08	1.80 ± 0.02	5.73
12.9×10 <sup>-5</sup>	1.81 ± 0.10	1.75 ± 0.03	11.69
25.9×10 <sup>-5</sup>	1.78 ± 0.12	1.74 ± 0.03	12.98
<b>Bleomicina</b>			
3.2 µg/mL	1.60 ± 0.06*	1.56 ± 0.05*	34.50

Resultados de tres experimentos independientes

<sup>a</sup> Índice de División Nuclear (IDN)

<sup>b</sup> Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis (IPBC)

\* Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Nweman-Keuls (p<0.05) entre los tratamientos y el testigo.

## **7.6 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE TNF-ALFA, TGF-BETA Y RELA INDUCIDOS POR EL INSECTICIDA OBERON *IN VITRO* EN LINFOCITOS HUMANOS**

La figura 11A-C muestra los resultados obtenidos para la evaluación de la expresión de las citocinas TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y del factor RelA en los cultivos de linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* al plaguicida Oberon. La expresión de TNF- $\alpha$  (Fig.10-A) aumentó significativamente en los linfocitos humanos expuestos *in vitro* a  $7.8 \times 10^{-5}$  mM de Oberon con relación al valor del testigo negativo ( $p < 0.05$ ). Las concentraciones de  $12.9 \times 10^{-5}$  y  $25.9 \times 10^{-5}$  mM de Oberon coincubadas con los cultivos de linfocitos humanos disminuyeron la expresión de TNF- $\alpha$  con respecto a la primera concentración hasta igualar los valores del testigo negativo (Figura 11A). La expresión del factor de crecimiento TGF- $\beta$  aumentó significativamente en los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a las concentraciones de  $7.8 \times 10^{-5}$ ,  $12.9 \times 10^{-5}$  y  $25.9 \times 10^{-5}$  mM ( $p < 0.05$ ). La máxima expresión de esta citocina ( $>1000$ ) en el cultivo de linfocitos humanos fue con  $25.9 \times 10^{-5}$  mM de Oberon (Figura 11B). Por otro lado, la expresión de RelA aumentó significativamente en los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a  $7.8 \times 10^{-5}$ ,  $12.9 \times 10^{-5}$  y  $25.9 \times 10^{-5}$  mM en relación al valor del testigo negativo ( $p < 0.05$ ), la máxima expresión ( $>40$ ) se observa a la concentración más baja (Figura 11C).

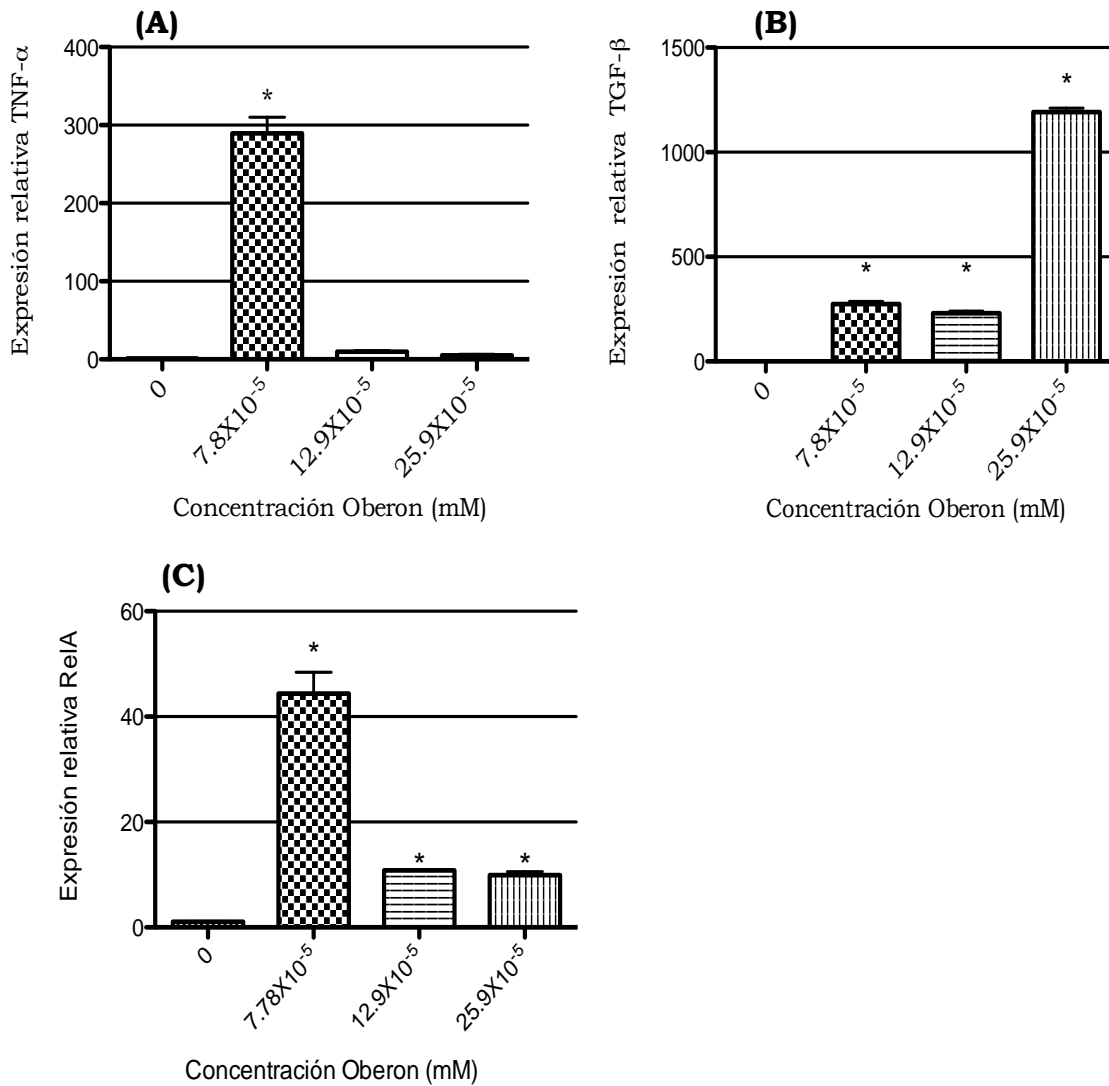


Figura 11. Cambios de expresión de citocinas (A) TNF-α (B) TGF-β y (C) la subunidad RelA del factor de transcripción NF-κB en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* a distintas concentraciones del compuesto Oberon.

Cada barra representa la media ± E.E. de tres experimentos independientes.\* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) ANOVA *post-hoc* Newman Keuls comparado con el testigo.

## VIII. DISCUSIÓN

Se estima que cada año se aplican millones de litros de plaguicidas en todo el mundo (USEPA, 2004). En México se ha incrementado cada vez más la producción y empleo de nuevas clases de agroquímicos, en el año 2013, el uso tan solo de insecticidas fue de 37,455 toneladas (FAO 2013). Sin embargo, sus acciones genotóxicas aún no han sido comprobadas (Garaj-Vrhovac y Zeljezic 2002), muchos plaguicidas están asociados con problemas reproductores y de desarrollo (Hanke y Jurewicz 2004, Lauria *et al.* 2006), con alteraciones neurológicas, metabólicas y del sistema inmune (Kishi *et al.* 1995, López *et al.* 1998, Dhillon *et al.* 2008, Corsini *et al.* 2013), así como, con diversos tipos de cáncer (Iarmacovai *et al.* 2008).

En este trabajo se utilizó el ensayo de micronúcleos para evaluar la citotoxicidad y la genotoxicidad *in vitro* de los plaguicidas Movento y Oberon en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana. El efecto genotóxico del spirotetramat y spiromesifen (ingredientes activos de los plaguicidas) se evaluó contando la presencia de micronúcleos en 2000 células binucleadas (BNMN) por concentración de cada agroquímico, como indicador de daño cromosómico. Los resultados obtenidos muestran que en los cultivos de linfocitos periféricos humanos expuestos a cinco concentraciones de los dos agroquímicos inducen aumento significativo en el porcentaje de BNMN, indicando que ambos plaguicidas son agentes genotóxicos al incrementar el daño cromosómico de los linfocitos humanos *in vitro*. Estos resultados concuerdan con numerosos estudios realizados con otros tipos de plaguicidas como los carbámicos, piretroides, organoclorados y neonicotinoides. Por ejemplo, el plaguicida S-metolaclor induce aumento significativo de MN en cultivos de la línea celular HepG2 expuestos por 24 horas a concentraciones de 0.5, 1.2 y 4.6 mg/mL (Nikoloff *et al.* 2013). Concentraciones de 10, 50, 100 y 200 mg/mL del insecticida pirimicarb en su formulación comercial Zineb y concentraciones de 1-5 mg/mL del fungicida Azurro incrementan significativamente la frecuencia de MN en células de ovario de criceto dorado CHO-K1 (Soloneski 2015). El insecticida neonicotinoide acetamiprid y su formulación Moseam inducen intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana

expuestos a concentraciones de 25, 30, 35 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y formación significativa de micronúcleos a concentraciones de 30 a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . De igual forma en células de intestino humano CaCo-2 expuestas a concentraciones de 25, 50, 75, 150 y 300  $\mu\text{M}$  acetamiprid eleva significativamente la frecuencia de micronúcleos y el índice de daño genético (Kocaman y Topaktas 2007, Çavaş *et al.* 2012) Zeljezic y colaboradores (2004) encontraron ascenso significativo de micronúcleos en linfocitos tratados con el herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético comparado con el testigo negativo. En un meta-análisis se demostró que la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica humana es significativamente mayor en los grupos expuestos a plaguicidas comparados con los grupos testigo (Yang *et al.* 2014). En este trabajo se utilizó la Bleomicina como testigo positivo ya que es un agente genotóxico ampliamente conocido que induce significativamente incremento en la frecuencia de MN en células de sangre periférica de seres humanos, ratas y ratones vía estrés oxidante, y rompimientos de cadena simple y doble del ADN (Erexson 1995).

Paralelamente a la evaluación de daño cromosómico por los plaguicidas Movento y Oberon, se analizaron los IDN e IPBC de los linfocitos expuestos a los dos agroquímicos y se compararon con los linfocitos expuestos a Bleomicina (testigo positivo) para evidenciar y comparar la potencia de sus acciones citotóxicas. Los resultados obtenidos muestran que el plaguicida Movento altera la cinética de proliferación celular al disminuir de forma gradual y significativa ambos índices IDN y el IPBC. La modificación de la cinética de proliferación indica claramente que este plaguicida es un agente citotóxico, sin efectos letales inhibidores *in vitro*, ya que no disminuye más del 50% el valor del IDN (Antosiewicz 1990). Estos resultados son concordantes con estudios realizados con otros plaguicidas que afectan la división celular como los organoclorados, carbamatos y los neonicotinoides. En lombrices y en la planta de trébol blanco expuestas a endosulfán reportan descenso del IDN (Liu *et al.* 2009). También existe reducción en el índice de división nuclear en células de ovario CHO-K1 expuestas a pirimicarb (Soloneski 2015). Y se ha reportado disminución en la proliferación celular en linfocitos periféricos humanos y células humanas intestinales CaCo-2 expuestas a acetamiprid (Kocaman y Topaktas 2007, Çavaş *et al.* 2012). Los valores de estos índices por debajo del testigo negativo indican que el desarrollo y



crecimiento de los linfocitos se ve afectado por la exposición al plaguicida Movento. Estas alteraciones en las actividades mitóticas inducidas por los plaguicidas han sido atribuidas a su efecto sobre la síntesis de ADN, lo cual puede retrasar el inicio de la mitosis (Kligerman *et al.* 2000, Bolle *et al.* 2004). La inhibición de proteínas específicas del ciclo celular puede ser otro posible mecanismo de acción de los plaguicidas sobre la proliferación, por ejemplo, la inhibición de la ADN polimerasa resulta en un efecto antimitótico (Valencia-Quintana *et al.* 2013).

Por su parte, el acaricida Oberon no resultó citotóxico, no altera significativamente los valores de los índices de división nuclear y de proliferación con bloqueo de la citocinesis.

Para elucidar el mecanismo de acción inmunotóxica de los plaguicidas en los linfocitos periféricos humanos *in vitro* se evaluó la expresión de las citocinas TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  y del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Los resultados obtenidos en este trabajo, en los cultivos de linfocitos expuestos a Movento indican que es un posible agente inmunotóxico ya que altera la expresión normal de citocinas. La detección de TNF- $\alpha$  en específico revela el estado de la respuesta inmune en una etapa determinada (Colosio *et al.* 1999, Duramad 2007), el aumento significativo observado en la expresión de TNF- $\alpha$  indica un estado potencial de inflamación. Esto concuerda con resultados obtenidos por Phillips y colaboradores (2000), quienes encontraron elevados niveles de citocina TNF- $\alpha$  en 25 niños expuestos a plaguicidas, indicando un estado generalizado y neurogénico de inflamación, acompañado de estimulación del sistema inmune. Seth y colaboradores (2008) detectaron aumento de los niveles TNF- $\alpha$  en sangre de personas con intoxicación por Malatión. Otros estudios utilizando los plaguicidas Malatión, MCPA, Metamitrón, Paraquat y Clornitrofen, aumentan *in vitro* la expresión de TNF- $\alpha$  (Hooghe *et al.* 2000, Vandana *et al.* 2008, Paolillo *et al.* 2011).

La vía de señalización del TNF- $\alpha$  puede provocar la activación de una cascada de caspasas que produce apoptosis (Chang y Yang 2000) o activar los factores de transcripción, AP-1 y NF- $\kappa$ B, que a su vez inducen genes que participan en la respuesta inflamatoria (Barnes y Karin 1997). El aumento de la expresión de RelA indica que el TNF puede estar siguiendo la ruta que lleva a la respuesta inflamatoria, activando al NF- $\kappa$ B. Este a su vez es responsable de la activación de genes que contribuyen a la

generación de citocinas (existe una retroalimentación positiva entre el TNF y el NF- $\kappa$ B) y genes que participan en la metástasis tumoral, angiogénesis, y en la protección de las células a apoptosis después de la exposición a TNF- $\alpha$  I (Marrogi *et al.* 2000, Bharti y Aggarwal 2002).

Aunado a esto los resultados obtenidos en este estudio muestran que cuando los linfocitos son coincubados con Movento expresan bajas concentraciones de TGF- $\beta$  quizás esto se deba a que la elevada expresión de TNF- $\alpha$  y NF- $\kappa$ B bloquea la expresión de los genes de esta citocina que están activando la producción de estrés oxidante e inhibiendo la proliferación de los linfocitos humanos en cultivo.

Por otro lado, los cultivos de linfocitos humanos expuestos al acaricida Oberon muestran un aumento significativo en la expresión de RelA a todas las concentraciones, dándose el máximo aumento (>40) a la menor concentración, el TNF- $\alpha$  incrementa su expresión de forma significativa ( $p < 0.05$ ) a la concentración más baja, las otras concentraciones muestran un efecto comparable a los niveles basales. Por su parte la expresión de TGF- $\beta$  se eleva significativamente en todas las concentraciones utilizadas del compuesto. La modulación de la expresión del TNF- $\alpha$ , depende de la señalización de la concentración del NF- $\kappa$ B. Corsini y colaboradores (2006) mostraron que el fungicida mancozeb previene la degradación de I $\kappa$ B evitando así la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo disminuyendo la producción de TNF- $\alpha$ . El aumento de la expresión de TGF- $\beta$ , tiene acción anti-inflamatoria y suprime la producción de TNF- $\alpha$  (Omer *et al.* 2000). Estudios muestran que la regulación del TGF- $\beta$  está conectada con los procesos inflamatorios y con la transcripción de otros mediadores del sistema inmune (Prud'homme y Piccirillo 2000). Eder y colaboradores (2004) reportaron aumento la expresión de la interleucina 1 $\beta$ , y TGF- $\beta$  en salmones (*Oncorhynchus tshawytscha*) expuestos al insecticida organofosforado clorpirifos y al piretroide esfenvalerato. Posiblemente, la expresión intensificada de TGF- $\beta$  en los linfocitos humanos expuestos a Oberon, contrarresta la acción de la citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  y su acción sobre el NF $\kappa$ B.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se pueden plantear diferentes hipótesis acerca de los mecanismos de respuesta a genotoxinas ambientales como los plaguicidas, los cuales modulan la respuesta inmune (Figura 12) e intervienen

indirectamente en la generación de daño al ADN que se traduce en la formación de MN, lo cual podría deberse a la producción de estrés oxidante con la generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, los cuales rompen el ADN de los cromosomas visualizados como micronúcleos en los linfocitos bloqueados por citocalacina B. La inducción de un estado de inflamación ocasionado por el incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias, como el TNF- $\alpha$  podría reducir la actividad y la síntesis de los antioxidantes endógenos como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, NADPH oxidasa, la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), la xantina oxidasa (XO) entre otras, lo cual a su vez origina altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERN). Las ERO y ERN pueden oxidar las bases del ADN o por nitración y halogenación, produciendo rompimientos en las cadenas del ADN, mutaciones y modificación de las bases nitrogenadas. Además del daño directo, las bases de ADN pueden ser modificadas por los productos de la lipoperoxidación (LPO) (Ohshima *et al.* 2003, Calderón-Segura *et al.* 2004, Sawa y Ohshima 2006). Asimismo las ERO, las ERN y los productos de LPO pueden actuar como segundos mensajeros y modular diferentes vías de señalización implicadas en los procesos de inflamación como el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual regula la expresión de muchos mediadores de la inflamación, como el TNF (Ohshima 2003, West y Manrett 2006). El desequilibrio entre los oxidantes y antioxidantes altera la homeostasis celular, produciendo varios tipos de daño al ADN como rompimientos de cadena dobles y simples, deficiencia en los mecanismos de reparación del ADN, sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias y reducción o inhibición de la apoptosis en células dañadas aumentando la inestabilidad genómica e incrementando el riesgo al proceso de carcinogénesis (Hussain *et al.* 2003, Bartsch y Nair 2005).

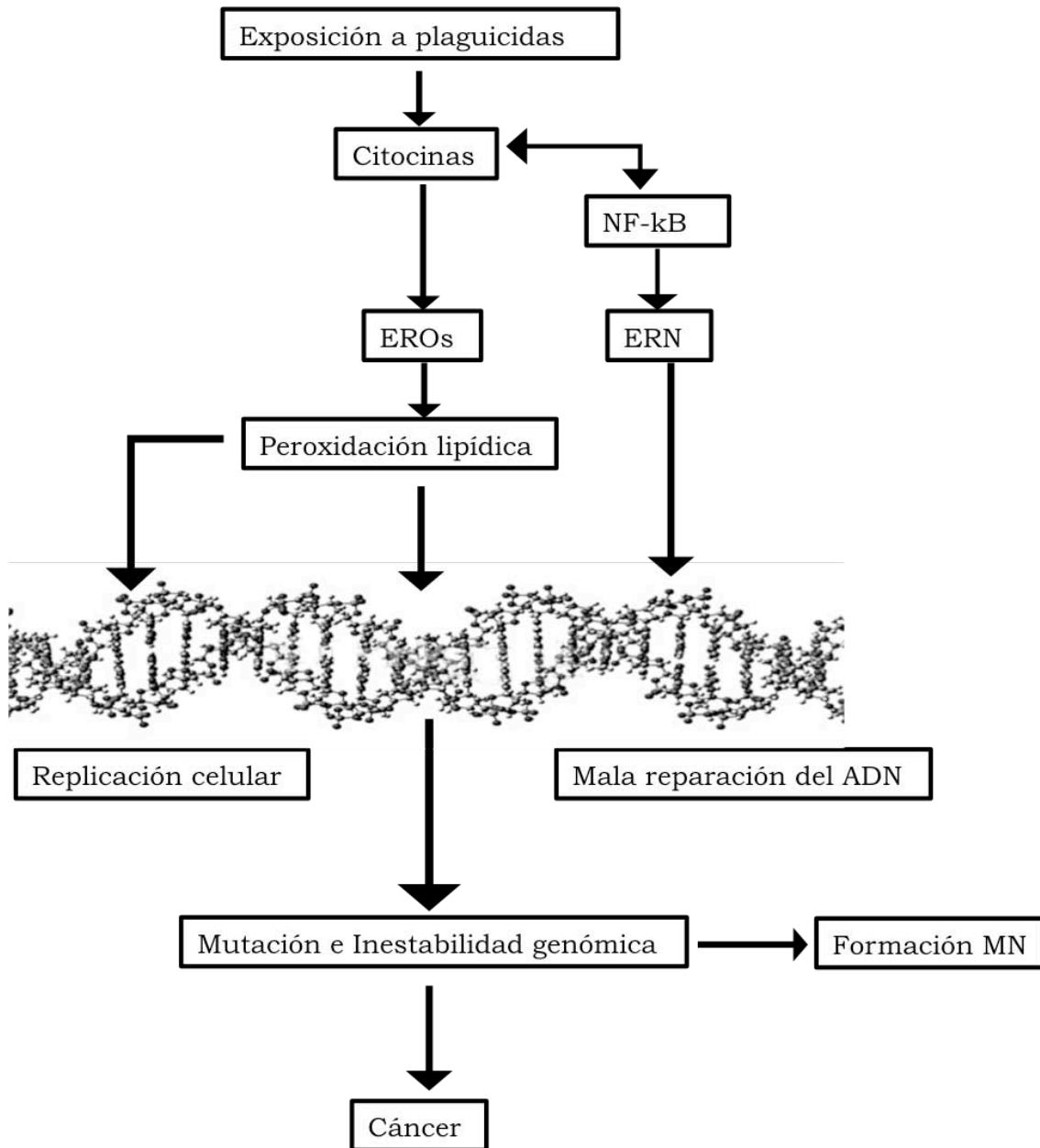


Figura 12. Posible mecanismo de acción de los plaguicidas Oberon y Movento, el cual involucra un aumento en la producción de citocinas, la liberación de ERO y ERN, y productos de LPO que pueden dañar al ADN. Este proceso genera mutaciones las cuales pueden llevar a la carcinogénesis.

Estudios previos han reportado que la exposición a plaguicidas organofosforados, organoclorados, carbámicos, piretroides y fungicidas producen estrés oxidante (Prakasam *et al.* 2000, Dorval *et al.* 2003). El insecticida piretroide cipermetrina incrementa la peroxidación lipídica en cinco líneas celulares de trucha arcoiris

(*Oncorhynchus mykiss*) expuestas a 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 ng/mL del plaguicida (Taju *et al.* 2014). Ojha y Srivastava (2014) encontraron aumento significativo en los rompimientos del ADN y en los niveles de EROs, anión superóxido ( $O_2\cdot^-$ ) y peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en linfocitos de rata tratados con 1/20, 1/10, 1/8, 1/6 and 1/4 L  $C_{50}$  de los plaguicidas organofosforados clorpirifos, malatión y metil-paratión.

Un estudio con el sapo *Bufo gargarizans* demostró la generación de EROs con reducción de la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px), y lipoperoxidación con incremento de malonaldehído (MDA) después de la exposición a 0.03, 0.06, 0.13, 0.65, y 3.23 mg/L del plaguicida spirotetramat durante 4, 15, y 30 días (Yin *et al.* 2014).

La genotoxicidad y la inmunotoxicidad, están asociadas con el riesgo de desarrollo de algún tipo de cáncer. La hipótesis de una relación entre la frecuencia de MN y el desarrollo de cáncer está sustentada por varias observaciones, entre las que destaca la correlación que existe entre los agentes genotóxicos inductores de MN y la carcinogénesis (Bonassi *et al.* 2007). Existen datos que sugieren que existe una relación entre la inmunotoxicidad inducida por agentes químicos y la carcinogénesis, Luster y colaboradores (1992) encontraron una concordancia de 81% entre la inmunotoxicidad y la carcinogénesis en 27 compuestos, lo que sugiere que si un compuesto es inmunotóxico es muy probable que sea cancerígeno en roedores.

Nuestros resultados indican que los plaguicidas probados en este estudio (Movento y Oberon) provocan daño en el genoma de los linfocitos periféricos humanos en cultivo y pueden modular algunas funciones inmunes como la expresión normal de citocinas, estas características sugieren que probablemente sean candidatos con acción carcinogénica. Sin embargo, los resultados de este trabajo corresponden a ensayos *in vitro*, y deben servir para respaldar futuras investigaciones realizadas *in vivo* que permitan mejorar el entendimiento de los mecanismos por los cuales los plaguicidas causan daño al ADN y alteran la expresión de las citocinas.

## **IX. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir lo siguiente:

- El insecticida Movento es un agente citotóxico ya que altera la cinética de proliferación de los cultivos celulares, evidenciado en una disminución del IDN e IPBC.
- El insecticida Movento es un agente genotóxico, ocasiona daño al ADN de las células, lo que se refleja en un aumento en la frecuencia de MN en células binucleadas.
- El insecticida Movento es un agente inmunotóxico capaz de modificar la expresión de citocinas. Aumenta de forma significativa la expresión de TNF y RelA a las máximas concentraciones.
- El acaricida Oberon es un agente genotóxico que daña al ADN y aumenta los MN, pero no presenta acción citotóxica al no interferir con la cinética de proliferación de los cultivos (no modifica el IDN ni el IPBC).
- El acaricida Oberon es un agente inmunotóxico que modula la respuesta inmune generando cambios en la expresión de citocinas. Aumenta la expresión de TGF- $\beta$  y presenta un incremento inicial de TNF y RelA el cual disminuye hacia los valores del testigo.

## X. REFERENCIAS

- Abbas A, Lichtman A y Pillai S. (2008). *Inmunología Celular y Molecular*. (6ª edición). Barcelona. Elsevier.
- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaiee A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit*. 10: 144–7.
- Abrevaya XC, Carballo MA, Murdy MD. (2007). The bone marrow micronucleus test and metronidazole genotoxicity in different strains of mice (*Mus musculus*) *Genet Mol Biol*. 30: 1139-1143.
- Al-Saleh IA. (1994). Pesticides: a review article. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 13: 151-161.
- Albert L. (2005). Panorama de los plaguicidas en México. *Rev Toxicol*. (en línea) No. 8. <http://www.sertox.com.ar/retel/n08/01.pdf>.
- Albert L. (2007). Panorama de los plaguicidas en México. Séptimo congreso de actualización en toxicología clínica. Pag: 359-378.
- Albert. L. (2004). *Toxicología ambiental*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2004). *Introducción a la biología celular*. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Amer SM, Ibrahim AA, el-Sherbeny KM. (1993). Induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in vivo and in vitro by the insecticide cypermethrin. *J Appl Toxicol*. 13:341–345.
- AMIPFAC (2001). Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes. México.
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. (2003). Making sense of latent TGF- $\beta$  activation. *J Cell Sci*. 116:217-224.
- Antosiewicz D. (1990). Analysis of the cell in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of Ledakrin. *Folia Histochem Cytobiol*. 26, 79-96.

- Arencibia D, Rosario I. (2003). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. *Rev. Toxicol.* (en línea). [http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/20003.pdf](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/20003.pdf) 24-41.
- Arnett, HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting, JP. (2001) TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci.* 4:1116–1122.
- Atzeni F, Talotta R, Salaffi F, Cassinoti A., Varisco V, Battellino M, Ardizzone S, Sarzi-Puttini P. (2013). Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy. *Autoimmu Rev.* 12:703-708.
- Backer LC, Grindem CB, Corbett WT, Cullins L, Hunter JL. (2001). Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Sci Total Environ.* 274: 161-169.
- Bagci EZ, Vodovotz Y, Billiar TR, Ermentrout GB, Bahar I. (2006) Bistability in apoptosis: roles of bax, bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores. *Biophys J.* 90(5):1546-1559.
- Balkwill F. (2006). TNF- $\alpha$  in promotion and progression of cancer. *Transl Oncol.* 25: 409-416.
- Barnes PJ, Karin M. (1997) Nuclearfactor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Engl J Med.* 336:1066–1071.
- Bartsch H, Nair J. (2005) Accumulation of lipid peroxidation derived DNA lesions: potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies. *Mutat Res.* 591:34–44.
- Bassil KL, Vakil C, Sanborn M, Cole DC, Kaur JS, Kerr KJ. (2007). Cancer health effects of pesticides: Systematic review. *Can Fam Physician.* 53:1704–1711.
- Baud V. y Karin M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor an its relatives. *Trends Cell Biol.* 11:372-377.
- Bayer Crop Science. <http://www.bayercropscience.com.mx> (consultado el 20 de noviembre del 2013).
- Beinke S, Ley S. (2004). Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology. *Biochem J.* 382:393-409.
- Bernard A, Lauwerys R. (1986). Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals. *J Occup Med.* 28: 559.



- Bharti A. C, Aggarwal B. B. (2002) Nuclear factor-kappa B and cáncer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol.* 64:883-888.
- Blagosklomny MV y Pardee AB (2002). The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle.* 2:103-110.
- Bolle P, Mastrangelo S, Tucci P, Evandri MG. (2004). Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. *Environ Mol Mutagen.* 43:137-141.
- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 543:251- 272.
- Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP. (2001). Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen.* 37:31-45.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Fenech M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28:625–631.
- Bretschneider T, Benet-Buchhol J, Fischer R, Nauen R. (2003). Spirodiclofen and spiromesifen – novel acaricidal and insecticidal tetrionic acid derivatives with a new mode of action. *Chimia.* 57:697-701.
- Calderon-Segura ME, Gomez-Arroyo S, Molina-Alvarez B, Villalobos-Pietrini R, Calderon-Ezquerro C, Cortes-Eslava J, Valencia-Quintana PR, López-González L, Zúñiga-Reyes R, Sánchez-Rincón J. (2007). Metabolic activation of herbicide products by *Vicia faba* detected in human peripheral lymphocytes using alkaline single cell gel electrophoresis. *Toxicol In Vitro* 21(6):1143–1154.
- Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Espinosa-Ramirez M. (1999). *In vivo* and *in vitro* promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 438:81-88.
- Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Martínez-Valenzuela MC, Carbajal-López Y. (2012). Evaluation of genotoxic and cytotoxic

- effects in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to neonicotinoid insecticides. *J Toxicol*. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/612647>.
- Calderón–Segura ME, Gómez–Arroyo S, Villalobos–Pietrini R, Butterworth F, Amador–Muñoz O. (2004). The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in México City. *Mutat Res*. 558: 7–17.
  - Çavaş T, Çinkılıç N, Vatan Ö, Yılmaz D, Coşkun M. (2012). *In vitro* genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and CH2AX foci assays. *Pest Biochem Physiol*. 104: 212–217 .
  - Celada A. 1994. *Inmunología básica*. Ed. Labor S.A. Barcelona.
  - Chang H, Brown CW, Matzuk MM. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *Endocr Rev*. 23:787-823.
  - Chang HY, Yang X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64:821–846.
  - Chen C, Edelstein LC, Gélinas C. (2002). The Rel/NF- $\kappa$ B family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-xL. *Mol Cell Biol*. 20: 2687-5695.
  - Chen G, Goeddel DV. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296:1634–1635.
  - Cheng JL, He XR, Wang ZC, Zhang JG, Zhao JH, Zhu GN. (2012). Metabolism-based synthesis, biological evaluation and structure–activity relationship analysis of spirotetramat analogues as potential lipid biosynthesis inhibitors. *Pest Manag Sci*. 69:1121–1130.
  - CICOPLAFEST (2004). Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. *Catálogo de plagucidas*. México.
  - COFEPRIS. (2002). Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios-Dirección General de Salud Ambiental. *Primer diagnóstico nacional de salud ambiental y ocupacional*.
  - Colosio C, Corsini E, Barcellini W, Maroni M. (1999) Immune parameters in biological monitoring of pesticide exposure: current knowledge and perspectives. *Toxicol lett*. 108:285-295.

- Corra L. (2009). *Herramientas de capacitación para el manejo responsable de plaguicidas y sus envases: efectos sobre la salud y prevención de la exposición* (2a ed.) Buenos Aires. Organización Panamericana de la Salud (OPS).
- Corsini E, Codecà I, Mangiaratti S, Brindelli S, Minoia C, Turci R, Viviane B, Facchi A, Vitelli N, Lucchi L, Galli CL, Marinovich M, Colosio C. (2007). Immunomodulatory effects of the herbicide propanil on cytokine production in humans: In vivo and in vitro exposure. *Toxicolo App Pharmacol.* 222:202-210.
- Corsini E, Oukka M, Pieters R, Kerkvliet NI, Ponce R, Germolec DR. (2011). Alterations in regulatory T-cells: rediscovered pathways in immunotoxicology. *J Immunotoxicol.* 8:251–257.
- Corsini E, Sokooti M, Galli CL, Moretto A, Colosio C. (2013) Pesticide induce immunotoxicity in humans: A comprehensive review of existing evidence. *Toxicology.* 307:123-135.
- Corsini E, Viviani B, Birindelli S, Gilardi F, Torri A, Codeca I, Lucchi L, Bartesaghi S, Galli CL, Colosio C. (2006) Molecular mechanisms underlying mancozeb-induced inhibition of TNF-alpha production. *Toxicolo App Pharmacol.* 212:89 – 98.
- Cortés-Genchi P, Villegas-Arrizón A, Aguilar-Madrid G, Paz-Román MP, Maruris-Reducindo M, Juárez-Pérez CA. (2008). Síntomas ocasionados por plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 46:145-152.
- Countryman P, Heddle J. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutat Res.* 41:321- 332.
- Cuddihy AR, O’Connell (2003). Cell-cycle responses to DNA damage in G2. *Int Rev Citol.* 222: 99-140.
- Derynck R, Zhang YE. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling. *Nature* 425: 577-584.
- Dhillon AS, Tarbutton GL, Levin JL, Plotkin GM, Lowry LK, Nalbone JT, Shepherd S. (2008). Pesticide/environmental exposures and Parkinson’s disease in East Texas. *J Agromedicine.* 13:37–48.
- Dong M, Blobel GC. (2006). Role of transforming growth factor- $\beta$  in hematologic malignancies. *Blood.* 107:4589-4596.

- Dorval J, Leblond VS, Hontela A. (2003). Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vitro* to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquat Toxicol.* 63:229-41.
- Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R. (1995). Processing of transforming growth factor h1precursor by human furin convertase. *J Biol Chem.* 270:10618-24.
- Duramad P, Tager IB, Holland NT. (2007). Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. *Toxicol Lett.* 172:48–59.
- Eddleston M, Karalliedde L, Buckley N, Fernando R, Hutchinsosn G, Konradsen F, Murray D, Piola JC, Senanayake N, Sheriff R, Singh S, Siwach SB, Smit L. (2002). Pesticide poisoning in the development world: a minimum pesticide list. *Lancet.* 360:1163-1167.
- Eder K, Luetengger CM, Wilson BW, Werner I. (2004). Molecular and cellular biomarker responses to pesticide exposure in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Mar Environ Res.* 58: 809–813
- Engel L, Checkoway H, Keifer M, Seixas N, Longstreth W, Scott K, Hudnell K, Anger W, Camicioli R. (2001). Parkinsonism and occupational exposure to pesticides. *Occup Environ Med.* 58:581-589.
- Erexson GL, Bryant MF, Kwanyuen P, Kligerman AD. (1995). Bleomycin sulfate-induced micronuclei in human, rat, and mouse peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 25:31-36.
- Esser C, Jux B. (2009). Small chemicals, bioactivation, and the immune system: a fragile balance of i-tox and benefits?. *Chem Biodivers.* 6:2138-2143.
- Falck GC, Hiroven A, Scarpato R, Saarikoski ST, Migliore L, Norppa H. (1999). Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for *GSTM1*, *GSTT1* and *NAT2* in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat Res.* 441:225-237
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2006). *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas*. Roma.

- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2013). Dirección de estadística (FAOSTAT). Estadística para el uso de Plaguicidas en México [en línea] <http://faostat3.fao.org/browse/R/RP/S>.
- Fautsman D, Davis M. (2010). TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 9: 482-493.
- Fenech M, Morley AA. (1989). Kinetochores detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis*. 4:98-104.
- Fenech M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect*. 101:101-107.
- Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 455:81-95.
- Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat protoc*. 2:1084-1104.
- Feng S, Kong Z, Wang X, Peng P, Zeng EY. (2005). Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* with comet assay and cytogenetic test. *Ecotoxicol and Environ Safe*. 61: 239-246.
- Feng S, Kong Z, Wang X, Zhao L, Peng P. (2004). Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosph*. 56: 457-463.
- Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Kosaka T. (2011). Prior exposure to immunosuppressive organophosphorus or organochlorine compounds aggravates the T(H)1- and T(H)2-type allergy caused by topical sensitization to 2,4-dinitrochlorobenzene and trimellitic anhydride. *J Immunotoxicol*. 8:170-182.
- Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. (2002). Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. *J App Toxicol*. 22: 249-255.
- García JE. (1997). Consecuencias indeseables de los plaguicidas en el ambiente. *Agronomía Mesoamericana*. 8:119-135.
- García JE. (1998). Intoxicaciones agudas con plaguicidas: costos humanos y económicos. *Rev Panam Salud Publica*. 4:383-387.

- Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ. (2014). NF- $\kappa$ B control of T cell development. *Nat Immunol.* 15: 15-25.
- Gil F, Hernández A. (2009). Significance of biochemical markers in applied toxicology. *General Applied and Systems Toxicology.* doi: 10.1002/9780470744307.gat179
- Gil F, Pla A. (2001). Biomarkers as biological Indicators of xenobiotic exposure. *J Appl Toxicol.* 21:245-255.
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. (2006). NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 72: 1493-1505.
- Goldman R. (1998). Linking research and policy to ensure children's environmental health. *Environ Health Perspect.* 106:857-862.
- Gómez-Arroyo S, Calderón-Segura ME, Villalobos-Pietrini R. (1995). Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environ Mol Mutagen.* 26:324–330.
- Govinden R, Bhoola KD. (2003). Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- $\beta$ . *Pharmacology Ther.* 98:257-265.
- Grell M, Becke FM, Wajant H, Mannel DN, Scheurich P. (1998). TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur J Immunol.* 28:257–263.
- Grell M. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 83:793-802.
- Gruen JR, Weissman SM. (1997). Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood.* 90:4252–4265.
- Gupta A, Gupta A, Shukla GS. (1998). Effects of neonatal quinalphos exposure and subsequent withdrawal on free radical generation and antioxidative defenses in developing rat brain. *J Appl Toxicol.* 18:71–77.
- Györfy E, Anna L, Kovács K, Rudnai P, Shoket B. (2008). Correlation between biomarkers of exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adducts. *Mutagen.* 23: 1-18.
- Hagmar L, Stromberg U, Tinnerberd H, *et al.* (2001). The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *Int J Hyg Environ Health.* 2204:43-47.

- Hallenbeck JM. (2002) The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med.* 8:1363-1368.
- Hamilton D, Abrus A, Dieterle R, Felsot A, Haris C, Petersen B, Racke K, Wong SS, Gonzalez R, Tanaka K, Earl M, Roberts G. (2004). Pesticides residues in food-acute dietary exposure. *Pest Management Science.* 60:311-339.
- Hanke W, Jurewicz J. (2004). The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure: an overview of current epidemiological evidence. *Int J Occup Med Environ Health.* 17:223-243.
- Hayden MS, Ghosh S. (2014). Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol.* 26:253-266.
- Hayden MS, West AP, Ghosh S. (2006). NF- $\kappa$ B and the immune response. *Oncogen.* 30:6758-6780.
- Heddle, JA. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res.* 18: 187-190.
- Hernández AF, López O, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, Parrón T, Alvarez JC, Lorente JA, Pla A. (2005). Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol Lett.* 159:13-21.
- Hooghe RJ, Devos S, Hooghe-Peters EL. (2000). Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sci.* 66:2519-2525.
- Huang T, Wuerzberger-Davis S, Wu Z, Miyamoto S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKK $\gamma$  by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF- $\kappa$ B activation by genotoxic stress. *Cell.* 115:565-576.
- Huse M, Muir TW, Xu L, Chen YG, Kuriyan J, Massagué J. (2001). The TGF- $\beta$  receptor activation process: an inhibitor to substrate-binding switch. *Mol Cell.* 8:671-682.
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. (2003). Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer.* 3:276–285 .
- Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, Orsière T, Bonassi S. (2008). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. *Mutat Res.* 659: 74-283.

- INEGI. (2011). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. *Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera EMIM: SCIAN 2007. Resumen anual Enero-Junio 2010*. México, 618 pp. [en línea]. [http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/encuestas/establecimientos/indus\\_manu/resumanul\\_ene\\_jun2010/EMIM\\_20101er.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/encuestas/establecimientos/indus_manu/resumanul_ene_jun2010/EMIM_20101er.pdf) 06/05/2015.
- INEGI. 2013. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *Boletín de información oportuna del sector alimentario*. México. 106 pp. [en línea]. [http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sectorial/biosa/biosa.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sectorial/biosa/biosa.pdf) 06/05/2015.
- Jaga K, Dharmani C. (2006). Methyl parathion: an organophosphate insecticide not quite forgotten. *Rev Environ Health*. 21:57-67.
- Jones AL, Selby P. (1989). Tumor necrosis factor: clinical relevance. *Cancer Surv*. 8:817-836.
- Josso N, Di Clemente N. (1997). Serine/ Threonine kinase receptors and ligands. *Curr Opin Genet Dev*. 7:371-377.
- Karabay NU, Oguz MG. (2005). Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides imidacloprid and methamidophos. *Genet Mol Res*. 4:653–662.
- Karin M, Lin A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 3:221-227.
- Khuder SA, Mutgi AB. (1997). Meta-analyses of multiple myeloma and farming. *Am J Ind Med*. 32:510–516.
- Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Humelen P. (1997). The *in vitro* micronucleus test: A multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res*. 392:19-30.
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay-working group. *Mutat Res*. 35:167-172.
- Kishi M, Hischhorn N, Djajadisastra M, Satterlee LN, Strowman S, Dilts R. (1995). Relationship of pesticide spraying to signs and symptoms in Indonesian farmers. *J Work Environ Health*. 21:124–133.



- Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Zucker RM. (2000). Cytogenetic studies of three triazine herbicides *in vitro* studies. *Mutat Res.* 465:53-59.
- Kocaman AY, Topaktas M. (2009). The *in vitro* genotoxic effects of a commercial formulation of a-cypermethrin in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 50:27-36.
- Kodandaram MH, Rai AB, Halder J. (2010). Novel insecticides for management of insect pests in vegetable crops. *Veg Sci.* 37:109-123.
- Lauria L, Settini L, Spinelli A, Figa-Talamanca I. (2006). Exposure to pesticides and time to pregnancy among female greenhouse workers. *Reprod Toxicol.* 22:425-430.
- Levine RS, Doull J. (1992). Global estimates for acute pesticide morbidity and mortality. *Rev Environ Contam Toxicol.* 129:29-50.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. (2006). Transforming growth factor- $\beta$  regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 24:99-146.
- Liu W, Zhu LS, Wang J, Wang JH, Xie H, Song Y. (2009). Assessment of the genotoxicity of endosulfan in earthworm and white clover plants using the comet assay. *Arch Environ Contam Toxicol.* 56:724-746.
- Locksley RM. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.
- Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. (2002). *Biología Celular y Molecular*. Madrid, España: Editorial Medica Panamericana.
- López F, Obiols J, Subias PJ. (1998). *Plaguicidas agrícolas y salud* en: Plaguicidas, Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos. Ed. I. Morell y L. Candela. Universitat Jaume. Castelló de la Plana. pp. 273-295.
- Luster MI, Portier C, Pait DG, White KL, Gennings C, Munson AE, Rosenthal GJ. (1992). Risk assessment in immunotoxicology, sensitivity and predictability of immune tests. *Fundam Appl Toxicol.* 18:200-210.
- Macdad AA, Ahmed MH, ElHalgawy ME, Afify MM. (2011). A study on oxidative stress biomarkers and immunomodulatory effects of pesticides in pesticides-sprayer. *Egypt J Forensic Sci.* 1:93-98.

- Makhatadze NJ. (1998). TNF locus: genetic organisation, and biological implications. *Hum Immunol.* 59:571-579.
- Mansour SA. (2004). Pesticide exposure-Egyptian scene. *Toxicol.* 198:91-115.
- Marcic D, Petronijevic S, Drobnjakovic T, Prijovic M, Peric P, Milenkovic S. (2012). The effects of spirotetramat on life history traits and population growth of *Tetranychus urticae*. *Exp Appl Acarol.* 56:113–122.
- Marino MW, Dunn A, Grail D, Ingeles M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old LJ. (1997). Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci.* 94:8093–8098.
- Marrogi AJ, Travis WD, Welsh JA, Khan MA, Rahim H, Tazelaar H, Pairolero P, Trastek V, Jett J, Caporaso NE, Liotta LA, Harris CC. (2006). Nitric oxide synthase cyclooxygenase 2 and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.* 6:4739-4744.
- Martín A, Fresno M. (2000). Tumor necrosis factor alpha activation of NF- $\kappa$ B requires the phosphorylation of Ser-471 in the transactivation domain of c-Rel. *J Biol Chem.* 275:24383-24391.
- Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R. (2009). Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environ Int.* 35:1155-1159
- Massagué J, Attisano L, Wrana JL. (1994). The TGF- $\beta$  family and its composite receptors. *Trends Cell Biol.* 4:172-177.
- Massagué J, Gomis RR. (2006). The logic of TGF-  $\beta$  signaling. *FEBS Lett.* 580: 2811-2820.
- Massagué, J. (2008). TGF $\beta$  in cancer. *Cell.* 134: 215–230.
- Minozzo R, Deimling LI, Santos-Mello R. (2010). Cytokinesis-blocked micronucleus cytome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B12 status. *Mutat Res.* 697:24-32.
- Mohammad HB, Varela S. (2008). Insecticidas organofosforados: Efectos sobre la salud y el ambiente. *Cul CyT.* 28:5-17.

- Moller P. (2006). The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 98:336-345.
- Monteón-López A, Ligonio-Ramos A. (2008). El papel inmunoregulador del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) en las infecciones parasitarias. Universidad Veracruzana. *Rev Med UV*. 8:38-44.
- Mourad TA. (2005). Adverse impact of insecticides on the health of Palestinian farm workers in the Gaza Strip: a hematologic biomarker study. *Int J Occup Environ Health*. 11:144-149.
- Murli H. (2003). Screening assay for chromosomal aberrations in CHO cells with argentyne. *Final Report en Covance*. Natural Immunogenics Corporation. Covance Laboratories Inc. Virginia, USA.
- Navarareni R, Jamil K. (2005). Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on human lymphocytes. *J Biochem Mol Toxicol*. 19:304-310
- Nikoloff N, Escobar L, Soloneski S, Larramendy LM. (2013). Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold in human hepatoma (HepG2) cells. *Food Chem Toxicol*. 62: 777-781.
- OECD (2004). Guideline for the testing of chemicals. *Draft proposal for a new guideline 487: in vitro micronucleus test*. pp 1-13
- Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. (2003). Chemical basis of inflammation induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 417:3-11.
- Ohshima H. (2003). Genetic and epigenetic damage induced by reactive nitrogen species: implications in carcinogenesis. *Toxicol Letters*. 141:99-104.
- Ojha A, Srivastava N. (2014). *In vitro* studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. *Mutat Res*. 76:10-17.
- Omer FM, Kurtzhals JAL, Riley EM. (2000). Maintaining the immunological balance in parasitic infections: A role for TGF-β? *Parasitol Today*. 16: 18-23.
- OMS. (1990). Organización Mundial de la Salud. *Plaguicidas*. Informe Técnico No. 12. Ginebra.
- OMS. (1992). Organización Mundial de la Salud. *Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura*. Ginebra.

- OMS. (1993). Organización Mundial de la Salud División Salud y Ambiente. *Plaguicidas y Salud en las Americas*. Washington.
- Paolillo N, Piccirilli S, Giardina E, Rispoli V, Colica C, Nisticò S. (2011). Effects of paraquat and capsaicin on the expression of genes related to inflammatory, immuneresponses and cell death in immortalized human HaCat keratinocytes. *Int. J Immunopathol Pharmacol*. 24:861–868.
- Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Cebulka-Wasilewskab A, Marcos R. (2001). Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutat. Res*. 495:147-156.
- Pastor-Benito S. (2002). Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. *Universidad Autónoma de Barcelona*. Barcelona, España.
- Phillips TM. (2000). Assessing environmental exposure in children: immunotoxicology screening. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 10:769-775.
- Pottelberge SV, Leeuwen TV, Khajehali J. (2009). Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected Spirodiclofen-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Pest Manag Sci*. 65:358–366.
- Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. (2001). Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta*. 310:107-112.
- Prud'homme GJ, Piccirillo CA. (2000). The inhibitory effects of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 14:23-42.
- Ramírez JA, Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: calificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*. 4:67-75.
- Remor A.P., Totti C.C., Moreira D.A., et al. (2009). Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Inter*. 35:273-278.
- Repetto M. (1997). Diagnóstico de la intoxicación. *Toxicología Fundamental*. Díaz de Santos: Madrid, 327–333.
- Repetto R, Baliga SS. (1996). *Los plaguicidas y el sistema inmunitario: riesgos para la salud pública*. World Resources Institute (WRI), Washington, D.C. 2:110-112.

- Restrepo (1992). *Los plaguicidas en México*. Comisión Nacional de Derechos Humanos, México.
- Ritz B, Yu F. (2000). Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984–1994. *Inter J Epidemiol*. 29:323–329.
- Roberts A. (1998) Molecular and Cell biology of TGF- $\beta$ . *Miner Electrol Metab* 24:111-119.
- Rodríguez-Fragoso L., Hernández-Baltasar E., Reyes-Esparza J. A. (2004). El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotechnol Apl*. 21: 60-69.
- Rodríguez-Romero MI, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Calderón Segura ME. (2012). *Toxicol Mechanism and Method*. 22:170-183.
- Sakyas SM, Suarez-Contreras M, Dirlam JP, O'Connell TN, Hayashi SF, Santoro SL, Kamicker BJ, George DM, Ziegler CB. (2001). Synthesis and structure–activity relationships of thiotetronic acid analogues of thiolactomycin. *Bioorg Med Chem Lett*. 11:2751-2754.
- Sanz P. (1995). Los polimorfismos genéticos como causa de variabilidad individual de la toxicidad. En *Toxicología Avanzada*. Díaz de Santos: Madrid, 87-116.
- Sawa T, Ohshima H. (2006). Nitrate DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. *Nitric Oxide*. 14:91–100
- Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mutat Res*. 31: 9-15.
- Seth V, Banjeree BD, Ahmed RS, Bhattacharya A, Pasha ST. (2008). Alterations in immunoglobulins and cytokine levels in blood of malathion poisoning cases. *Ind J Biochem*. 45:209-2011.
- Shishodia S, Sethi G, Konopleva M, Andreeff M, Aggarwal BB. (2006). A synthetic triterpenoid, CDDO-Me, inhibits I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and enhances apoptosis induced by TNF and chemotherapeutic agents through down-regulation of expression of nuclear factor kappaB-regulated gene products in human leukemic cells. *Clin Cancer Res*. 15:1828-1838.
- Sis man T, Türkez H. (2010). Toxicologic evaluation of imazalil with particular reference to genotoxic and teratogenic potentials. *Toxicol Ind Health*. 26:641-648.

- Soloneski S, Kujawski M, Scuto A, Larramendy LM. (2015). Carbamates: A study on genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects induced in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicol In Vitro*. 29: 834-844.
- Sorensen M, Autrup H, Moller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, Knudsen LE, Loft S. (2003). Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat Res*. 544: 255-271.
- Sosa-Garrocho M, Macía-Silva M. (2004). El factor de crecimiento transformante beta (TGF-  $\beta$ ): funciones y vías de transducción. *REB* 23:3-11.
- Surrallés J, Natarajan AT. (1997). Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat Res*. 392, 165-174.
- Surrallés J, Xamena N, Creus A, Catalán J, Norppa H, Marcos R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole blood and isolated human lymphocytes cultures. *Mutat Res*. 341:169-184.
- Suvannavejh GC, Lee HO, Padilla J, Del Canto MC, Miller SD. (2000). Divergent roles for p55 and p575 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*. 205:24-33.
- Taju G, Abdul S, Nambi KSN, Farook MA, Vimal S, Sahul Hameed AS. (2014). *In vitro* cytotoxic, genotoxic and oxidative stress of cypermethrin on five fish cell lines. *Pest Biochem Physiol*. 113:15-24.
- Teicher BA. (2001). Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor- $\beta$ . *Cancer Metastasis Rev*. 20:133-143.
- Thomas DA, Massague J. (2005). TGF-  $\beta$  directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*. 8:369-380.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 35: 206-221.
- Undeğer U, Başaran N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: Induction of DNA damage. *Arch Toxicol*. 79: 169-176.

- USEPA. (2004). United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs, Health Effects Division, Science Information Management Branch. *Chemicals evaluated for carcinogenic potential*.
- Valencia-Quintana R, Alarcón-Sánchez J, Gómez-Arroyo S, Córtes-Eslava J, Waliszewski S, Fernández S, Villalobos-Pietrini R. (2013). Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales. *Rev Int Contam Ambie*. 29: 133-157.
- Van Cauteren H, de Kok MCM, Van Schooten FJ. (1996). *Cancer risk evaluation In Toxicology: Principles and applications*. CRC, New York, 384-413.
- Van Maele-Fabry G, Libotte V, Willems J, Lison D (2006). Review and meta-analysis of risk estimates for prostate cancer in pesticide manufacturing workers. *Cancer Cause Control*. 17:353-373.
- Vandana S, Banerjee BD, Ahmed RS, Bhattacharya A, Pasha ST. (2008). Alterations in immunoglobulins and cytokine levels in blood of malathion poisoning cases. *Ind J Biochem Biophys*. 45:209-211.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. (1995). Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol*. 5:392–399.
- Vassalli P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*. 10:411–452.
- Vázquez-Contreras M. (2003). UNAM. Bioquímica y biología molecular [en línea]<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/piruvato%20acetil%20coa.html>.
- VKM. (2011). Norwegian Scientific Committee for Food Safety. *Risk assessment of the pesticide Envidor with the active substance spiroadiclofen*.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 10:45–65.
- Weil R, Israel A. (2004). T cell receptor and B cell receptor mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 16: 374-381.
- Weitzman MD, Wang JYJ. (2013). Cell Cycle: DNA Damage Checkpoints. *Cell Architech Funct*. 1: 338-344.
- West JD, Marnett LJ. (2006). Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem Res Toxicol*. 19:173–194.

- Wigle DT, Arbuckle TE, Turner MC, Bérubé A, Yang Q, Liu S, Krewski D. (2008). Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 11:373–517.
- Xanthoulea S, Pasparakis M, Kousteni S, Brackebusch C, Wallach D, Bauer J, Lassman H, Kollias G. (2004) Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. *J Exp Med.* 200:367–376.
- Yang HY, Feng R, Liu J, Wang HY, Wang YD. (2014). Increased frequency of micronuclei in binucleated lymphocytes among occupationally pesticide-exposed populations: A Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15: 6955-6960.
- Yin XH, Jiang SJ, Yu J, Zhua GN, Wua HM, Maoa CL. (2014) Effects of spirotetramat on the acute toxicity, oxidative stress, and lipid peroxidation in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) tadpoles. *Environ Toxicol Pharmacol.* 7:1229–1235.
- Zahm SH, Ward MH. (1998). Pesticides and childhood cancer. *Environ Health Perspect.* 106:893–908.
- Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An Sist Sanit Navar.* 28:227-236.
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, HayakawaM, Karin M. (1997). The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IKappa B phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell.* 91: 243-252.
- Zeljezic D, Garaj-Vrhovac (2004). Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicol.* 200: 39-47.