



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTOS GENOTÓXICO E INMUNOTÓXICO IN VITRO DE LOS PLAGUICIDAS
SCALA Y ENVIDOR EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ESLAVA AVILÉS EMILIO CÉSAR

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CALDERÓN SEGURA MARÍA ELENA
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. ARENAS HUERTERO FRANCISCO JESÚS
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
COMITÉ TUTOR: DR. VALENCIA QUINTANA PEDRO RAFAEL
FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA, UAT**

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.



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 **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ESLAVA AVILÉS EMILIO CÉSAR**, con número de cuenta **514012616**, con la tesis titulada **"EFECTOS GENOTÓXICO E INMUNOTÓXICO *IN VITRO* DE LOS PLAGUICIDAS SCALA Y ENVIDOR EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA."**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA**:

Presidente: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
Vocal: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Secretario: DR. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTANA
Suplente: DR. ERNESTO MALDONADO OLVERA
Suplente: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO

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.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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.

Un agradecimiento al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Apoyo al Personal Académico [DGAPA-UNAM-IN205613] de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

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: 545208).

Un agradecimiento al Centro de Ciencias de la Atmósfera por la beca otorgada con el objetivo de concluir la redacción de la tesis.

Un agradecimiento especial a mi tutora principal, la Dra. María Elena Calderón Segura y a los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero y el Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana por todo su tiempo, dedicación y paciencia en el desarrollo de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

RESUMEN

Se evaluó el daño genotóxico e inmunotóxico *in vitro* del plaguicida cetoenol Envidor y del fungicida anilinopirimidina Scala en linfocitos de sangre periférica humana de un donador joven y sano. Utilizando como biomarcador el ensayo de micronúcleos se evaluó el efecto citotóxico de los plaguicidas mediante la determinación del índice de división nuclear (IDN) y el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) y el daño genotóxico a partir de la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos (BNMN). También se determinaron las citocinas TNF- α , TGF- β y el factor de transcripción NF- κ B mediante RT-qPCR para evaluar la inmunotoxicidad de los compuestos.

Los grupos expuestos a 9.34×10^{-6} , 11.6×10^{-6} , 14.01×10^{-6} y 23.3×10^{-6} mM del plaguicida Envidor mostraron una disminución significativa en el IDN y el IPBC con respecto al testigo negativo ($p < 0.05$). En todas las concentraciones utilizadas se observa un aumento significativo de BNMN ($p < 0.05$). También se obtuvo en los grupos expuestos una inmunoestimulación del TNF- α y del NF- κ B en las últimas dos concentraciones (14.01×10^{-6} y 23.3×10^{-6}) y una inmunoestimulación del TGF- β en la primera concentración (4.67×10^{-6}), disminuyendo su expresión en las siguientes dos concentraciones.

En el caso del fungicida anilinopirimidina Scala se observa descenso del IDN solo en los grupos expuestos a 1.20×10^{-5} y 2.41×10^{-5} mM ($p < 0.05$), a ninguna concentración empleada (1.20×10^{-5} , 2.41×10^{-5} , 4.82×10^{-5} , 6.03×10^{-5} y 12.03×10^{-5} mM) se observa cambio significativo en el IPBC. Todos los grupos expuestos, sin excepción, mostraron un aumento de BNMN. A su vez se observó una inmunoestimulación del TNF- α y del NF- κ B en las dos primeras concentraciones (1.20×10^{-5} , 4.82×10^{-5} mM) y después una disminución en las siguientes concentraciones (12.03×10^{-5} mM) lo cual puede derivar en una

inmunosupresión. En el caso del TGF- β se evidenció una inmunoestimulación en la última concentración (12.03×10^{-5} mM).

El presente estudio representa una contribución importante en la evaluación del daño *in vitro* de los plaguicidas y un primer acercamiento para poder dilucidar los mecanismos por los cuales estos dos plaguicidas provocan fragmentación del ADN e inmunotoxicidad *in vitro*.

ABSTRACT

Genotoxic and immunotoxic damage *in vitro* of the ketoenol pesticide Envidor and the anilinopyrimidine fungicide Scala was evaluated in peripheral blood lymphocytes from a healthy young donor. Using the micronucleus assay as a biomarker the cytotoxic and genotoxic effect of the pesticides was evaluated by the determination of the division nuclear index (DNI), the cytokinesis block proliferation index (CBPI) and by estimating the number of binucleated cells with micronucleus (BNMN). The expression of the cytokines TNF- α , TGF- β and the transcription factor NF- κ B was also determined by RT-qPCR in order to evaluate the immunotoxicity of the compounds.

The groups exposed to 9.34×10^{-6} , 11.6×10^{-6} , 14.01×10^{-6} and 23.3×10^{-6} mM of the pesticide Envidor showed a significative decrease in the DNI and in the CBPI compared to the negative control. At all the concentrations it was observed a significative increase in the BNMN. An immunoestimulation of TNF- α and NF- κ B was also observed in the last two concentrations (14.01×10^{-6} y 23.3×10^{-6}) and also an immunoestimulation of TGF- β in the first concentration, decreasing its expression in the next two concentrations.

In the case of the anilinopyrimidine fungicide Scala a decrease in the DNI was observed only in the groups exposed to 1.20×10^{-5} and 2.41×10^{-5} mM, it does not appear to be any modification in the CBPI at any concentration used. All of

the groups without exception showed a significant increase in the BNMN. It was also observed an immunoestimulation of TNF- α and NF- κ B in the first two concentrations (1.20×10^{-5} , 4.82×10^{-5} mM) and then a decrease in the next concentrations (12.03×10^{-5} mM) which can result in an immunosuppression. In the case of TGF- β it was observed and immunoestimulation in the last concentration (12.03×10^{-5} mM).

The present study represents an important contribution in the evaluation of the in vitro damage of the pesticides and a first approach in trying to understand the mechanisms in which these two pesticides cause fragmentation of the DNA and immunotoxicity.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Historia de los plaguicidas.	14
1.2 Definición y clasificación de los plaguicidas.	16
1.3 Toxicología de los plaguicidas.....	21
1.4 Biomarcadores.....	24
II. ANTECEDENTES	28
2.1 Insecticidas cetoenoles.....	28
2.1.1 Spirodiclofen.....	28
2.1.2 Modo de acción.	29
2.1.3 Efectos tóxicos.	30
2.2 Fungicidas anilopirimidinas.	30
2.2.1 Modo de acción.	30
2.2.2 Efectos tóxicos.	31
2.3 Ensayo de micronúcleos.....	32
2.3.1 Historia y fundamento de los micronúcleos.....	34
2.3.2 Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.	35
2.3.3 Micronúcleos en linfocitos de sangre periférica.....	39
2.3.4 Factores que afectan la frecuencia de micronúcleos.....	40
2.3.5 Evolución del ensayo.....	40
2.3.6 Criterios de selección en el ensayo de micronúcleos.....	40
2.4 Ciclo celular.....	43
2.4.1 Puntos de control en la regulación del ciclo celular.....	44
2.4.2 Puntos de control en G ₁ y G ₂	45
2.4.3 Puntos de control en mitosis.....	46
2.4.4 Armado incorrecto del huso mitótico.....	46
2.5 Citocinas.....	47
2.5.1 Factor de necrosis tumoral (TNF).	48
2.5.2 Factor de crecimiento transformante (TGF-β).....	50

2.5.3 Factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB).	52
III. JUSTIFICACIÓN	56
IV. HIPÓTESIS	57
V. OBJETIVOS	58
5.1 Objetivo general:	58
5.2 Objetivos particulares.	58
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	60
6.1 Plaguicidas comerciales Envidor y Scala.	60
6.2 Citotoxicidad de los plaguicidas Scala y Envidor.	60
6.3 Ensayo de micronúcleos.	60
6.4 Evaluación de la expresión del TNF-α, TGF-β y NF-kB.	61
6.4.1 Extracción de ARN.	61
6.4.2 Cuantificación de ARN.	62
6.4.3 Síntesis de cDNA o templado	62
6.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).	62
6.5 Análisis estadístico.	63
VII. RESULTADOS.	64
7.1 Genotoxicidad, citotoxicidad e inmunotoxicidad <i>in vitro</i> del acaricida Envidor en linfocitos de sangre periférica humana.	64
7.2 Genotoxicidad, citotoxicidad e inmunotoxicidad <i>in vitro</i> del fungicida Scala en linfocitos de sangre periférica humana.	71
VIII. DISCUSIÓN	77
IX. CONCLUSIONES	86
X. REFERENCIAS	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del Spirodiclofen (Envidor®) (a), Spiromesifen (Oberon®) (b) y Spirotetramat (Movento®) (c).....	28
Figura 2. Estructura química del Pirimetanil (a), Cyprodinil (b) y Mepanipyrim (c).....	30
Figura 3. Formación de MN.....	37
Figura 4. Diferentes tipos de división celular con micronúcleos y diferentes estadios de células en vías de apoptosis.....	38
Figura 5. Media de la frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas de los linfocitos periféricos humanos expuestos <i>in vitro</i> al acaricida Envidor..	66
Figura 6. Correlación lineal de la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana expuestos <i>in vitro</i> al acaricida Envidor.....	67
Figura 7. Media del cambio de magnitud de expresión de TNF- α en linfocitos periféricos humanos expuestos <i>in vitro</i> al acaricida Envidor.....	68
Figura 8. Media del cambio de magnitud de expresión de TGF- β en linfocitos periféricos humanos expuestos <i>in vitro</i> al acaricida Envidor.....	69
Figura 9. Media del cambio de magnitud de expresión del NF- κ B en linfocitos periféricos humanos expuestos <i>in vitro</i> al acaricida Envidor.....	70
Figura 10. Media de la frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas de los linfocitos periféricos humanos expuestos <i>in vitro</i> al fungicida Scala.....	72
Figura 11. Correlación lineal de la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana expuestos <i>in vitro</i> al fungicida Scala.....	73
Figura 12. Media del cambio de magnitud de expresión de TNF- α en linfocitos periféricos humanos expuestos <i>in vitro</i> al fungicida Scala.....	74
Figura 13. Media del cambio de magnitud de expresión de TGF- β en linfocitos periféricos humanos expuestos <i>in vitro</i> al fungicida Scala.....	75
Figura 14. Media del cambio de magnitud de expresión del NF- κ B en linfocitos periféricos humanos expuestos <i>in vitro</i> al fungicida Scala.....	76
Figura 15. Mecanismo de acción propuesto para los plaguicidas Envidor y Scala.....	84

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas con base en su toxicidad.....	17
Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su DL ₅₀	18
Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su vida media.....	19
Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su estructura química..	20
Tabla 5. Tipos de biomarcadores de efecto genético.....	25
Tabla 6. Secuencia de los oligos de cada gen utilizado en la reacción de RT-qPCR.	63
Tabla 7. Efectos de Envidor sobre el IDN, el IPBC, y la citotoxicidad relativa a diferentes concentraciones.....	65
Tabla 8. Efectos de Scala sobre el IDN, el IPBC, y la citotoxicidad relativa a diferentes concentraciones.....	71

I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son productos químicos altamente empleados por el ser humano para el control de plagas agrícolas y su aplicación correcta es la medida más aceptada y efectiva para lograr la máxima producción y mejor calidad de los cultivos. (Bolognesi, 2003; Mansour, 2004). El consumo y la variedad de plaguicidas a nivel mundial se ha incrementado a la par del aumento de la población y de la producción agrícola (Zhang *et al.*, 2011). Esto ha propiciado el progreso de la industria de agroquímicos en el siglo XX. Este proceso se ha acompañado del inadecuado uso de estos compuestos, muchos de ellos con efectos nocivos, lo cual tiene como resultado impactos graves tales como la contaminación del ambiente mediante la interacción de dichos compuestos con el aire, suelo, agua y alimentos y riesgos para la salud de los seres humanos, quienes en mayor o menor grado están inevitablemente expuestos a los plaguicidas (Bolognesi, 2003).

Esto es motivo de preocupación, ya que en México se carece de medidas o normas de seguridad para detectar y cuantificar los efectos tóxicos de los plaguicidas en los seres humanos (Mohammad y Varela, 2008).

Los casos de intoxicación aguda por plaguicidas representan un porcentaje elevado y son los que se refieren a la morbilidad y a la mortalidad en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo y es precisamente en éstos donde la colaboración intersectorial es necesaria para elaborar de manera conjunta los riesgos ambientales y para la salud (WHO, 2007).

Aunque los beneficios no pueden ser despreciados, en los últimos años su estudio se ha enfocado en los efectos sobre la salud humana y el ambiente. Estos compuestos pueden dañar a los seres vivos, desde microorganismos benéficos del suelo, hasta insectos, plantas no blanco, peces, aves y mamíferos, incluyendo al hombre. De igual manera, los plaguicidas son de los compuestos que representan una de las causas de la contaminación del agua y del suelo (Valencia *et al.*, 2013).

Entre los daños causados por los agentes químicos en los organismos expuestos, se encuentran los efectos genotóxicos e inmunotóxicos y han sido de los más preocupantes, debido a que esta capacidad puede causar diferentes problemas de salud y también afectar a generaciones futuras. Esta preocupación ha llevado al desarrollo de distintos ensayos de genotoxicidad e inmunotoxicidad en diversos organismos (Valencia *et al.*, 2013). En ese sentido, la toxicología genética ha aportado distintos biomarcadores para el biomonitoreo del riesgo genotóxico asociado a la exposición a plaguicidas como el análisis de micronúcleos (MN), de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y el ensayo cometa (Magnarelli, 2011).

La prueba de MN se encuentra en gran auge dada su utilización en líneas de investigación sobre mutagénesis, para conocer *in vitro* el efecto genotóxico de nuevos agentes químicos como los plaguicidas (Zalacain *et al.*, 2005). Los MN resultan de daños no reparados o por errores de reparación en las células. La formación de éstos puede ser resultado de daños directos a los cromosomas o alteraciones al huso y al aparato mitótico (Cavusoglu *et al.*, 2012). Son fácilmente observados en las células hijas como una estructura similar a la del núcleo principal pero de menor tamaño (Valencia *et al.*, 2013).

De igual manera diferentes estudios indican que el sistema inmune puede ser un blanco de acción tóxica de algunos plaguicidas. Muchos plaguicidas son inmunomoduladores, mediante la sobreexpresión de citocinas lo cual es posible que genere problemas de autoinmunidad y cáncer o mediante la supresión inmune lo cual probablemente aumente la incidencia de enfermedades infecciosas (Corsini *et al.*, 2013). Por lo tanto es de vital importancia el estudio de los cambios en el sistema inmune provocados por la exposición a plaguicidas. Es importante realizar estos ensayos de manera rutinaria y establecer un seguimiento de aquellos individuos que, por su ocupación laboral o estilo de vida, se encuentran más expuestos o con mayor riesgo de sufrir alteraciones capaces de modificar su estabilidad genética (Zalacain *et al.*, 2005).

1.1 Historia de los plaguicidas.

Desde épocas remotas el hombre ha combatido las plagas y, por lo tanto, ha utilizado plaguicidas. La primera etapa de la historia de los plaguicidas abarcó desde antes de Cristo hasta mediados del siglo XIX y se le suele llamar “Era de los productos naturales”. Se usaba el azufre, las flores de piretro, los arsenitos y finalmente durante los dos últimos siglos de esta etapa se utilizaron como plaguicidas sustancias más complejas, como el jabón, pero que seguían siendo naturales (Humberto, 2011).

A partir de la Revolución Industrial, con el crecimiento de las zonas urbanas y su dependencia de las áreas rurales para proveerlas de alimentos, se requirió una mayor capacidad de producción, almacenamiento y protección de los alimentos. Como resultado, la agricultura que hasta entonces había sido principalmente de subsistencia, adquirió un carácter más industrial. Ante esto, la industria química lanzó al mercado, para combatir las plagas, una serie de sustancias de toxicidad inespecífica y de muy bajo costo. Se establecieron entonces las bases de la relación mercantil, que aún perdura, entre la producción de alimentos y la elaboración y uso de plaguicidas. Este segundo periodo se le conoce como “Era de los fumigantes y los derivados del petróleo”, y abarca desde mediados del siglo XIX hasta principios del siglo XX. Durante esta era se emplearon productos como los ácidos carbónico y fénico, el sulfato de cobre con cal, el acetoarsenito de cobre, así como diversos fumigantes, entre ellos disulfuro de carbono y bromuro de metilo (Albert, 2007).

La tercera etapa en la historia de los plaguicidas se conoce como “Era de los productos sintéticos” y se inició a mediados de la década de los 20, en Estados Unidos, con la síntesis y el empleo de los dinitroderivados. En esta tercera etapa se desarrollaron la mayoría de los plaguicidas sintéticos de uso actual.

La aplicación de estos productos se popularizó hasta después de la Segunda Guerra Mundial. El diclorodifeniltricloroetano (DDT) se sintetizó por primera vez a finales del siglo pasado, sin embargo sus propiedades insecticidas no se

reconocieron sino hasta 1939. Al finalizar la guerra, el DDT se empezó a utilizar ampliamente en la agricultura y, con gran éxito inicial para el control de vectores causantes de enfermedades como la malaria (Humberto, 2011).

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 funguicidas, todo lo cual estuvo relacionado con la llegada de la Revolución Verde, siendo México uno de los primeros países en adoptarla (Albert, 2005).

El uso de plaguicidas agrícolas en México se establece desde finales del siglo XIX (Albert, 2005). A partir de 1947 se inicia con la producción de ingredientes activos y para 1994 México se convirtió en el principal importador de plaguicidas en América Latina. Hay datos que muestran las grandes cantidades que se produjeron en el año 2000; por mencionar algunas, se documentó que se elaboraron y asperjaron 244.1 mil toneladas de insecticidas, funguicidas y desinfectantes (Albert, 2005; Genchi *et al.*, 2008).

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, se elaboraron 25, 546 toneladas de insecticidas, 25, 862 de funguicidas y 18, 890 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 reportan 37, 501 toneladas de insecticidas de aplicación agrícola y 37, 684 toneladas de herbicidas y desfoliantes (INEGI, 2013).

En la década de los ochenta, en el marco institucional y jurídico con relación a los plaguicidas se publicó el decreto de creación de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICLOPAFEST), organismo que agrupa diversas Secretarías tales como la de Salud (a través de la Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios: COFEPRIS), Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT),

Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). En 2004 como parte de las actividades que desarrolla CICLOPAFEST, se publicó el reglamento en materia de registros, autorizaciones de importación y exportación y certificados de exportación de plaguicidas, nutrientes vegetales y sustancias, así como de materiales tóxicos o peligrosos, instrumento a través del cual se controla el ingreso de estos productos (Cortinas, 2004).

Los principales países exportadores de plaguicidas hacia México son Estados Unidos y Canadá gracias al Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) celebrado en 1994. De dicho tratado nace el Grupo de Trabajo Técnico sobre Plaguicidas del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TWG/TLCAN) el cual es el encargado de vigilar la seguridad de los plaguicidas que ingresan y viajan a través de América del Norte (Genchi *et al.*, 2008).

La regulación ambiental de plaguicidas y de sus desechos considerados como residuos peligrosos se ha abordado desde 1998 a través de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA); en el artículo 134 la LGEEPA establece la prevención y control de la contaminación del suelo y decreta que los plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas quedarán sujetos a las normas oficiales mexicanas (Gómez *et al.*, 2013).

1.2 Definición y clasificación de los plaguicidas.

De acuerdo con la Ley General de Salud un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destine a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten las enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, así como las sustancias desfoliantes y las desecantes (Romero, 2008).

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso (López, 1993).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1978 clasificó los plaguicidas principalmente con base en su toxicidad aguda en animales (Tabla 1): extremadamente peligrosos (Ia), altamente peligrosos (Ib), moderadamente peligrosos (II), poco peligrosos (III), normalmente no ofrecen peligro bajo uso normal (IV) (OMS, 1993a).

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas con base en su toxicidad. Tomado de OMS (1993a).

Banda de color de las etiquetas según la categoría toxicológica		
Color de la Banda	Clasificación de la OMS según los riesgos	Clasificación del Peligro
Rojo (PMS 199 C)	I a - Producto Sumamente Peligroso	MUY TÓXICO
Rojo (PMS 199 C)	I b - Producto Muy Peligroso	TÓXICO
Amarillo (PMS Amarillo C)	II - Producto Moderadamente Peligroso	NOCIVO
Azul (PMS 293 C)	Producto Poco Peligroso	CUIDADO
Verde (PMS 347 C)	IV - Producto que Normalmente no Ofrece Peligro	CUIDADO

Otro criterio para evaluar la toxicidad es a través de la dosis letal media (DL_{50}) o de la concentración letal media (CL_{50}) (Tabla 2) (López, 1993).

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su DL₅₀. Tomado de OMS (1993b).

Clasificación Toxicológica de los Plaguicidas				
Clasificación de la OMS según los riesgos	Formulación Líquida DL50 Aguda		Formulación Sólida DL50 Aguda	
	Oral	Dérmica	Oral	Dérmica
Clase I a Productos Sumamente Peligrosos	<20	<40	<5	<10
Clase I b Productos Muy Peligrosos	20 a 200	40 a 400	5 a 50	10 a 100
Clase II Productos Moderadamente Peligrosos	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	10 a 1000
Clase III Productos Poco Peligrosos	2000 a 3000	> a 4000	500 a 2000	> a 1000
Clase IV Productos que Normalmente No Ofrecen Peligro	> a 3000		> a 2000	

Diversos factores influyen tanto la DL₅₀ como la CL₅₀. Entre éstos se puede citar: la presentación del producto, la vía de entrada, la temperatura, la dieta, la edad, el sexo, entre otros. Al basarse en la observación de especies animales, es importante señalar que estos indicadores no proporcionan información sobre los efectos crónicos, ni sobre la citotoxicidad de algún compuesto (OMS, 1990).

Por su vida media, los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes, y no persistentes (Tabla 3) (OMS, 1990).

Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su vida media. Tomado de Ramírez y Lacasaña (2001).

Persistencia ^a	Vida media ^b	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

^a Capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó.

^b Lapso de tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto o mezcla aplicada.

De acuerdo a su estructura química, los plaguicidas se clasifican en diversas familias, que incluyen compuestos orgánicos e inorgánicos (Tabla 4) (López, 1993).

Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su estructura química. Tomado de Ramírez y Lacasaña (2001).

Familia química	Ejemplos
<u>Organoclorados</u>	DDT, <u>aldrín</u> , <u>endosulfán</u> , <u>endrín</u>
<u>Organofosforados</u>	<u>Bromofos</u> , <u>diclorvos</u> , <u>malatión</u>
<u>Carbamatos</u>	<u>Carbaril</u> , <u>metomilo</u> , <u>propoxur</u>
<u>Tiocarbamatos</u>	<u>Ditiocarbamato</u> , <u>mancozeb</u> , <u>maneb</u>
<u>Piretroides</u>	<u>Cipermetrina</u> , <u>fenvalerato</u> , <u>permetrina</u>
<u>Derivados bupiridilos</u>	<u>Cloromequat</u> , <u>diquat</u> , <u>paraquat</u>
<u>Derivados del ácido fenoxiacético</u>	<u>Dicloroprop</u> , <u>picram</u> , <u>silvex</u>
<u>Derivados cloronitrofenólicos</u>	DNOC, <u>dinoterb</u> , <u>dinocap</u>
<u>Derivados de triazinas</u>	<u>Atrazina</u> , <u>ametrina</u> , <u>desmetrina</u> , <u>simazina</u>
<u>Compuestos orgánicos del estaño</u>	<u>Cihexatino</u> , <u>dowco</u> , <u>plictrán</u>
<u>Compuestos inorgánicos</u>	Arsénico <u>pentóxido</u> , <u>obpa</u> , fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, <u>arsenato de plomo</u> , bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco
<u>Compuestos de origen botánico</u>	Rotenona, nicotina, aceite de canola

1.3 Toxicología de los plaguicidas.

En 1993 se inició el registro de intoxicaciones por plaguicidas en México; para 2001 se habían reportado 4,606 casos anuales en promedio, con un mínimo de 1,576 en 1993 y un máximo de 7,032 en 1996 (COFEPRIS, 2002).

Según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en el lapso comprendido entre 2005 y 2009 las cifras de intoxicaciones por plaguicidas se incrementaron de 3,174 a 3,229 casos. En 2010 se reportaron 3,068 casos de intoxicación con plaguicidas en toda la República Mexicana, en donde Jalisco presenta la mayor cantidad, seguido del Estado de México, Guerrero, Chiapas, Veracruz, Nayarit, Michoacán, Morelos y Oaxaca. La mayor parte de dichas intoxicaciones se manifestó en hombres con 2,167 casos y 901 en mujeres (DGE, 2010).

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).

Su biodisponibilidad en el organismo depende de su toxicocinética: absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Estos procesos están influenciados tanto por factores externos relacionados con los patrones de exposición y con las sustancias químicas, como por factores inherentes al individuo (Fait y Colosio, 1998). Las dietas bajas o carentes de proteínas y los estados de deshidratación son factores que influyen en la gravedad del daño a la salud. Además, gran proporción de la población laboral y ambientalmente expuesta vive en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, donde el uso de plaguicidas es tan común como las carencias nutricionales mencionadas (OMS, 1993a).

En el medio laboral la vía dérmica es la más importante, pues a través de ella y en función de la superficie de piel expuesta, se absorben cantidades significativas de diversos plaguicidas que varían en su nivel de absorción (Al-Saleh, 1994). Es

posible encontrar en la dermis residuos de compuestos incluso meses después de la última exposición. Ya absorbidos, los plaguicidas liposolubles se difunden a través de los componentes grasos de la piel y la sangre, mientras que los de moléculas hidrosolubles lo hacen a través del material proteico intracelular (Moses, 1993).

El uso de fumigantes en forma de gases, polvos, vapores y nebulizaciones, coloca a la vía respiratoria como la segunda en importancia (Al-Saleh, 1994).

En la población general la vía de absorción más importante es el aparato digestivo a partir de la ingestión de alimentos y agua contaminados. La ingestión deliberada o accidental es relativamente poco frecuente (Al-Saleh, 1994).

La vía aérea es también otra importante ruta de absorción, la aplicación frecuente de plaguicidas en zonas de cultivo, su arrastre por el viento hacia zonas aledañas y el uso común en el hogar de productos en aerosol, nebulizaciones, bombas de humo, etc., favorecen la presencia del producto en el ambiente de forma continua y en pequeñas cantidades. El epitelio alveolar favorece el intercambio de gases en el pulmón; de igual manera, permite una rápida y eficiente absorción de plaguicidas (Moses, 1993).

La circulación transplacentaria y la lactancia materna se consideran mecanismos de traspaso más que de absorción, ya que los plaguicidas o sus metabolitos pasan directamente al nuevo ser a través de la barrera hematoplacentaria y/o durante el proceso de lactancia materna (OMS, 1990).

El cuerpo humano elimina los plaguicidas por tres vías principales: la orina, las heces fecales y el aire exhalado. Algunos productos hidrosolubles, como el lindano y los herbicidas tipo fenoxi, son eliminados fácilmente por vía urinaria sin cambio alguno. La bilis es el medio principal por el que algunos compuestos liposolubles como el DDT se desechan en las heces fecales. Los fumigantes que llegan al cuerpo en forma de gases o vapores son eliminados comúnmente por vía respiratoria, tal es el caso del acrilonitrilo o del bromuro de metilo (Fait y Colosio, 1998).

Considerando el grupo químico al que pertenecen los plaguicidas se establece que los piretroides causan 22% de las intoxicaciones, los organofosforados 20%, los carbamatos 15%, bipiridilos 7%, rodenticidas 6%, fosfúricos 5%, fosfometilglicina y amicina 2% cada una, fluoroacetatos, triazinas, fenoxi, organoclorados, y clorofenólicos 1% cada uno y el 16% restante de casos se desconoce (AFIMAC, 2012).

Los efectos causados por la exposición a los plaguicidas representan un problema de salud pública en varias partes del mundo. Existen más de mil sustancias usadas como plaguicidas con una gran diversidad en cuanto a: su modo de acción, entrada al organismo, metabolismo y eliminación y por lo tanto en cuanto a su toxicidad. Además, cuando éstos son usados para el control de plagas agrícolas, generalmente se utilizan en mezclas complejas, lo cual dificulta la evaluación de la exposición y el estudio de sus efectos adversos en las poblaciones (Pérez, 2006). En México, la población mexicana dedicada a la actividad agrícola es de aproximadamente 7 millones de individuos y se calcula que el 25% de ellos está expuesto directamente a plaguicidas (AMIPFAC, 2001).

Se ha asociado la exposición ocupacional a plaguicidas con efectos genotóxicos en células somáticas, como incremento en la cauda del cometa, en las frecuencias de aberraciones cromosómicas (AC), de ICH y de MN. Se ha observado que el efecto es menor en aquellos trabajadores que usan algún tipo de equipo de protección y que los sujetos que trabajan en invernadero muestran mayor daño que los que trabajan en el campo (Gómez *et al.*, 2013).

Las intoxicaciones y las muertes provocadas por plaguicidas son principalmente debidas a la falta de equipo de protección y al manejo inadecuado de estas sustancias, así como al bajo nivel de escolaridad de los trabajadores agrícolas que les impide darse cuenta del riesgo que constituye la exposición directa o indirecta a plaguicidas (Gómez *et al.*, 2013).

1.4 Biomarcadores.

Los marcadores biológicos o biomarcadores son los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpreta como reflejo o marcador de la exposición a un agente tóxico (Garte y Bonassi, 2005). Suelen utilizarse como indicadores del estado de salud o del riesgo a enfermedades y se emplean en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que pueden incluir a seres humanos. Se clasifican por lo general en tres tipos concretos: de exposición, de efecto y de susceptibilidad y son una herramienta útil para evaluar el riesgo potencial de las diferentes exposiciones ambientales. A nivel individual pueden emplearse para apoyar o rechazar el diagnóstico de un determinado tipo de exposición o de otro efecto adverso inducido por productos químicos (Gómez y Martínez, 2007).

Los biomarcadores de exposición pueden ser un compuesto exógeno, sus metabolitos o el producto de la interacción con una biomolécula, esta clase de biomarcadores se pueden medir en sangre, orina, cabello, uñas o en ADN, ARN, lípidos y proteínas. Se distinguen dos tipos 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, se utiliza principalmente para cuantificar la concentración del agente tóxico acumulado en el tejido, en el órgano o en el organismo completo como por ejemplo los niveles de plomo en la sangre. Los metabolitos de los plaguicidas son biomarcadores de exposición de dosis interna tal como los niveles del insecticida en orina y en suero, que estima la exposición individual a los insecticidas neonicotinoides (Bernard y Lawerys, 1986; Van Cauteren *et al.*, 1996; Sorensen *et al.*, 2003) y b)

Los biomarcadores de dosis biológicamente efectiva (no selectivos) indican que el agente tóxico ya ha producido daño en el organismo. Los aductos 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.

Son útiles cuando la vida media del xenobiótico es muy corta y resulta difícil medir su concentración (Rodríguez *et al.*, 2012).

Los biomarcadores de efecto han sido los más utilizados para medir el daño una vez que ya ha sido procesado por el organismo. Las lesiones en el ADN, una vez establecidas, pueden convertirse en cambios permanentes en las células dando lugar a una mutación. Como sus efectos se fijan, reflejan daños correspondientes a exposiciones pasadas, por lo que son útiles para detectar daño acumulativo. Se pueden dividir en informativos y en relevantes para algunas enfermedades, es decir, aquellos biomarcadores que determinan daños cromosómicos o genómicos en lugares críticos relacionados con el desarrollo de una enfermedad (Saleha *et al.*, 2001).

Tabla 5. Tipos de biomarcadores de efecto genético. Tomado de Saleha (2001).

	DAÑO CROMOSOMICO	DAÑO GENETICO
INFORMATIVOS (no específicos)	Aberraciones cromosómicas Micronúcleos Intercambios de cromátidas hermanas Ensayo del cometa	Mutaciones puntuales Deleciones Recombinaciones Amplificaciones
RELEVANTES Enfermedad	Alteraciones específicas	Mutaciones en : Protooncogenes Genes supresores de tumores Genes de reparación

Los biomarcadores de susceptibilidad son indicadores de la sensibilidad individual hacia un agente tóxico. Se conocen dos tipos: a) Los biomarcadores de polimorfismos enzimáticos del metabolismo de xenobióticos, los cuales miden la actividad del complejo enzimático CYP450, involucrado en las reacciones de óxido-reducción de la fase I del metabolismo de xenobióticos (activación), para formar metabolitos primarios reactivos. El polimorfismo genético de las enzimas CYP450 determina las diferencias en la susceptibilidad de los individuos para desarrollar enfermedades y b) Los biomarcadores de polimorfismos enzimáticos

de las reacciones de conjugación que miden la actividad de las enzimas de conjugación de la fase II del metabolismo (inactivación) tales como el complejo glutatión-S-transferasa, acetiltransferasa y sulfotransferasa implicadas en la desintoxicación de metabolitos reactivos. La predisposición al cáncer se ha relacionado con el polimorfismo genético de estas enzimas (Van Cauteren *et al.*, 1996).

Los principales biomarcadores utilizados en el biomonitoreo de poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas son los siguientes:

- a) AC: detecta cambios citológicamente identificables que afectan el número o a la estructura de los cromosomas que constituyen el cariotipo de la especie y pueden ser observados al microscopio óptico. Estas modificaciones corresponden a rompimientos y rearrreglos en el mismo o entre diferentes cromosomas. Las aberraciones estructurales han sido consideradas como marcadores de riesgo (Gómez y Martínez, 2007).
- b) MN: es uno de los biomarcadores de genotoxicidad más frecuentemente empleados en mamíferos y en la actualidad se utiliza para la evaluación de exposiciones ocupacionales a mutágenos (Vaglenov *et al.*, 2001; Norppa y Falck, 2003). Los MN son la expresión en interfase de los fragmentos acéntricos, que al no tener centrómero no se incluirán en los núcleos hijos durante la división celular, ya que no interactúan con las fibras del huso mitótico en anafase; estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen como pequeños núcleos en interfase. Mientras que cuando el daño se da en el centrómero, alterando el cinetocoro o bien las fibras del huso acromático, se produce un desequilibrio en la distribución de los cromosomas, provocando que queden fuera de la cinética normal de la anafase y se rodeen de envoltura nuclear, como ocurre con los fragmentos acéntricos, originando también MN aunque de mayor tamaño. Este ensayo puede realizarse utilizando células de descamación de la vejiga urinaria y de las mucosas oral y nasal (Stich *et al.*, 1983; Stich y Rosin, 1984; Rosin y Gilbert, 1990), o de sangre periférica (Lee *et al.*, 2002; Clare *et al.*, 2006).

- c) ICH: son eventos que se producen durante la fase de síntesis. Representan el intercambio simétrico, entre *loci* homólogos, de productos de replicación (Norppa, 2004). Ocurren sin pérdida de ADN ni cambios en la morfología cromosómica y es posible detectarlos en metafases obtenidas de cultivos adicionados con bromodesoxiuridina que es un análogo de la base nitrogenada timina del ADN (Latt, 1979; Latt *et al.*, 1981). Los ICH no representan situaciones letales para la célula, además, por sí mismos, no pueden ser considerados mutaciones ya que, en principio, no producen cambios en la información genética. Sin embargo, se ha observado que la frecuencia de ICH aumenta cuando las células son expuestas a agentes mutagénicos y cancerígenos conocidos y en el caso de ciertas enfermedades congénitas como el síndrome de Bloom, *Xeroderma pigmentosa* (Wolf, 2004) y la enfermedad de Behcet (Ikbali *et al.*, 2006). Se puede observar incremento en la frecuencia de ICH por exposición de las células a agentes clastogénicos, lo que ha permitido que se reconozca como un evento indicador de daño al ADN (Zeljezic y Garaj, 2001). Este ensayo se utiliza en investigaciones sobre monitoreo biológico de individuos expuestos a agentes genotóxicos potenciales o conocidos (Lambert *et al.*, 1982; Cavallo *et al.*, 2006).
- d) Ensayo cometa: es un biomarcador rápido, simple, visual y sensible, conocido como electroforesis unicelular alcalina, que se utiliza para medir y analizar rupturas en el ADN. Detecta diferencias intracelulares y daño en los procesos de reparación de virtualmente todas las células (Speit y Hartmann, 2006). El ensayo cometa consiste en cuantificar el daño inducido en el ADN de células que son embebidas en agarosa, lisadas y posteriormente sometidas a una electroforesis en pH alcalino, para así lograr que los fragmentos de cromosomas se dirijan hacia el ánodo y se revelen como la cola de un cometa, que se visualiza luego de teñir con un colorante fluorescente (Tice *et al.*, 2000). La capacidad de migración del ADN depende de la cantidad de rompimientos producidos por el agente en

cuestión (Garaj y Zeljezic, 2002), de esta manera cada célula lesionada tiene la apariencia de un cometa con una cabeza y una cola brillante y fluorescente y las células que no han sido dañadas aparecen con núcleos intactos, sin colas (Möller, 2006).

II. ANTECEDENTES

2.1 Insecticidas cetoenoles.

En 2002, Bayer Cropscience lanzó el spirodiclofen (Envidor®), el primer miembro del grupo de los cetoenoles (Wachendorff *et al.*, 2002). Poco después, fue introducido el segundo cetoenol, spiromesifen (Oberon®), acaricida e insecticida contra ácaros y la mosca blanca (Nauen, 2005). Recientemente produjeron y comercializaron el tercer miembro, spirotetramat (Movento®), insecticida que es efectivo contra la mosca blanca, el pulgón y otras pestes (Nauen, 2005).

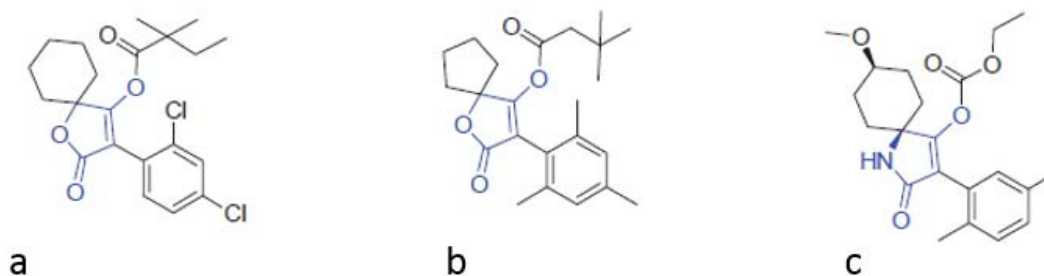


Figura 1. Estructura química del Spirodiclofen (Envidor®) (a), Spiromesifen (Oberon®) (b) y Spirotetramat (Movento®) (c). Tomado de Ke *et al* (2010).

2.1.1 Spirodiclofen (Envidor®).

El spirodiclofen (3-(2,4-Diclorofenil)-2-oxo-1-oxaspiro[4,5]dec-3-en-4-il 2,2-dimetilbutanoato) es un acaricida selectivo, con una gran eficacia y poco tóxico.

Ha sido comercializado para el control de ácaros fitófagos de importancia económica como *Tetranychus*, *Panonychus*, *Brevipalpus*, *Phyllocoptuta* y *Aculus* (Rauch y Nauen, 2002).

2.1.2 Modo de acción.

El spirodiclofen no tiene actividad neurotóxica, pero actúa durante el desarrollo de los ácaros. Al aplicar este plaguicida en especímenes jóvenes, éstos mueren posteriormente. Este acaricida afecta la fertilidad de las hembras adultas. Al tratar a las hembras con este acaricida son incapaces de depositar huevos y mueren después de unos cuantos días debido a la acumulación de huevos en su cuerpo. En los huevos expuestos a dosis subletales provoca que los organismos que salen de éstos sean infértiles (Wachendorff *et al.*, 2002).

Se ha observado que el contenido lipídico en hembras adultas de *Tetranychus urticae* tratadas con este acaricida se reduce considerablemente, lo cual sugiere una interferencia en la síntesis de lípidos a través de la potente inhibición de la acetil-CoA-carboxilasa, su actividad biológica se correlaciona con la inhibición de la lipogénesis especialmente de triglicéridos y ácidos grasos libres (Bretschneider *et al.*, 2007).

2.1.2 Efectos tóxicos.

En experimentos realizados con ratas tratadas con spirodiclofen se reporta que tiene poca o nula toxicidad a nivel oral, dérmica o por inhalación, no es irritante para los ojos, pero sí para la piel (VKM, 2011).

Se ha descrito negativo para las pruebas de AC y de MN. Basados en éstas se considera que el spirodiclofen es un producto no genotóxico (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 (VKM, 2011).

El spirodiclofen se clasifica como un agente carcinogénico ya que induce tumores en las células de Leydig y adenocarcinomas en el útero de ratas, así como tumores en el hígado de ratones (VKM, 2011).

2.2 Fungicidas anilopirimidinas.

Las anilopirimidinas fueron patentadas como fungicidas en 1981 por VEB Fahlberg-List, Magdeburg (Friedrich *et al.*, 1981), pero en 1990 fueron redescubiertas por Ciba-Geigy, Schering y Kumai/Ihara Chemical Industries. Como resultado de estas investigaciones, tres anilopirimidinas fueron introducidas en el mercado entre 1992 y 1995: el Pirimetanil fue comercializado en 1992, el Ciprodinil en 1994 y Mepanipyrimen 1995 (Maeno *et al.*, 1990).

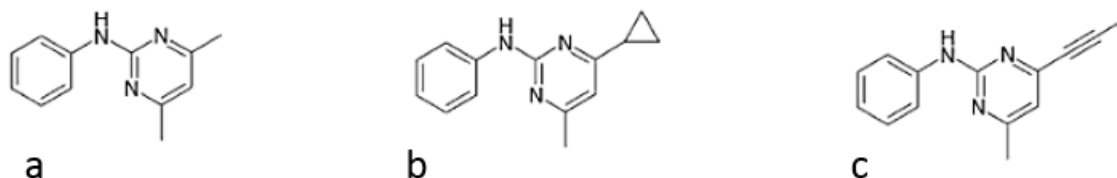


Figura 2. Estructura química del Pirimetanil (a), Cyprodinil (b) y Mepanipyrim (c). Tomado de Friedrich et al (1981).

2.2.1 Pirimetanil (Scala®).

El pirimetanil (N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)anilina) (Scala®) es un fungicida de tipo translaminar y de contacto, el cual es efectivo contra hongos del género *Botrytis* que han desarrollado resistencia a la mayoría de los fungicidas comerciales (NRA, 1996).

2.2.2 Modo de acción.

El pirimetanil inhibe la biosíntesis de metionina e interfiere en la secreción de enzimas hidrolíticas durante la penetración de los patógenos blanco en los tejidos de la planta, aunque la biosíntesis de estas enzimas no es afectada (Sierotzki *et al.*, 2002).

Estudios bioquímicos, sugieren como las enzimas blanco la cistationina β -liasa (CBL) o la cistationina γ y la sintasa (CGS). Sin embargo, en otros experimentos se comprobó que la CBL no es sensible al pirimetanil así como en especies de *Neurospora crassa* deficientes de la CGS (Sierotzki *et al.*, 2002). No obstante, cuando se hicieron las secuencias genéticas para la CGS, se encontraron dos mutaciones en el gen CGS, lo cual se cree que forma parte del proceso de inhibición de la biosíntesis de la metionina (Sierotzki *et al.*, 2002).

2.2.2 Efectos tóxicos.

El pirimetanil (Scala®) tiene bajo nivel de toxicidad dérmico, oral y de inhalación y no es un irritante para la piel, ni para los ojos. Los principales efectos a corto y mediano plazo en ratas son: alteraciones en la glándula tiroides, en el sistema urogenital y en hígado. A largo plazo indujo tumores benignos en la glándula tiroides. En estos mismos organismos estimula indirectamente la glándula tiroides al incrementar la actividad enzimática en el hígado. Los tumores en la tiroides solamente ocurrieron a dosis extremadamente elevadas, por lo cual no se consideró como un indicador importante que comprometa la salud humana al usar este tipo de fungicidas. En caninos causa vómito y reducción en su peso corporal y algunos efectos hematológicos moderados (NRA, 1996).

El pirimetanil es considerado como un agente no genotóxico, no afecta la reproducción, ni tampoco provoca efectos teratogénicos en animales. Basándose en los estudios toxicológicos para este fungicida, se considera que el pirimetanil no causa efectos adversos en la salud humana (NRA, 1996).

2.3 Ensayo de micronúcleos.

El análisis de MN es uno de los biomarcadores de genotoxicidad más frecuentemente empleado en mamíferos y en la actualidad se utiliza para la evaluación de exposiciones ocupacionales a mutágenos (Gómez y Martínez, 2007). Es un biomarcador de efecto que puede reflejar exposición a agentes con modo de acción clastogénico o aneugénico (Albertini *et al.*, 2000) y es considerado una medida cuantitativa de daño cromosómico correlacionada con la incidencia de cáncer en poblaciones humanas (Tolbert *et al.*, 1992).

Los agentes clastogénicos causan alteraciones cromosómicas de tipo estructural, provocando lesiones a los cromosomas que dan como resultado:

- a) Anillos o fragmentos cromosómicos sin centrómero (acéntricos) que en anafase no interactúan con las fibras del huso mitótico y por lo tanto en la telofase no se incorporan a los núcleos de las células hijas.
- b) Anillos o fragmentos con centrómero (céntricos) en los que éste se encuentra dañado, alterando el cinetocoro o bien las fibras del huso acromático, lo que provoca retraso en la migración de estos fragmentos hacia los polos del huso mitótico quedando fuera de los núcleos hijos.

Estas dos situaciones también se presentan con cromosomas completos, en los que el daño es causado por agentes aneugénicos, presentándose AC de tipo numérico causadas por pérdida del centrómero o afectación del mismo (con o sin disyunción), dando como resultado cromosomas céntricos que, por las mismas razones que en el caso de los fragmentos, tampoco se pueden incorporar a los núcleos de las células hijas. En todos los casos, el material genético no incluido en los núcleos de las células hijas, queda en el citoplasma y una porción de éstos se rodean de membrana nuclear y aparecen en la interfase como pequeños núcleos que por ser de menor tamaño que el núcleo se les llama MN. En general los de menor dimensión son resultado de la acción de clastógenos y los grandes de aneuploidógenos. Sin embargo, puede haber cromosomas completos pequeños

que, por tanto, produzcan MN de tamaño reducido (Zalacain *et al.*, 2005; Gómez y Martínez, 2007).

En ocasiones se observan además, puentes nucleoplásmicos entre los núcleos de las células binucleadas. Éstos se originan de cromosomas dicéntricos y proveen una medida complementaria del reordenamiento cromosómico (Fenech, 2000).

Los MN, como su nombre indica, son agrupaciones/conglomerados de cromatina que tienen la forma de pequeños núcleos y que aparecen cerca del núcleo principal en las células interfásicas. Los MN se pueden originar de manera espontánea o como respuesta a la acción de determinados agentes, resultando en la pérdida durante la división celular de fragmentos cromosómicos y/o cromosomas enteros (Pastor, 2002). Los rompimientos cromosómicos darán lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos que al no disponer de centrómero no se incluirán en los núcleos hijos durante la división celular, al no poder unirse al huso mitótico en anafase. Estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen en el citoplasma como pequeños núcleos. Si el daño genotóxico ha afectado a proteínas del cinetocoro, al centrómero o al huso mitótico, lo más probable es que se produzca un retraso mitótico y un desequilibrio en la distribución de los cromosomas, provocando que los cromosomas rezagados se pierdan durante la anafase y se rodeen de membrana nuclear, como ocurre con los fragmentos cromosómicos, originando también MN (Pastor, 2002).

Conviene destacar dos puntos relevantes sobre los MN:

- 1.- Se requiere una división celular después del daño para que se formen y puedan ser visualizados.
- 2.- Los MN pueden ser consecuencia tanto de agentes clastogénicos como aneugénicos (Fenech, 1997).

El hecho de que se puedan identificar los efectos producidos por agentes clastogénicos y aneugénicos permite al ensayo detectar diferentes tipos de lesiones, como por ejemplo:

- a) Rompimientos de doble cadena de DNA.
- b) Rompimientos de cadena simple de DNA, mal reparadas o sin reparar. La mayoría de los MN 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 AC que pueden dar origen a los MN.
- e) Apoptosis, mediante la frecuencia de núcleos condensados (Surrallés *et al.*, 1995; Kirsch, 1997).

Para identificar el contenido de los MN y poder así determinar el mecanismo de inducción, se utilizan técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y en ocasiones identificar la región cromosómica que se ha perdido o roto. Estudios realizados utilizando sondas específicas de centrómero, demuestran que aproximadamente el 50% de los MN espontáneos son consecuencia de pérdidas cromosómicas y la otra mitad son fragmentos acéntricos (Fenech y Morley 1989; Surrallés *et al.*, 1995).

El significado biológico de los MN dependerá de la región involucrada en el rompimiento y del cromosoma que se pierda. Si bien, algún rompimiento puede generar muerte celular, las aneuploidías tanto germinales como somáticas, se relacionan con alteraciones genéticas mucho más graves implicadas en abortos espontáneos, retraso mental y cáncer (Hassold *et al.*, 1996; Hagmar *et al.*, 1998).

2.3.1 Historia y fundamento de los micronúcleos.

Heddle (1973) y Schmid (1975) fueron los primeros investigadores que de manera independiente propusieron que un ensayo alternativo y simple para determinar el daño cromosómico *in vivo* era el conteo de MN en poblaciones celulares en división (Arencibia y Rosario, 2003). Más tarde, el ensayo de genotoxicidad fue mejorado por Fenech y Morley (1989), consiguiendo frenar el proceso de división

celular cuando la célula solo hubiese sufrido una división mitótica, para ello desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: por sus siglas en inglés de *cytokinesis-block micronucleus*) (Fenech, 2000).

El año 1999 fue crucial para el ensayo de MN, ya que la técnica fue validada a nivel mundial y considerada como un biomarcador efectivo de daño en el ADN. Para la validación se creó un programa internacional de MN humanos (HUMN: *Human MicroNucleus Project*), diseñado por Michael Fenech y Stefano Bonassi con el fin de recopilar las frecuencias basales de MN obtenidas en diferentes laboratorios y poblaciones del mundo (Fenech *et al.*, 1999; Bonassi *et al.*, 2001). El ensayo de MN es ampliamente utilizado en estudios ambientales, tanto con plantas (Valencia *et al.*, 2013), sobre todo con las raíces de *Allium cepa* y *Vicia faba* (Grant, 1994) o con polen de *Tradescantia* (Rodrigues *et al.*, 1997; Sadowska *et al.*, 2001); como con algunas especies animales sensibles a la contaminación ambiental. Así, el análisis de MN en peces, anguilas y mejillones ha sido un buen identificador de contaminación (Mersch y Beauvais, 1997; Campana *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2001).

El ensayo de MN también ha sido aplicado para conocer el efecto de determinados pesticidas y plaguicidas, productos químicos considerados de riesgo para los seres vivos; existen estudios tanto con ratones como con seres humanos donde se demuestra el efecto potenciador de estos productos sobre el índice de MN (Lucero *et al.*, 2000; Siu *et al.*, 2004).

2.3.2 Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.

Teniendo en cuenta que los MN solo pueden ser expresados en células eucariotas en división, el ensayo no puede ser usado cuantitativamente en poblaciones celulares que no se estén dividiendo o en aquellas donde la cinética de división no sea bien conocida y que las células se dividen a diferentes tasas *in vivo* e *in vitro* dependiendo de distintas condiciones fisiológicas, genéticas y de micronutrientes (Arencibia y Rosario, 2003).

Los linfocitos, al encontrarse generalmente en estado no proliferativo, necesitan de una estimulación durante el cultivo, lo que hace que éstos empiecen su ciclo de división, pasando de la fase G₁, y generalmente se realiza mediante la adición del mitógeno fitohemaglutinina. Sin embargo, una vez que los MN se han podido visualizar, al ser aberraciones inestables tienden a desaparecer a lo largo de las divisiones celulares. Por esta razón, es indispensable conocer si una célula se ha dividido y cuántas veces lo ha hecho. Para averiguar si las células se han dividido o no, se han descrito diferentes métodos. El método introducido por Pincu y colaboradores, consiste en el marcado de las células con bromodesoxiuridina y timidina tritiada. Su baja eficacia y el hecho de que causase daño por sí mismo determinó que se dejará de utilizar. Por lo tanto se empezó a emplear la propuesta de Fenech y Morley, que consiste en emplear la citocalasina B para inhibir la citocinesis celular. La citocalasina B, sustancia que proviene del hongo *Helminthosporium dematoideum*, impide la polimerización de las fibras de actina y, por lo tanto, del anillo microfilamentoso requerido para la división del citoplasma después de la telofase (Fenech, 2000). Las células llevarán a cabo todo su ciclo celular normalmente hasta llegar al final de la telofase cuando la célula no se divide y los dos núcleos hijos quedan englobados dentro de una misma membrana citoplasmática. Así, las células que han sufrido una división celular se distinguirán fácilmente por su aspecto binucleado y las que han experimentado más de una división por ser polinucleadas (Fenech, 1993; Kirsch *et al.*, 2000).

Los MN son registrados solo en las células binucleadas, lo cual permite realizar comparaciones confiables de daño cromosómico entre poblaciones celulares que difieren en la cinética de división nuclear. El método fue inicialmente desarrollado para linfocitos humanos en cultivo. Puede realizarse a partir de un cultivo de linfocitos aislados de sangre periférica u obtenerse de un cultivo de sangre completa (Fenech, 2000). Más tarde fue adaptado a otros tipos de cultivos celulares como son los de tumores sólidos y los de médula ósea (Arencibia y Rosario, 2003).

El ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis se ha mejorado con el tiempo, y además de evaluar la tasa de daño genético mediante los MN, permite estimar paralelamente el retraso mitótico, que se traduce en información citotóxica, cuantificando el número de células que no se han dividido (mononucleadas), las que se han dividido una vez (binucleadas) y más de una vez (polinucleadas). El ensayo de MN también permite evaluar la reparación por escisión (Surrallés *et al.*, 1995) y, si se realiza conjuntamente con una tinción fluorescente, es posible detectar la no disyunción (Kirsch *et al.*, 1997).

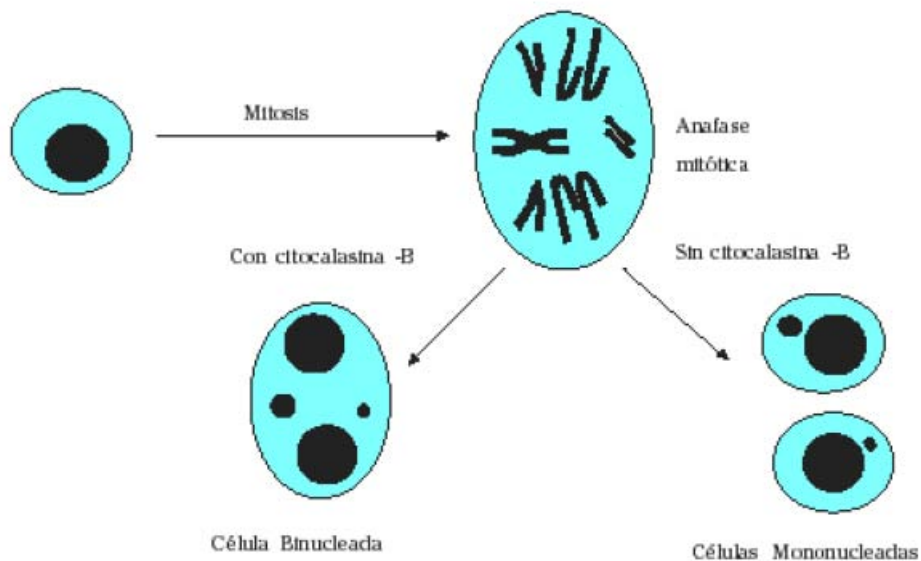


Figura 3. Formación de MN. Tomado de Larrea Poma (2007).

En el siglo XX se propuso que el ensayo de MN sea usado en lugar del análisis de metafases para el ensayo de genotoxicidad de nuevos agentes químicos. Esta propuesta está basada en el grupo de ventajas que tiene el ensayo de MN sobre el análisis de metafases. Dentro de ellas se distinguen las siguientes: los MN en las células en interfase pueden ser registrados mucho más objetivamente que las AC en células en metafase; no hay un requerimiento riguroso para el entrenamiento detallado del personal competente para este ensayo; esto permite mayor rapidez en el conteo de las preparaciones, además, como se pueden

analizar miles de células por tratamiento, le imparte mayor poder estadístico al ensayo. Por otra parte, como los MN pueden contener cromosomas completos, es posible detectar agentes inductores de aneuploidía, los cuales son muy difíciles de estudiar en el ensayo de AC convencionales (Fenech, 2000).

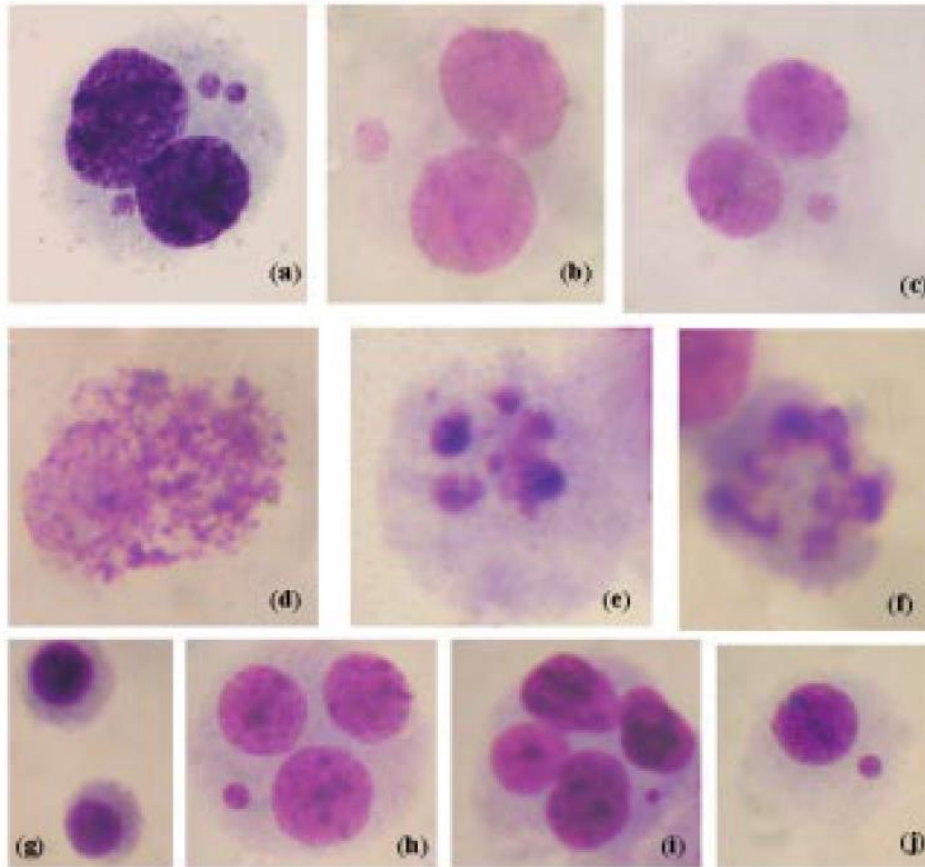


Figura 4. (a) (b) y (c) células binucleadas portadoras de MN; (d) (e) y (f) distintos estadios de células en vías de apoptosis; (g) células mononucleadas; (h) célula trinucleada portadora de MN; (i) célula tetranucleada portadora de MN, (j) célula mononucleada con MN. Tomado de Zalacain *et al* (2005).

2.3.3 Micronúcleos en linfocitos de sangre periférica.

La utilización de linfocitos de sangre periférica en estudios genotóxicos empleando MN para evaluar el daño provocado por mutágenos/carcinógenos está ampliamente reportado, desde 1976 en que Countryman y Heddle aplicaron el ensayo de MN *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, que para su obtención se requiere un método poco invasivo y que reflejan una exposición global del organismo a los agentes genotóxicos, ya que la sangre está en contacto directo con los distintos tejidos corporales (Pastor, 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 solamente viven 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 G₀, los hace un blanco ideal de estudio para que las alteraciones producidas no se pierdan y se puedan detectar (Pastor, 2002)

La frecuencia basal de MN 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 tanto en estudios *in vitro* como de biomonitorio de poblaciones expuestas y con animales como indicadores de exposición (Backer *et al.*, 2001).

2.3.4 Factores que afectan la frecuencia de micronúcleos.

Los factores que pueden alterar la frecuencia de MN son edad, sexo, en las mujeres la entrada en la menopausia y el posible desarrollo de osteoporosis (Landi *et al.*, 2000), adicción al tabaco, déficit de folato y de vitamina B12,

suplementar la dieta con agentes antioxidantes como vitamina E, vitamina C, caroteno, ginseng e incluso infusiones de té (Lee *et al.*, 1998), además del manejo adecuado de la técnica y de las muestras.

2.3.5 Evolución del ensayo.

Posteriormente se introdujeron una serie de modificaciones en el ensayo para la determinación de daño más específico, por ejemplo la utilización de inmunofluorescencia para la localización de regiones centroméricas en los MN, lo que permite discriminar entre agentes químicos clastogénicos y aneugénicos (Basso y Russo, 2000); la síntesis de ADN *in situ* con sondas (PRINS) (Koch *et al.*, 1989; Gosden *et al.*, 1991) empleada para la localización citogenética de secuencias de ADN, para diferenciar tres tipos de MN:

- a) Los que son inducidos por rompimientos cromosómicos.
- b) Los que provienen de una mala segregación de las cromátidas completas.
- c) Los que son resultado de una mala segregación de cromosomas completos.

El análisis de MN ha evolucionado en un robusto ensayo para daño genético con aplicaciones en ecotoxicología, nutrición, pruebas de sensibilidad a radiaciones y de determinación para riesgo de contraer cáncer, optimización de radioterapia, biomonitoreo de poblaciones humanas y prioritariamente para pruebas de nuevos fármacos y otros agentes químicos como disolventes orgánicos, metales pesados y plaguicidas, entre otros (Celik y Kanik 2006; Heuser *et al.*, 2007).

2.3.6 Criterios de selección en el ensayo de micronúcleos.

Existen criterios de selección para reconocer tanto las células en las que se realizará el registro 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, esto permite una mayor precisión del ensayo para detectar eventos genotóxicos (Fenech *et al.*, 2003; Zalacain *et al.*, 2005).

Las células que se deben considerar para evaluar la frecuencia de MN deben de tener las siguientes características:

- a) Deben ser binucleadas.
- b) Los dos núcleos de la célula binucleada deben tener su membrana nuclear intacta y estar dentro del mismo límite citoplásmico.
- c) Los dos núcleos de la célula binucleada deben ser de aproximadamente el mismo tamaño y con el mismo patrón e intensidad de tinción.
- d) Los dos núcleos pueden encontrarse unidos por un puente nucleoplásmico que no sea más amplio que $\frac{1}{4}$ del diámetro nuclear más grande.
- e) Los dos núcleos principales pueden tocarse pero lo ideal es que no se superpongan. Una célula con dos núcleos superpuestos puede ser contada solo si las membranas nucleares de cada uno se distinguen.
- f) Los límites citoplásmicos de la membrana de una célula binucleada deben estar intactos y distinguirse claramente de los de la célula adyacente (Fenech *et al.*, 2003).

Los MN deben ser morfológicamente idénticos que el núcleo principal pero más pequeños y reunir las siguientes características:

- a) El diámetro de los MN en linfocitos humanos varía entre $\frac{1}{16}$ y $\frac{1}{3}$ del diámetro del núcleo principal que corresponde al área de $\frac{1}{256}$ y $\frac{1}{9}$ del núcleo principal en una célula binucleada, respectivamente.
- b) Son de forma redonda u oval.
- c) No son refráctiles y por lo tanto pueden ser diferenciados de artefactos como partículas de tinción.
- d) No se encuentran unidos o conectados al núcleo principal.
- e) Pueden tocar pero no superponerse al núcleo principal y los límites del MN deben diferenciarse de los del núcleo principal.
- f) Usualmente tienen la misma intensidad de tinción que el núcleo principal, pero algunas veces puede ser más intenso (Fenech *et al.*, 2003).

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 (Fenech *et al.*, 2003; Zalacain *et al.*, 2005).

Los criterios para identificar las células apoptóticas son los siguientes:

- a) Las células en estado temprano de apoptosis pueden ser identificadas por la presencia de condensación de cromatina en el núcleo con membranas nuclear y citoplásmica intactas.
- b) Las células en estado tardío de apoptosis exhiben fragmentación nuclear en cuerpos nucleares más pequeños dentro de un citoplasma/ membrana citoplásmica intacta.
- c) La intensidad de tinción en el núcleo, los fragmentos nucleares y el citoplasma usualmente es mayor que en las células viables (Fenech *et al.*, 2003).

Por su parte las células necróticas presentan las siguientes características:

- a) Las células en estado de necrosis temprana pueden identificarse por la presencia de un citoplasma pálido con numerosas vacuolas (principalmente en el citoplasma y algunas en el núcleo) y una membrana citoplasmática dañada con un núcleo casi intacto.
- b) Las células en estado de necrosis tardía exhiben pérdida de citoplasma y membrana nuclear dañada o irregular con solo una estructura nuclear parcialmente intacta y usualmente material nuclear saliendo de la membrana nuclear.
- c) La intensidad de tinción del núcleo y el citoplasma es usualmente menor a la observada en células viables (Fenech *et al.*, 2003).

2.4 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 hijas a partir de una progenitora. De esta manera, la replicación debe ocurrir necesariamente antes de la segregación de los cromosomas y de la división celular para asegurar la fidelidad de transmisión de toda la información genética (Lodish, 2002).

El ciclo celular mitótico eucarionte habitual está dividido en dos fases bien definidas:

- a) Interfase: representa la parte del ciclo celular durante la cual las células sintetizan proteínas, crecen y duplican su ADN. Se conforma por el periodo conocido como G₁ (la G proviene del inglés *gap*, brecha o intervalo), la fase S (Síntesis) en la cual se lleva a cabo la replicación del ADN y otro intervalo denominado G₂ (Wolpert *et al.*, 2010).
- b) Fase M (Mitosis): es la parte del ciclo que consiste en el reparto equitativo del ADN seguido de la división celular; se presenta principalmente en las células somáticas (Blow y Tanaka, 2005).

La mitosis es el mecanismo de los eucariontes para repartir en forma equitativa el genoma en la división celular. Para realizar esta tarea, las células vegetales y animales construyen una máquina especializada, el aparato mitótico, que enlaza los cromosomas y luego los mueve y empuja hacia los polos opuestos de la célula en división (Maeshima y Eltsov, 2008). Aunque los acontecimientos de la mitosis transcurren de manera continua, por convención se dividen en cuatro subetapas que representan las fases de los movimientos cromosómicos (Pierce, 2009). De acuerdo con Maeshima (2008) y Márquez (2011) éstas son:

- a) Profase: los cromosomas se condensan y pueden verse con el microscopio óptico. Cada cromosoma posee dos cromátidas porque el ADN se ha

duplicado en la fase S. Se forma el huso mitótico, una matriz organizada de microtúbulos que mueven los cromosomas en la mitosis.

En este punto puede considerarse a la prometafase, la cual se caracteriza por la desintegración de la membrana nuclear. Los microtúbulos del huso, que hasta ese momento habían permanecido fuera del núcleo, ingresan en la región nuclear. Los extremos de los microtúbulos del cinetocoro entran en contacto con los cromosomas.

- b) **Metafase:** los cromosomas se ordenan en un solo plano en la región ecuatorial de la célula (placa metafásica) entre ambos centrosomas. Los centrosomas, ahora en los extremos opuestos de la célula con microtúbulos que irradian hacia afuera y se encuentran en el medio de la célula, están centrados en los polos del huso. Un punto de control del ensamblaje del huso garantiza que cada cromosoma se encuentre alineado sobre el plano ecuatorial de la metafase y fijado a las fibras del huso de los polos opuestos.
- c) **Anafase:** comienza cuando las cromátidas hermanas se separan y se mueven hacia los polos opuestos del huso. Los microtúbulos que conectan los cromosomas con los polos del huso están compuesto por subunidades de una proteína denominada tubulina. Cada una de las cromátidas se considera un cromosoma separado después de la separación.
- d) **Telofase:** es caracterizada por la llegada de los cromosomas a los polos del huso. La membrana nuclear se reorganiza alrededor de cada juego cromosómico, aparecen dos núcleos separados dentro de la célula y los cromosomas se relajan.

2.4.1 Puntos de control en la regulación del ciclo celular.

Para asegurar la integridad de la célula y su material genético, los procesos del ciclo celular deben ocurrir en una secuencia bien definida; ciertos fenómenos deben concluir antes de empezar otros. Las vías de señalización de la vigilancia

existen en el ciclo celular para asegurar el orden y el tiempo adecuados para llevar a cabo los procesos requeridos durante el ciclo celular (Lodish, 2002).

En general, la función de estos puntos de vigilancia es proporcionar el tiempo necesario para que termine alguna función; sin embargo ciertas lesiones en el DNA pueden inducir o activar un punto de vigilancia (Lodish, 2002).

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 catastrófico. Para reducir al mínimo la aparición de estos errores en los acontecimientos del ciclo celular, el progreso de una célula a través de él es verificado en puntos de control fundamentales. Los mecanismos de control que actúan en estos puntos aseguran que los cromosomas estén intactos y que cada etapa del ciclo celular se complete antes de que se inicie la siguiente (Lacadena, 1996).

2.4.2 Punto de control en G₁ y G₂.

Un factor relevante en el ciclo es la interfase G₁-S (denominado en los organismos multicelulares punto de restricción), en la cual la célula debe estar capacitada para completar todo el ciclo celular. Si estas condiciones no se presentan, entonces la célula se detiene en la fase G₁ (Lodish *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2004).

La detención en G₁ y G₂ de las células con daño en su ADN depende de un gen supresor de tumor y de un inhibidor de ciclina-cinasa. Los genes cuya inactivación contribuyen al desarrollo de un tumor se llaman genes supresores de tumores (Lodish *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2004).

Las células cuyo ADN es alterado por irradiación con luz UV, o por modificación química, se detienen en G₁ y G₂ hasta que se repare la lesión. La proteína p53 actúa en el punto de control frenando en G₁ las células humanas con daño en su ADN y contribuye a la retención en G₂. Las células con p53 funcional se retrasan

en G_1 o G_2 cuando son expuestas a irradiación γ , mientras que las células carentes de proteína p53 funcional siguen su ciclo (Lacadena, 1996).

Si el daño del ADN es extenso, la p53 también activa la expresión de genes que conducen a la apoptosis. Este proceso de muerte celular programada normalmente se desencadena en células específicas durante el desarrollo de los animales multicelulares. En los vertebrados, la respuesta de p53 evolucionó para inducir la apoptosis frente a un daño extenso del ADN, con el fin de impedir la acumulación de mutaciones múltiples que pudieran traer como resultado la aparición de una célula cancerosa (Lacadena, 1996).

Las células con mutaciones en ambos alelos de p53 no retrasan su entrada en la fase S después de un daño leve del ADN y no entran en apoptosis tras una lesión más extensa del ADN. Si en estas células se produce daño en el ADN, éste se puede replicar y así generar mutaciones y reordenamientos del ADN que contribuyen al desarrollo de una célula transformada metastásica (Lacadena, 1996).

2.4.3 Punto de control en mitosis.

Las células que no replican todos sus cromosomas no entran en mitosis. Para que el control sea más efectivo en estos puntos interviene el reconocimiento del ADN no replicado y la inhibición de la activación del factor promotor de la maduración. Aunque la capacidad del ADN no replicado para inhibir la entrada en la mitosis está bien documentada, poco se sabe aún sobre las proteínas que intervienen en este control (Kierszenbaum, 2008)

2.4.4 Organización incorrecta del huso mitótico.

Una señal de unión incorrecta a los cinetocoros o también una falla en la estructura del huso, previene la separación de los cromosomas y la salida de la mitosis mediante la inactivación del sistema de poliubiquitinización APC (complejo promotor de la anafase), que normalmente conduce a la degradación

del inhibidor de la anafase, necesaria para el inicio de ésta y más tarde a la degradación de las ciclinas mitóticas, que se requieren para la conclusión de la mitosis. Como consecuencia, la actividad del factor promotor de la maduración se mantiene alta, los cromosomas permanecen condensados y la envoltura nuclear no se reconstituye (Kierszenbaum, 2008).

2.5 Citocinas.

Muchas interacciones críticas entre las células del sistema inmune se controlan a través de mediadores solubles llamados citocinas (Parslow *et al.*, 2002).

Las citocinas son glicoproteínas de bajo peso molecular (15-30 kDa), contienen entre 120-180 aminoácidos, poseen la capacidad de modular las actividades funcionales de células individuales y de tejidos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana y sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica. Además, promueven la adhesión, la quimiotaxis, así como la activación de muchos tipos de poblaciones celulares, especialmente las del sistema inmune. Las principales fuentes de citocinas son los macrófagos, los neutrófilos y los linfocitos. La activación de las células se da por el reconocimiento de dichas citocinas a través de los receptores presentes en la superficie celular, los cuales son expresados por muchos tipos de células. Así, la liberación de una citocina puede estar inducida, potenciada o inhibida por otra citocina, que a su vez puede incrementar o inhibir la expresión de sus receptores (Gayo *et al.*, 2000).

En aspectos clínicos de las enfermedades, las citocinas son importantes como sustancias terapéuticas y como blancos de acción de antagonistas específicos en numerosas enfermedades inmunitarias e inflamatorias (Abbas *et al.*, 2008).

Los plaguicidas pueden interferir en las vías de señalización, lo cual resulta en cambios en la producción de citocinas, diferenciación y activación celular (Corsini

et al., 2011; Fukuyuma *et al.*, 2011). Para entender de una mejor manera el riesgo inmunotóxico que supone el uso de los plaguicidas, es necesario el empleo de marcadores inmunotóxicos, entre los que se incluyen el número de células inmunológicas los niveles de las citocinas (como el TNF- α) y otras proteínas de bajo peso molecular (como el factor de crecimiento TGF- β y el factor de transcripción NF- κ B) que estimulan o inhiben distintos procesos como la diferenciación, proliferación o función de las células inmunitarias (Schaalan *et al.*, 2012).

2.5.1 Factor de necrosis tumoral (TNF).

Es una citocina inflamatoria pleiotrópica, no glicosilada, de 17 kDa, que deriva de una de 26-27 kDa. En condiciones fisiológicas forma un homotrímero de 55 kDa que está ligado de manera no covalente (Aguillón *et al.*, 2001). Es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente a bacterias gram negativas y otros microorganismos infecciosos y es responsable de diversas complicaciones sistémicas de las infecciones graves. El nombre de esta citocina deriva de su identificación original como factor sérico que producía la necrosis de los tumores. El TNF se denomina TNF- α para distinguirlo de la citocina relacionada TNF- β , también denominada linfoxina (Abbas *et al.*, 2008).

El TNF- α es producido principalmente por monocitos, linfocitos, neutrófilos, y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, tales como los lipopolisacáridos (LPS). También puede ser producido por linfocitos T y B, NK, fibroblastos y mastocitos (Gayo *et al.*, 2000).

La principal función fisiológica del TNF es estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección y activar a estas células para fagocitar a los microorganismos (Abbas *et al.*, 2008).

Es un agente importante en la inmunidad del hospedero contra bacterias, ciertos hongos, virus e invasiones parasitarias. Es una molécula fundamental en la regulación de la respuesta inmune inflamatoria local, induce el crecimiento

tisular, la diferenciación de tejidos y la inmunorregulación (Janeway *et al.*, 1999).

En las infecciones graves, el TNF se sintetiza en grandes cantidades y produce alteraciones clínicas y patológicas sistémicas. Si el estímulo para la producción del TNF es suficientemente intenso, la cantidad de la citocina producida es tan grande que entra en el torrente sanguíneo y actúa en sitios distantes como hormona endocrina. De acuerdo con Abbas *et al.* (2008) las principales acciones sistémicas del TNF son las siguientes:

- a) Actúa sobre el hipotálamo induciendo fiebre y por tanto se denomina pirógeno endógeno.
- b) Actúa sobre los hepatocitos para aumentar la síntesis de algunas proteínas séricas, como la proteína A del amiloide sérico y el fibrinógeno.
- c) La síntesis prolongada de TNF produce adelgazamiento patológico del músculo y de las células grasas, denominada caquexia.
- d) Cuando se sintetizan grandes cantidades de TNF, se inhibe la contractilidad miocárdica y el tono del músculo liso vascular.
- e) Produce trombosis intravascular, principalmente como consecuencia de la pérdida de las propiedades anticoagulantes normales del endotelio.
- f) Causan modificaciones metabólicas graves, como disminución de glucosa sanguínea, incompatible con la vida.

Los receptores que interactúan con el TNF son el TNRF1 y TNRF2. En experimentos utilizando anticuerpos anti-TNF en ratones se demostró que las defensas del huésped bajaban considerablemente. También se observó que el TNRF1 era esencial para la supervivencia en infecciones por bacterias intracelulares como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* y *Salmonella typhimurium* (Pfeffer, 2003). En ratones knockout para el receptor TNRF1 se observó que son incapaces de controlar la replicación de *L. monocytogenes* en fagocitos, e incluso poca cantidad de este patógeno intracelular fue capaz de matar a estos ratones knockout. También se

realizaron experimentos utilizando *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major* en ratones knockout para el receptor TNFRF1 y se observó que estos ratones presentaban un mayor grado de inflamación y lesiones necróticas, lo cual indicó que el TNFRF1 juega un papel importante en el proceso inflamatorio (Pfeffer, 2003).

Así como, la inhibición del TNF puede llegar a generar diversas enfermedades, un aumento desmedido en los niveles de esta citocina, también puede generar enfermedades, incluyendo cáncer (Balkwill, 2006).

Diversos estudios han asociado el uso de plaguicidas con la oncogénesis (Noriega, 2005; Calviello y Piccioni, 2006). Asimismo otros estudios han revelado la relación entre la exposición a plaguicidas y la disminución en los niveles de algunas citocinas, entre las cuales está el TNF- α (Hooghe y Devos, 2000).

Hay evidencias importantes que vinculan al cáncer con la inflamación. Los mediadores químicos de la inflamación son encontrados en diversos tipos de cáncer; la eliminación de éstos ha inhibido el desarrollo y metástasis del cáncer. El uso de algunos compuestos anti-inflamatorios reduce el riesgo de mortalidad de algunos tipos de cáncer. Uno de los mediadores químicos implicados en los procesos de inflamación es el TNF- α . Actualmente, hay evidencia que indica que el TNF- α participa en la promoción y el progreso del cáncer. En experimentos en los cuales se ha eliminado o inhibido el TNF- α o su receptor, el TNFRF1, se reduce la incidencia de algunos tipos de cáncer. Estos experimentos indican la importancia del TNF- α en el desarrollo y metástasis del cáncer (Balkwill, 2006).

2.5.2 Factor de crecimiento transformante (TGF- β).

Es una proteína homodimérica multifuncional de 25 kDa. Es un factor esencial en la regulación de la respuesta inflamatoria desde su inicio hasta su total resolución (Letterio *et al.*, 1998; Monteon y Ligonio, 2008)

Existen varias isoformas designadas como TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 y TGF- β 5. Todas las isoformas del TGF- β son sintetizadas como precursores

diméricos y liberadas al medio extracelular como formas inactivas (latente) denominadas pro-TGF- β . A partir de estos precursores, se originan las isoformas maduras activas del factor, que también son diméricas siendo éstas las que ejercen sus efectos biológicos al unirse a sus receptores (Peralta, 2001).

El TGF- β es sintetizado por diversas células del sistema inmunológico, incluyendo los linfocitos, los monocitos, los macrófagos, los fibroblastos, los miocitos, los condrocitos, los astrocitos, las células epiteliales, las células de riñón, las células de placenta, las plaquetas, las células dendríticas y algunas células tumorales (Letterio *et al.*, 1998). También es un potente inhibidor de la proliferación de células epiteliales, endoteliales, linfoides y mieloides. Los efectos de las isoformas del TGF- β están asociados a su disponibilidad, a la combinación de los tipos de receptores y a la vía de señalización intracelular que inducen (Wrana *et al.*, 1992). Se conoce además, la participación de las proteínas transductoras de señales de la familia Smad en las vías de transducción inducidas por TGF- β . Estas proteínas tienen funciones inhibitoras y activadoras que median los efectos biológicos del TGF- β ; por lo tanto los Smads son un punto importante en la autorregulación de la señal del TGF- β (Barral *et al.*, 1995).

Normalmente el TGF- β es almacenado de manera latente dentro de la célula como un homodímero, el cual se encuentra unido en forma no covalente con la proteína asociada a latencia (LAP) y a la proteína de unión al TGF- β (LTBP). La unión de la citocina a su receptor requiere de la remoción de LAP, proceso que es catalizado *in vivo* por la plasmina o trombospondina e *in vitro* puede ser inducida por cambios en el pH o la temperatura (Omer *et al.*, 2000; Yu y Stamenkovic, 2000).

El TGF- β bioactivo se une a dos receptores (tipo I y II) en la célula blanco. El receptor tipo II fosforila y activa al receptor tipo I, el cual luego transduce la señal a las moléculas que intervienen en la señalización, dando lugar a la expresión de diferentes moléculas con una amplia actividad biológica (Wrana, 1994). La pérdida de cualquiera de ellos podría causar en la célula tumoral una incapacidad para responder a esta citocina; en consecuencia, estos receptores

tienen mutaciones o disminución de su expresión del gen o de la proteína en muchos cánceres humanos (Letterio y Robles, 1998).

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 que se encuentre como de su concentración. Cuando el TGF- β es liberado en concentraciones bajas, tiene propiedades pro-inflamatorias, e incluyen 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 (Monteon y Ligonio, 2008).

Sin embargo, a altas concentraciones es anti-inflamatorio, suprimiendo la elaboración del TNF- α y del óxido nítrico generado por los macrófagos, inhibe la producción de interferón gamma y TNF- α en las células asesinas naturales e indirectamente disminuye la expresión de antígenos clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, los cuales son estimulados por interferón gamma (Omer *et al.*, 2000).

El fino balance entre la liberación de esta citocina durante el proceso infeccioso e inflamatorio, y la relación entre sus concentraciones y el grado de diferenciación de los diferentes tipos celulares con los que interactúa, determinarán que la respuesta inflamatoria e inmunológica sea o no adecuada (Hernández *et al.*, 1997).

2.5.3 Factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B).

Se descubrió como una proteína que se une al potenciador de la cadena ligera κ de inmunoglobulinas en las células B. En un principio se creyó que este factor transcripcional era exclusivo de linfocitos B por haberse encontrado en el núcleo de este tipo celular. Sin embargo, ahora se sabe que se expresa de manera constitutiva en todas las células del sistema inmune (Haydn y Ghosh, 2004).

El NF- κ B se activa por varios estímulos como liposacáridos bacterianos, ésteres de forbol, virus, estrés oxidante, luz ultravioleta, radiación ionizante y drogas genotóxicas. Su activación se produce por las vías de señalización del receptor 1

del factor de necrosis tumoral (TNFR1), el receptor 1 de interleucina (IL-1R1), el receptor similar a Toll (TLR), el receptor de células B (BCR), el receptor de células T (TCR), receptor de linfotoxina β (LT β R), el factor activador de células B (BAFFR) y el grupo de diferenciación 40 (CD40) (Gloire *et al.*, 2006).

El NF- κ B forma parte de la familia Rel, constituida por cinco proteínas que contienen dominios homólogos y que forman entre ellas homo o heterodímeros. Estas proteínas son: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB; de éstas, solo las tres últimas tienen el dominio transactivador, indispensable para reconocer el promotor de los genes blanco (Beinke y Ley, 2004).

En células no estimuladas el NF- κ B se encuentra principalmente en el citoplasma donde es secuestrado mediante la interacción con proteínas inhibitoras de κ B (I κ Bs) (Gloire *et al.*, 2006). Los I κ Bs, en respuesta a estímulos con agonistas, son degradados por el proteosoma 26S, liberando los dímeros de NF- κ B, los cuales se translocan al núcleo y modulan la expresión génica (Chen y Green, 2004).

La familia de las cinasas de los inhibidores de NF- κ B (IKKs) está constituida por IKK α , IKK β e IKK γ o modulador esencial de NF- κ B (NEMO). Los inductores de NF- κ B, a través de diferentes receptores y proteínas adaptadoras, desencadenan señales que convergen en la activación del complejo IKK (Yamaoka *et al.*, 1998). Los homodímeros o heterodímeros de IKK α o IKK β fosforilan a las proteínas I κ Bs induciendo su ubiquitinación y degradación por el proteosoma permitiendo así la liberación de NF- κ B que se transloca al núcleo (Zandi *et al.*, 1997).

Aunque otras cinasas están involucradas en la fosforilación de las I κ Bs, las IKK se caracterizan por la rapidez de su activación, la acción simultánea sobre ambos residuos de serina en las I κ Bs y una preferencia por las serinas en relación a las treoninas (Lee y Burckart, 1998).

La activación del NF- κ B se da por cuatro rutas:

- a) Ruta clásica o canónica. Es inducida por una variedad de mediadores de respuesta inmune innata y adaptativa, tales como citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β), la activación del receptor similar a Toll (TLR) y los receptores de antígenos (TCR y BCR). Todas estas cascadas de señalización convergen en la activación de las proteínas IKK y en la degradación de I κ B α permitiendo la liberación de los heterodímeros p50/RelA y p50/c-Rel (Martin y Fresno, 2000; Weil e Israel, 2004; Gloire *et al.*, 2006).
- b) Ruta alternativa o no canónica. Ésta es independiente de NEMO, es inducida en respuesta al factor activador de células B (BAFF), LT β , ligando CD40, virus de leucemia humana tipo I de células T (HTLV) y virus de Epstein-Barr (EBV) y en ella participa la cinasa inductora de NF- κ B (NIK). NIK fosforila al homodímero IKK α 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 (Claudio *et al.*, 2002; Gloire *et al.*, 2006).
- c) Ruta inducida por luz ultravioleta. La activación de ésta es independiente de daño en el ADN, de la degradación de I κ B α y activación de las IKKs. En esta ruta I κ B α es fosforilada en una serina/treonina por la caseína II cinasa (CKII). La CKII es activada por la p38-MAPK en respuesta a estrés por luz UV. Esta vía desempeña un papel muy importante en la protección contra luz UV mediante la inducción de la expresión de genes antiapoptóticos dependientes de NF- κ B (Kato *et al.*, 2003).
- d) Ruta inducida en respuesta a daño en ADN y estrés oxidante. Los principales agentes inductores de estrés son los radicales libres de oxígeno y nitrógeno, ROS y NOR, respectivamente. Durante la respuesta inmune los eosinófilos, neutrófilos y macrófagos producen radicales libres (Conner

y Grisham, 1996). A diferencia de la ruta clásica en la que se presenta la ubiquitinación de NEMO, en esta ruta ocurre una modificación característica en el dominio de dedos de zinc de NEMO, uniéndose una molécula pequeña similar a la ubiquitina (SUMO) en las Lys 277 y 309, provocando la translocación de NEMO al núcleo, sin alterar su estabilidad (Huang *et al.*, 2003). En el proceso de transporte de NEMO al núcleo interviene el complejo conformado por la proteína con dominio de muerte inducida por p53 (PIDD) y la proteína interactuante de receptor (RIP). El ingreso de PIDD/RIP/NEMO al núcleo, permite la interacción de NEMO con la proteína de ataxia telangiectasia mutada (ATM), la cual se activa como respuesta a modificaciones en cromatina y daño en el DNA (Echeverri y Mockus, 2008). La relación entre NF- κ B y enzimas antioxidantes parece ser de gran importancia en la supervivencia celular. Se han encontrado elementos de unión a NF- κ B en los promotores de los genes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión. Estas enzimas participan en el control de los niveles de especies reactivas de oxígeno en la célula (Morales *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2003).

III. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, la integridad genética de la población humana se ha visto comprometida por la gran actividad industrial que provoca la exposición a productos químicos y agentes genotóxicos (Zalacain *et al.*, 2005). Idealmente los plaguicidas deberían afectar solo al organismo blanco; sin embargo, este deseo es raramente alcanzado debido a las similitudes en los procesos básicos de la vida del organismo blanco y de los no-blanco (Valencia *et al.*, 2013). En la actualidad, la exposición crónica a dosis bajas de plaguicidas se considera como uno de los factores de riesgo importantes para el desarrollo del cáncer (Magnarelli, 2015). Si bien el potencial carcinogénico de un plaguicida se evalúa antes de que su comercialización sea permitida, existe la presunción que el riesgo de genotoxicidad por exposición a estos tóxicos puede ser apreciablemente mayor que el predicho a partir de las pruebas de toxicidad (Collotta *et al.*, 2013). Tal es el caso del acaricida Envidor y del fungicida Scala, de los cuales no hay publicaciones científicas sobre los efectos genotóxico e inmunotóxico en cultivos de sangre periférica humana *in vitro*, por lo cual el presente estudio se realizó con la finalidad de obtener evidencias científicas que apoyen la regulación de su aplicación en campos agrícolas, la reducción en la exposición en seres humanos, y la contaminación del aire, suelo, agua y los alimentos.

IV. HIPÓTESIS

Diversos plaguicidas han demostrado ser capaces de producir efectos genotóxicos e inmunotóxicos en diversos sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*, es por ello que el acaricida Envidor y el fungicida Scala probablemente serán capaces de inducir daño al ADN evidenciado a través de la prueba de MN y daño inmunotóxico modificando la expresión de TNF- α , TGF- β y NF- κ B en linfocitos humanos en cultivo.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Evaluar los efectos genotóxico e inmunotóxico inducidos por el acaricida Envidor y el fungicida Scala, en linfocitos humanos de sangre periférica expuestos *in vitro*.

5.2 Objetivos particulares.

- 1.- Analizar el efecto genotóxico de los plaguicidas Envidor y Scala mediante la determinación de la frecuencia de MN y de núcleos apoptóticos.
- 2.- Detectar la expresión de TNF-alfa, TGF- β y NF- κ B en linfocitos periféricos expuestos a ambos compuestos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Plaguicidas comerciales Envidor y fungicida Scala.

Los plaguicidas fueron donados por Bayer Cropscience, México:

Envidor® es una suspensión concentrada (240g de i.a./L), su ingrediente activo es el 3-(2,4-Diclorofenil)-2-oxo-1-oxaspiro[4,5]dec-3-en-4-il 2,2-dimetilbutaonato.

No. de registro: RSCO-INAC-0103R-301-064-022.

Se utilizó a las siguientes concentraciones: 4.67×10^{-6} , 9.34×10^{-6} , 11.6×10^{-6} , 14.01×10^{-6} , 23.3×10^{-6} mM.

Scala® es una suspensión concentrada (600g de i.a./L), su ingrediente activo es N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)anilina. No. de registro: RSCO-FUNG-0301G-301-064-055.

El compuesto se utilizó a las siguientes concentraciones: 1.20×10^{-5} , 2.41×10^{-5} , 4.82×10^{-5} , 6.03×10^{-5} , 12.06×10^{-5} mM.

6.2 Citotoxicidad de los plaguicidas Scala y Envidor.

Para obtener información acerca de las propiedades citotóxicas y citostáticas de los plaguicidas se calcularon el índice de división nuclear (IDN) y el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) (Kirsch, 2003) de la siguiente manera:

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

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

Se determinó la citotoxicidad inducida por los plaguicidas empleando el IPBC del testigo (IPBC_c) y el de los tratamientos (IPBC_T) (Kirsch, 2003) con la siguiente fórmula:

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

6.3 Ensayo de micronúcleos.

Se obtuvo una muestra de 18 mL de sangre periférica heparinizada de un donador sano voluntario (no fumador, ni que ingiriera bebidas alcohólicas) y joven, se centrifugó la muestra y con una pipeta Pasteur estéril se recuperó la capa de células nucleadas.

En la campana de flujo laminar se adicionaron 400 µL del centrifugado en siete microtubos estériles, más 4 mL de medio RPMI1640 suplementado con fitohemaglutinina (2%) y penicilina-streptomina (0.5%) a un volumen final de 5 mL. Las muestras se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se agregaron 4.67 X 10⁻⁶, 9.34 X 10⁻⁶, 11.6 X 10⁻⁶, 14.01X10⁻⁶, 23.3 X 10⁻⁶ mM del acaricida Envidor y 1.20 X 10⁻⁵, 2.41 X 10⁻⁵, 4.82 X 10⁻⁵, 6.03 X 10⁻⁵, 12.06 X 10⁻⁵ mM del fungicida Scala. Se preparó un testigo positivo con Bleomicina (32 µg/mL) y un testigo negativo con sangre periférica más medio RPMI 1640 sin plaguicida. Las muestras se incubaron a 37°C por 24 horas.

A las 44 horas después de la siembra a todos los tubos se les agregó citocalasina B (4.5 µg/mL). Las muestras se incubaron a 37°C por 24 horas más.

Al cumplir las 72 horas se realizó la cosecha de los cultivos. Las muestras se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con PBS estéril. El botón de cada una de las muestras se dividió en dos partes, una se utilizó para realizar las laminillas para el ensayo de MN y la otra se mantuvo en PBS (pH 7.5) a -80°C para realizar la detección de TNF-α, TGF-β y NF-κB por RTq-PCR.

La parte que se utilizó para los MN se prefijó con 1 mL de fijador Carnoy (3:1) y se procedió a centrifugar las muestras a 1,500 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 5 mL del fijador Carnoy resuspendiendo el botón celular y las muestras se centrifugaron a 1,500 rpm por 10 minutos. Este paso se repitió dos veces más. Para realizar las preparaciones, en la última centrifugación utilizando una pipeta Pasteur estéril se retiraron 4.5 mL del sobrenadante y con los 500 μ L restantes se resuspendió el botón celular. Posteriormente, empleando la técnica de goteo se realizaron las laminillas y se dejaron secar al aire libre.

Las muestras se tiñeron con Giemsa al 5% y se observaron en el microscopio óptico a 40X para analizar

- a) Porcentaje de MN en 2,000 células.
- b) Porcentaje de núcleos apoptóticos en 1,000 células.

6.4 Evaluación de la expresión del TNF- α , TGF- β y NF- κ B.

6.4.1 Extracción de ARN.

Se aisló ARN total de linfocitos periféricos humanos expuestos previamente a las cinco concentraciones de los dos plaguicidas mediante el procedimiento de Trizol. A cada botón celular se le agregaron 500 μ L de Trizol y se dejaron reposar por 10 min. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm y se agregaron 100 μ L de cloroformo, se agitaron y se dejaron reposar por 10 min. Se realizó una segunda centrifugación a 10,000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se le agregaron 250 μ L de isopropanol y 1 μ L de glucógeno. Se agitaron y se dejaron reposar por 10 min para centrifugar a 10,000 rpm por 5 min. Se decantó, se agregaron 200 μ L de etanol (75%) y se centrifugaron. Por último se decantó y las muestras se dejaron en baño seco a 40°C.

6.4.2 Cuantificación de ARN.

Una vez aislado el ARN, se le agregaron 20 μL de agua inyectable a cada muestra y se cuantificaron en 1 μL la cantidad de ARN por espectrofotometría (absorbancia de 260-280 nm) con el NanoDrop ND-100. Posteriormente, se realizaron los cálculos para tener en cada 3 μL de muestra 200 ng de ARN.

6.4.3 Síntesis de cDNA o templado

En un volumen final de 7.5 μL (4.5 μL de solución para la síntesis de cDNA más 3 μL de ARN) se realizó la síntesis de cDNA siguiendo el protocolo del Kit Fermentas en un termociclador “Thermal cycler MJ mini”.

6.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).

El PCR en tiempo real se realizó en un equipo de la marca Stratagen Mx 300 SP, Agilent Technologies, siguiendo el protocolo del Kit SYBR Green.

El SYBR Green es un colorante, el cual se intercala a las bases de ADN de doble cadena. En cuanto se genera una molécula nueva de ADN, este agente se incorpora a la molécula y la señal fluorescente que genera es detectada por el termociclador. Para corroborar que la fluorescencia registrada corresponde al templado de interés, se establecerá un segmento de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C y 30 s a 95°C para la curva de disociación.

Cada muestra se corrió por triplicado colocando 18 μL de la mezcla de SYBR Green más 2 μL del cDNA y un testigo (NTC), es decir sin el templado para los oligos.

Tabla 6. Secuencia de los oligos de cada gen utilizado en la reacción de RT-qPCR.

GEN	SECUENCIA DEL PRIMER
TNF- α	AGGCGGTGCTTGTTTCCTCA
	GCCGATCACTCCAAAGTGC
TGF- β	TGCTAATGGTGGAAACCCAC
	GAAGCTCTGATGTGTTGAAG
NF-kB	AGAACCTGGGAATCCAGTGT
	GAACTTGGAAGGGGTTGTTG

6.5 Análisis Estadístico.

Los valores promedio de MN en células binucleadas, la expresión del TNF- α , TGF- β y NF-kB serán obtenidos de tres experimentos independientes de los lotes experimentales y de los testigos, y se expresaron como promedios \pm error estándar (E.E), a los cuales se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.05$ y la prueba de Tukey para evaluar si las diferencias fueron significativas entre el testigo y los grupos experimentales.

VII. RESULTADOS.

7.1 Genotoxicidad, citotoxicidad e inmunotoxicidad *in vitro* del acaricida Envidor en linfocitos de sangre periférica humana.

En la tabla 7 se muestran los promedios para el índice de división nuclear (IDN), el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) y el porcentaje de citotoxicidad relativa.

Los resultados muestran que el IDN y el IPBC disminuyeron significativamente en las células crecidas en presencia de Bleomicina (testigo positivo) al compararse con el testigo negativo. Para los experimentos de exposición con el acaricida Envidor, las concentraciones 9.34×10^{-6} , 11.6×10^{-6} , 14.01×10^{-6} y 23.3×10^{-6} mM mostraron disminución en ambos índices con respecto al testigo negativo y fueron significativas ($p < 0.05$).

Tabla 7. Efectos de Envidor sobre el IDN, el IPBC, y la citotoxicidad relativa a diferentes concentraciones.

Envidor (mM)	IDN ^a	IPBC ^b	Citotoxicidad relativa %
0	1.86 ± 0.02	1.85 ± 0.03	0
4.67 X 10 ⁻⁶	1.99 ± 0.03	1.92 ± 0.02	0
9.34 X 10 ⁻⁶	1.70 ± 0.02*	1.68 ± 0.02*	19.88
11.6 X 10 ⁻⁶	1.70 ± 0.03*	1.69 ± 0.03*	18.71
14.01X10 ⁻⁶	1.63 ± 0.02*	1.62 ± 0.02*	26.43
23.3 X 10 ⁻⁶	1.61 ± 0.01*	1.60 ± 0.01*	29.23
Bleomicina	1.60 ± 0.06*	1.56 ± 0.05*	34.50

a Índice de división nuclear.

b Índice de proliferación de bloqueo de la citocinesis.

*Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey (p<0.05) entre el testigo negativo y los tratamientos.

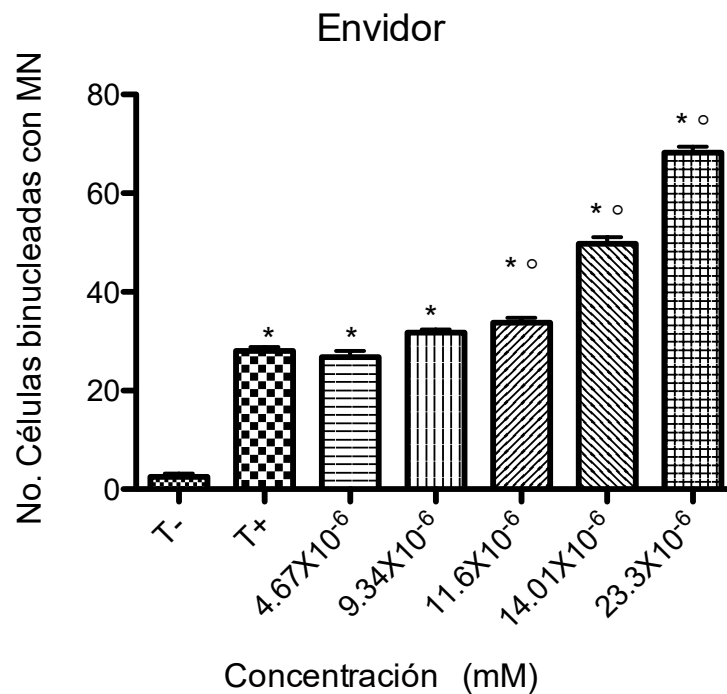


Figura 5. Media de la frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas de los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* al acaricida Envidor.

Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm EE$ de la frecuencia de micronúcleos de tres experimentos independientes.

*Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$) entre el testigo negativo y los tratamientos.

° Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$) entre el testigo positivo y los tratamientos.

En la figura 5 se muestra un aumento significativo en la frecuencia de MN en todas las concentraciones de exposición a Envidor al compararlas con el testigo negativo. Además se muestra un aumento significativo en el número de células binucleadas con MN en las tres concentraciones más altas al compararlas con el testigo positivo.

Envidor

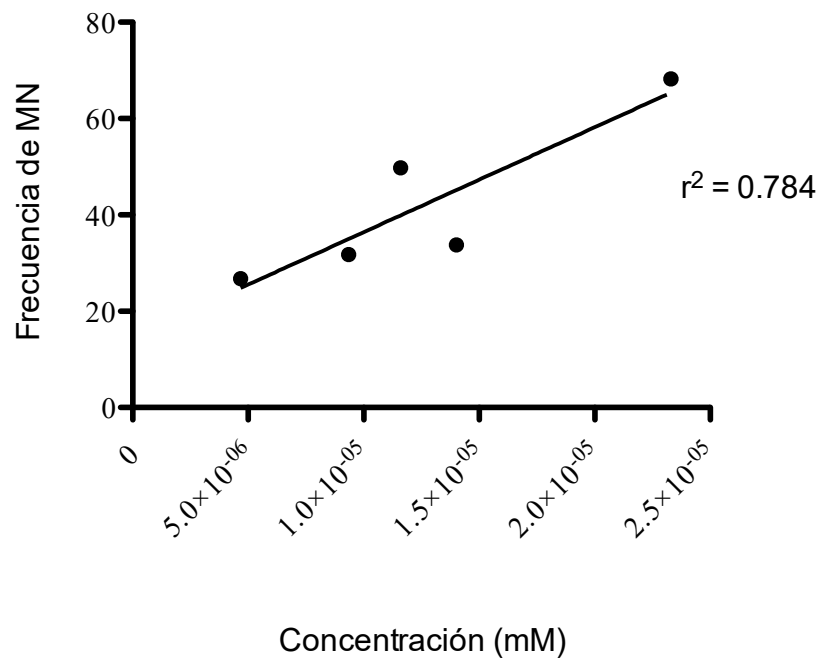


Figura 6. Correlación lineal de la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* al acaricida Envidor.

El análisis de regresión lineal de la frecuencia de MN y la concentración del plaguicida, indica la existencia de una respuesta concentración-efecto.

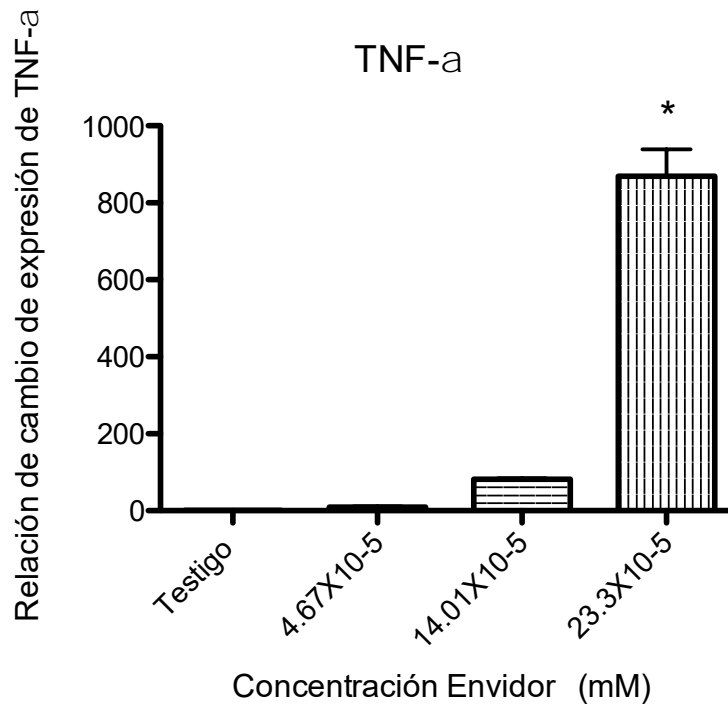


Figura 7. Media del cambio de magnitud de expresión de TNF- α en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* al acaricida Envidor.

Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm DE$ del cambio de magnitud de la expresión de TNF- α de tres experimentos independientes.
 *Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$) entre el testigo negativo y los tratamientos.

En la figura 7 se muestra un aumento en la expresión de TNF- α . Cambio significativo solo en la concentración más alta al compararla con el testigo para el compuesto Envidor.

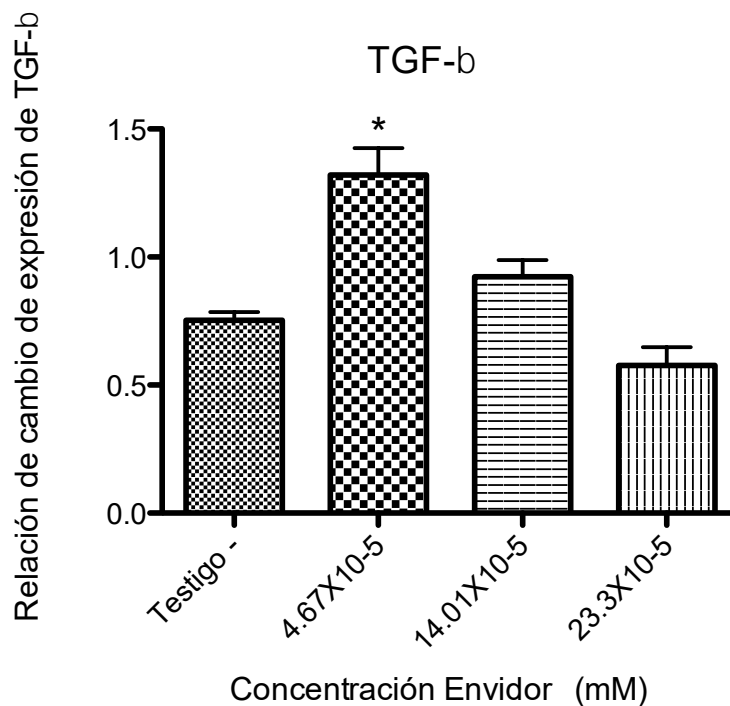


Figura 8. Media del cambio de magnitud de expresión de TGF-β en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* al acaricida Envidor.

Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm EE$ del cambio de magnitud de la expresión de TGF-β de tres experimentos independientes.

*Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$) entre el testigo negativo y los tratamientos.

La figura 8 muestra un aumento importante por efecto del compuesto Envidor en la expresión relativa de TGF-β y se observa que en la concentración más baja al compararla con el testigo, la diferencia fue significativa ($p < 0.05$).

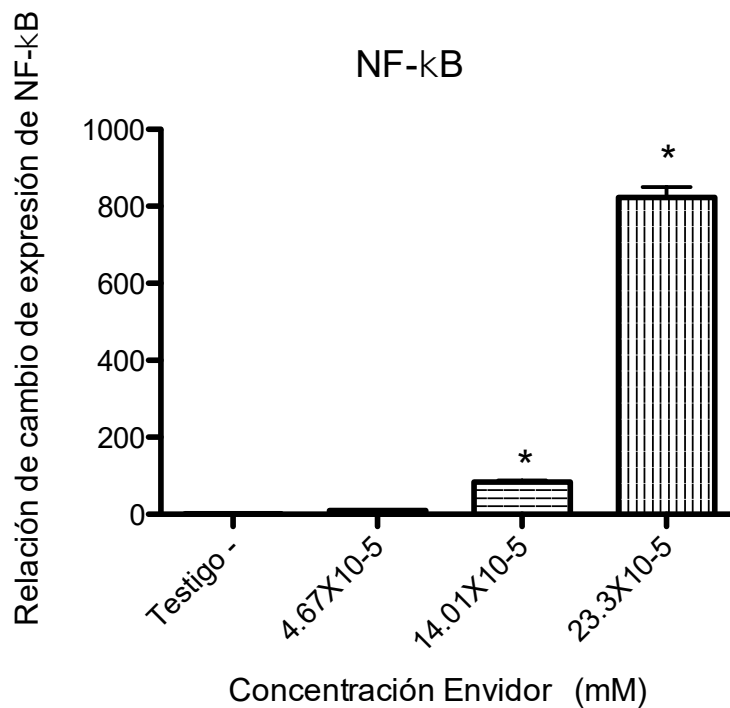


Figura 9. Media del cambio de magnitud de expresión del NF-κB en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* al acaricida Envidor.

Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm EE$ del cambio de magnitud de la expresión del NF-κB de tres experimentos independientes.

*Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$) entre el testigo negativo y los tratamientos.

Como se puede apreciar en la figura 9 existe un aumento en la expresión de NF-κB en las últimas dos concentraciones debido al efecto de Envidor, que al compararlas con el testigo fueron significativas ($p < 0.05$).

7.2 Genotoxicidad, citotoxicidad e inmunotoxicidad *in vitro* del fungicida Scala en linfocitos de sangre periférica humana.

En la tabla 8, se muestran los resultados obtenidos para el índice de división nuclear (IDN), el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) y el porcentaje de citotoxicidad relativa.

Los resultados muestran que tanto el IDN como el IPBC disminuyeron significativamente en las células crecidas en presencia de Bleomicina (testigo positivo) al compararse con el testigo negativo. Para los experimentos de exposición con el fungicida Scala, las concentraciones 1.20×10^{-5} y 2.41×10^{-5} , mostraron diferencias significativas en el IDN al compararlas con el testigo negativo.

Tabla 8. Efectos de Scala sobre el IDN, el IPBC y la citotoxicidad relativa a diferentes concentraciones.

Scala (mM)	IDN ^a	IPBC ^b	Citotoxicidad relativa %
0	1.86 ± 0.02	1.85 ± 0.03	0
1.20 X 10 ⁻⁵	2.12 ± 0.04*	2.03 ± 0.03	0
2.41 X 10 ⁻⁵	2.08 ± 0.11*	2.00 ± 0.09	0
4.82 X 10 ⁻⁵	1.99 ± 0.03	1.93 ± 0.07	0
6.03 X10 ⁻⁵	1.85 ± 0.07	1.82 ± 0.02	3.97
12.06 X 10 ⁻⁵	1.84 ± 0.02	1.82 ± 0.02	4.09
Bleomicina	1.60 ± 0.06*	1.56 ± 0.05*	34.50

a Índice de división nuclear.

b Índice de proliferación de bloqueo de la citocinesis.

*Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey (p<0.05) entre el testigo negativo y los tratamientos.

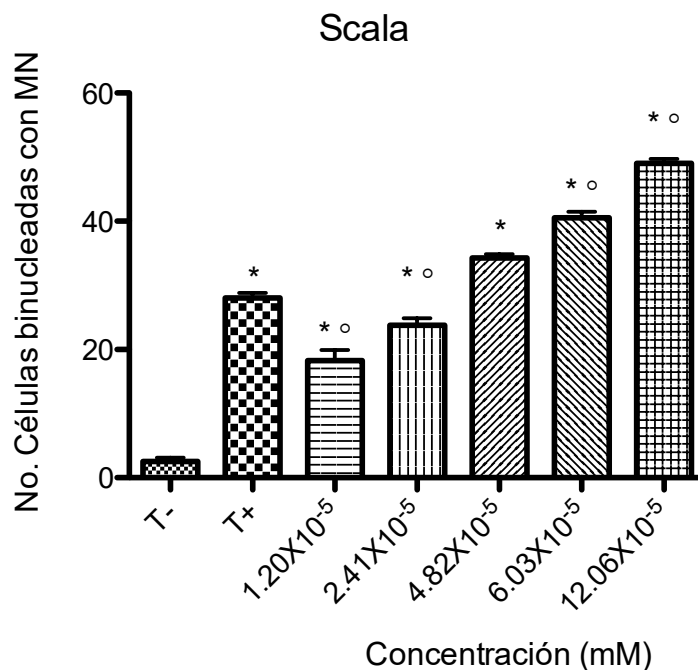


Figura 10. Media de la frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas de los linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* al fungicida Scala.

Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm EE$ de la frecuencia de micronúcleos de tres experimentos independientes.

*Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$) entre el testigo negativo y los tratamientos.

° Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$) entre el testigo positivo y los tratamientos.

En la figura 10 se muestra un aumento significativo en la frecuencia de MN en todas las concentraciones de exposición a Scala al compararlas con el testigo negativo. Además se nota un aumento significativo en el número de células binucleadas con MN en las dos concentraciones más altas al compararlas con el testigo positivo ($p < 0.05$).

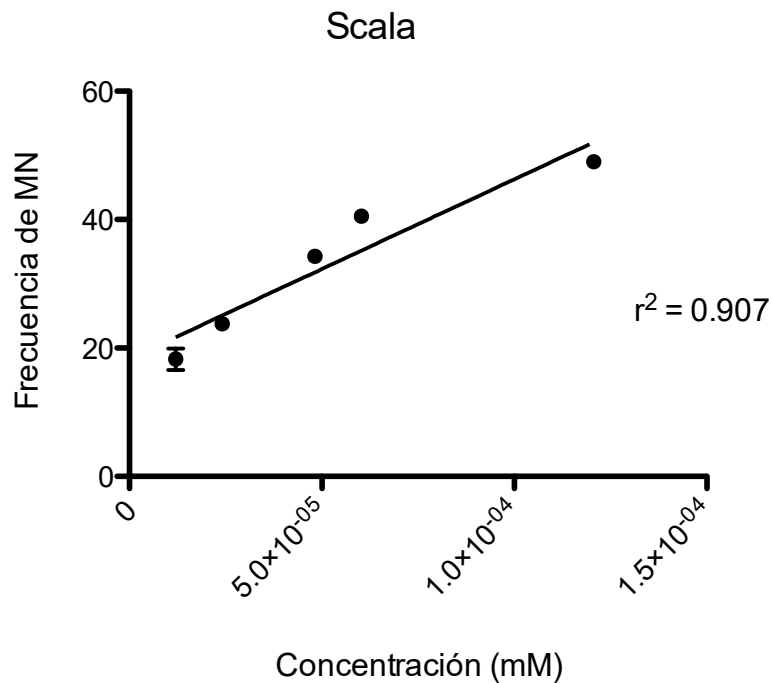


Figura 11. Correlación lineal de la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana expuestos *in vitro* al fungicida Scala.

El análisis de regresión lineal de la Figura 11 muestra que frecuencia de MN guarda una relación con la concentración del plaguicida, ya que revela una correlación de 0.907. Lo que indica la existencia de una respuesta concentración-efecto inducida por el compuesto Scala.

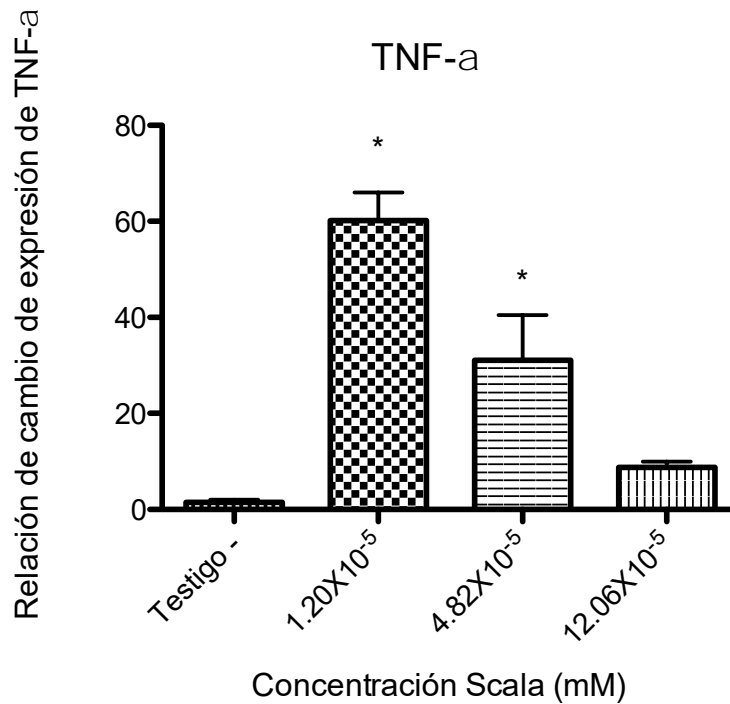


Figura 12. Media del cambio de magnitud de expresión de TNF- α en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* al fungicida Scala.

Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm DE$ del cambio de magnitud de la expresión de TNF- α de tres experimentos independientes.

*Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$) entre el testigo negativo y los tratamientos.

En la figura 12 se muestra un aumento significativo en la expresión de TNF- α a 1.20×10^{-5} y a 4.82×10^{-5} mM de Scala y que al compararlas con el testigo estas diferencias fueron significativas ($p < 0.05$).

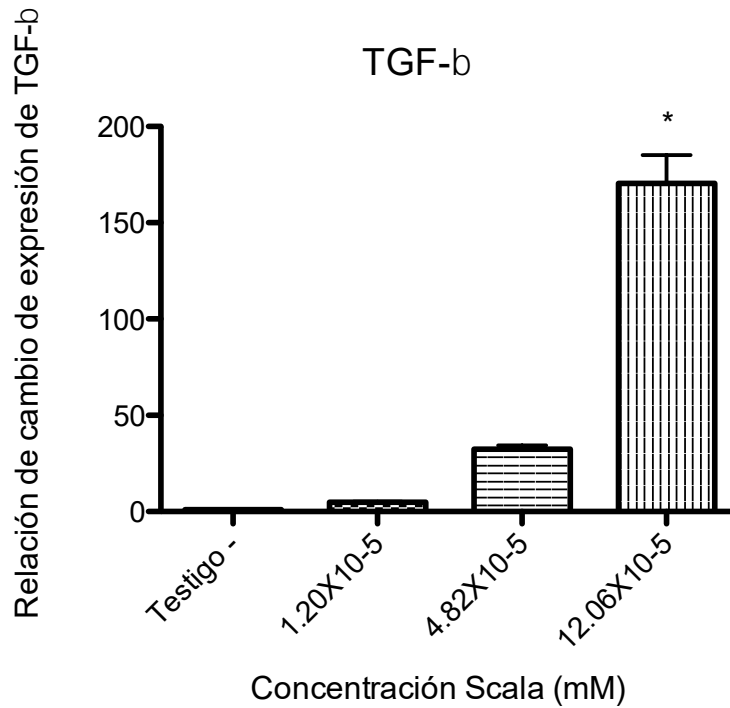


Figura 13. Media del cambio de magnitud de expresión de TGF-β en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* al fungicida Scala.

Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm DE$ del cambio de magnitud de la expresión de TGF-β de tres experimentos independientes.

*Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$) entre el testigo negativo y los tratamientos.

En la figura 13 se muestra un aumento en la expresión del gen TGF-β conforme aumenta la concentración del compuesto Scala y solo a 12.06×10^{-5} la diferencia fue significativa con respecto al testigo ($p < 0.05$).

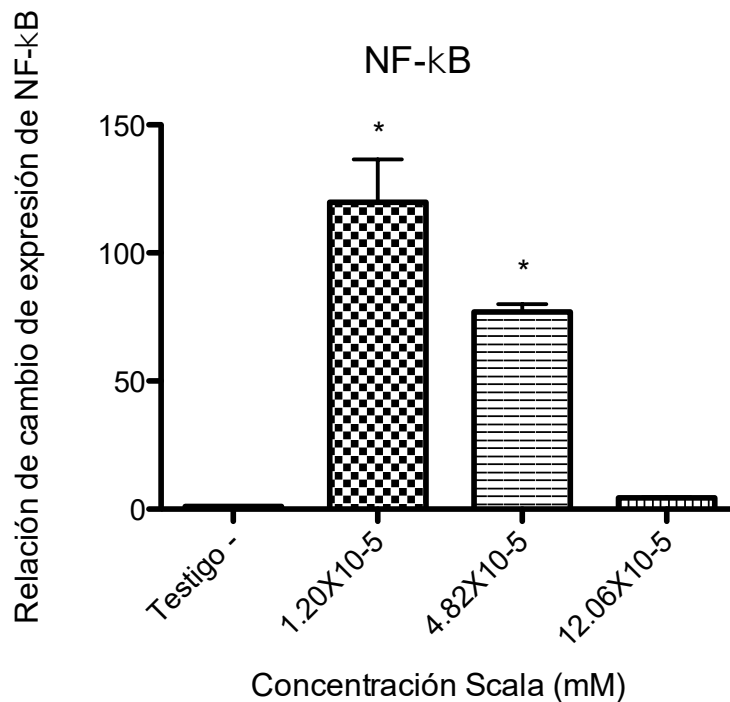


Figura 14. Media del cambio de magnitud de expresión del NF-κB en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* al fungicida Scala.

Las barras representan los valores de la $\bar{X} \pm DE$ del cambio de magnitud de la expresión del NF-κB de tres experimentos independientes.
 *Diferencia significativa ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$) entre el testigo negativo y los tratamientos.

Como se puede observar en la figura 14, en la concentración de 1.20×10^{-5} se observa el mayor aumento en la expresión del gen del NF-κB, siendo esta la concentración más baja del compuesto Scala, mientras que en la concentración de 4.82×10^{-5} empieza a disminuir la expresión del gen, sin embargo ambas concentraciones generaron una diferencia que al ser comparada con el testigo fue significativa ($p < 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluaron los efectos genotóxico e inmunotóxicos del acaricida Envidor y del fungicida Scala mediante la cuantificación de parámetros indicadores de daño al ADN. El porcentaje de micronúcleos en 2000 células binucleadas por concentración en linfocitos de sangre periférica humana *in vitro*, mediante el empleo del ensayo de BCMN, el IDN y el IPBC y la expresión de las citocinas TNF- α , TGF- β y NF- κ B por RTq-PCR.

Los resultados del análisis genotóxico de los dos plaguicidas en los linfocitos periféricos humanos *in vitro* evidencian que ambos plaguicidas provocan daño al ADN, aumentando significativamente la frecuencia de MN en células binucleadas en todas las concentraciones con respecto al testigo negativo, lo cual implica que tanto Scala como Envidor son agentes genotóxicos.

Los resultados del análisis citotóxico del cultivo de linfocitos periféricos humanos *in vitro* expuestos a Envidor indican que el compuesto modifica la cinética de proliferación, lo que se evidencia en cambios en el IDN que disminuye de forma significativa en las últimas cuatro concentraciones, demostrando así que es un agente químico citotóxico, sin embargo no exhibe un efecto subletal ni letal al no disminuirlo en un 20 % o 50 %, respectivamente.

Los resultados del análisis citotóxico del cultivo de linfocitos periféricos humanos *in vitro* expuestos a Scala indican que este compuesto modifica la cinética de proliferación celular, al aumentar significativamente los índices de división nuclear en las primeras dos concentraciones, lo cual puede tener como consecuencia un evento dañino para las células, llevando a una proliferación descontrolada.

Estos resultados concuerdan con los que se han obtenido para diversos tipos de plaguicidas como los organofosforados, carbámicos, piretroides, triazinas, (Barbosa y Bonin 1994; Gómez *et al.*, 2000; Bolognesi *et al.*, 2002; Pastor *et al.*, 2002) y organoclorados (Bolognesi *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 2000) utilizando

diferentes tipos de ensayos genotóxicos como el ensayo de MN, el ensayo cometa, ICH y AC.

En un estudio *in vitro* utilizando el epóxido de hepatocloro observaron que a 100, 125 y 150 μM aumenta la frecuencia de MN en cultivos de linfocitos humanos expuestos por 36 horas y disminuye el IDN (Alejandres *et al.*, 2013). El Temefos, un plaguicida organofosforado probado a concentraciones bajas de 0.5, 1, 2, 5 y 10 μM . A 10 μM disminuyó el índice nuclear, aumentó la longitud de la cola del cometa, momento de la cola, momento de la cola de olive y el porcentaje de ADN en la cola del cometa respecto al testigo negativo (Verdín *et al.*, 2013). El Malation, otro plaguicida organofosforado ha demostrado ser un agente genotóxico al provocar daños severos a nivel corporal y tisular en el aparato reproductor de *Eisenia foetida* tratada con 0, 10, 20, 24, 30, 35, 40 y 50 μL del plaguicida por 15 días. Este plaguicida además evitó que las lombrices realizaran sus actividades biológicas, entre ellas la reproducción (Regalado y Rodríguez, 2013). En el caso del Diazinón evaluaron su efecto sobre el cultivo de linfocitos de sangre periférica humana. Los linfocitos aislados se incubaron en medio de cultivo por 24, 48 y 72 horas y fueron expuestos a 5, 10, 15, 30, 50 μM . Observaron un aumento en la proliferación a 5 μM y una disminución en el número de células viables a 10, 15, 30 y 50 μM . Visualizaron de forma ocasional, células con indicios de necrosis y apoptosis (Castillo *et al.*, 2009).

Otro grupo que ha demostrado una acción genotóxica muy importante son los plaguicidas carbámicos. En un estudio realizado se evaluó el efecto del Lannate-90 y Primor-50 utilizando como bioensayo la frecuencia de ICH en linfocitos humanos. En el caso del Primor-50 se probó su efecto a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 y 100 ppm, mientras que Lannate-90 se probó a 0, 500, 750, 1000, 1500, 2000 y 2500 ppm (Valencia, 2000). A las 48 horas Primor-50 provocó un aumento en ICH a partir de 50 ppm, mientras que Lannate produjo ICH a partir de 250 ppm. A partir de 500 ppm el Primor-50 indujo retraso en la cinética de proliferación celular evidenciado por la disminución del índice de replicación. Lannate-90 no

causó retraso en la cinética de proliferación celular, pero a 1000 ppm provocó la muerte celular (Valencia, 2000).

También se ha demostrado que los fungicidas son agentes genotóxicos importantes. En un estudio realizado con el Antracol WP70 evaluaron el daño al ADN usando el ensayo de AC utilizando cultivos de linfocitos humanos y los expusieron a concentraciones de 0.02 mg/mL, 1.25 mg/mL y 2.5 mg/mL del plaguicida. Observaron un aumento en el número de AC en las concentraciones media y alta. Sin embargo el análisis estadístico marcó que no era una diferencia significativa (Hernán *et al.*, 2008).

En otro trabajo empleando el ensayo cometa se evaluó el efecto de los fungicidas Imazalil y Thiabendazole y del insecticida Clorpirifos en linfocitos humanos, usaron concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 µg/mL por 30 minutos a 37°C. El fungicida Imazalil y el insecticida Clorpirifos indujeron daño al ADN evidenciado por un aumento en la frecuencia de cometas (Vindas *et al.*, 2004).

El fungicida Rovral mostró elevación significativa en la frecuencia de MN en linfocitos coincubados con 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 % por 16 horas, concentraciones que son aplicadas en los campos agrícolas (Gadeva y Dimitrov, 2008).

Muchos de los estudios realizados con plaguicidas se han hecho en poblaciones expuestas, como ejemplo de esto se tiene un trabajo realizado por Bernardia Natali *et al.* (2014), en el cual encontraron una incidencia alta de MN en niños que viven cerca de las zonas agrícolas. También se ha evidenciado una mayor incidencia de MN en trabajadores expuestos que no poseen ningún tipo de protección (Luna *et al.*, 2007). Si bien estos estudios son de gran importancia, la mayoría de estas personas están expuestas a mezclas de plaguicidas y no es posible establecer la relación entre cierto tipo de compuesto y el daño que este pueda ocasionar, de ahí la importancia de que también se realicen estudios *in vitro* en líneas celulares para determinar la posible genotoxicidad, inmunotoxicidad y citotoxicidad de los plaguicidas por separado.

Paralelamente al análisis genotóxico, se detectó la acción inmunotóxica de los plaguicidas Scala y Envidor mediante la expresión de las citocinas TNF- α , TGF- β y NF- κ B.

Los estudios disponibles sugieren que muchos plaguicidas pueden actuar como inmunomoduladores, al provocar dos tipos de efectos adversos:

- a) Inmunosupresión. Aumenta el riesgo de incidencia de enfermedades infecciosas.
- b) Inmunoestimulación. Provoca hipersensibilidad y autoinmunidad (Corsini *et al.*, 2013).

Los niños son los más susceptibles a los efectos adversos, como infecciones, alergias y leucemias (Philips, 2000; Corsini *et al.*, 2008). Además, estos efectos también se pueden observar en la población general y en los trabajadores ocupacionalmente expuestos. Lo cual se ha descrito que se debe a una modificación en los perfiles Th1/Th2 de las citocinas (Duramad *et al.*, 2007; Corsini *et al.*, 2013).

Los plaguicidas también pueden interferir en las vías de señalización, lo cual resulta en cambios en la producción de citocinas, diferenciación y activación celular (Corsini *et al.*, 2011; Fukuyuma *et al.*, 2011).

Diversos estudios indican un posible rol de la alteración de la función inmune provocada por la exposición a plaguicidas y la incidencia de cáncer (Vesely *et al.*, 2011; Corsini *et al.*, 2013). Luster *et al.* (1993), mencionan que si un compuesto es inmunotóxico es muy probable que también sea carcinogénico, por el contrario, si un compuesto no es inmunotóxico, el estado carcinogénico se vuelve menos claro.

La información obtenida de modelos animales e incluso del mismo ser humano expuestos a plaguicidas indica una interferencia en el proceso de inmunovigilancia, cuya función es prevenir el crecimiento de diversos tipos de tumores, afectando la actividad de las células NK, macrófagos, linfocitos citotóxicos, producción de citosinas, el reconocimiento y destrucción de células

anormales, facilitando así la progresión tumoral (Luster *et al.*, 1993; Corsini *et al.*, 2008; Corsini *et al.*, 2013).

No se conocen todos los efectos que causan los plaguicidas al sistema inmune, lo cual provoca un atraso en la regulación de medidas preventivas. Para entender de una mejor manera el riesgo inmunotóxico que supone el uso de diferentes compuestos químicos, incluidos los plaguicidas, es necesario el empleo de marcadores inmunotóxicos, entre los que se incluyen el número de células inmunológicas y los niveles de las citocinas, proteínas de bajo peso molecular que estimulan o inhiben distintos procesos como la diferenciación, proliferación o función de las células inmunitarias (Schaalan *et al.*, 2012).

En el caso del cultivo de linfocitos de sangre periférica expuestos *in vitro* al acaricida Envidor se observa una inmunoestimulación del TNF- α a mayor concentración del plaguicida. Estos resultados concuerdan con los encontrados para los insecticidas organoclorados, organofosforados, piretroides y carbámicos (Michielsen *et al.*, 1999; Vine *et al.*, 2000; Thrasher *et al.*, 2002; Galloway y Handy, 2003; Whalen *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 2004; Vandana *et al.*, 2008; Corsini *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2013; Ojha y Srivastava, 2014), en los cuales se ha visto un aumento en la producción de TNF- α . También se ha mencionado una relación en el aumento de la expresión del TNF- α y los procesos de alergia. Esto se observó en dos plaguicidas, el Paraquat y el Clornitrofen (Sato *et al.*, 1998; Paolillo *et al.*, 2011), los cuales incrementan la producción de histamina y TNF- α en mastocitos, determinando así el papel de los plaguicidas y la expresión de citocinas en las enfermedades alérgicas.

La activación del NF- κ B se da por cuatro rutas, una de ellas, la ruta clásica, es inducida por mediadores de la respuesta inmune, tales como citocinas proinflamatorias como el TNF- α (Martin y Fresno, 2000; Weil e Israel, 2004; Gloire *et al.*, 2006). Los resultados para el factor de transcripción NF- κ B de los cultivos de linfocitos humanos expuestos al acaricida Envidor muestran un aumento en su expresión, indicando una posible activación del TNF- α por esta ruta.

Por otra parte, se estudió la expresión del TGF- β , cuya liberación determina que la respuesta inflamatoria e inmunológica sea o no adecuada. Los resultados del acaricida Envidor muestran un aumento significativo en la primera concentración, lo cual indica un proceso antiinflamatorio, disminuyendo la producción de TNF- α . En las siguientes concentraciones se observa una disminución hasta casi alcanzar los niveles del testigo.

En el caso de los cultivos de linfocitos humanos expuestos al fungicida Scala se observa un incremento en las citocinas TNF- α y NF- κ B en la primera concentración y después una disminución en las siguientes, lo cual puede indicar que termina en una inmunosupresión de estas citocinas. En el caso del TGF- β se observa una inmunoestimulación.

Esta respuesta concuerda con los resultados que se han obtenido para algunos fungicidas como el Mancozeb, el Ziram, el Simazin, el Metoxuron y el Mecoprop (Colosio *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1998; Hooghe *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2004; Corsini *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2005; Corsini *et al.*, 2006; Alaa *et al.*, 2011; Mandarapu *et al.*, 2014), en los cuales se observó una supresión de la citocina TNF- α . La modulación de la expresión del NF- κ B podría explicar este efecto, ya que se ha visto que el Mancozeb, el Zinem y el Ziram producen especies reactivas de oxígeno, lo cual previene la degradación de I κ B y la translocación nuclear del NF- κ B, lo cual resulta en una disminución de la producción del TNF- α (Corsini *et al.*, 2005). Se sabe que a altas concentraciones el TGF β -beta tiene acción anti-inflamatoria suprimiendo la elaboración del TNF- α y el óxido nítrico generado por los macrófagos, inhibe la producción de interferón gama y TNF- α en las células asesinas naturales, lo cual podría explicar los resultados obtenidos para la expresión de TNF- α , que a su vez explicaría la disminución en la expresión de NF- κ B, al no activarse por la vía clásica.

Estudios previos han reportado que la exposición a plaguicidas organofosforados, organoclorados, carbámicos y fungicidas pueden causar estrés oxidante (Prakasam *et al.*, 2001). Se sabe que la generación de especies reactivas de

oxígeno (EROs) y radicales libres como los aniones superóxidos (O_2^-), radicales hidroxilos (OH^-) son altamente reactivos con el ADN produciendo rompimientos en sus cadenas, mutaciones (Segura et al., 2004), oxidaciones y modificaciones de sus bases (Calviello et al 2006; Valko *et al.*, 2007). Con esto es posible hipotetizar que la generación de MN y los cambios en la expresión de citocinas por parte del acaricida cetoenol Envidor y del fungicida Scala puede deberse a la generación de EROs.

Empleando el Metil-paratión, un plaguicida organofosforado, observaron que tiene capacidad para generar estrés oxidante. Esto lo comprobaron al evaluar el efecto oxidante en los espermatozoides maduros de ratones expuestos a 3, 6, 9 y 12 mg/kg del plaguicida. Observaron un aumento en la concentración del malondialdehído a partir de la dosis de 6 mg/kg, y en la formación del aducto 8-hidroxidesoxiguanosina a partir de la dosis de 9 mg/kg con respecto al grupo testigo, demostrando así el poder oxidante de este plaguicida (Mireles *et al.*, 2013).

Por otra parte, se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno también pueden actuar como un segundo mensajero celular y activar al $NF-\kappa B$, el cual regula la expresión de muchos mediadores de la inflamación, como el $TNF-\alpha$.

Sin embargo la producción de EROs no es la única vía de activación de las citocinas. En otro estudio realizado con el malation observaron que este plaguicida es capaz de interferir con la esterasa, una proteína de membrana vital para que las células inmunes interactúen y destruyan a los organismos extraños (Vandana *et al.*, 2008).

También se ha visto que el aumento en el $TNF-\alpha$ puede resultar de un mecanismo de compensación por la disminución en la producción de $IFN-\gamma$ después de la exposición a plaguicidas o por activación de mecanismos de reparación (Banerjee *et al.*, 2001, Luster *et al.*, 1999).

Tomando como base los resultados obtenidos en los cultivos de linfocitos de sangre periférica humana expuestos a los plaguicidas se puede proponer el siguiente escenario (Figura 16):

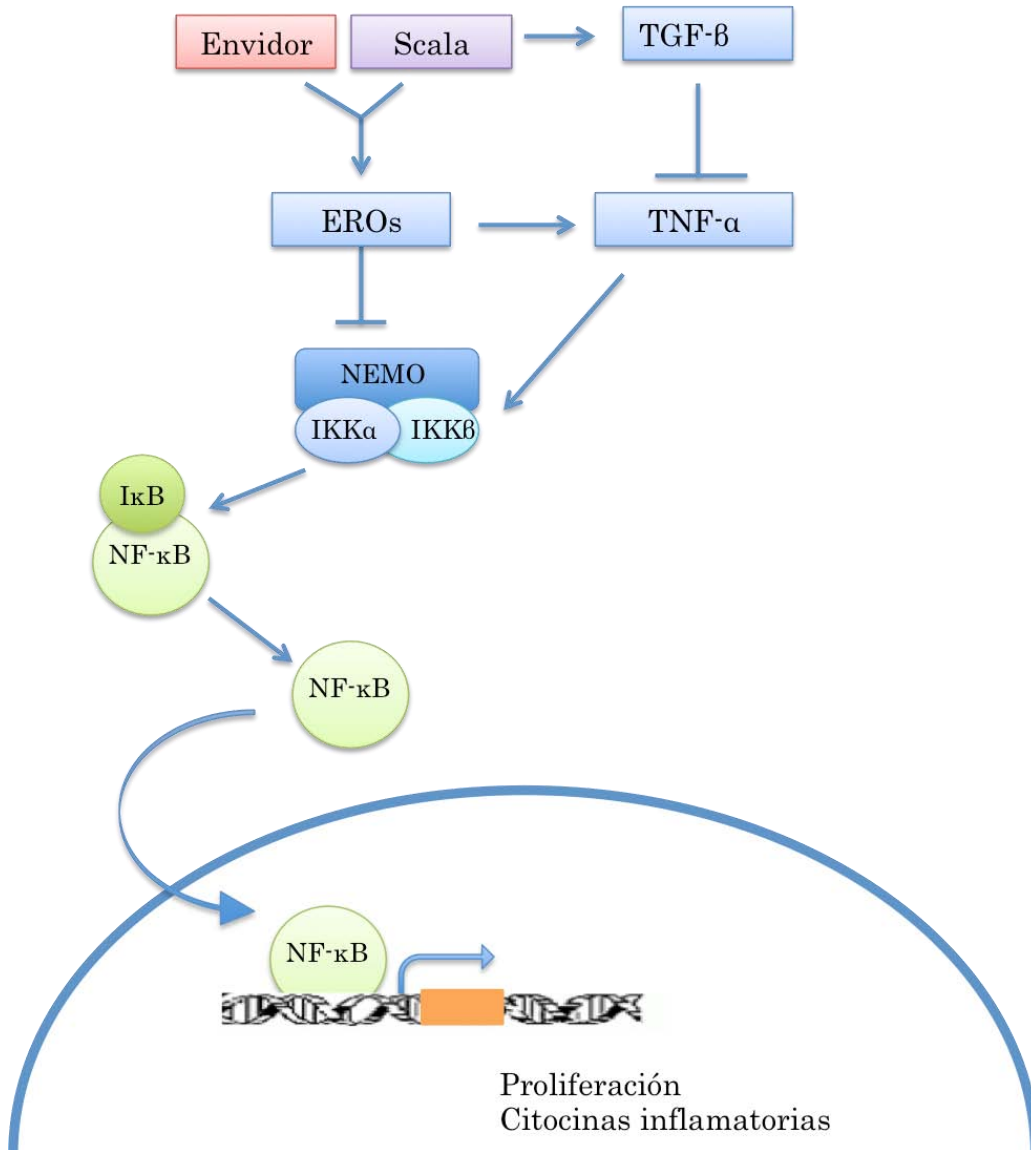


Figura 15. Mecanismo de acción propuesto para los plaguicidas cetoenoles Envidor y Scala.

Los plaguicidas interfieren de alguna manera con la producción de especies reactivas de oxígeno. Scala bloquea la activación de IKK y la posterior fosforilación y degradación de IκB, lo cual previene la translocación nuclear del

NF- κ B, su expresión y por consiguiente el bloqueo en la transcripción del RNAm del TNF- α . Por su parte, el compuesto Envidor aumenta la producción de TNF- α el cual a su vez activa al NF- κ B.

El presente estudio demuestra que los niveles séricos de ciertas citocinas pueden aumentar o disminuir en respuesta al fungicida Scala y al acaricida cetoenol Envidor. Aun cuando, no se conocen los mecanismos moleculares por los cuales el acaricida cetoenol Envidor y el fungicida anilinopirimidina Scala producen fragmentación del ADN, apoptosis e inmunotoxicidad, en las células humanas, es posible sugerir que tanto Envidor como Scala podrían ser fuente de radicales libres o ROS. Sin embargo una mejor caracterización de la interferencia específica puede llevar a una mejor comprensión del mecanismo molecular de acción y en particular estos datos contribuyen al entendimiento de la acción inmunotóxica de estos plaguicidas.

IX. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos de esta investigación se puede concluir lo siguiente:

- a) El acaricida cetoenol Envidor es un agente genotóxico y citotóxico evidenciado por el incremento de MN en células binucleadas comparadas con el testigo negativo y la disminución del IDN y del IPBC comparadas con el testigo negativo en las últimas cuatro concentraciones.
- b) El acaricida cetoenol Envidor es un agente inmunotóxico evidenciado por un cambio en la expresión de las citocinas TNF, RelA y TGFB. Aumenta la expresión del TNF y RelA comparados con el testigo. Aumenta la expresión del TGFB en la primera concentración comparado con el testigo negativo y va disminuyendo en las siguientes concentraciones.
- c) El fungicida anilopirimidina Scala es un agente genotóxico evidenciado por el incremento de MN en células binucleadas comparadas con el testigo negativo. Sin embargo no se considera un agente citotóxico ya que no modifica el IDN y del IPBC en ninguna de las concentraciones comparadas con el testigo negativo.
- d) El fungicida Scala es un agente inmunotóxico evidenciado por un cambio en la expresión de las citocinas TNF, RelA y TGFB. Aumenta la expresión del TNF y RelA en la primera concentración comparado con el testigo negativo y va disminuyendo en las siguientes concentraciones. Eleva la expresión del TGFB comparado con el testigo.

X. REFERENCIAS

- Abbas A., Lichtman A. y Pillai S. 2008. *Inmunología Celular y Molecular*. Sexta Edición. Barcelona. Pp 267-277.
- Aguillón J. C., Escobar A., Ferreira V., Aguirre A., Ferreira L., Molina M. C. 2001. Daily production of human tumor necrosis factor in lipopolysacchride (LPS) situated *ex vivo* blood culture assays. *Eur. Cytokine Netw.* 12: 105-110.
- Aiassa D., Mañas F., Bosch B., Gentile N., Bernardi N., Gorla N. 2012. Biomarcadores de daño genético en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas. *Acta Biol. Colomb.* 17: 485-510.
- Alaa A. M., Manal H. A., Manal E. A., El Halwagy, Mostafa M. M. A. 2011. A study on oxidative stress biomarkers and immunomodulatory effects of pesticides in pesticide-sprayers. *Egypt. J. For. Sci.* 1: 93-98.
- Albert L. A. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. *Rev. Toxicol.* (En Línea). <http://www.sertox.com.ar/retel/n08/01.pdf> 05/05/2015.
- Albert L. A. 2007. Panorama de los plaguicidas en México. Séptimo congreso de actualización en toxicología clínica. Pp 359-378.
- Albertini R., Anderson D., Douglas G., Hagman L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A., Norppa H., Shuker D., Tice R., Waters M. y Aitio A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* 463: 111-172.
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. 2004. *Introducción a la biología celular*. Editorial Médica Panamericana, Argentina.
- Alejandres S. U. A., Navez G. D., Moreno-Godínez M.E., Huerta-Beristain G. 2013. Genotoxicidad del epóxido de heptacloro en cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica. Nuevo Vallarta, Nayarit México. *Revista Bio. Ciencias. Supl 2*: 142

- Al-Saleh I. A. 1994. Pesticides: a review article. *J Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 13: 151-161.
- AMIFAC. 2012. Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria, A.C. <http://www.amifac.org.mx/medio-ambiente.html> 07/05/2015.
- AMIPFAC. 2001. Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes. México.
- 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. F., Rosario L. A. 2003. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. *Retel revista de toxicología en línea.* 24-41.
- Backer L. C., Grindem C. B., Corbett W. T., Cullins L., Hunter J. L. 2001. Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Sci. Total Environ.* 274: 161-169.
- Balkwill F. 2006. TNF- α in promotion and progression of cancer. *Centre for Translational Oncology.* 25: 409-416.
- Banerjee B. D., Seth V., Ahmed R. S. 2001. Pesticides induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev. Environ. Health.* 16: 1-40.
- Barbosa A. y Bonin A. 1994. Evaluation of phosphine genotoxicity at occupational levels of exposure in New South Wales, Australia. *Occup. Environ. Med.* 51: 700-705.
- Barral N. M., Barral A., Brodskyn C., Carvalho E. M. 1995. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 17: 21-28.
- Basso K. y Russo A. 2000. Detection and characterization of micronuclei in a murine liver epithelial cell line, by application of the in vitro cytokinesis block MN assay and PRINS. *Mutagenesis.* 15: 349-356.
- Beinke S., Ley S. 2004. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J.* 382: 393-409.

- Bernard A. y Lauwerys R. 1986. Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals. *J. Occup. Med.* 28: 559-562.
- Bernardia N., Gentilea N., Mañasa F., Méndeza A., Gorlaa N. y Aiassaa D. 2014. Evaluación del nivel de daño en el material genético de niños de la provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas. *Arch. Argent. Pediatr.* 113: 126-132.
- Blow J. J. y Tanaka T. U. 2005. The chromosome cycle: coordinating replication and segregation. *EMBO Reports*.
- Bolognesi C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543: 251-272.
- Bolognesi C., Perrone E., Landini E. 2002. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria. Italy. *Mutagenesis.* 17: 391-397.
- Bolognesi C., Parrini M., Merlo F. y Bonassi S. 1993. Frequency of micronuclei in lymphocytes from a group of floriculturists exposed to pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health.* 40: 405-411.
- Bonassi S., Fenech M., Lando C., Lin Y. P., Ceppi M., Chang W. P. 2001. Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 37: 31-45.
- Bretshneider T., Fischer R., Nauen R. 2007. Inhibitors of lipid synthesis (acetyl-CoA-carboxylase inhibitors), in *Modern Crop Protection Compounds*, Ed. By Kramer W. and Schirmer U. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co, Weinheim, Germany. Pp: 909-925.
- Calviello G. y Piccioni E. 2005. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. *Institute of general pathology. Rome, Italy.* 87-96.

- Campana M. A., Panzer A. M., Escalante A. H., Moreno V. J, Dulout F. N. 2001. Micronucleus test in fish from a pampasic pond (Argentina): an estimation of the presence of genotoxic compounds. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20: 325-331.
- Castillo S. Y., Sierra F. A., Martínez M. A., Plenge T. F. 2009. Efecto del diazinón sobre el cultivo de linfocitos de sangre periférica de humano. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Vol 3.
- Cavallo D., Cinzia L.U., Carelli G., Iavicoli I., Ciervo A., Perniconi B., Rondinone B., Gismondi M., IavicoLi S. 2006. Occupational exposure in airport personnel characterization and evaluation of genotoxic and oxidative effects. *Toxicol.* 223: 26-35.
- Çavuşoğlu K., Kaya A., Yilmaz F., Yalçın E. 2012. Effects of cypermethrin on *Allium cepa*. *Environ. Toxicol.* 27: 583-589.
- Celada A. 1994. *Inmunología básica*. Ed. Labor, S.A. Barcelona.
- Celik A. y Kanik A. 2006. Genotoxicity of occupational exposure to wood dust: micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal mucosa cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 47: 693-698.
- Chen L., Greene W. 2004. Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nat Immunol.* 5: 392-401.
- Clare M. G., Lorenzon G., Akhurst L.mC., Marzin D., Van Delft J., Montero R., Botta A., Bertens A., Cinelli S., Thybaud V., Lorge E. 2006. SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutat. Res.* 607: 37-60.
- Claudio E., Brown K., Park S., Wang H., Siebenlist U. 2002. BAFF induced NEMO-independent processing of NF-kappaB2 in maturing B cells. *Nat. Immunol.* 3: 958-965.
- COFEPRIS-DGSA (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios-Dirección General de Salud Ambiental). 2002. Primer diagnóstico nacional de salud ambiental y ocupacional.

- Collotta M., Bertazzi P. A., Bollati V. 2013. Epigenetics and pesticides. *Toxicol.* 307: 35-41.
- Colosio C., Barcellini W., Maroni M., Alcini D., Bersani M., Cavallo D., Galli A., Meroni P. L., Pastorelli R., Rizzardi G. P., Soleo L., Foà V. 1996. Immunomodulatory effects of occupational exposure to mancozeb. *Arch. Environ. Health.* 51: 445-451.
- Conner E. y Grisham M. 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition.* 12: 274-277.
- Corsini E., Codecà I., Mangiaratti S. 2005. Immunomodulatory effects of the herbicide propanil on cytokine production in humans: In vivo and in vitro exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222: 202-210.
- Corsini E., Sokooti M., Galli CL., Moretto A., Colosio C. 2013. Pesticide induced immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence. *Toxicol.* 307: 123-135.
- Corsini E., Viviani B., Birindelli S., Gilardi F., Torri A., Codeca I., Lucchi L., Bartesaghi S., Galli L. C., Marinovich M., Colosio C. 2006. Molecular mechanisms underlying mancozeb-induced inhibition of TNF-alpha production. *Italy. Toxicol. Appl. Pharm.* 212: 89-98.
- Corsini E., Liesivuori J., Vergieva T., Van Loveren H., Colosio C. 2008. Effects of pesticide exposure on the human immune system. *Hum. Exp. Toxicol.* 27: 671-680.
- Corsini E., Oukka M., Pieters R., Kerkvliet N. I., Ponce R., Germolec D. R. 2011. Alterations in regulatory T-cells: rediscovered pathways in immunotoxicology. *J. Immun. Toxicol.* 8: 251-257.
- Cortinas N. C. 2004. Situación en México de las existencias de plaguicidas sujetos al convenio de Estocolmo. (En Línea): http://siscop.ine.gob.mx/descargas/diagnos/diag_situación_plaguicidas_convenio_estocolmo.pdf 06/05/2015
- DGE 2010. Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario 2010. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, México. México.

[en línea] [http:// www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/inicio_anuarios.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/inicio_anuarios.html) 07/05/2015.

- Duramad P., Tager I. B., Holland N. T., 2007. Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. *Toxicol. Lett.* 172: 48-59.
- Echeverri N. P. y Mockus I. 2008. Factor nuclear κ B (NF- κ B): Signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cáncer. Universidad Nacional de Colombia. *Rev. Fac. Med.* Vol 56.
- Fait A. y Colosio C. 1998. Recent advances and current concepts in pesticide hazards. En: Emmett EA, Frank AL, Gochfeld M, Hez SM editors. *The year book of occupational and environmental medicine.* St. Louis Mosby. 15-29.
- Fenech M., Holland N., Chang W. P., Zeiger E., Bonassi S. 1999. The Human MicroNucleus Project: An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428: 271-283.
- 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. 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat. Res.* 392: 11-18.
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455: 81-95.
- Fenech M., Chang WP., Kirsch V. M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mut. Res.* 534: 65-75.
- Fenech M. y Morley A. A. 1989. Kinetochore detection in micronuclei: an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutat.* 4: 98-104.

- Friedrich F., Klepel M., Krause G., Lehmann H., Bramer B. 1981. Deutsche Demokratische Republik. Patentschrift. 151: 404.
- 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. Immun. Toxicol.* 8: 170–182.
- Gadeva P. y Dimitrov B. 2008. Genotoxic effects of the pesticides rubigan, omite and rovril in root-meristem cells of *Crepis capillaris* L. *Mutat. Res.* 652: 191-197.
- Galloway T. y Handy R. 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Eco. Toxicol.* 12: 345–363.
- Garaj V. V. y 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. Appl. Toxicol.* 22: 249-255.
- Garte S. y Bonassi S. 2005. Linking toxicology to epidemiology: biomarkers and new technologies-Special issue overview. *Mutat. Res.* 592: 3-5.
- Gayo A., Mozo L., Suárez A., Tuñón A., Lahoz C., Gutiérrez C. 2000. Long term effect of IFN beta 1b treatment on the spontaneous and induced expression of IL-10 and TGFβ1 in MS patients. *J. Neurol. Sci.* 179: 43-9.
- Genchi C. P., Arrizón V. A., Madrid A. G., Roman P. M. del P., Reducindo M. M., Pérez J. A. C. 2008. Síntomas ocasionados por plaguicidas en trabajadores agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Social.* 46: 145-152.
- Gloire G., Legrand Poels S., Piette J. 2006. NF-κB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72: 1493-1505.

- Gómez A. S., Martínez V. C., López C. Y., Martínez A. A., Calderón S. M. E., Pietrini V. R., Waliszewski S. 2013. Riesgo Genotóxico por la exposición ocupacional a plaguicidas en América Latina. Universidad Nacional Autónoma de México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29: (Número especial sobre plaguicidas). 159-180.
- Gómez A. S. y Martínez V. C. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23: 185-200.
- Gómez A. S., Díaz S. Y., Meneses P. M. A., Villalobos P. R., De León R. J. 2000. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture workers group exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 466: 117-124.
- Gómez A. S. y Martínez V. C. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 23(4): 185-200.
- Gosden J., Hanratty D., Starling J., Fantes J., Mitchell A., Porteous D. 1991. Oligonucleotideprimed in situ DNA synthesis (PRINS): a method for chromosome mapping, banding and investigation of sequence organization. *Cytogenet. Cell. Genet.* 57: 100-104.
- Grant W. F. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310: 175-185.
- Guo G., Yan S. Y., Lyn C. B., Wang T., Tamae D., Oqi J. 2003. Manganese superoxide dismutase mediated gene expression in radiation induced adaptive responses. *Mol. Cell. Biol.* 23: 2362-2378.
- Hagmar L., Bonassi S., Stromberg U., Mikoczy Z., Lando C., Hansteen I. L., Montagud A. H., Knudsen L., Norppa H., Reuterwall C., Tinnerberg H., Brogger A., Forni A., Hogstedt B., Lambert B., Mitelman F., Nordenson I., Salomaa S., Skerfving S. 1998. Cancer predictive value of cytogenetic makers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Mutat. Res.* 405: 171-178.

- Hassold T., Abruzzo M., Adkins K., Griffin D., Merrill M., Millie E., Saker D., Shen J., Zaragoza M. 1996. Human aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environ. Mol. Mutagen.* 28: 167-175.
- Haydn M. S. y Ghosh S. 2004. Signaling to NF-kappa B. *Genes Dev.* 18: 2195-2224.
- Heddle J. A. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat. Res.* 18: 187-190.
- Hernán B. C., Carolina P. L., David C. G. 2008. Evaluación del efecto genotóxico del Antracol WP70 en cultivo de linfocitos humanos. *Escuela de Ciencias Biológicas. Colombia. Vol. 39.*
- Hernández P. R., Orozco E. H., Arriaga K., Sampieri A., Larriva S. J., Madrid M. V. 1997. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immun.* 90: 607-17.
- Heuser V., Erdtmann B., Kvitko K., Rohr P., da Silva J. 2007. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect and susceptibility. *Toxicol.* 232: 235-247.
- Hooghe R. J., Devos S., Peters-Hooghes E. L. 2000. Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sci.* 66: 2519-2525.
- Huang T., Wuerzberger D. S., Wu Z., Miyamoto S. 2003. Sequential modification of NEMO/IKK gamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell.* 115: 565-576.
- Humberto C. N. 2011. Ventajas y desventajas de los insecticidas químicos y naturales. *Universidad Veracruzana.*
- Ikbal M., Atasoy M., Pirim I., Aliagaoglu C., Karatay S., Erdem T. 2006. The alteration of sister chromatid exchange frequencies in Behcet's disease with and without HLA-B51. *J. Eur. Acad. Dermatol.* 20: 149-52.
- INEGI. 2011. Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera EMIM: SCIAN 2007. Resumen anual Enero - Junio, 2010. Instituto Nacional de

Estadística, Geografía e Informática. 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 06/05/2015.

- INEGI. 2013. Boletín de información oportuna del sector alimentario. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México. 106 pp. [en línea]. http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sectorial/biosa/biosa.pdf 06/05/2015.
- Janeway C., Trvers P., Walport M., Capra J. 1999. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York, N. Y: Garland Publishers.
- Kato T., Delhase M., Hoffman A., Karin M. 2003. CKII is a C-terminal I κ B kinase responsible for NF- κ B activation during UV response. Mol. Cell. 12: 829-839.
- Ke S., Sun T., Zhang Z., Zhang Y-N., Liang Y., Wang K., Yang Z. 2010. Spirodiclofen analogues as potential lipid biosynthesis inhibitors: a convenient synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. Bull. Korean chem. Soc. 31: 2315-2321.
- Kierszenbaum A. L. 2008. *Histología y biología celular*. Elsevier, España.
- Kirsch V. M., Elhajouji A., Cundari E., Van H. 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 V. M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M Jr., Lorge E., Norppa H., Surrallés J., von der Hude W., Wakata A. 2000. Report from the in vitro micronucleus assay working group. Environ. Mol. Mutagen. 35: 167-172.
- Kirsch V. 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.

- Koch J., Kolvraa S., Petersen K., Gregersen N., Bolund L. 1989. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chrom.* 98: 259-265.
- Lacadena J. R. 1996. *Citogenética*. Editorial Complutense, España.
- Lambert B., Lindbland A., Holmberg L., Francesconi D. 1982. The use of sister chromatid exchange to monitor human populations for exposure to toxicologically harmful agents. En: *Sister chromatid exchanges* (S. Wolff, Ed.), Wiley Nueva York. Pp. 149-182.
- Landi S., Iazzolino E., Barale R. 2000. Are baseline frequencies of SCEs, CAs and MN in human lymphocytes related to haematological values?. *Mutat. Res.* 469: 159-166.
- Larrea P. M. M. 2007. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay. La Paz-Bolivia.
- Latt S. 1979. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 3395-3399.
- Latt S., Allen J., Blom S., Carrano A., Falke E., Kram D., Schneider E., Schreck R., Tice R., Whitfield B., Wolff S. 1981. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. *Sci.* 205: 1273-1275.
- Lee B., Lee S., Kim H. 1998. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonil contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, betacarotene and red ginseng). *Cancer Lett.* 132: 219-227.
- Lee J. I., Burckart G. J. 1998. Nuclear factor κ B: Important transcription factor and therapeutic target. *J. Clin. Pharmacol.* 38: 981-993.
- Lee T. K., Allison R. R., O'Brien K. F., Naves J. L., Karlsson U. L., Wiley A. L. 2002. Persistence of micronuclei in lymphocytes of cancer patients after radiotherapy. *Radiat. Res.* 157: 678-684.

- Letterio J. J., Roberts B. A. 1998. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu. Rev. Immunol.* 16: 137-161.
- Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Madrid, España: Ed. Med. Panam.
- López L. 1993. Exposición a plaguicidas organofosforados. *Perspectivas en Salud Pública* 18. México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Lotterman C. D., Kent O. A., Mendell J. T. 2008. Functional integration of 70 microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. *Cell Cycle.* 7: 2493-9.
- Lucero L., Pastor S., Suárez S., Durbán R., Gómez C., Parrón T. 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat. Res.* 464: 255-262.
- Luna A. I., Gminski R., Sundermann M. V., Pérez H. J. A. 2007. Determinación de daño genético en comerciantes de plaguicidas en el departamento de Matagalpa. Universidad Centroamericana. Nicaragua.
- Luster M. I., Simenova P. P., Gallucci R. 1999 Tumor necrosis factor alpha and toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.* 29: 491-511.
- Luster M. I. y Rosenthal G. J. 1993. Chemical agents and the immune response. *Environ. Health Perspect.* 100: 219-226.
- Maeno S., Miura I., Masuda K., Nagata T. 1990. *Proc. Brighton Crop Prot. Conf. PestsDis.* 2: 425.
- Maeshima K. y Eltsov M. 2008. Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes. *J. Biochem.*
- Magnarelli G. 2015. Exposición ambiental a plaguicidas: biomarcadores en matrices de la triada madre-placenta-feto. Laboratorio de investigaciones bioquímicas y del medio ambiente. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 49: 39-53.
- Magnarelli G., Alvarez G., Bulgaroni V., Cecchi A., Chiapella G., Quidel N. 2011. Parámetros moleculares, bioquímicos y morfométricos de la

tríada madre-placentafeto y alteraciones del embarazo en la exposición ambiental a plaguicidas: estudio prospectivo. LIBIQUIMA-IDEPA. Universidad Nacional del Comahue, Becas Ramón Carrillo MSAL, FONCyT.

- Mandarapu R., Ajumeera R., Venkatesan V., Prakhya M. B. 2014. Proliferation and Th1/Th2 cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells after treatment with Cypermethrin and Mancozeb in vitro. *J. Toxicol.*
- Mansour S. 2004. Pesticide exposure-Egyptian scene. *Toxicol.* 198: 91-115.
- Márquez S., Valenzuela P. L., Ifrán S. D., Pinto M. 2011. Guías de biología celular: ciclo básico común. < <http://genomasur.com/lecturas/Guia06.htm>> Consultado el 15 de noviembre de 2014.
- Martín A. y Fresno M. 2000. Tumor necrosis factor alpha activation of NF- κ B requires the phosphorylation of Ser-471 in the transactivation domain of c-Rel. *J. Biol. Chem.* 275: 24383-24391.
- Mersch J. y Beauvais M. N. 1997. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutat. Res.* 393: 141-149.
- Michielsen C. C., van Loveren H., Vos J. G. 1999. The role of the immune system in hexachlorobenzene-induced toxicity. *Environ. Health Perspect.* 107: 783-792.
- Mireles O. J., Solís H. M., Monroy P. V., Uriostegui A. M., Quintanilla V. B. 2013. Daño oxidante en espermatozoides por exposición al metilparatión. Nuevo Vallarta, Nayarit México. *Revista Bio. Ciencias.* 2: 142-143.
- Mohammad H. B. y Varela S. 2008. Insecticidas organofosforados: Efectos sobre la salud y el ambiente. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Möller P. 2006. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98: 336-345.

- Monteon L. A. y Ligonio R. 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.
- Morales A., Miranda M., Sánchez R. A., Colell A., Biete A., Fernández C. J. 1998. Transcriptional glutation of the heavy subunit chain of g-glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation. FEBS Letters. 427: 15-20.
- Moses M. 1993. Pesticides. En: Paul M, editor. Occupational and environmental reproductive hazards: a guide for clinicians. Baltimore: Williams and Wilkins. 296-305.
- Nauen R. 2005. Spirodiclofen, mode of action and resistanc risk assessment in tetranychid mite species. J. Pestic. Sci. 30: 272-274.
- Noriega B. 2005. Valoración de Genotoxicidad con determinación de micronucleos con ratones expuestos a metamidofos. Universidad Autónoma de Siinaloa. Bol. Med. Vol. 1.
- Norppa H. 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. Toxicol. Lett. 149: 309-334.
- Norppa H. y Falck G. 2003 What do human micronuclei contain? Mutagenesis. 18: 221-233.
- NRA National Registration Authority. 1996. Pyrimethanil. Scala 400 sc Funguicide.
- Ojha A. y Srivastava N. 2014. *In vitro* studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. Mutation Research. 761: 10-17.
- Omer F. M., Kurtzhals J. A. L., Riley E. M. 2000. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: A role for TGF- β ? Parasitol. Today. 16: 18-23.
- OMS Organización Mundial de la Salud. 1990. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Serie Vigilancia, 9. Plaguicidas organoclorados. México.

- OMS Organización Mundial de la Salud. 1993a. Clasificación Toxicológica de los Plaguicidas. Anexo B.
- OMS Organización Mundial de la Salud. 1993b. Organización Panamericana de la Salud (OPS), 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. Immun. Pathol. Pharmacol.* 24: 861-868.
- Parslow T. G., Suites D. P., Terr A. I., Imboden J. B. 2002. *Inmunología básica y clínica. Manual Moderno 10a ed.* Pp 917.
- Pastor B. S. 2002. Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Genética y de Microbiología.
- Peralta Z. O., Lagunas M. A., Madrid M. V. 2001. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Pública Mex.* 43: 340-351.
- Pérez H. N. 2006. Toxicología, CINVESTAV, IPN. Exposición crónica a plaguicidas y sus efectos genotóxicos.
- Pfeffer K. 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Inst. Med. Microbiol.* Pp 185-191.
- Phillips T. M. 2000. Assessing environmental exposure in children: immunotoxicology screening. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 10: 769-775.
- Pierce B. A. 2009. *Genética: un enfoque conceptual.* Editorial Médica Panamericana, Argentina.
- Prakasam A., Sethupathy S., Lalitha S. 2001. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin. Chim. Acta.* 310: 107-12.

- Ramírez J. A. y Lacasaña M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Instituto Nacional de Salud Pública. Barcelona.
- Rauch N. y Nauen R. 2002. Spirodiclofen resistance risk assessment in Tetranychusurticae (Acari: Tetranychidae): a biochemical approach. *Pest Biochem. Physiol.* 74: 91-101.
- Reed A., Dzon L., Loganathan B. G., Whalen M. M. 2004. Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by organochlorine pesticides. *Hum. Exp. Toxicol.* 23: 463-471.
- Regalado S. D. I. y Rodríguez M. G. 2013. Evaluación de la toxicidad de los plaguicidas: Glifosato y malatión sobre el aparato reproductor de la lombriz de tierra Eisenia foetida. IX Congreso Nacional de Toxicología. Nuevo Vallarta, Nayarit México. *Rev. Bio. Cien.* 2: 138-139.
- Rodrigues G. S., Ma T. H., Pimentel D., Weinstein L. H. 1997. Tradescantia bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. *Critical Rev. Plant Sci.* 16: 325-359.
- Rodríguez R. M. I., Gómez A. S., Villalobos P. R., Martinez V. C., Cortes E. J., Calderon E. M. C., Garcia M. R., Arenas H. F., Calderon S. M. E. 2012. Evaluation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation. *Toxicol. Mech. Meth.* 22: 170-183.
- Romero T. L. 2008. Comisión Nacional para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
- Rosin M. P. y Gilbert A. 1990. Modulation of genotoxic effects in humans. *Environ. Mutagen.* 245: 351-359.
- Sadowska A., Pluygers E., Niklinska W., Maria M. R., Obidoska G. 2001. Use of higher plants in the biomonitoring of environmental genotoxic pollution. *Folia Histochem. Cytobiol.* 39: 52-53.

- Saleha B., Danadevi K., Rahman M. F., Aheya Y. R., Kaiser J. 2001. Genotoxic effect of monocrotophos to sentil species using comet assay. *Food chem. Toxicol.* 39: 361-366.
- Sánchez G. S., Linde A. R., Ayllón F., García V. E. 2001. Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 139-143.
- Sato T., Taguchi M., Nagase H., Kito H., Niikawa M. 1998. Augmentation of allergic reactions by several pesticides. Elsevier Science. *Irel. Toxicol.* 126: 41-53.
- Schaalán M. F., Abdelraouf S. M., Mohamed W. A., Hassanein F. S. 2012 Correlation between maternal milk and infant serum levels of chlorinated pesticides (CP) and the impact of elevated CP on bleeding tendency and immune status in some infants in Egypt. *J Immun. Toxicol.* 9: 15-24.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31: 9-15.
- Sierotzki H., Wullschleger J., Bruyere T., Pillonel C., Parisi S., Gisi U. 2002. In modern fungicides and antifungal compounds III. Agroconcept. Bonn. Pp 141-148.
- Siu W. H., Mak E., Cao J., De Luca-Abbott S. B., Richardson B. J., Lam P. K. 2004. Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 1317-1325.
- Sorensen M., Autrup H., Moller P., Hertel O., Solvang J. S., Vinzents P., Knudsen L. E., Loft S. 2003. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat. Res.* 544: 255-271.
- Speit G. y Hartmann A. 2006. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 314: 275-286.
- Stich H. y Rosin M. P. 1984. Micronuclei in exfoliated human cells as tool for studies in cancer risk and cancer intervention. *Cancer Lett.* 22: 241-253.

- Stich H., San R., Rosin M. P. 1983. Adaptation of the DNA repair and micronucleus test to human cell suspensions and exfoliated cell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 407: 93-105.
- Surrallés J. y Natarajan A. T. 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.
- Taylor T. R., Tucker T., Whalen M. M., 2005. Persistent inhibition of human natural killer cell function by ziram and pentachlorophenol. *Environ. Toxicol.* 20: 418-424.
- Thrasher J. D., Madison R., Broughton A. 2002. Immunological abnormalities in humans chronically exposed to chlorpyrifos. *Arch. Environ. Health* 57: 181-187.
- Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartman A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki Y. F. 2000. Single cell/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221.
- Tolbert P., Shy C., Allen J. 1992. Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: Methods and development. *Mutat. Res.* 271: 69-77.
- Vaglenov A., Laltchev S., Petkova V., Pavlova S., Marcos R. 2001. Occupational exposure to lead and induction of genetic damage. *Environ. Health Perspect.* 109: 295-298.
- Valencia Q. P. R. 2000. Efecto citogenético de plaguicidas carbámicos en *Vicia faba* y linfocitos humanos. Tratamientos directos y a través de los metabolismos vegetal y animal. Centro de Ciencias de la Atmósfera. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Valencia Q. R., Alarcón S. J., Gómez A. S., Córtes E. J., Waliszewski S., Fernández S., Villalobos P. R. 2013. Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29: 133-157.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44-84.
- Van Cauteren H., de Kok M. C. M., Van Schooten F. J. 1996. Cancer risk evaluation. In: *Toxicol. Prin. Appl.* CRC, New York. 384-413.
- Vandana S., Banerjee B. D., Rafat S. A., Bhattacharya A., Pasha S. T. 2008. Alterations in immunoglobulins and cytokine levels in blood of malathion poisoning cases. Central Insecticides Lab. India. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 45: 209-211.
- Verdín B. F. A., Vázquez E. G., Sordo C. L. M., Benítez T. A. B., Gómez P. E., Robledo M. M. L., Medina D. I. M., Barrón V. B. S., Ostrosky W. P., Girón P. M. I., Rojas G. A. E. 2013. Efecto genotóxico del plaguicida organofosforado temefos, evaluado mediante el ensayo cometa en células HepG2. IX Congreso Nacional de Toxicología. Nuevo Vallarta, Nayarit México. *Rev. Bio Cien.* 2: 133
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29: 235-271.
- Vindas R., Ortiz F., Ramírez V., Cuenca P. 2004. Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. Universidad de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* Vol 52.
- Vine M. F., Stein L., Weigle K., Schroeder J., Degnan D., Tse C. K., Hanchette C., Backer L. 2000. Effects on the immune system associated with living near a pesticide dump site. *Environ. Health Perspect.* 108: 1113-11124.

- VKM. Norwegian Scientific Committee for Food Safety. 2011. Risk assessment of the pesticide Envidor with the active substance spirodiclofen.
- Wachendorff U., Nauen R., Schnorbach H. J., Rauch N., Elbert A. 2002. The biological profile of spirodiclofen (Envidor)- a new selective tetroneic acid acaricide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*. 55: 149-176.
- Watanabe W., Yoshida H., Hirose A., Akashi T., Takeshita T., Kuroki N., Shibata A., Hongo S., Hashiguchi S., Konno K., Kurokawa M. 2013. Perinatal exposure to insecticide methamidophos suppressed production of proinflammatory cytokines responding to virus infection in lung tissue in mice. *Biomed. Research. International*.
- Weil R. e Israel A. 2004. T cell receptor and B cell receptor mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol*. 16: 374-381.
- Whalen M. M., Loganathan B. G., Yanashita N., Saito T. 2003. Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides. *Chem. Biol. Interact*. 145: 311-319.
- WHO. 2007. The WHO recommended classification of pesticides by hazards and guidelines to classification: 2009. World Health Organization. Ginebra. P 81.
- Wilson S., Dzon L., Reed A., Pruitt M., Whalen M. M. 2004. Effects of in vitro exposure to low levels of organotin and carbamate pesticides on human natural killer cell cytotoxicity function. *Environ. Toxicol*. 19: 554-563.
- Wolf D. H. 2004. A new deal for holliday junctions. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 11: 117-119.
- Wolpert L., Jessell T., Lawrence P., Meyerowitz E., Robertson E., Smith J. 2010. *Principios del Desarrollo*. Ed. Méd. Panam, Arg. Pp 452-453.
- Wrana J. L. 1994. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*. 370: 341-347.

- Wrana J. L., Atissano L., Carmaso J., Zentella A., Doody J., Laiho M. 1992. TGF-beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*. 71: 1003-1014.
- Yamaoka S., Courtois G., Bessia C., Whiteside S. T., Weil R., Agou F. 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell*. 93: 1231-1240.
- Yu Q, Stamenkovic I. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*. 14: 163-176.
- 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 D. M., Delhase M., Hayakawa M., 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.
- Zhang W., Jiang F., Feng J. 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci*. 1: 125-144.
- Zeljezic D. y Garaj V. V. 2001. Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Chemosphere*. 46: 295-303.
- Zhou L., Johnson A., Rando T. 2001. NF-kB and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med*. 31: 1405-1416.