



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

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE DAÑO A TRAVÉS DEL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS
OCASIONADO POR UN COADYUVANTE MICROENCAPSULADOR EN
COMBINACIÓN CON GLIFOSATO, PERMETRINA Y CARBOFURANO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ZELTZIN MUÑOZ JUÁREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

**DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO, CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA,
UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTANA, FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA, UAT.**

MÉXICO, CD. MX. ABRIL, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE DAÑO A TRAVÉS DEL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS
OCASIONADO POR UN COADYUVANTE MICROENCAPSULADOR EN
COMBINACIÓN CON GLIFOSATO, PERMETRINA Y CARBOFURANO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ZELTZIN MUÑOZ JUÁREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

**DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO, CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA,
UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTANA, FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA, UAT.**

MÉXICO, CD. MX. ABRIL, 2019

OFICIO CPCB/276/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

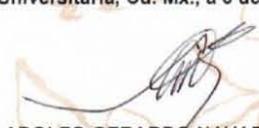
M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de enero de 2019, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MUÑOZ JUÁREZ ZELTZIN** con número de cuenta **308211894** con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE DAÑO A TRAVÉS DEL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS OCASIONADO POR UN COADYUVANTE MICROENCAPSULADOR EN COMBINACIÓN CON GLIFOSATO, PERMETRINA Y CARBOFURANO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO**:

Presidente: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO
Secretario: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 5 de marzo de 2019.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación profesional durante mis estudios de maestría.

Al programa de becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización del presente trabajo (CVU: 774411).

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera, por el apoyo financiero recibido del Fondo Especial de Ingresos Extraordinarios del CCA para concluir el proceso para obtener el grado de maestría.

A los integrantes del comité tutorial:

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo por el apoyo incondicional, la paciencia y la gran determinación que tiene por formar nuevos investigadores, le agradezco infinitamente la oportunidad de formar parte de su equipo desde hace ya cinco años.
¡Muchas gracias!

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García y Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana por todo el apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo así como por sus valiosas aportaciones.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Sandra Gómez** por ser mi mentora profesional desde hace cinco años, mil gracias por recibirme, por su dedicación, consejo y enseñanza.

Mil gracias a Denisse, Cyn y Javier por la gran compañía en el laboratorio, por siempre escuchar mi música y divertirnos por cualquier situación.

A Pao, Adriana y Yu, por las ridículas locuras, con ustedes hasta el final, gracias por siempre estar presentes.

**A mi mamá, MOMMY igracias por todo! Sin ti nada de esto sería posible, eres el mejor ejemplo de vida, la más fuerte. Simplemente la mejor mujer
iiiTE AMO MOMMY!!!**

A mi hermano, mi carnalito, te agradezco por las risas y enseñanzas en todo momento, por ser el mejor maestro iite quiero mucho manito!!

A mi Mors, Javier, por apoyarme en cada momento de este viaje, por ser el más paciente y amoroso, por ayudarme cada momento de cada día, pero sobre todo por caminar junto a mí, iite AMO!! Más y más.

Índice

RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Plaguicidas	2
<i>1.1.1. Plaguicidas Organoclorados</i>	2
<i>1.1.2. Plaguicidas Organofosforados</i>	3
<i>1.1.3. Carbamatos</i>	4
<i>1.1.4. Piretrinas</i>	5
1.2. Coadyuvantes	6
<i>1.2.1. Activadores</i>	7
<i>1.2.1.1 Tensoactivos</i>	7
<i>1.2.1.2 Penetrantes</i>	7
<i>1.2.1.3 Adherentes</i>	8
<i>1.2.2 Utilitarios</i>	8
<i>1.2.2.1 Correctores de agua</i>	8
<i>1.2.2.2 Antiderivantes</i>	8
<i>1.2.2.3 Compatibilizantes</i>	8
2. ANTECEDENTES	9
2.1 México y el consumo de plaguicidas y coadyuvantes	9
1.2 Evaluación de riesgo toxicológico	11
<i>2.2.1 Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis (MNBC)</i>	13
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVO GENERAL	14
5.1. Objetivos particulares	14

6. METODOLOGÍA	15
6.1. Selección del coadyuvante y plaguicidas	15
6.2. Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis	15
6.2.1. <i>Siembra</i>	16
6.2.2. <i>Inducción de daño</i>	16
6.2.3. <i>Inhibición de la citocinesis</i>	16
6.2.4. <i>Cosecha celular</i>	16
6.2.5. <i>Preparación de laminillas</i>	17
6.2.6. <i>Observación y conteo celular</i>	17
6.3. Análisis estadístico	21
7. RESULTADOS	22
7.1. Micronúcleos (MN)	22
7.1.1. <i>Hidrix®, el coadyuvante</i>	22
7.1.2. <i>Permetrina, insecticida piretroide</i>	23
7.1.3. <i>Carbofurano, insecticida carbamato</i>	25
7.1.4. <i>Glifosato, herbicida</i>	26
7.2. Puentes nucleoplásmicos (PN) y brotes nucleares (Bn)	27
7.3. Índices de proliferación con bloqueo de citocinesis (IPBC) y de citotoxicidad de la división nuclear (ICDN)	28
7.3.1. <i>Hidrix®, el coadyuvante</i>	28
7.3.2. <i>Permetrina, insecticida piretroide</i>	29
7.3.3. <i>Carbofurano, insecticida carbamato</i>	32
7.3.4. <i>Glifosato, herbicida</i>	33
8. DISCUSIÓN	35
9. CONCLUSIÓN	38

RESUMEN

En la actualidad la evaluación del riesgo que implica la exposición a agentes químicos que están en contacto con poblaciones humanas, así como sus posibles efectos sobre la salud e incluso con el ambiente, sigue en aumento ya que la sociedad depende en gran medida del uso de compuestos que con el paso de los años siguen diversificándose.

En México, una de las principales actividades económicas es la agricultura pues proporciona empleo a 5 millones de habitantes, las principales sustancias utilizadas en esta actividad son los plaguicidas (insecticidas y herbicidas) y coadyuvantes, estos agentes además de ser benéficos para la economía de los países traen consigo diversos efectos adversos para la salud de las poblaciones humanas, así como para el medio, pues son persistentes y no son de fácil degradación. Asimismo, la exposición a plaguicidas se ha relacionado con enfermedades crónico degenerativas, cardiovasculares, respiratorias, renales, inmunes y reproductoras, además, existe una estrecha relación entre la exposición a plaguicidas con las alteraciones al ADN. Por otro lado, las consecuencias que puedan traer consigo los coadyuvantes no han sido descritas con anterioridad.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos que ocasiona un coadyuvante y la mezcla de éste con el herbicida glifosato y los insecticidas permetrina y carbofurano en cultivos de sangre periférica a través del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, *in vitro*, para tal efecto cultivos de sangre periférica se sometieron a los plaguicidas en diferentes concentraciones: para la aplicación del coadyuvante de manera individual 1.0, 5.0 y 10.0 µg/mL, para la permetrina: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 µg/mL; carbofurano: 0.6, 2.0, 5.0 y 7.5 µg/mL y glifosato: 25, 50, 75 y 100 µg/mL. Al finalizar la prueba de micronúcleos se realizó un conteo celular de 500 células polinucleadas para obtener el índice de proliferación celular (IPBC) y el índice de citotoxicidad de la división nuclear (ICDN) y 1000 células binucleadas (BN) para registrar la presencia de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN) y brotes nucleares (Bn), los datos fueron analizados a través de pruebas de t de Student, Mann Whitney y Wilcoxon, los análisis con valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados obtenidos relacionados con la frecuencia de MN por cada 1000 células binucleadas muestran que el coadyuvante Hidrix®, produce incremento en la frecuencia de MN en las concentraciones analizadas, para el insecticida permetrina por si solo la mayor cantidad de micronúcleos se encontró en la concentración de 0.4 µg/mL mientras que en combinación con el coadyuvante el daño se mantiene también en la concentración de 0.8 µg/mL, en cuanto al carbofurano la frecuencia de MN se mantiene desde la primera concentración

hasta la última de 7.5 µg/mL, mientras que para la mezcla con el adyuvante solo existe diferencia significativa en dos de las cuatro concentraciones analizadas, para el glifosato se observó que la frecuencia de MN no fue constante cuando el herbicida es aplicado de forma individual; sin embargo, este efecto se contrarresta en los cultivos sometidos a la mezcla del coadyuvante y el herbicida pues las frecuencias más elevadas se hallaron en la concentración de 25 y 75 µg/mL, todo lo mencionado con anterioridad fue diferente estadísticamente en comparación con el testigo negativo con una $p \leq 0.05$. Los PN y Bn no mostraron diferencias significativas estadísticamente.

Los índices de proliferación observados indicaron que el coadyuvante por sí solo no modifica el ritmo de la división celular en las concentraciones analizadas. Para el caso de la permetrina se evidenció que aplicada de manera individual disminuye significativamente los valores del IPBC mientras que al mezclarse con el coadyuvante, este último contrarresta el efecto del insecticida conservando los valores del índice de proliferación de manera similar a los datos que pertenecen al testigo negativo. En cuanto a los resultados obtenidos por la aplicación del carbofurano de manera individual así como en la combinación con el coadyuvante los valores que se obtuvieron para IPBC e ICDN no fueron diferentes significativamente en comparación con el testigo negativo, por último para el glifosato por si solo se observa que al aplicarse individualmente no produce cambios en el ritmo de la división celular; sin embargo, si existe diferencia significativa en los valores obtenidos a partir de la concentración de 75 µg/mL cuando se aplica en conjunto con el coadyuvante.

Los datos recopilados en este trabajo indican que el coadyuvante por sí solo no genera efecto genotóxico ni alteraciones en la división celular, pero cuando se combina con los diferentes plaguicidas puede contrarrestar el efecto de éstos como es el caso de la permetrina o actuar de manera sinérgica incrementando los efectos de los plaguicidas, como sucede con el glifosato.

Con esta investigación se corrobora una vez más que las diferentes mezclas que suelen realizarse en campo pueden alterar los efectos que se reportan cuando únicamente se considera al ingrediente activo, por lo que la evaluación toxicológica, para agroquímicos en particular, debe hacerse de manera similar a lo que sucede en el área de cultivo, para que de esta forma se generen datos más certeros de lo que realmente ocurre como consecuencia de la exposición ocupacional.

ABSTRACT

Through the years the exposition to chemical agents has been an increasing risk to human population, due to their negative effects in health and the environment. This exposition represents today a potential danger to human populations because the amply use of different products and to the growing and diversifying industry around them.

In countries like Mexico pesticides (insecticides and herbicides) and adjuvants are widely used because a large size of the territory is destined to agriculture, activity that provides jobs to more than 5 million inhabitants. Even when pesticides contribute to the country economy, they also may cause unwanted effects in health and the environment. The majority of the pesticides used are not biodegraded thusthey are persistent. Moreover, the exposition to pesticides it has been related with chronic degenerative, respiratory, kidney and reproductive diseases, as well as with DNA alterations. Additionally the consequences that adjuvants may produce have not been previously described.

The objective of the work reported here was to evaluate the genotoxic potential of an adjuvant (Hidrix®) in combination with herbicide glyphosate and the insecticides permethrin and carbofuran in whole blood cultures through *in vitro* cytokinesis-block micronucleus assay. For this purpose the blood cultures were exposed to different concentrations of the adjuvant 1.0, 5.0 and 10.0 µg/mL; permethrin 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 µg/mL; carbofuran 0.6, 2.0, 5.0 and 7.5 µg/mL; and gliyphosate 25, 50, 75 and 100 µg/mL. At the end of the micronucleus assay 500 multinucleated cells were counted to obtain the cellular proliferation index (CPI) and the nuclear division cytotoxicity index (NDCI). Afterwards 1000 binucleated cells where analyzed to register the presence of micronuclei (MN), nucleoplasmic bridges (NPB) and nuclear buds (NBuds). The data were analyzed with a Student´s t test, Man Whitney and a Wilcoxon test, with a confidence interval of $p \leq 0.05$.

The results shown that the adjuvant Hidrix® produces an increment in MN frequencies in all the concentrations analyzed, for permethrin and in combination with Hidrix® the highest frequency of micronuclei was found at 0.4 µg/mL. Carbofuran maintained similar frequencies of micronucleus in the first and second concentrations but decrease the damage at 5.0 and 7.5 µg/mL; carbofuran with the adjuvant produces an increment in the frequency of MN in 2.0 µg/mL.

Cultures treated with the herbicide glyphosate alone presented an irregular frequency of micronucleus, however when treated with Hidrix® the frequencies increased at the concentrations of 25 and 75 µg/mL; all the results obtained were

statistically different when compared with the negative control at $p \leq 0.05$. The NPB and NBuds didn't show statistical differences compared with the data obtained in the negative control. The proliferation index indicates that the adjuvant by itself does not modify the cellular proliferation rhythm at all concentrations tested.

For permethrin, there was a significant decrease in the values of PBCI whereas in combination with the adjuvant it was shown a reduction of the effects induced by the insecticide to similar levels obtained with the negative control. Regarding the results obtained with the application of individual carbofuran and mixed with the adjuvant, the obtained values for CPI and NDCI were not statistically different from those obtained with the negative control. Glyphosate by itself does not induce changes in cell proliferation rhythm but it produced significant differences from 75 $\mu\text{g/mL}$ in combination with the adjuvant.

The results compiled in this research indicates that the adjuvant by itself does not generate genotoxic effects or interfere with cell proliferation, but when Hidrix® is mixed with the different pesticides, this adjuvant may counteract the effect of the pesticides like it did with permethrin or interact in a synergistic way increasing the effect of the active ingredient like it did with glyphosate. This research proved once again that the mixtures used in crop field can change the effects produced in health that are already reported when only active ingredients are considered. For this reason the toxicology evaluation, specifically for agrochemicals, should be carry out similarly to what happens in the crop fields so the results obtained could be more accurate with the occupational exposition.

1. INTRODUCCIÓN

El análisis de los efectos adversos de agentes físicos o químicos sobre seres vivos es de gran importancia, el estudio de ello desde un punto de vista celular, bioquímico y molecular es crucial para así posteriormente comunicar y dar solución a las posibles consecuencias, particularmente este proceso de investigación corresponde a la toxicología, siendo una parte muy importante de esta rama de la biología, la evaluación del riesgo de agentes químicos que están en contacto con poblaciones humanas, así como sus posibles efectos sobre la salud e incluso con el ambiente, las investigaciones sobre estos tópicos sigue en aumento ya que la sociedad depende en gran medida del uso de compuestos que con el paso de los años siguen diversificándose.

Entre los productos químicos con mayor uso en el planeta son los plaguicidas, el término plaguicida engloba una enorme cantidad de compuestos activos, sustancias inertes de acompañamiento y disolventes, su uso se extendió a lo largo del planeta después de la Segunda Guerra Mundial y a partir del descubrimiento del DDT (Domenech, 2004). Actualmente los países con mayor consumo anual de pesticidas (kg/ha) son Japón (18.94), China (10.45), México (7.87), Brasil (6.16), Alemania (5.123), Francia (4.859), Reino Unido (4.034), EUA (3.886) e India (0.261) (Zhang, 2018). Estos compuestos son necesarios para incrementar la producción de comida para alimentar a la creciente población, está estimado que cerca de un tercio de los productos agrícolas se obtienen gracias a la aplicación de los plaguicidas (Liu *et al.*, 2002) que sin el uso de ellos la pérdida mundial de frutas, vegetales y cereales sería del 78%, 54% y 32%, respectivamente (Cai, 2008). Debido al creciente empleo de estas sustancias, se han incrementado las investigaciones toxicológicas a nivel mundial, las cuales han demostrado que tienen un impacto negativo sobre ecosistemas acuáticos y terrestres, así como efectos tóxicos en poblaciones humanas y en poblaciones de otros seres vivos (Carvalho, 2017).

1.1. Plaguicidas.

Los plaguicidas se pueden clasificar de acuerdo con su toxicidad aguda en extremadamente peligrosos, altamente peligrosos, moderadamente peligrosos y ligeramente peligrosos y según su vida media en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (Ramírez y Lacasaña 2001). Sin embargo, la clasificación más común es por su estructura química, agrupándose en diferentes familias tal como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrinas, tiocarbamatos, bupiridilos, derivados del ácido fenoxiacético, cloronitrofenólicos, triazinas, compuestos orgánicos del estaño y compuestos de origen botánico (Ramírez y Lacasaña 2001). A continuación se hará una breve descripción de las familias más importantes.

1.1.1. Plaguicidas Organoclorados.

Son un grupo de compuestos formados por un anillo orgánico el cual tiene un esqueleto de carbono y múltiples átomos de cloro, lo que les confiere una alta estabilidad física y química, haciéndolos insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos, estas características incrementan su persistencia en el ambiente y lenta biodegradabilidad por lo que forman parte de la clase de los contaminantes orgánicos persistentes, debido a su naturaleza lipofílica se bioacumulan y biomagnifican (Ramírez y Lasaña, 2001; Sparling, 2016), los representantes de esta familia en su mayoría son insecticidas algunos ejemplos son el DDT, metoxiclor, endrin, endosulfan, heptaclor, clordano, toxafeno, mirex y aldrin. Su modo de acción del DDT, es a través de la interferencia con el sistema nervioso, opera en los canales de sodio de los axones de las neuronas causando alteración cinética de flujo de Na^+ y K^+ a través de la membrana de las mismas, lo que ocasiona pérdida del control de músculos que interfieren en la respiración y por consecuencia asfixia (Sparling, 2016).

Existe una clase de organoclorados llamados ciclodienos, los más comunes, que actúan sobre los receptores neuronales del ácido gammaaminobutírico (GABA), que es un

neurotransmisor del sistema nervioso central específicamente de la corteza cerebral, los ciclodienos se unen a los receptores GABA e interfieren con la habilidad del neurotransmisor para llevar a cabo el potencial de acción de la siguiente neurona, lo que conlleva a convulsiones, agitación y excitabilidad (Sparling, 2016).

Dentro de los principales efectos adversos que se han atribuido a los plaguicidas organoclorados se encuentran la bioconcentración, biotransformación, bioacumulación, se transfieren vía materna, interrumpen la señalización hormonal, de enzimas, factores de crecimiento y neurotransmisores asimismo se sabe que alteran la homeostasis lo que conlleva a muerte celular por apoptosis, y posteriormente a enfermedades autoinmunes, cáncer y problemas reproductores (Mrema *et al.*, 2013).

1.1.2. *Plaguicidas Organofosforados (OFs).*

La estructura química general de los pesticidas organofosforados fue descubierta por el químico alemán, Gerhard Schrader, él sintetizó y comercializó el primer insecticida organofosforado, el paratión, en 1944 (Costa, 2010). La estructura química general de los OFs consta de un átomo de fósforo con un doble enlace a un oxígeno o azufre (en dado caso de que sea este último, es necesario que se lleve a cabo una activación metabólica dada por una desulfuración mediada por enzimas de la familia CYP 450 esta reacción es llevada a cabo frecuentemente, en el hígado), dos grupos alcoxi (generalmente metoxi o etoxi) y un enlace llamado "grupo viviente" que se desplaza siempre que los OFs fosforilan a la acetilcolinesterasa este enlace es el más sensible a la hidrólisis. Los OFs pueden ser divididos en diferentes subclases que son los fosfatos, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos, entre otros (Chambers *et al.*, 2001). Dentro de estos plaguicidas se encuentran el paratión, clorpirifos, diazinón, diclorón, fosmet, azinfosmetil, malatión y metil paratión. Su mecanismo de acción es a través de la unión irreversible de los OFs a la acetilcolinesterasa para evitar el rompimiento de la acetilcolina, la liberación de la acetilcolina conlleva al sobreestímulo de receptores muscarínicos y nicotínicos los cuales están ampliamente distribuidos en todo el cuerpo, la sobreexcitación de estos

receptores produce debilidad y fasciculación muscular, hipertensión y taquicardia, bradicardia, calambres abdominales, salivación, broncoespasmos, urgencia urinaria, ansiedad, agitación y ataques nerviosos (Adeyinka y Pierre, 2018). Las consecuencias negativas que se le han atribuido a la exposición a OFs son la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y esclerosis amiotrofica lateral, entre otras (Sánchez-Santed *et al.*, 2016).

1.1.3. Carbamatos.

Son compuestos derivados del ácido carbámico (NH_2COOH). Estos compuestos pueden ser de tres tipos: derivados de esteres carbamatados usados como insecticidas, derivados del ácido tiocarbámico utilizados como fungicidas y carbamatos como tal empleados como herbicidas; todos ellos relativamente inestables con tienen tiempos cortos de persistencia ambiental (Al-Saleh, 1994).

Los carbamatos causan carbamitación reversible de la enzima acetilcolinesterasa, lo que permite la acumulación de la acetilcolina, que es el neurotransmisor encargado de mandar impulsos nerviosos, la combinación carbamilo-acetilcolinesterasa se disocia más rápidamente que el complejo fosforil-acetilcolinesterasa producido por los compuestos OFs, lo que ocasiona que el mecanismo de acción sea similar con la diferencia de que rápidamente reversible (Boyd Barr y Buckley, 2011). Esta debilidad de unión tiende a limitar la duración del envenenamiento con insecticidas carbamatos, el intervalo de tiempo que existe entre la dosis que genera los síntomas y la dosis letal es mayor que la de los OFs y casi siempre no permite la medición de la colinesterasa en la sangre como indicador de envenenamiento (Sparling, 2016).

Los efectos que causan los carbamatos son contracciones y espasmos musculares, ataques respiratorios, convulsiones, hipertensión broncoespasmos y depresión cardiorespiratoria, dentro de los plaguicidas carbamatos más conocidos se encuentran el carbofurán, mobán, propoxur, aldicarb y pirimicarb (Domenech, 2004). Los efectos adversos en los que se implica a estos plaguicidas se relacionan con el incremento de enfermedades

asociadas a la respuesta inmune como reacciones hipersensibles y cáncer, el principal mecanismo que se ha propuesto por el que los carbamatos inducen desregulación inmune es estrés oxidante e inhibición de la activación de esterasas (Dhouib *et al.*, 2016).

1.1.4. *Piretrinas.*

Son plaguicidas obtenidos por secado, molienda y pulverización de la flor del crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), se clasifican en cinerinas I y II, jasmolinas I y II y piretrinas I y II. Estas últimas son las que tienen el efecto más potente; no obstante, debido a que las piretrinas son de origen natural, se descomponen rápidamente por la luz, por lo que se desarrollaron los piretroides (Al-Saleh, 1994).

Los piretroides son piretrinas sintéticas que surgen en los años cincuenta y son considerados más efectivos, se dividen en dos tipos: sin grupo alfa ciano y con grupo alfa ciano (Ramírez y Lacasaña, 2001). Son insecticidas potentes, tienen toxicidad baja en mamíferos y mínima persistencia en el ambiente su uso se ha incrementado en los últimos 30 años y actualmente forman una cuarta parte del mercado de plaguicidas mundial (Soderlund *et al.*, 2002).

Todos los piretroides están constituidos por la mitad de un ácido, un enlace éster central y una porción de un alcohol, la mitad del ácido contiene dos carbonos quirales, y algunas veces el alcohol también puede tenerlo, debido a estas propiedades es posible que existan esteroisómeros (*cis* y *trans*), estas características son muy relevantes en cuanto a los efectos biológicos debido a que el modo de acción en los canales de Na⁺ y la toxicidad en mamíferos es esteroespecífica, los isómeros *cis* generalmente son más tóxicos que los *trans* (Casida *et al.*, 1983). El modo de acción de la mayoría de estos plaguicidas se basa en la interrupción del correcto funcionamiento de los canales de sodio mediados por voltaje, los piretroides se unen a la subunidad α del canal de sodio y hacen más lenta su activación y cierre llevando a la célula a un estado estable de hiperexcitación debido a la apertura por hiperpolarización de los canales de Na⁺ lo que ocasiona que se mantengan activos

por mucho más tiempo permitiendo que una mayor cantidad de iones crucen y despolaricen la membrana de las neuronas (Shafer *et al.*, 2005).

También existen piretroides que se unen a los canales GABA dependientes de cloro (Forshaw *et al.*, 2000), así como algunos reportes de compuestos que interrumpen el correcto funcionamiento de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} (Enan y Matsumura, 1993), los insecticidas piretroides de mayor importancia y estudio son la cipermetrina, aletina, fenvalerato y permetrina (Ramírez y Lacasaña, 2001). Entre las consecuencias negativas para los seres vivos que ocasionan los piretroides se encuentran efectos en el sistema reproductor masculino como aneuploidías en espermatozoides, incremento en el riesgo a padecer tumores cerebrales en niños, leucemia linfocítica y enfermedades coronarias (Tang *et al.*, 2017).

1.2. Coadyuvantes

Dentro de los plaguicidas se pueden hallar sustancias de acompañamiento como agregados inertes, aditivos y coadyuvantes o adyuvantes, que son compuestos químicos que se adicionan al formulado con el fin de facilitar su aplicación y mejorar la actividad de los ingredientes activos desde la fase de preparación de la mezcla hasta su acción en campo (Alfaro, 2002), muchos de éstos se encuentran por separado de los plaguicidas por lo que pueden ser agregados posteriormente al tanque de preparación (Adjuvant Guide, 2016).

Los coadyuvantes han sido utilizados desde el mismo tiempo que los plaguicidas, por ejemplo, a inicios del siglo XX las proteínas de animales como el caseinato de calcio se utilizaba como dispersante para el arseniato de plomo, los primeros plaguicidas eran difíciles de formular y de asperjar adecuadamente y solo algunos coloides naturales y surfactantes eran buenos como adyuvantes (Witt, 2012).

Las funciones de los coadyuvantes van desde mejorar el rendimiento del plaguicida al hacerlo más húmedo, hasta estimular el crecimiento del cultivo por lo que de estos compuestos se clasifican a partir de su efecto principal en activadores como los tensoactivos, penetrantes y adherentes y los utilitarios como correctores del agua, antiderivantes y compatibilizantes (Adjuvant Guide, 2016). Cada uno de ellos tiene

características fisicoquímicas y funciones específicas, entre las que destacan potenciar el desempeño, incrementar la absorción en los tejidos de las plantas y disminuir la fotodegradación de los herbicidas y plaguicidas con los que se encuentran en combinación (Curran y Ligenfelter, 2009). En seguida se menciona una breve descripción de las principales características de los coadyuvantes mencionados.

1.2.1. Activadores.

Son comúnmente utilizados para potenciar el desempeño de las aplicaciones postemergentes, pueden incrementar la actividad de los herbicidas, así como su absorción en el tejido de las plantas, resistencia a la lluvia, también reduce la fotodegradación

1.2.1.1. Tensoactivos.

También conocidos como surfactantes (**surface action agent**: agente de acción superficial). Su función es disminuir la tensión superficial del agua que actúa como diluyente del agroquímico, propicia que las gotas producidas por la mezcla del plaguicida tomen el mayor contacto posible con la superficie de las hojas al disminuir su tensión superficial (Aplicación Eficiente de Fitosanitarios, 2014).

1.2.1.2. Penetrantes.

Cumplen con la función de lograr que los ingredientes activos ingresen a través de las membranas, lo cual se logra por su mayor permanencia debido a una evaporación lenta y por su capacidad de disolver las capas cerosas de las hojas. Debido a su acción tienen cierto grado de fitotoxicidad y se usa frecuentemente en combinación con herbicidas (Aplicación Eficiente de Fitosanitarios, 2014).

1.2.1.3. Adherentes.

Su función es fijar el plaguicida a la superficie de las hojas de los cultivos con el fin de evitar el lavado de los productos, es muy frecuente el uso de este tipo de compuestos en zonas tropicales donde se producen lluvias torrenciales de corta duración (Aplicación Eficiente de Fitosanitarios, 2014).

1.2.2. Utilitarios

Dentro de estos coadyuvantes se encuentran:

1.2.2.1. Correctores de aguas.

El término de corrector de agua hace referencia a la acidificación del medio debido al secuestro de cationes producidos en la mezcla de plaguicida más coadyuvantes (Aplicación Eficiente de Fitosanitarios, 2014).

1.2.2.2. Antiderivantes.

Son aquellos que aumentan la densidad de la mezcla para producir gotas de mayor tamaño, diámetro volumétrico mediano, para evitar el traslado por el viento (Aplicación Eficiente de Fitosanitarios, 2014).

1.2.2.3. Compatibilizantes.

En el caso de que dos productos no se puedan mezclar es necesario mediar esta unión a través de este tipo de coadyuvantes; sin embargo esta asociación solo se realiza a nivel de laboratorio en donde se garantiza que los principios activos conserven sus cualidades originales (Aplicación Eficiente de Fitosanitarios, 2014).

2. ANTECEDENTES

2.1 México y el consumo de plaguicidas y coadyuvantes.

En México, la superficie destinada a la agricultura es de 27 496 118 ha, los principales cultivos son el maíz en grano, sorgo, trigo, jitomate, chile verde, naranja, limón, aguacate, café cereza y plátano. Las ha de cultivo, así como su volumen y valor de producción durante el 2014 se pueden observar en la Tabla 1 (Encuesta Nacional Agropecuaria, 2017).

Tabla 1. Hectáreas cultivadas, volumen y valor de producción de los principales cultivos de México.

Cultivo	Cíclicos					Perennes				
	Maíz grano	Sorgo	Trigo	Jitomate	Chile verde	Naranja	Limón	Aguacate	Café cereza	Plátano
Hectáreas	7428	2078	707	51	143	353	172	176	737	75
Volumen de producción (miles de toneladas)	23273	8394	3670	2875	2733	4533	2187	1521	1166	2151
Valor de producción (millones de pesos)	72518	19984	12955	15736	17896	6727	8990	20716	5594	6306

Datos en tabla tomados de la Encuesta Nacional Agropecuaria, 2017.

La República Mexicana cuenta con una autosuficiencia alimentaria del 55%, posicionándolo como el segundo importador de alimentos a nivel mundial (AMIFAC, 2013). Debido a la gran importancia económica que tiene la agricultura es indispensable el uso de plaguicidas, como ya se mencionó anteriormente México es el tercer país con mayor consumo de plaguicidas mundialmente (Zhang, 2018).

Específicamente para 2013 se emplearon 37 455 t de insecticidas; 31 195 ton de herbicidas y 42 223 t de fungicidas (FAO, 2016), de esta manera los productos de mayor venta son: organofosforados, en especial, paratión metílico, metamidofos y malatión, también de importancia se encuentran los carbamatos mancozeb y carbofurano (Albert, 2005). En las zonas noroeste y centro del país se consumen cantidades importantes de plaguicidas de todo tipo para producir granos y una gran variedad de hortalizas, entre ellas, jitomate, cucurbitáceas y chile, por otra parte, en las zonas de plátano se consumen principalmente fungicidas, mientras que en el maíz se aplican sobre todo herbicidas como el glifosato y paraquat (Albert, 2005). Además es muy importante señalar que no hay un agricultor en México que no use uno o más tipos de plaguicidas o que los mezclen con otras sustancias que intensifiquen su efecto como lo hacen los coadyuvantes, especialmente en el país y debido al amplio uso de herbicidas los adyuvantes de mayor aplicación son los surfactantes, penetrantes, adherentes y antiderivantes.

Cabe destacar que en México aún se utilizan plaguicidas y fertilizantes que han sido suspendidos en diferentes países, puesto que se tienen amplias investigaciones en donde se presentan pruebas sobre su peligrosidad, estos estudios son realizados principalmente por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS), dentro de los plaguicidas prohibidos se encuentran la atrazina, azinfos metílico, carbofurano, diurón, endosulfán, metamidofos, monocrotofós, ometoato, paraquat, paratión metílico, tamarón y glifosato (Arellano-Aguilar y Rendón von Osten, 2016).

Este uso indiscriminado se debe a falta de regulación y monitoreo en el país, no existe información detallada sobre el uso de estas sustancias y cuáles son, particularmente en México únicamente existe un Catálogo Oficial de Plaguicidas elaborado por la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) el cual fue actualizado por última vez en 2004 (Arellano-Aguilar y Rendón von Osten, 2016), en este listado no se tiene referencia alguna sobre los adyuvantes, por lo que se puede argumentar que no hay información actualizada ni necesaria para el uso adecuado de plaguicidas y coadyuvantes.

Aunado a lo anterior se conoce que el 4% del total de la población, 5.5 millones de habitantes, se dedica a la agricultura, se refiere que el 98.3% son jornaleros, de los cuales el 88.7% son hombres y el 11.8% mujeres (Análisis de Extensionismo Agrícola, 2011), este sector productivo es completamente vulnerable a las consecuencias negativas que puedan tener los pesticidas y coadyuvantes debidas a la exposición ocupacional, por lo que el cuidado de esta población, económicamente importante para el país, debe ser de vital importancia.

2.2 Evaluación de riesgo toxicológico.

A pesar de los beneficios que otorgan los plaguicidas y coadyuvantes se sabe que los primeros no son de fácil degradación, no solo eliminan a los objetivos para los que fueron desarrollados, sino que también afectan al ambiente. Algunas investigaciones han mostrado que el daño que provocan los pesticidas también repercute en la salud humana, principalmente en la de los jornaleros (WHO, 1990), también se ha relacionado la exposición a plaguicidas con enfermedades cardiovasculares, respiratorias, diabetes y cáncer (Aktar-Wasim *et al.*, 2009), así como con daño en las funciones nerviosas (Dick, 2007), respiratorias (Hoppin *et al.*, 2008), inmunes (Colosio *et al.*, 2005) y reproductoras (Sharpe, 2004), también se han asociado con alteraciones en células germinales y somáticas, provocando un aumento en la ocurrencia de enfermedades genéticas, cromosómicas y multifactoriales (Aiassa *et al.*, 2012). En cuanto a los coadyuvantes se asume que

son biológicamente inertes e incluso no se encuentran registrados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América dejando de lado su regulación y monitoreo en sus estados individuales. Se han encontrado residuos de coadyuvantes en productos de cuidado personal de uso diario particularmente en shampoos y en gran medida en los ambientes a los que se encuentran expuestos polinizadores, ocasionando un decremento en la cantidad de individuos de estas poblaciones (Mullin *et al.*, 2011).

La evaluación del riesgo toxicológico enfocada a agroquímicos generalmente solo toma en cuenta los ingredientes activos de los plaguicidas por lo que se conoce suficiente información acerca de lo que pueden ocasionar estos compuestos químicos; sin embargo, se pierden de vista efectos importantes que pueden tener los demás componentes de la mezcla que se aplican en cultivos, entre ellos la de los coadyuvantes, consecuencias que pueden perjudicar tanto a las especies blanco como a las que no lo son (Mullin *et al.*, 2011).

Una forma de conocer los posibles efectos que ocasionan diferentes xenobióticos es a través de diferentes pruebas. Para la adecuada evaluación es recomendable llevar a cabo al menos un ensayo de mutagenicidad en células somáticas, especialmente para sustancias con exposición relativamente alta en los seres humanos, como lo son los plaguicidas y adyuvantes. Actualmente se sabe que los eventos mutagénicos involucrados en la carcinogénesis son aquellos que se producen por dos modos de acción, el primero, reactivos con el ADN o genotóxicos, mediado por la unión covalente del compuesto químico o sus metabolitos al ADN o por alteraciones en su estructura o contenido. El segundo mecanismo, no reactivos con el ADN o no genotóxicos, involucra alteraciones químicas en la homeostasis que pueden haber sido originadas por necrosis de tejidos y apoptosis celular (Waters *et al.*, 1999). Varias son las pruebas toxicológicas que se llevan a cabo para el daño ocasionado por estos compuestos, como los son las aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y ensayo de electroforesis alcalina aunque una de las más reconocidas es la prueba de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.

2.2.1 *Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis (MNBC).*

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis es una prueba práctica, universalmente válida, accesible tecnológicamente y útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por diversos agentes (Zalacain *et al.*, 2005),

Este ensayo fue propuesto por primera vez en 1985 por Fenech y Morley, en este trabajo se utiliza el bloqueo de la citocinesis a través del uso de la citocalasina b que es una sustancia inhibidora del anillo contráctil de actina encargado de la división celular. Gracias a este compuesto es que se asegura que las células que se están evaluando pasen por al menos una división celular, lo que permite la observación de células binucleadas o multinucleadas (Fenech, 2000), es posible evidenciar a través de un análisis microscópico simple, rápido y objetivo: pérdida cromosómica y rompimiento a través de la visualización de micronúcleos (MN), así como puentes nucleoplásmicos (PN) y brotes nucleares (Bn), respectivamente. Además se puede analizar el ritmo de la división celular a través del índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC) y permite tener una visión general acerca de la muerte celular ocasionada por el xenobiótico gracias al conteo de células apoptóticas y necróticas y la posterior obtención del índice de citotoxicidad nuclear (ICDN) (Fenech, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

En la actualidad el ensayo de MNBC se considera una prueba "citómica" de inestabilidad cromosómica, disfunción mitótica y muerte celular (Fenech, 2006). Lo que la acredita como una prueba muy útil para evaluar efectos celulares y genéticos ocasionados por xenobióticos.

3. JUSTIFICACIÓN.

Es muy importante señalar que no hay un agricultor en México y en el resto del mundo que no use uno o más tipos de plaguicidas o que los mezclen con otras sustancias como los coadyuvantes, las características que poseen estos últimos pueden modificar el efecto biológico de los plaguicidas en las personas que aplican, por lo que el hecho de conocer las consecuencias que pueden acarrear este tipo de mezclas, así como los coadyuvantes por sí mismos, es de vital importancia, además de que este tipo de efectos no han sido descritos con anterioridad. Para evaluar las consecuencias de los compuestos químicos mencionados se propone el uso del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis que es una prueba que permite evidenciar daño genotóxico y citotóxico.

4. HIPÓTESIS.

La genotoxicidad ocasionada por los plaguicidas se incrementará en cultivos celulares de linfocitos tratados con la mezcla de un coadyuvante, en comparación con los tratados únicamente con los plaguicidas de forma individual.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del coadyuvante Hidrix®, tanto en forma directa como en la mezcla con los plaguicidas carbofurano, permetrina o el herbicida glifosato a través del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.

5.1. Objetivos particulares

Identificar las frecuencias de MN, PN y Bn en los cultivos celulares de linfocitos tratados con los plaguicidas carbofurano, permetrina, el herbicida glifosato y el coadyuvante Hidrix® solo y en combinación con los pesticidas.

Obtener los IPBC e ICDN ocasionados por Hidrix® de manera individual y en la mezcla de los agroquímicos.

Comparar los niveles de daño ocasionados por los plaguicidas individualmente y en la mezcla con el coadyuvante para determinar si éste modifica el comportamiento de los plaguicidas.

6. MÉTODOS

6.1 Selección del coadyuvante y plaguicidas.

Uno de los coadyuvantes utilizados en México es el microencapsulador antiacarreo con carga positiva Hidrix® desarrollado por la empresa Química Sagal. Es una microemulsión inversa con ingredientes activos de aminas de ácidos orgánicos y alifáticos, gracias a estas características químicas tiene las ventajas de aumentar la permanencia de los pesticidas en el cultivo mezclados con él, agrandar la cobertura y adherencia hasta 60% pues forma gotas uniformes, también amplía la penetración de los pesticidas en las células por su alto grado de solubilidad en lípidos, además reduce el acarreo debido a que por su carga positiva Hidrix® es atraído por la carga negativa de las plantas (Ficha técnica Hidrix®). Las características mencionadas con anterioridad fueron favorables para su selección pues cumple con los rasgos más comunes de este tipo de compuestos químicos, además de tener una amplia comercialización en el país.

Los plaguicidas se seleccionaron a partir de la cantidad de hectáreas que tienen los principales cultivos del país, el volumen y el valor de producción, así como por la compatibilidad de los mismos con Hidrix® se utilizó permetrina, carbofurano y glifosato.

6.2 Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de la Citocinesis.

Para la realización del ensayo se utilizaron muestras de sangre completa de 2 individuos de sexo masculino con edad de 20 y 25 años, con buen estado de salud y sin toxicomanías.

6.2.1 Siembra.

De cada una de las muestras de sangre, se depositaron por goteo de 8 a 10 gotas (0.5 mL), en tubos cónicos para centrifuga de 15 mL previamente preparados con 4.5 mL de medio RPMI 1640 con L-Glutamina y bicarbonato (MicroLab) suplementado con 0.2 mL de fitohemaglutinina (MicroLab), para estimular la división celular en los linfocitos. Posteriormente, los tubos se colocaron en la incubadora a 37 °C durante 72 h.

6.2.2 Inducción de daño.

A las 24 h del inicio del experimento se agregaron las diferentes concentraciones a evaluar, para los cultivos con solo el coadyuvante las concentraciones aplicadas fueron 1, 5 y 10 µg/mL, para el glifosato fueron 25, 50, 75 y 100 µg/mL, para el carbofurano 0.6, 2, 5 y 7.5 µg/mL y para la permetrina 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 µg/mL, las concentraciones antes mencionadas se agregaron tanto en la mezcla con el adyuvante y por individual.

Para cada uno de los experimentos realizados se contó con un testigo negativo, sin tratamiento, y un testigo positivo, tratado con 200 µg/mL de bleomicina (BLM) que es un agente clastogénico, por lo que de esta manera se aseguraba la obtención de MN.

6.2.3 Inhibición de la citocinesis.

A las 48 horas de la siembra, 24 h después de adicionar los xenobióticos, se agregaron 270 µL de citocalasina-b (concentración final de 6 µg/mL) a cada tubo. Los cultivos se regresaron a la incubadora a 37 °C.

6.2.4 Cosecha celular.

Veinticuatro horas más tarde, a las 72 h del inicio se realizó la cosecha del cultivo, para lo cual los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió delicada y perfectamente el botón celular. Posteriormente, se realizó la fijación de las células, proceso por el cual se tiene como

objetivo la eliminación de eritrocitos y detrito celular, para esto se preparó fijador MAA (metanol-ácido acético) en proporción 3:1 frío. A cada uno de los tubos, se adicionaron 5 mL de fijador, se mezcló rápidamente y los cultivos se colocaron nuevamente en centrifuga por 10 minutos a 1500 rpm, transcurrido el tiempo de centrifugación se retiró el sobrenadante, se resuspendió el botón celular y se adicionaron 10 mL de fijador, los pasos anteriores se repitieron hasta obtener un sobrenadante transparente y un botón celular de color blanquecino. Al término los cultivos se mantuvieron en refrigeración (4-8 °C).

6.2.5 Preparación de laminillas.

Los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos se retiró el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente el botón celular, se tomaron unas cuantas gotas y delicadamente se deslizaron en portaobjetos limpios, secos y a temperatura ambiente para asegurar que el citoplasma de las células permaneciera intacto y se facilitara el conteo celular, se hicieron 3 laminillas por individuo de cada uno de los plaguicidas y el coadyuvante. Las preparaciones se dejaron secar al aire. Una vez secas por completo se tiñeron con una mezcla de amortiguador de fosfatos y colorante Giemsa (Sigma-Aldrich) de 3 a 5 minutos, transcurrido el tiempo se les dio un enjuague rápido en agua. Por cada 10 laminillas se preparó colorante nuevo.

6.2.6 Observación y conteo celular.

Cada laminilla se analizó al microscopio óptico en campo claro a 40x. Se contaron al azar 1000 células binucleadas consecutivas para así obtener la frecuencia de MN, PN y Bn también se registraron las primeras 500 células multinucleadas, ya sean mononucleadas (MONO), binucleadas (BN), trinucleadas (TRI) y tetranucleadas (TETRA) con la finalidad de obtener el IPBC y el ICDN, a través de las siguientes formulas:

$$IPBC = \frac{MONO+2(BN)+3(TRI+TETRA)}{500} \quad ICDN = \frac{MONO+AP+NEC+2(BN)+3(TRI)+4(TETRA)}{500}$$

Los criterios para contabilizar las células se basaron en la descripción detallada del proyecto humano de micronúcleos (HUMN project) propuesta por Fenech *et al.*

(2003). Las principales características se describen a continuación:

- Células binucleadas (BN).

1. Ser binucleada.
2. Las membranas de ambos núcleos, así como de la célula deben estar intactas.
3. Los dos núcleos de la célula deben ser muy similares en tamaño, patrón e intensidad de la tinción.
4. Los dos núcleos pueden tocarse pero no estar sobrepuestos, en caso de que lo estén, la célula solo puede tomarse en cuenta si se distinguen las membranas de ambos núcleos.
5. La membrana citoplasmática de la célula binucleada debe distinguirse perfectamente, si esto no sucede pero se está seguro que los dos núcleos pertenecen a la misma célula puede tomarse en cuenta.

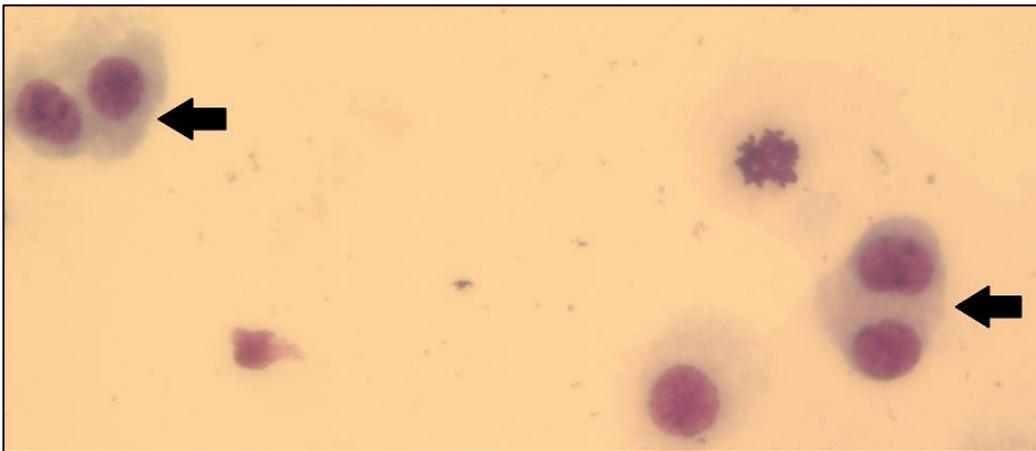


Fig. 1. Células binucleadas.

- Micronúcleos (MN)

1. Deben ser muy similares al núcleo principal.
2. Diámetro usualmente entre $1/16$ y $1/3$ del núcleo principal y alrededor de $1/9$ de la célula completa.

3. Forma ovalada o circular.
4. No son refringentes.
5. No deben estar conectados con el núcleo principal.
6. Los MN pueden tocar el núcleo principal pero su membrana debe ser completamente distinguible de la membrana de los núcleos principales.
7. Su tinción debe ser igual o más intensa que la de los núcleos principales.



Fig. 2. Células BN con micronúcleos.

- Puentes nucleoplásmicos (PN)

1. Son enlaces nucleoplásmicos continuos entre los dos núcleos de la célula binucleada.
2. El ancho del puente es variado pero no debe exceder $\frac{1}{4}$ del diámetro de los núcleos.
3. Misma tinción que los núcleos.
4. Se puede encontrar más de un puente.
5. Las células con puentes pueden o no contener MN.

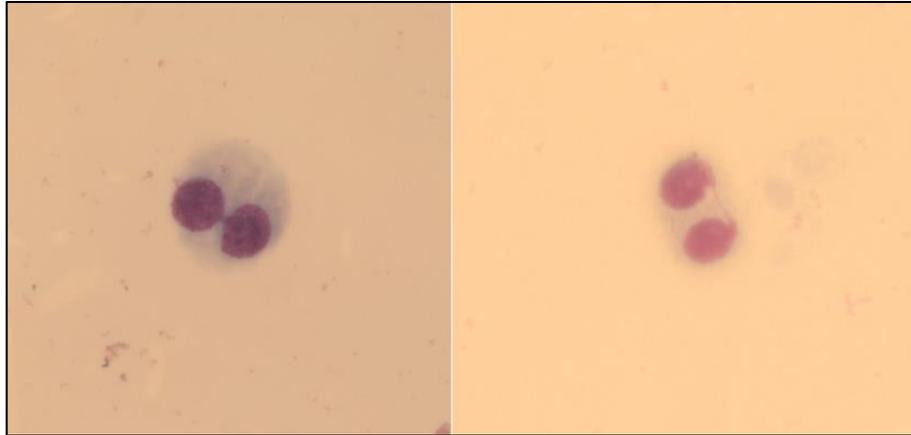


Fig. 3. Células BN con puentes nucleoplásmicos

- Células apoptóticas

1. Las células apoptóticas en estado temprano se identifican por la presencia de la condensación de la cromatina con las membranas del núcleo y bordes citoplasmáticos intactos.
2. Células apoptóticas en estado tardío exhiben fragmentación nuclear en cuerpos nucleares pequeños con membrana y citoplasma intactos.
3. La intensidad de la tinción en el núcleo o fragmentos nucleares y el citoplasma es usualmente más fuerte que en las células que se fijaron vivas.

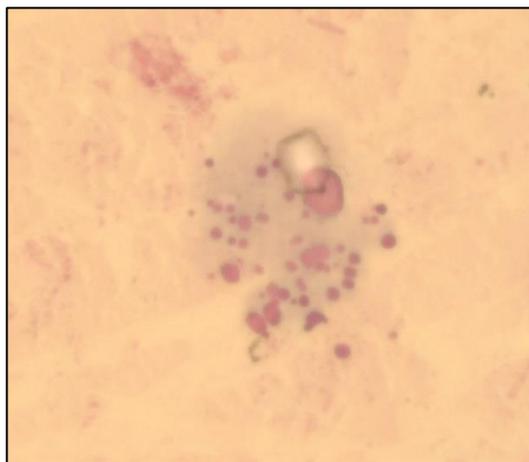


Fig. 4. Célula apoptótica.

- Células necróticas.

1. Las células necróticas en estado temprano se identifican por la presencia de citoplasma pálido con numerosas vacuolas (la mayoría en citoplasma y solo algunas en el núcleo), la membrana citoplasmática está dañada y el núcleo está relativamente intacto.
2. Células necróticas en estado tardío exhiben pérdida del citoplasma y membrana irregular o completamente dañada y con material genético fuera de los límites del núcleo.
3. La intensidad de la tinción en el núcleo y el citoplasma es usualmente menor que en las células que se fijaron vivas.

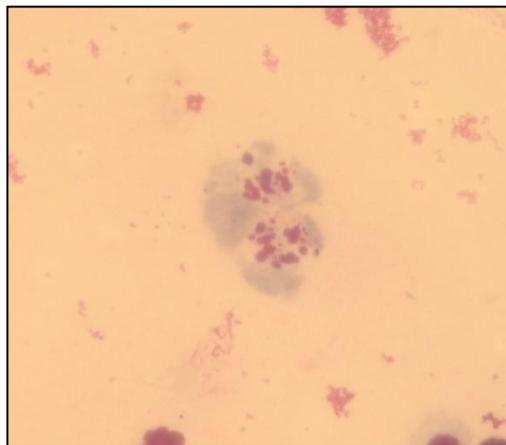


Fig. 5. Célula necrótica.

6.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron con el programa GraphPad Prism 8, se realizaron pruebas de t pareadas para evaluar si existía diferencias intra individuales en los experimentos realizados por cada individuo y su respectiva repetición, esto para cada una de las variables evaluadas, es decir, para los plaguicidas por individual y con la mezcla del coadyuvante, así como para el adyuvante solo, tanto para las frecuencias de MN como para los IPBC e ICDN. Asimismo se evaluaron las diferencias interindividuales. Posteriormente, para estimar las diferencias entre las distintas

concentraciones evaluadas y los testigos negativo y positivo se hicieron pruebas de Mann Whitney y Wilcoxon. Las diferencias encontradas se consideraron como significativas cuando el valor de $p \leq 0.05$. En cada una de las gráficas y tablas se muestran la media \pm el error estándar.

7. RESULTADOS

7.1 Micronúcleos (MN)

A partir de los distintos experimentos realizados se llevaron a cabo pruebas de t pareadas para determinar las diferencias intraindividuales en las repeticiones realizadas, debido a que éstas fueron no significativas, cada experimento por individuo fue unificado en uno solo, con la finalidad de comparar las diferencias interindividuales, se corroboró que esta prueba también fue negativa, por lo que los datos que se presentan a continuación son el conjunto de las repeticiones realizadas en ambos individuos analizados. La información obtenida acerca de las frecuencias de MN por cada 1000 células BN son los siguientes:

7.1.1 Hidrix®, el coadyuvante.

La mayor frecuencia de MN para el coadyuvante analizado fue de 0.005, lo que indica que se realizó un conteo de 5 MN por cada 1000 células binucleadas (BN), dato registrado en la concentración de 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas, $p \leq 0.05$, en las tres concentraciones analizadas, 1.0, 5.0 y 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 6.), lo que puede sugerir que el daño genético ocasionado primero incrementa y conforme aumenta la concentración va disminuyendo.

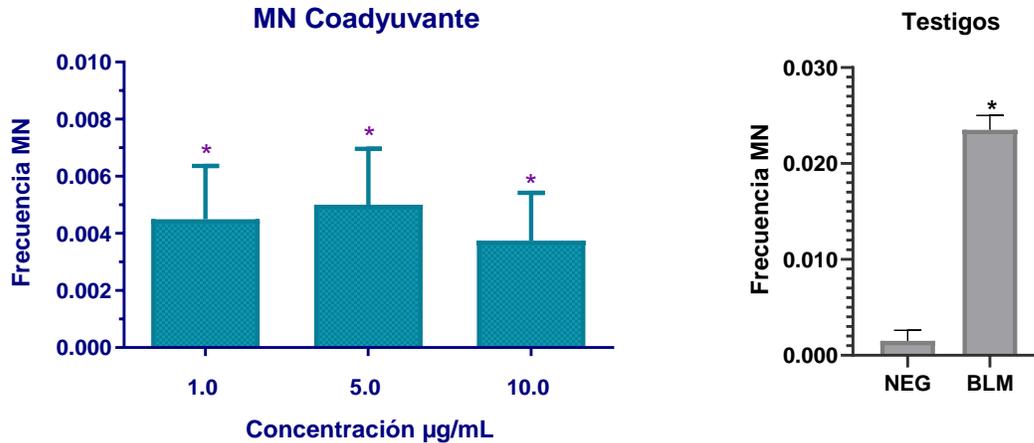


Fig. 6. Frecuencia de MN ocasionados por las diferentes concentraciones del coadyuvante Hidrix®

7.1.2 Permetrina, insecticida piretroide.

Para los cultivos tratados con el plaguicida de forma individual se puede observar que las concentraciones que aumentaron la frecuencia de MN de manera significativa, $p \leq 0.05$, en comparación con el testigo negativo fueron 0.4 y 1.0 µg/mL presentando una frecuencia de 0.004 y 0.003, 4 y 3 MN por cada 1000 BN, respectivamente, mientras que todas las demás no presentaron diferencias (Fig. 7.). Por otro lado cuando se evaluó la mezcla con el coadyuvante las frecuencias aumentaron en las cinco concentraciones analizadas y hubo diferencias representativas, $p \leq 0.05$, en dos concentraciones 0.4 y 0.8 µg/mL en comparación con el testigo negativo. El comportamiento del daño, de acuerdo con la curva de dosis-respuesta para la permetrina aplicada por individual indica que el insecticida aumenta la frecuencia de MN en la segunda concentración evaluada y que posteriormente el daño empieza a disminuir con respecto a las que si presentan diferencias significativas, también en la concentración de 1 µg/mL la frecuencia de MN vuelve a aumentar, el decremento en la frecuencia es visto nuevamente en los cultivos tratados con la mezcla de la permetrina y el adyuvante, la disminución se mantiene a partir de la concentración de 0.6 µg/mL (Fig. 7.)

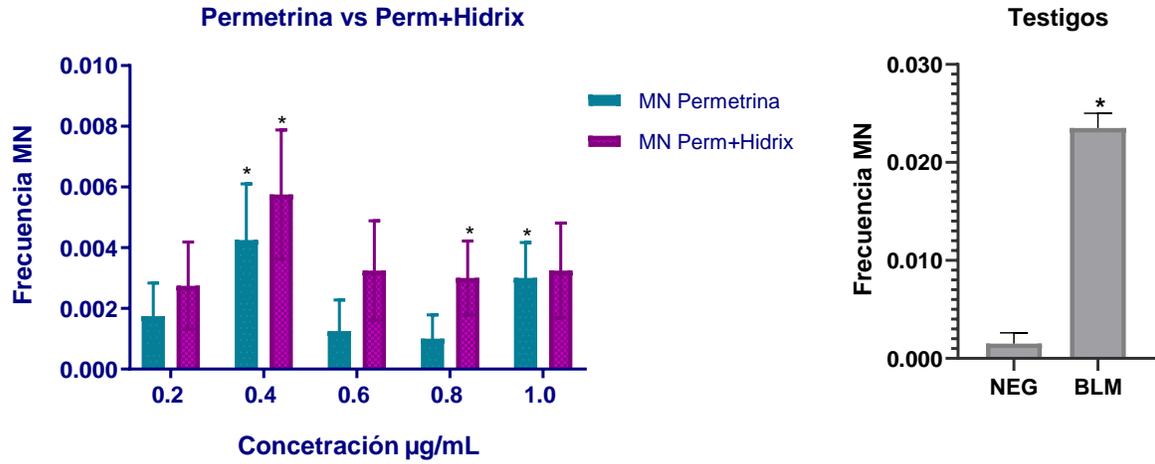


Fig. 7. Frecuencias de MN ocasionadas por el insecticida en forma individual y la mezcla de permetrina con el coadyuvante.

7.1.3 Carbofurano, insecticida carbamato.

En el caso de las frecuencias de micronúcleos ocasionadas por el insecticida carbofurano se observa que existen diferencias significativas, $p < 0.01$, en comparación con el testigo negativo en las concentraciones analizadas, estas son 0.6, 2, 5 y 7.5 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 8), lo anterior indica que el daño se incrementa y conforme va aumentando la concentración del plaguicida las frecuencias de MN van disminuyendo, registrando frecuencias de 0.006 a 0.004 MN. Cuando se analizó la mezcla con el coadyuvante las frecuencias disminuyeron en todas las concentraciones exceptuando la segunda, 2 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 8.) indicando que el coadyuvante está ejerciendo un efecto sobre el carbofurano disminuyendo su característica genotóxica.

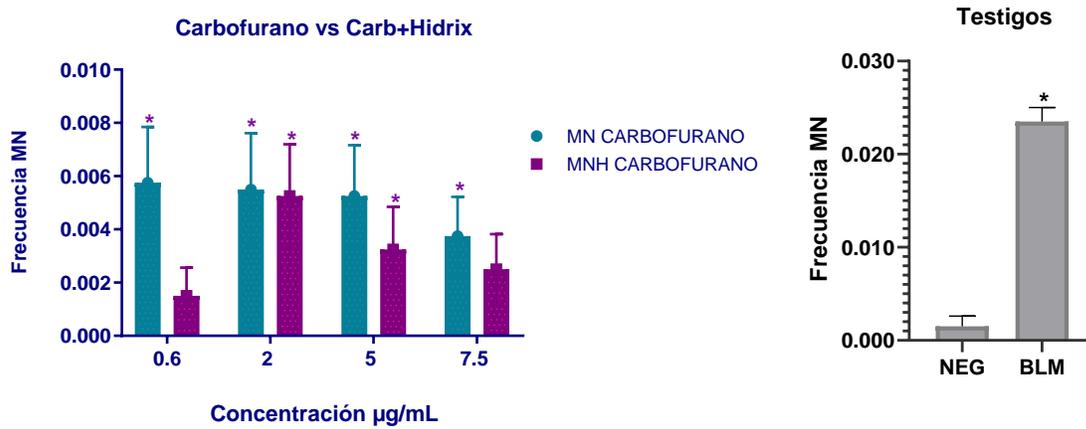


Fig. 8. Frecuencias de MN ocasionados por el plaguicida carbofurano aplicado en forma individual y en combinación con el coadyuvante.

7.1.4 Glifosato, herbicida.

En cuanto a la frecuencia de MN ocasionado por el glifosato de manera individual se aprecia una disminución de micronúcleos conforme aumenta la concentración, las frecuencias son significativamente diferentes para las primeras tres concentraciones evaluadas. Cuando el herbicida se combina con el adyuvante existen frecuencias muy similares para las concentraciones de 25 y 75 $\mu\text{g/mL}$ (4 MN por cada 1000 binúcleadas) estas frecuencias significativamente diferentes contra el testigo negativo, mientras que para 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ se observaron frecuencias menores (Fig. 9.).

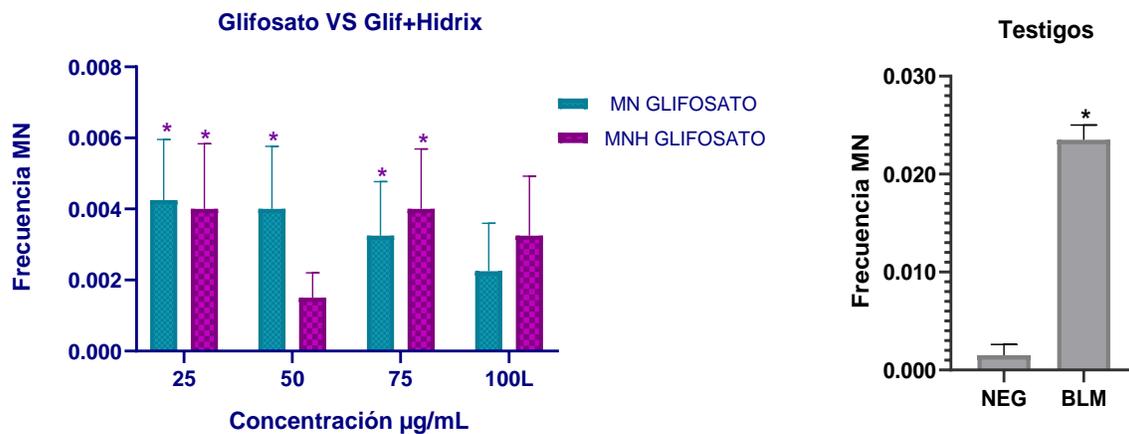


Fig. 9. MN ocasionados por el glifosato con y sin el coadyuvante.

7.2 Puentes nucleoplásmicos (PN) y brotes nucleares (Bn).

Los datos registrados de PN y Bn no fueron significativamente diferentes al comparar con el testigo negativo para ninguno de los experimentos realizados, lo que indica que estos compuestos químicos no están ocasionando rearrreglos cromosómicos ni amplificación génica.

Tabla 2. Cantidad de PN y Bn por cada 1000 células BN.

Plaguicida		PN \pm error estándar		Bn \pm error estándar	
Testigo negativo		0 \pm 0		1 \pm 0	
Coadyuvante	1	0 \pm 0		0.25 \pm 0.21	
	5	0 \pm 0		0 \pm 0	
	10	0 \pm 0		0.75 \pm 0.41	
		Sin coadyuvante	Con coadyuvante	Sin coadyuvante	Con coadyuvante
Permetrina	0.2	0 \pm 0	0.25 \pm 0.21	0.5 \pm 0.43	0 \pm 0
	0.4	0 \pm 0	0.25 \pm 0.21	0.5 \pm 0.43	1 \pm 0.61
	0.6	0 \pm 0	0 \pm 0	0.5 \pm 0.25	0.5 \pm 0.25
	0.8	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0.25 \pm 0.21
	1	0 \pm 0	0.25 \pm 0.21	0 \pm 0	0.75 \pm 0.64
Carbofurano	2	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	1.5 \pm 0.55
	5	0 \pm 0	0 \pm 0	0.25 \pm 0.21	0 \pm 0
	7.5	0.25 \pm 0.21	0 \pm 0	0.25 \pm 0.21	0.5 \pm 0.43
Glifosato	25	0 \pm 0	1.25 \pm 0.41	0 \pm 0	0.5 \pm 0.25
	50	0 \pm 0	1.73 \pm 0.86	0 \pm 0	0.5 \pm 0.25
	75	0 \pm 0	0.25 \pm 0.21	0.25 \pm 0.21	0.25 \pm 0.21
	100	0 \pm 0	0.25 \pm 0.21	0 \pm 0	0.75 \pm 0.41

7.3 Índices de proliferación con bloqueo de citocinesis (IPBC) y de citotoxicidad de la división nuclear (ICDN).

7.3.1 Hidrix®, el coadyuvante.

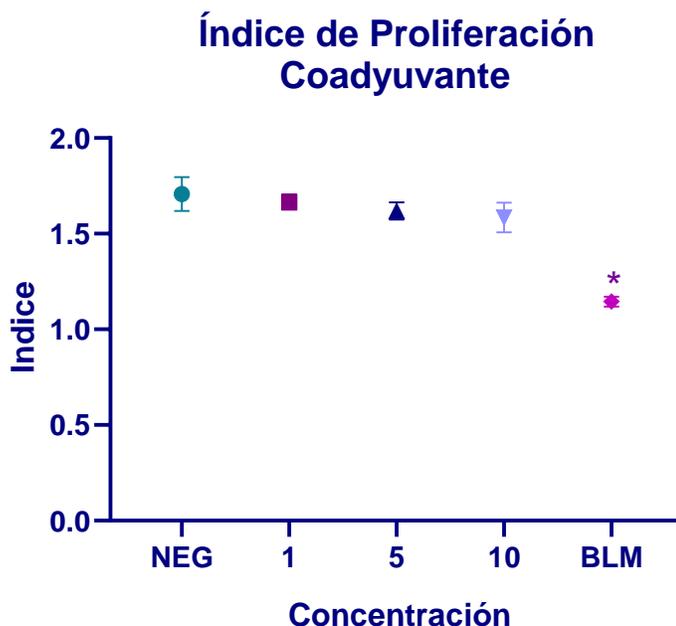


Fig. 10. IPBC e ICDN ocasionados por el coadyuvante aplicado de forma individual.

Como se observa en la *Fig. 10*, el coadyuvante no produce diferencias estadísticas en los índices de proliferación obtenidos en cada una de las distintas concentraciones, esto a partir de las evaluaciones hechas en comparación con el testigo negativo. Tampoco se encontró diferencia entre los IPBC e ICDN, lo que indica que el adyuvante no ocasiona altas frecuencias de células apoptóticas ni necróticas (*Fig. 11*).

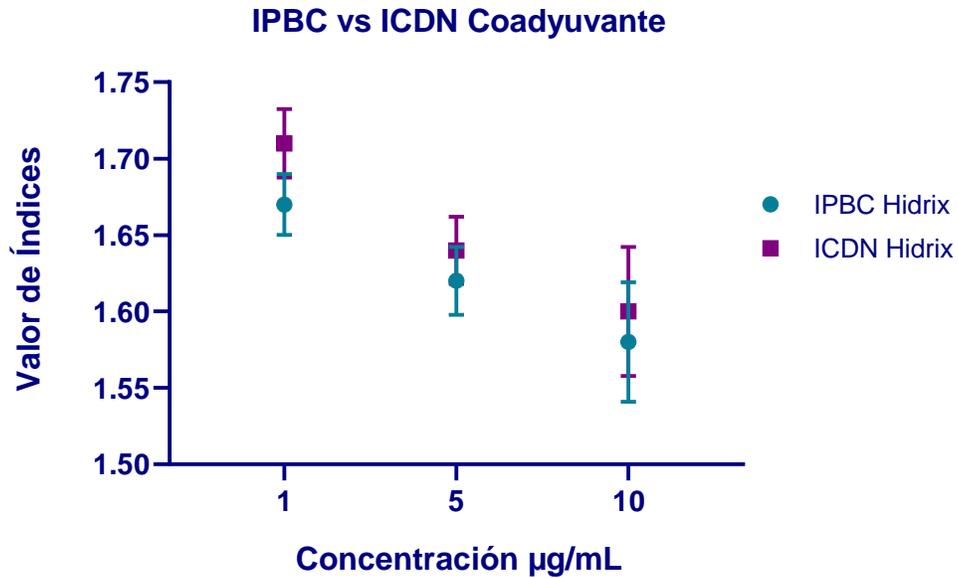


Fig. 11. Índices de proliferación y citotoxicidad ocasionados por las diferentes concentraciones evaluadas del coadyuvante Hidrix®.

7.3.2 Permetrina, insecticida piretroide.

En cuanto al efecto de la permetrina sobre la progresión de la división celular se puede ver (*Fig. 12.*) que el índice en cada concentración va disminuyendo hasta ser menor que el testigo negativo (concentración de 1.0 µg/mL con $p=0.05$), indicando que existe menor cantidad de células binucleadas, por lo que hay una correlación negativa con la concentración, $r^2=0.91$ y $p=0.01$, es decir, que conforme aumenta la concentración del insecticida las células dejan de dividirse (*Fig. 13.*).

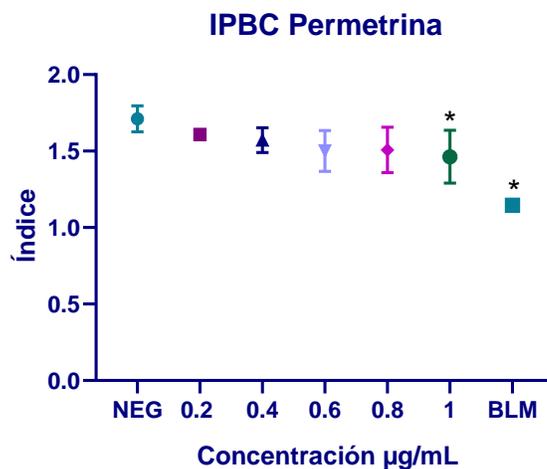


Fig. 12. Índice de Proliferación ocasionado por cada una de las concentraciones evaluadas.

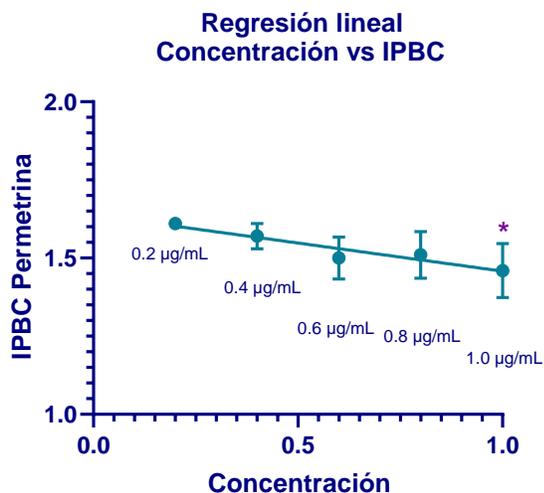


Fig. 13. Regresión lineal a partir de las diferentes concentraciones evaluadas para el insecticida permetrina.

Por otro lado la permetrina, en combinación con el adyuvante ocasiona que el ciclo celular permanezca muy similar en todas las concentraciones (*Fig. 14*). El efecto que ocasiona el adyuvante en combinación con el insecticida es significativamente diferente en comparación con la permetrina por si sola la cual induce una disminución en los valores del IPBC, $p=0.01$ (*Fig. 15*).

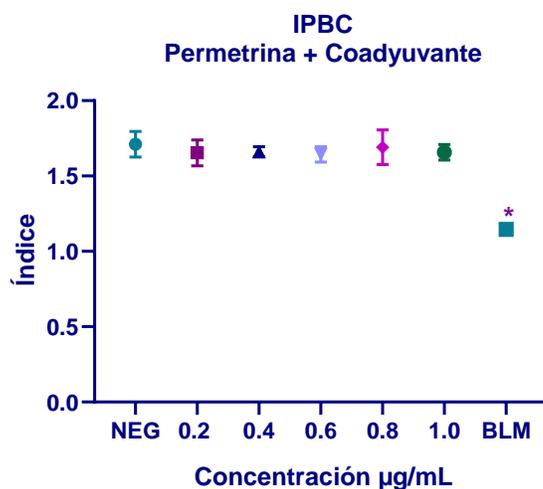


Fig. 14. IPBC ocasionado por la mezcla del insecticida con el coadyuvante.

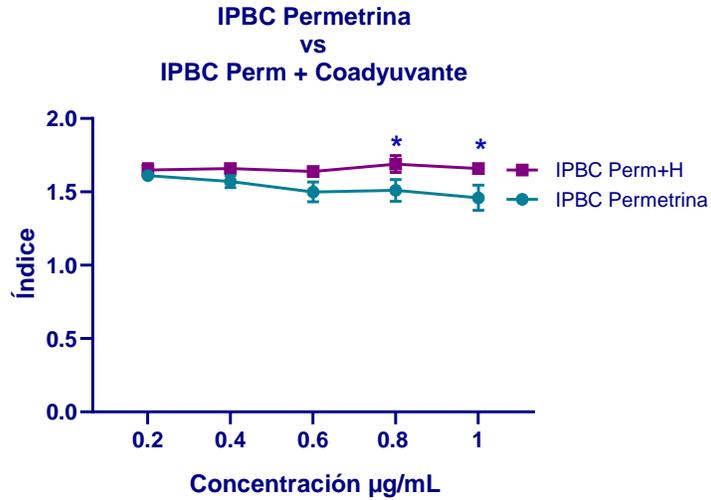


Fig. 15. Comparación de los IPBC ocasionados por la mezcla del insecticida con el coadyuvante y el insecticida aplicado en forma individual.

Los valores obtenidos para ICDN sin y con Hidrix® son muy semejantes a los de IPBC, indicando de esta manera la ausencia de células muertas (*Fig. 16*).

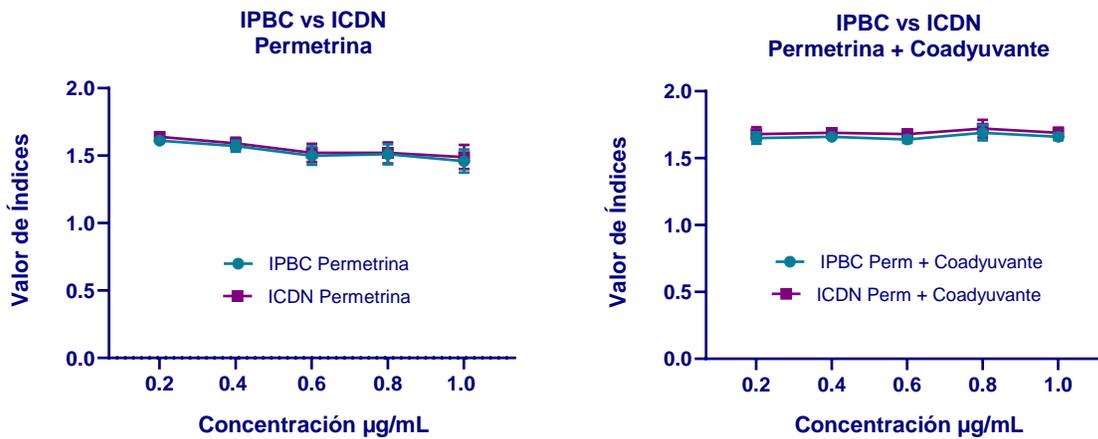


Fig. 16. Comparación de IPBC e ICDN de permetrina con y sin Hidrix®

7.3.3 Carbofurano, insecticida carbamato.

Este plaguicida no muestra efecto por si solo, ni en combinación con el adyuvante en cuanto al índice de proliferación, ni con el de citotoxicidad (Fig. 17) incluso al aumentar la concentración del compuesto los índices no se modifican con respecto al testigo negativo y siguen comportándose de la misma manera, ya sea por si solo o en la mezcla con Hidrix® (Fig. 18).

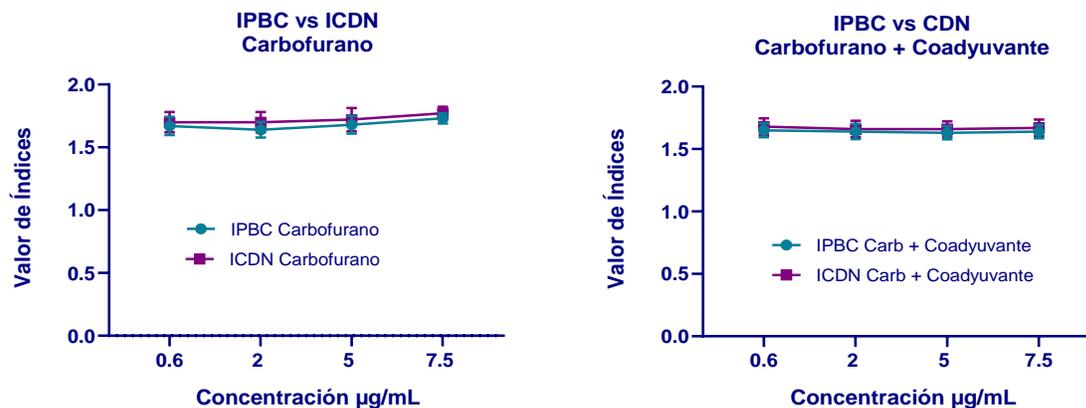


Fig. 17. Comparaciones de los valores de IPBC e ICDN con y sin adyuvante.

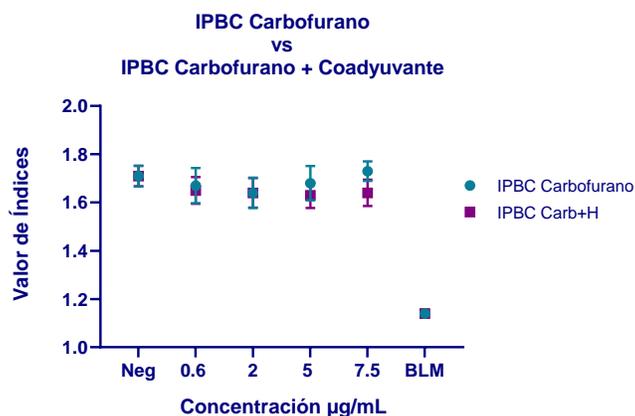


Fig. 18. Índices de proliferación con bloqueo de la citocinesis derivados de cada una de las concentraciones evaluadas para el carbofurano aplicado de forma individual y en mezcla con Hidrix®.

7.3.4 Glifosato, herbicida.

Por último el glifosato aplicado de manera individual, no afecta el índice de división celular (*Fig. 19*); sin embargo, cuando se mezcla con el coadyuvante se puede apreciar que para las concentraciones de 75 y 100 µg/mL se registra una caída del IPBC, esta disminución es significativa ($p < 0.05$) en comparación con los valores del IPBC para el testigo negativo (*Fig. 20*).

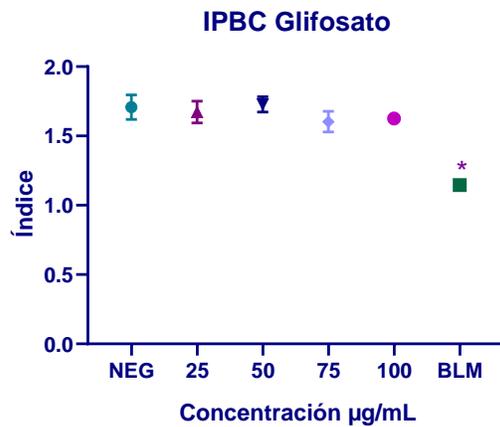


Fig. 19. IPBC ocasionado por únicamente el herbicida (* $p < 0.05$ en comparación con el testigo negativo).

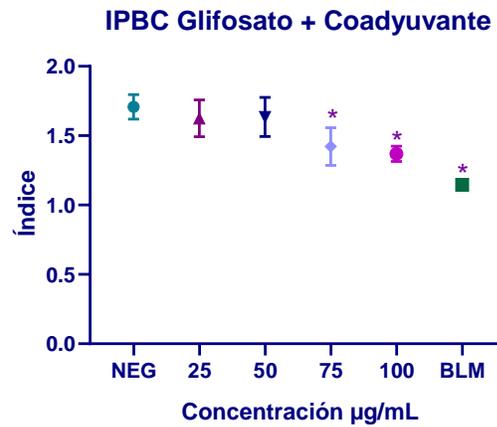


Fig. 20. IPBC ocasionado por la mezcla del glifosato con Hidrix® (* $p < 0.05$ en comparación con el testigo negativo).

Debido a esa disminución en el IPBC en los cultivos tratados con Hidrix® más el herbicida es que se encuentran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de los índices para el glifosato por si solo y en mezcla, asimismo se registra una correlación entre el IPBC y el aumento de las concentraciones cuando las células fueron tratadas, tanto con el herbicida y el coadyuvante (Fig. 21).

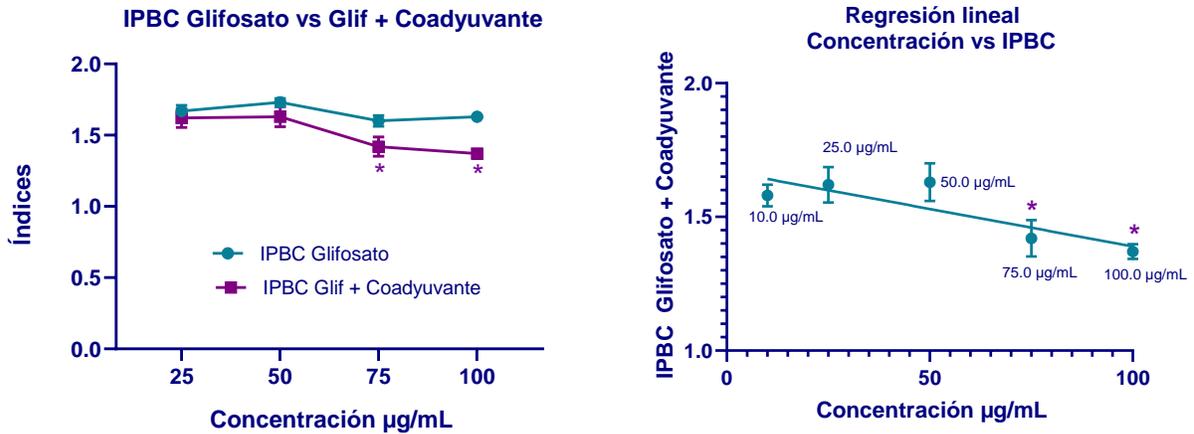


Fig. 21. Comparación entre los índices de proliferación para los cultivos tratados con el glifosato aplicado de forma individual y en mezcla con el coadyuvante y correlación entre los IPBC para las células tratadas con la mezcla del herbicida más el Hidrix® ($r^2 = 0.85, p < 0.1$).

Finalmente, no existen diferencias entre los índices de proliferación y citotoxicidad, tanto para los tratamientos con el herbicida por si solo y en mezcla con el adyuvante, indicando que no existe muerte celular (Fig. 22)

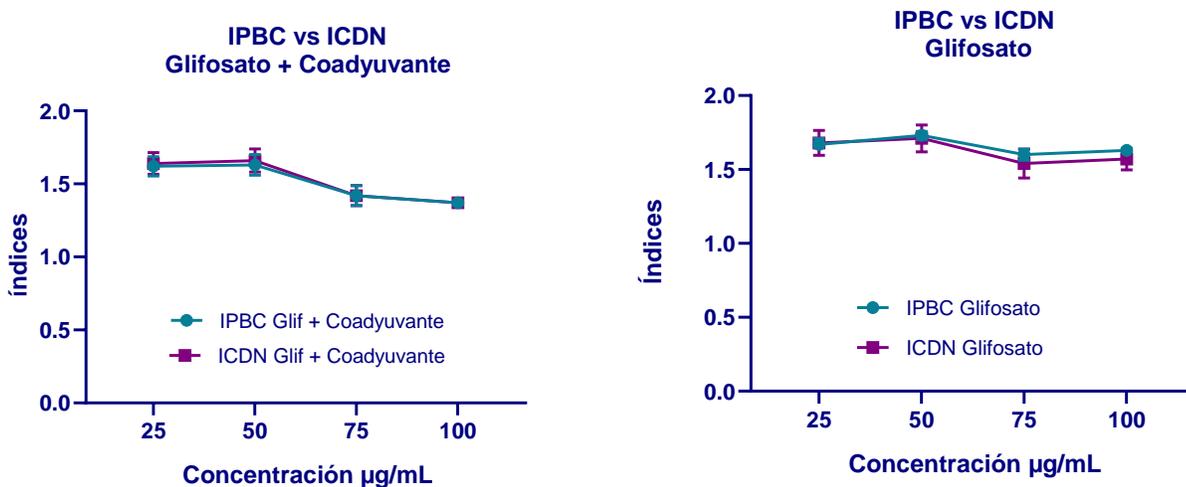


Fig. 22. Comparación entre los IPBC e ICDN para el herbicida aplicado en forma individual y para la mezcla con el adyuvante.

8. DISCUSIÓN

A partir de los resultados antes descritos para los plaguicidas y la mezcla de cada uno de ellos con Hidrix se puede decir que el coadyuvante por sí solo genera un ligero aumento en la frecuencia de MN en comparación con el testigo negativo pero esta frecuencia no es comparable con el testigo positivo, por lo que no es un agente clastogénico como la bleomicina. Tampoco produce rearrreglos cromosómicos específicamente cromosomas dicéntricos pues no hay evidencia de PN, los brotes nucleares observados son muy pocos, lo que indica que el coadyuvante no ocasiona amplificación génica (Fenech, 2000). En cuanto a los valores de los índices de proliferación de la división nuclear y de citotoxicidad nuclear (IPBC e ICDN) registrados en los tratamientos llevados a cabo con Hidrix®, se observó que no hubo alteración en los valores normales registrados en el testigo negativo indicando que el coadyuvante por sí solo no está generando alteraciones sobre la progresión de la división celular, tampoco ocasiona muerte celular por apoptosis o necrosis. Esto puede corroborar de alguna manera lo que el productor comenta en su hoja de seguridad en donde se afirma que al ser una mezcla de "aminas de ácidos orgánicos y alifáticos" para sus componentes, aplicado de manera individual, no han sido descritos efectos adversos a la salud ni al ambiente (Ficha Técnica Hidrix®).

Por otro lado cuando el coadyuvante se aplica en conjunto con otros plaguicidas como los evaluados en esta investigación (permetrina, carbofurano y glifosato), los efectos que produce tanto para la frecuencia de MN como para la división celular son completamente diferentes.

La permetrina por sí sola aumenta la frecuencia de MN en la concentración de 0.4 y 1.0 µg/mL, este incremento es significativo con respecto al testigo negativo, en las concentraciones de 0.2, 0.6 y 0.8 µg/mL la frecuencia de MN disminuye, los micronúcleos que se forman debido a la permetrina pueden ser consecuencia de

estrés oxidante (Wang *et al.*, 2016) y el aumento posterior en la concentración más elevada concuerda con el daño genético observado en la primera concentración; sin embargo esté va acompañado del posible arresto del ciclo celular, pues la cantidad de células mononucleadas aumenta y las binucleadas disminuyen para esta última concentración lo que ocasiona un índice de proliferación muy cercano a uno evitando un análisis de daño en concentraciones más elevadas a 1.0 µg/mL. Cuando la permetrina se mezcla con el Hidrix® el efecto no es significativo, pues las frecuencias de MN no se ven incrementadas, indicando una vez más que el coadyuvante no produce rompimientos en la cadena de ADN o afectaciones a nivel centromérico. Por otro lado, la permetrina aplicada en forma individual induce una disminución muy evidente en el IPBC desde la primera concentración evaluada (0.2 µg/mL) en comparación con el testigo negativo lo que indica que la división celular se detiene ya que este insecticida induce un efecto citostático en las células resultado que es muy similar al reportado por Sundaramoorthy *et al.* (2016). En ese estudio se observó un decremento de células vivas tratadas con permetrina en diferentes concentraciones debido a que el plaguicida produce disfunción celular al unirse a macromoléculas pues actúa como una fuente de iones metálicos que desestabilizan a las células (Gogoi *et al.*, 2006).

Sin embargo, cuando los cultivos fueron tratados con la mezcla del plaguicida y el coadyuvante los valores del IPBC no presentaron diferencias significativas respecto al testigo negativo, lo que indica que el adyuvante está contrarrestando el efecto sobre la división celular que tiene la permetrina. Esta disminución del IPBC se puede explicar debido a que el plaguicida se hidroliza cuando se encuentra en medios muy alcalinos o ácidos perdiendo de esta manera su estabilidad (Swaine y Tandy, 1984) lo que ocasiona una reducción en su efectividad, el adyuvante pudo contribuir a su desestabilización al cambiar el pH de la mezcla.

El carbofurano por si solo produce daño genético evidenciado a través de las frecuencias de MN significativamente diferentes al compararse con el testigo negativo. El daño observado parece mantenerse en todas las concentraciones

evaluadas, este potencial mutagénico de los insecticidas carbamatos también es corroborado con otros biomarcadores como la inducción de intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y formación de cometas (Dhouib *et al.*, 2016). Estos efectos genotóxicos han propiciado la prohibición de este insecticida en muchos países al ser vinculado con diversas alteraciones inmunes y cáncer (WHO, 1990). Al hacer la combinación con el adyuvante, se puede decir que Hidrix está conservando el daño solo en una concentración (2.0 µg/mL) y conforme estas aumentan los MN disminuyen, lo que indica que el adyuvante está evitando que el carbofurano ejerza su potencial genotóxico. Por otra parte, el carbofurano tanto aplicado en forma individual como en la mezcla con el adyuvante no está afectando el proceso del ciclo celular.

En este trabajo no se reportan frecuencias elevadas para MN cuando los cultivos fueron tratados por glifosato, por lo que es posible mencionar que en esta investigación no se evidencia daño genético asociado a este herbicida en las concentraciones evaluadas. En otras investigaciones como la de Fox (1998) y la de Mañas y colaboradores (2009) se reporta que cuando el glifosato produce efectos genotóxicos éstos se deben a la citotoxicidad que puede generar y no por su interacción con el ADN (Kier y Kirkland, 2013), lo cual podría explicar los datos observados en este trabajo. Sin embargo, cuando el glifosato es mezclado con el adyuvante las frecuencias de MN se incrementan significativamente en comparación con el testigo negativo este resultado concuerda con datos reportados por Kier y Kirkland (2013) quienes describen resultados genotóxicos para este herbicida siempre que se encuentre en combinación con un surfactante. El efecto que ocasiona el glifosato sobre el IPBC por si solo es nulo, pero cuando el herbicida se encuentra en conjunto con Hidrix® se registra una disminución significativa del índice de proliferación, lo que indica que el coadyuvante en combinación con el glifosato potencia el efecto del herbicida, es decir actúan de manera sinérgica, tanto para el resultado genotóxico como para los efectos en la división celular, son consecuencias que pueden otorgarse al cambio de las propiedades químicas de la mezcla, permitiendo de esta manera el ingreso más sencillo hacia las células.

9. CONCLUSIÓN.

- El adyuvante Hidrix® por sí solo no genera efecto genotóxico ni alteraciones en la progresión de la división celular.

Sin embargo cuando se combina, los efectos que produce sobre el ciclo celular son diversos dependiendo del tipo de plaguicida con el que se mezcle:

- Cuando es con permetrina el adyuvante contrarresta el efecto individual de éste insecticida estabilizando su comportamiento, incrementando el IPBC.
- Con el glifosato el coadyuvante actúa de manera sinérgica potenciando el efecto del mismo, disminuyendo el IPBC.
- Y con el carbofurano no se observa efecto sobre el ciclo celular por lo que los índices son muy similares.

Por lo anterior, con esta investigación se sugiere una vez más (Reffstrup *et al.*, 2010 y Hernández *et al.*, 2017) que las mezclas de plaguicidas con adyuvantes suelen alterar los efectos que se reportan cuando únicamente se evalúa el ingrediente activo, por lo que se hace una amplia recomendación para que se lleve a cabo una regulación de las mezclas que se realizan en campo entre pesticidas y plaguicidas con coadyuvantes las cuales pueden generar datos más certeros y cercanos a lo que realmente ocurre como consecuencia de la exposición ocupacional.

10. REFERENCIAS

- Adeyinka, A. y Pierre, L. (2018). Organophosphates. Editorial StatPearls Publishing. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499860/>
- Adjuvant Guide. (2016). Helena Chemical Company. Disponible en: <http://www.helenachemical.com/products/helena-products/adjuvants/>
- Aiassa, D., Mañas, F., Bosch, B., Gentile, N., Bemardi, N. y Gorla, N. (2012). Biomarcadores de daño genético en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas. *Acta Biológica Colombiana* 17: 485-510
- Aktar-Wasim, M., Segupta, D. y Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2: 1-12.
- Al-Saleh, I. A. (1994). Pesticides: a review article. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 13: 151-161.
- Albert, L. (2005). Panorama de los Plaguicidas en México. *Revista Toxicológica en línea (retel)*. No. 8. Disponible en: <http://www.sertox.com.ar/retel/no8/01.pdf>.
- Alfaro, P. R. (2002). El uso de coadyuvantes y acidificantes en el manejo de agroquímicos en la caña de azúcar en costa rica. Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar. 1-19 pp.
- AMIFAC. (2013). Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria, A. C. Disponible en: http://archivos.diputados.gob.mx/Comisiones_LXII/Hacienda/P/021013/30.pdf
- Aplicación Eficiente de Fitosanitarios. (2014). INTA. Disponible en: <http://www.manualfitosanitario.com/InfoNews/INTA%20Aplicacion%20eficiente%20de%20fitosanitarios%20Cap%202.%20%20Formulaciones.pdf>
- Arellano-Aguilar, O y Rendon von Osten J. (2016). La huella de los plaguicidas en México. *Greenpeace*, pp 7-38.
- Boyd Barr, D. y Buckley, B. (2011). In vivo biomarkers and biomonitoring en: *Reproductive and Developmental Toxicity*: 253-265.
- Cai D. W. 2008. Understand the role of chemical pesticides and prevent misuses of pesticides. *Bulletin of Agricultural Science and Technology* 1: 36-38.
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6: 48-60.
- Casida J. E., Gammon D. W., Glickman A. H y Lawrence, L. J. (1983). Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annual Review Pharmacology Toxicology* 23: 413-438.

- Chambers, W., Boone, H., Boone, S., Carr, R. y Chambers, J. (2001) Chemistry of Organophosphorus Insecticides. 10.1016/B978-012426260-7.50047-1.
- Colosio, C., Birindelli, S., Corsini, E., Galli, C. L. y Maroni, M. (2005) Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2: S320–S328.
- Costa, L. G. (2010). Toxic effects of pesticides, Chapter 22 Cassarett: Toxicology: 883-930.
- Curran, W. S. y Ligenfelter, D. D. (2009). Adjuvants for enhancing herbicide performance. *Agronomy Facts* 37: 1-6.
- Dhouib, I., Jallouli, M., Annabi, A., Marzouki, S., Gharbi, N., Elfazaa, A. y Montassar Lasram, M. (2016). From immunotoxicity to carcinogenicity: the effects of carbamate pesticides on the immune system. *Environmental Science Pollution Research* 23: 9448-9458.
- Dick, F. D. (2007). Parkinson's diseases and pesticides. *British Medical Bulletin* 80:219–231.
- Domenech, J. (2004). Plaguicidas. Sus efectos en la salud humana. *OFFARM* 23:108-114.
- Enan E, Matsumura F. (1993). Activation of phosphoinositide protein kinase C pathway in rat brain tissue by pyrethroids. *Biochemical Pharmacology* 45: 703–710.
- Encuesta Nacional Agropecuaria. (2017). Plataforma oficial del INEGI: <http://www.beta.inegi.org.mx/programas/ena/2017/>
- FAO. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/download/R/RP/E>
- Fenech, M. y Morley A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* 147: 29-36.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455: 81-95.
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. y Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. *Mutation Research* 534: 65-75.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research* 600: 58-66.
- Ficha Técnica Hidrix®. Química Sagal. Nuevo León, México. Disponible en: <http://www.quimicasagal.com/fichas%20tecnicas/HIDRIX.pdf>
- Forshaw P. J., Lister T., Ray D. E. (2000). The role of voltage-gated chloride channels in Type II pyrethroid insecticide poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology* 163:1–8.

- Fox, V. (1998). Glyphosate acid: in vitro cytogenetic assay in human lymphocytes. Unpublished Regulatory Study. Report Identification Number: CTL/P/6050.
- Gogoi, S. K., Gopinath, P., Paul, A., Ramesh, A., Ghosh, S. S. y Chattopadhyay, A. (2006). Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir* 22:9322–9328.
- Hernández, A. F., Gil, F. y Lacasaña, M. (2017). Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Archives of toxicology* 91:3211-3223.
- Hoppin, J. A., Umbach, D. M., London S. J., et al. (2008). Pesticides and atopic and nonatopic asthma among farm women in the agricultural health study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177: 11–18.
- Kier, L. y Kirkland, D. J. (2013). Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. *Critical Reviews in Toxicology* 43: 283-315.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Ardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Surrallés, J., Vaanhauwaert, A. y Wakata, A. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research* 540: 153-163.
- Liu, C. J., Men, W., J. y Liu, Y., J. (2002). The pollution of pesticides in soils and its bioremediation. *System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture* 18: 295-297.
- Mañas F, Peralta L y Raviolo J. (2009). Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28: 37–41.
- Mrema, E. J., Rubino, F. M., Brambilla, G., Moretto, A., Tsatsakis, A. M. y Colosio, C. (2013). Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology* 307: 74–88.
- Mullin, C. A., Fine, J. D., Reynolds, R. D. y Frazier, M. T. (2016). Toxicological risks of agrochemical spray adjuvants: organosilicone surfactants may not be safe. *Frontiers in Public Health* 4: 1-8.
- Ramírez, J. A. y Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales* 4: 67-75.
- Reffstrup, T. K., Larsen, J. C. y Meyer, O. (2010). Risk assesment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56: 174-192.
- Sánchez-Santed, F., Colomina, M. T., Herrero Hernández, E. (2016). Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex* 74: 417-426.

- Shafer T. J., Meyer D. A., Crofton K. M. (2005). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: Critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives* 113: 123–136.
- Sharpe, R. M. (2004). How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *British Medical Journal* 7437: 447–451.
- Sparling, D. W. (2016). *Ecotoxicology Essentials. Environmental Contaminants and Their Biological Effects on Animals*, Chapter 4 Organochlorine Pesticides. 69-107.
- Sundaramoorthy, R., Velusamy, Y., Balaji, A. P. B., Mukherjee, A. y Chandrasekaran, N. (2016). Comparative cytotoxic and genotoxic effects of permethrin and its nanometric form on human erythrocytes and lymphocytes in vitro. *Chemico-Biological Interactions* 257: 119-124.
- Swaine, H. y Tandy, M. J. (1984). Permethrin. *Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators*. Academic Press: 103-120.
- Tang, W., Wang, D., Wang, J., Wu, Z., Li, L., Huang, M., Xu, S., Yan, D. (2017). Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. *Chemosphere* 191: 90-1007.
- Wang, X., Martínez M. A., Dai, M., Chen, D., Ares, I., Romero, A., Castellano, V., Martínez, M., Rodríguez, J. L., Martínez-Larrañaga, M. R., Anadón, A y Yuan, Z. (2016). Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environmental Research* 149: 86-104.
- Waters, M. D., Stack, H. F. y Jackson, M. A. (1999). Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutation Research* 437: 21-49.
- WHO. World Health Organization (1990). *Public health impact of pesticides used in agriculture*. Ginebra.
- Witt J. M. (2012). *Agricultural spray adjuvants*. Pesticide Safety Education Program. Oregon State University. Disponible en: <http://psep.cce.cornell.edu/facts-slides-self/facts/gen-peapp-adjuvants.aspx>
- Zalcain, M., Sierrasesúmagu, L. y Patiño, A. (2005). El ensayo de MN como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 28: 227-236.
- Zhang, W. J. (2018). Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more. *Proceedings of International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 8:1-27.