



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO CAUSADO POR EL
HERBICIDA HARNES XTRA (ACETOCLOR + ATRAZINA) EN
CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA
POR MEDIO DEL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS**

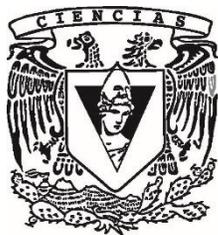
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GUADALUPE GABRIELA GALLEGOS GARCÍA



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO**

2020

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.



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.

1. Datos del alumno

Gallegos
García
Guadalupe Gabriela
5535976887
Universidad Nacional Autónoma
de México
Facultad de Ciencias
Biología
310082781

2. Datos del tutor

Dra.
Sandra Luz
Gómez
Arroyo

3. Datos del sinodal 1

M. en C.
Cynthia Alejandra
Paz
Trejo

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Ana Rosa
Flores
Márquez

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Denisse Josefina
Badillo
Velázquez

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Josefina
Cortés
Eslava

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación del daño genotóxico causado por el herbicida Harness Xtra (acetoclor + atrazina) en cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica por medio del ensayo de micronúcleos

62 p
2020

AGRADECIMIENTOS

Mi infinito agradecimiento a mi asesora de tesis Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo por todo su apoyo y su paciencia.

A la M en C. Cynthia Alejandra Paz Trejo por toda tu ayuda y tu tiempo dedicado a mi proyecto de tesis, mi eterno agradecimiento.

A mis sinodales:

M. en C. Ana Rosa Flores Márquez

M. en C. Denisse Josefina Badillo Velázquez

Dra. Josefina Cortés Eslava

Gracias por su tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

A Victoria Carrillo por toda tu ayuda brindada en el laboratorio, por tus consejos, tu apoyo, sin ti no sería posible...

A mis amigos Pablo y Norberto, gracias por su consejo y por acompañarme en parte del camino hasta hoy.

A mis compañeros de laboratorio en especial a Lucero y Araceli, gracias por su ayuda y en general a todos por hacer de mi estadía más divertida y enriquecedora.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de cumplir mi sueño y permitirme conocer personas maravillosas.

DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mis padres por confiar en mí, por ser mi soporte y apoyo incondicional. A mis hermanas Ale y Sandra por ser un ejemplo de éxito y por abrirme camino. A Valeria por escuchar mis quejas todos los días y ser mi compañera en horas de estudio y distracción. A mi tía Julia, que en la distancia has sabido estar presente y me has impulsado a terminar mi carrera.

A David, mi mejor amigo, el amor de mi vida, por caminar a mi lado tantos años y no dejarme sola; tú me demostraste que con esfuerzo y dedicación puedo lograr cualquier cosa

A mi amiga Marina, desde que te conozco mis días de universidad fueron mejores, gracias por tu consejo, por escucharme y por acompañarme todo el recorrido hasta el día de hoy.

ÍNDICE

I. RESUMEN	7
II. INTRODUCCIÓN	9
II.I Uso de plaguicidas.	9
II. I Clasificación de plaguicidas.....	10
II.II Amidas.	11
II.III Triazinas.....	13
II.IV Mezclas de plaguicidas.	15
II.V Exposición a plaguicidas.....	16
II.VI Genotoxicidad por exposición a plaguicidas.....	18
II. VII Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC).	19
III. ANTECEDENTES	26
III.I Acetoclor	26
III.II Atrazina	27
III.III Estudios sobre mezclas de acetoclor y atrazina	30
IV. JUSTIFICACIÓN.....	32
V. HIPÓTESIS.....	33
VI. OBJETIVOS.....	33
VI.I Objetivo general.....	33
VI.II Objetivos particulares.....	33
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
VII.I Toma de muestra.....	34
VII.II Cultivo celular	34
VII.III Preparación de los plaguicidas	34
VII.IV Tratamientos.....	35
VII.V Bloqueo de la citocinesis	35
VII.VI Cosecha celular	36
VII.VII Elaboración de laminillas y tinción	36
VII.VIII Observación al microscopio.....	36

VII.IX Análisis estadístico	37
VIII RESULTADOS.....	38
VII.I Acetoclor.....	39
VII.II Atrazina.....	41
VII.III Acetoclor y atrazina.....	43
IX DISCUSIÓN	45
Acetoclor	45
Atrazina.....	46
Mezcla de atrazina y acetoclor	49
X CONCLUSIONES	52
XI REFERENCIAS	53
XII ANEXO	62

I.RESUMEN

Los plaguicidas son productos químicos ampliamente utilizados con propiedades únicas diseñadas para tener un efecto biológico intenso en las plagas blanco. Sin embargo, el uso de diferentes grupos de plaguicidas ha llevado a una contaminación cruzada en todo el mundo que causa complicaciones no intencionales que afectan a los seres humanos. Además, los efectos crónicos sobre la salud se han asociado a la exposición a plaguicidas, incluidos las alteraciones neurológicas, los problemas reproductivos, teratogénicos y cáncer.

Alrededor del 95% de los estudios de plaguicidas se realizan con productos químicos individuales; sin embargo, los trabajos sobre la medida en que estas mezclas químicas afectan los sistemas humanos son muy pocos. Por lo tanto, es importante analizar los efectos citotóxicos y genotóxicos de las combinaciones de plaguicidas más utilizadas para una evaluación adecuada de los riesgos.

El acetoclor pertenece a una subclase de las acetamidas. Es un herbicida selectivo que controla un amplio espectro de malezas de hoja ancha, anuales, juncos y principalmente en el cultivo de maíz. Está clasificado como un carcinógeno del Grupo B2 por la EPA y como posible carcinógeno por la IARC. Mientras que la atrazina pertenece a las triazinas, de acuerdo a la IARC, éste está clasificado en el grupo 3 y la evidencia indica que no es posible clasificarlo como un agente cancerígeno.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el daño genotóxico de estos dos plaguicidas de manera individual y en su combinación comercial (Harness Xtra) por medio del ensayo de micronúcleos (MN) en linfocitos humanos de sangre periférica. Los plaguicidas fueron evaluados en tres concentraciones diferentes: en el caso de atrazina 0.22, 0.44 y 0.66 mM para acetoclor se usaron 0.015, 0.03 y 0.06 mM. En el caso de la mezcla de acetoclor y atrazina (Harness Xtra) también fueron usadas tres concentraciones que, con respecto a atrazina fueron 0.0075, 0.015 y 0.022 mM y con respecto a acetoclor fueron 0.015, 0.03 y 0.045 mM. Se tomaron en cuenta para el análisis 500 células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas, para el cálculo del Índice de División Nuclear (IDN) e Índice de

Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis (IPBC). Posteriormente, para los biomarcadores, se contabilizaron 1000 células binucleadas registrando el número de MN, los puentes nucleoplásmicos (PN) y los brotes nucleares (BrN). Los resultados fueron analizados con Statistica 7 y se llevó a cabo un ANOVA y una prueba post hoc Newman-Keuls con un nivel de significancia de 0.05.

En el caso de acetoclor, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los índices (IDN e IPBC) ni en la frecuencia de PN y BrN, mientras que en micronúcleos si se encontraron incrementos significativos en la concentración más alta (0.06 mM). Con atrazina, hubo daño citostático significativo en las tres concentraciones (0.22, 0.44 y 0.66 mM) y genotóxico en la concentración más alta. En la mezcla de ambos plaguicidas no se observó el mismo daño genotóxico que en su formulación individual de acetoclor y de atrazina, la frecuencia de micronúcleos se vio disminuida con la mezcla en ambos herbicidas. Se concluye que es importante llevar a cabo este tipo de análisis de plaguicidas actuando individualmente y en mezcla, debido a que su efecto puede cambiar al combinarlos y los estudios deben acercarse más a la realidad de lo ocurrido en el campo, puesto que suelen ser aplicados en mezclas.

II. INTRODUCCIÓN

II.1 Uso de plaguicidas.

La creciente demanda de alimentos a nivel mundial ha sido un factor de gran importancia en la transformación de los sistemas agropecuarios actuales, los cuales deben maximizar los rendimientos, logrando inmejorables condiciones ecofisiológicas para el desarrollo de los cultivos. La implementación de nuevas tecnologías tales como el manejo integrado de plagas (malezas, enfermedades y vectores), son fundamentales en los sistemas agropecuarios modernos (Diez, 2013). Por lo tanto, existen diversas sustancias químicas encargadas de prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, estos productos químicos son llamados plaguicidas (Coalova *et al.*, 2013).

Los plaguicidas son compuestos químicos ampliamente utilizados, con propiedades únicas diseñadas para tener un efecto biológico intenso en las plagas objetivo. Sin embargo, el uso de diferentes grupos de plaguicidas ha llevado a una contaminación cruzada en todo el mundo que causa complicaciones no intencionales que afectan a los seres humanos (Al-Saleh, 1994). Además de que no son específicos de un organismo blanco y que, dependiendo de la concentración y la exposición, puede generar efectos adversos en distintos organismos no blanco.

Generalmente el empleo de plaguicidas ha tenido efectos contraproducentes que incluyen el deterioro ecológico y el daño a la salud humana. Su potencial tóxico se debe a esta dicotomía; es decir, la capacidad para destruir plagas es una poderosa herramienta para el control de las mismas y, a la vez, esta característica los hace potencialmente dañinos para la salud y el ambiente (Ortega-Ceseña *et al.*, 1994).

Debido a sus propiedades tóxicas, el uso de plaguicidas es en muchos casos una práctica riesgosa e inadecuada, particularmente para los agricultores (Ortiz *et al.*, 2013). Los efectos crónicos sobre la salud incluidos los neurológicos, los problemas reproductivos, teratogénicos y cáncer, se han asociado a la exposición a plaguicidas. Los estudios epidemiológicos en agricultores, fabricantes, fumigadores y en trabajadores industriales o residentes expuestos accidentalmente han demostrado que el contacto con estos compuestos puede aumentar el riesgo de padecer cáncer (Bolognesi *et al.*, 2011). Por ello, es importante que los riesgos asociados con su uso sean estimados y evaluados minuciosamente, para juzgar si son aceptables para la sociedad, o si se requiere intervenciones en forma de políticas estatales para evitar impactos adversos (Stoorvogel *et al.*, 2003). Por lo tanto, se debe dirigir la investigación hacia la prevención, ya que resulta imprescindible el empleo de biomarcadores como el ensayo de micronúcleos para la detección temprana de los efectos que pueden provocar estas sustancias (Matheus y Bolaños, 2014).

Las investigaciones sobre la presencia de plaguicidas en México, y sus efectos sobre la salud y el ambiente, son parciales. De hecho, no existen datos suficientes sobre la presencia de sus residuos en los diferentes sustratos ambientales del país y tampoco hay estadísticas confiables por intoxicaciones en las zonas rurales; no se han realizado estudios epidemiológicos para detectar los efectos crónicos, que deberían existir al menos para los jornaleros agrícolas (Albert, 2005). Además, alrededor del 95% de los estudios se realizan con productos químicos individuales; sin embargo, los trabajos sobre la medida en que estas mezclas químicas afectan la salud humana son muy pocos (Das *et al.*, 2007).

II. I Clasificación de plaguicidas.

Los plaguicidas pueden clasificarse de diversas maneras: según la plaga a la que controlan, por la estructura química del compuesto utilizado o de acuerdo al grado o tipo de riesgo sanitario que entrañan. Dependiendo de la plaga a la que están

dirigidos se pueden clasificar en: insecticidas, acaricidas, herbicidas, nematocidas, fungicidas, molusquicidas y rodenticidas. La Organización Mundial de la Salud propone la clasificación en función de su riesgo para la salud, basándose en la dosis letal media (LD₅₀) que estima la muerte en el 50% de los animales expuestos, en este caso en ratas u otros animales de laboratorio administrado por vía oral y dérmica (Heydens *et al.*, 2001); esta clasificación ordena de menor a mayor la toxicidad en números del I al IV, siendo ligeramente tóxicos, moderadamente tóxicos, muy tóxicos y extremadamente tóxicos, respectivamente (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

Por su vida media, los plaguicidas se clasifican en permanentes (indefinidamente), persistentes (de varios meses a 20 años,) moderadamente persistentes (de 1 a 18 meses) y no persistentes (de días hasta 12 semanas) (Ramírez y Lacasaña, 2001). Otra clasificación está determinada de acuerdo a la estructura química de las sustancias con actividad plaguicida, siendo los plaguicidas organoclorados, organofosforados, carbamatos, los ácidos carboxílicos, los piretroides, las amidas, las anilinas, los derivados alquil de urea, los compuestos heterocíclicos con nitrógeno, los fenoles, las imidas, los compuestos inorgánicos, entre otros (Badii y Landeros, 2007). Este trabajo se referirá solamente a algunas familias de plaguicidas relevantes para el estudio.

II.II Amidas.

Al grupo químico de las amidas pertenecen herbicidas que llevan en su fórmula el grupo NH₂, pero tienen propiedades diversas entre sí. Por su estructura química pueden configurarse tres subgrupos: cloroacetamidas, clorofenilamidas y fenilamidas. Dentro del grupo de las cloroacetamidas se encuentra el alaclor, metolaclor y acetoclор. Las amidas son un grupo de herbicidas cuya actividad está muy ligada con la de las ureas. La capacidad herbicida de las ureas es debida a la inhibición de la reacción de Hill o transporte fotosintético de electrones al igual que las atrazinas y los herbicidas amidados. Sin embargo, se considera que los

herbicidas derivados de la dinitroanilina deben su actividad primordialmente a la inhibición de la división celular y nuclear de la planta (Pérez, 2000).

El acetoclor pertenece a una subclase de las acetamidas. El modo de acción herbicida de las cloracetanilidas no se conoce totalmente; se sabe que esta clase de herbicidas inhibe la biosíntesis de lípidos, alcoholes, ácidos grasos, proteínas, isoprenoides y flavonoides. Al inhibir la síntesis de varios precursores de terpenoides (por ejemplo, el kaureno), estos herbicidas parecen interferir con la producción de giberelina (fitohormona relacionada al crecimiento de la planta). Los terpenos y las ceras se forman a través de diferentes vías biosintéticas, utilizando los intermedios y sustratos de coenzima A; la interferencia con la síntesis de ambas sustancias puede indicar un mecanismo común de inhibición a través de acciones sobre la coenzima A. Además, se ha demostrado que las cloracetanilidas se desintoxican en las plantas por conjugación con glutatión. Esto también ha llevado a la sugerencia de que estos compuestos causan su efecto herbicida a través de la conjugación de acetyl coenzima A y otras enzimas que contienen sulfhidrilo, con la consiguiente inhibición de alguna función crítica necesaria para la germinación o supervivencia de las plántulas (Heydens *et al.*, 2001).

Acetoclor es el nombre de 2-cloro-N-(etoximetil)-N-(2-etil-6-metilfenilacetamida) y cuya estructura química se representa en la Figura 1 (Pérez, 2000). Tiene la fórmula empírica de $C_{14}H_{20}NO_2Cl$ y un peso molecular de 269.77. Es un líquido aceitoso de color ámbar claro a violeta a temperatura ambiente con un peso específico de 1.110 g/mL a 30 °C. El acetoclor tiene un punto de ebullición de 162 °C a 7 mmHg y una presión de vapor de 3.4×10^{-8} a 25 °C. La solubilidad en agua es de 233 ppm a 25 °C. El acetoclor también es soluble en disolventes orgánicos, como alcohol, acetona, tolueno y tetracloruro de carbono (Heydens *et al.*, 2001).

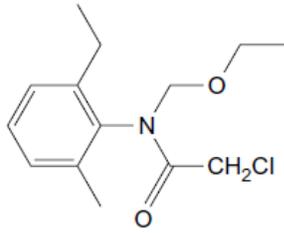


Figura 1. Estructura química del acetoclor (Heydens *et al.*, 2010)

El acetoclor es un herbicida de acción selectiva que controla un amplio espectro de malezas de hoja ancha, anuales, juncos y principalmente en el maíz. La empresa Monsanto fabrica varias formulaciones con el nombre comercial Harness®, mientras que las producidas por Zeneca se venden con el nombre comercial Surpass®.

II.III Triazinas.

El grupo químico de las triazinas fue introducido como herbicida en 1954 y el primer producto ensayado fue la cloracina (2-cloro-4,6-bis [dietilamino]-s-triazina). La actividad más importante de las triazinas es la destrucción de plantas en los primeros estados de desarrollo, de diez a quince días después de la germinación. Los derivados de triazinas de acción herbicida pueden clasificarse, de acuerdo con los sustituyentes que posean, en: 1) Derivados con dos átomos de cloro y otro sustituyente; 2) Derivados con un átomo de cloro y otros dos sustituyentes y 3) Derivados sin átomos de cloro en la molécula. Su persistencia es de tres a seis meses, dependiendo del tipo de suelo, dosis aplicada y factores climáticos, aunque puede extenderse hasta un año (Pérez, 2000). El grupo de las triazinas destaca entre los herbicidas más empleados por los agricultores de los Estados Unidos de América y México. Estos herbicidas se emplean en pre y pos emergencia de cultivos de caña de azúcar, maíz, piña, plátano, naranja, avena, cebada, espárrago, lenteja, papa, sorgo, zanahoria, chícharo, tomate y trigo (Flores-Maya, 2000).

La atrazina pertenece al grupo de las triazinas y es un herbicida de acción selectiva que se aplica al suelo, que se absorbe por las raíces o las hojas de las hierbas y es

eficaz antes o después de que germinen. Controla la aparición de malezas en cultivos, principalmente de maíz, sorgo, caña de azúcar, trigo y varios tipos de pastos, igualmente en lagos y estanques, en campos de golf, en céspedes y a lo largo de carreteras o vías férreas. En el ámbito mundial, el herbicida se introdujo en 1958, pero su uso se ha incrementado constantemente desde hace 50 años. En México comenzó a emplearse en 1975 y son diversas las empresas productoras en el país. Gesaprim es el nombre comercial más conocido, pero existen otros productos con el mismo ingrediente activo (Hansen *et al.*, 2013).

Atrazina es el nombre común del compuesto 2-cloro-4-(etilamino)-6(isopropilamino)-1,3,5-triazina. Su fórmula estructural se representa en la Figura 2. Ésta, es absorbida principalmente por las raíces y en menor grado por las hojas. Se desplaza en el interior de la planta acumulándose en los meristemos (yemas) y en las hojas. Interfiere el proceso de asimilación de CO₂ y la formación de almidón en la actividad fotoquímica (reacción de Hill), es decir impide la fotosíntesis (Pérez, 2000).

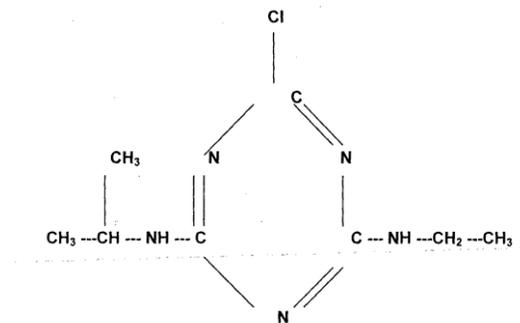


Figura 2. Atrazina 2-cloro-4-(etilamino)-6(isopropilamino)-1,3,5-triazina (tomado de Pérez, 2000).

II.IV Mezclas de plaguicidas.

Dado que los plaguicidas a menudo se aplican en mezclas a los cultivos, sus residuos se pueden encontrar en los alimentos y en el agua. Sin embargo, las mezclas de plaguicidas son comunes no solo en el suministro humano de alimentos sino también en el ambiente acuático, incluidas las aguas superficiales que sostienen la vida en el agua (Hernández *et al.*, 2013).

La exposición a múltiples plaguicidas puede causar cambios en la toxicocinética de los compuestos individuales modificando la toxicidad predicha. Las interacciones toxicocinéticas son el resultado de un plaguicida que altera la absorción, distribución, metabolismo o eliminación de otros (Reffstrup *et al.*, 2010).

Hay tres principios que describen cómo los plaguicidas individuales en una mezcla se afectan entre sí: el concepto de aditividad, no interacción e interacción. El primero se refiere a que pueden derivarse de los conceptos de adición de dosis y acción independiente, que suponen que los agentes químicos actúan por los mismos o diferentes modos de acción, respectivamente. El segundo concepto denominado "no interacción", la toxicidad de una mezcla se asemeja a los efectos que se espera que ocurran cuando todos los componentes de la mezcla actúan sin aumentar o disminuir sus efectos. Por el contrario, el tercero surge cuando los efectos de la mezcla observados se desvían de lo esperado. En este caso, uno o varios plaguicidas pueden haber interactuado entre sí, por ejemplo, facilitando o disminuyendo su absorción, transporte, metabolismo o excreción. Interacción es el término para sinergias (efectos de mezcla mayores de lo esperado) y antagonismos (Hernández *et al.*, 2013).

El sinergismo se observa cuando el efecto de la exposición a una mezcla de plaguicidas es mucho mayor que el esperado de un efecto aditivo y las respuestas no pueden predecirse por la toxicología conocida de cada compuesto individual. Mientras que el antagonismo ocurre cuando un plaguicida interfiere con la acción

del otro, el resultado es una reducción en el efecto predicho para los compuestos individuales que no necesitan ser estructuralmente similares. Una sustancia química puede estimular el metabolismo de una segunda o interferir de alguna manera con su absorción (Hernández *et al.*, 2013).

II.V Exposición a plaguicidas.

Los plaguicidas son aplicados mediante diversos métodos en actividades de tipo forestal, granjas, hábitats acuáticos, vías de ferrocarril, carreteras, zonas urbanas, jardines, entre otros. Su amplio uso hace que el contacto con ellos por parte de personas y animales sea inevitable, dada la amplitud en el empleo de estos compuestos químicos. El envenenamiento por plaguicidas puede resultar de exposiciones agudas y crónicas. Adicionalmente, los plaguicidas pueden impactar en poblaciones humanas y animales mediante exposición secundaria o a través de efectos indirectos (Badii y Landeros, 2007).

Se consideran dos tipos de intoxicaciones derivadas de la exposición a plaguicidas: la aguda y la crónica. Los efectos agudos suceden usualmente al cabo de unos minutos u horas de la exposición y pueden ser locales o sistémicos, mientras que los crónicos pueden manifestarse incluso hasta años después de la exposición. Las intoxicaciones asociadas con el empleo de plaguicidas pueden ocurrir no obstante las medidas de control, debido al mal uso de los equipos de protección laboral y de los equipos de trabajo (como bombas para fumigar), deficientes medidas de regulación, los cambios en los patrones de aplicación de los plaguicidas y las diferentes mezclas que se realizan (Sánchez y Ortiz, 2011).

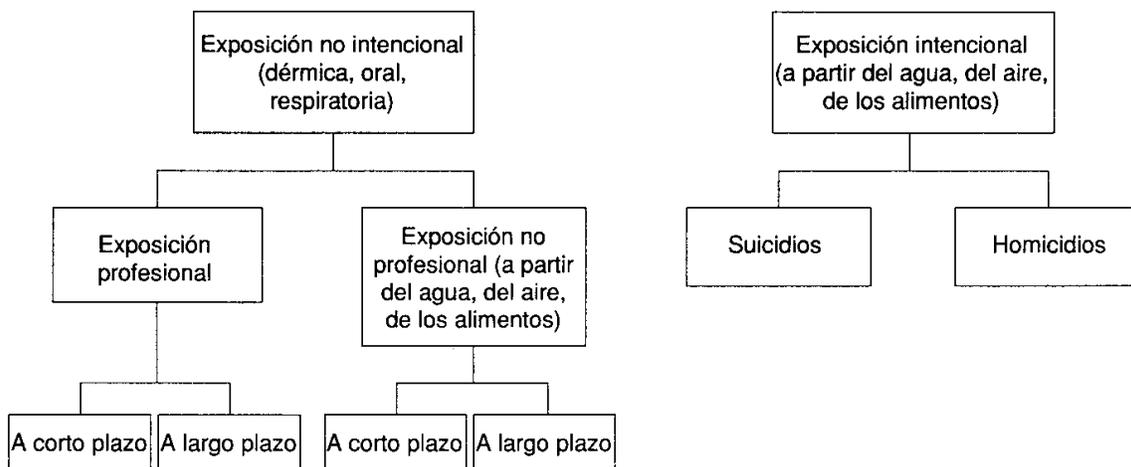
El ambiente es una fuente primordial de exposición a plaguicidas, a partir de la actividad agrícola. Aproximadamente el 47% del producto aplicado se deposita en suelos y cuerpos de agua colindantes o se dispersa en la atmósfera. Esta situación depende de condiciones climáticas como la lluvia y la dirección e intensidad del viento, de características geológicas como el tipo de suelo y la presencia de

corrientes de agua y de otros factores como la fórmula y la presentación del producto (líquido, polvo, gel, aerosol, etc.), así como de la técnica de aplicación (aérea, terrestre, etc.) (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Desde el punto de vista de las prácticas de uso y manejo de los plaguicidas, existen patrones de gran complejidad y con una amplia variedad de formas e intensidades de exposición. Pero es la población del sector agrícola la que corre mayor riesgo, principalmente en países en vías de desarrollo, ya que ahí se aplica el porcentaje más elevado de los plaguicidas producidos en el mundo (Sánchez y Ortiz, 2011).

La exposición que afecta a la población general es ubicua y tiende a ser crónica. Son diversos los tipos de plaguicidas que, en períodos prolongados, desde múltiples fuentes y a dosis bajas penetran al organismo utilizando distintas vías. Las principales fuentes de exposición en la población son los alimentos de origen vegetal (frutas, verduras, cereales, leguminosas) o animal (carne bovina, porcina y sus derivados, pescado, productos lácteos, huevo, etc.) y en menor grado el agua, el aire, la tierra, la fauna y la flora contaminados (Figura 3) (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Figura 3. Tipos de exposición a plaguicidas (OMS, 1992).



Como se menciona anteriormente, en la población general la vía de absorción más importante es el aparato digestivo a partir de la ingestión de alimentos y agua

contaminados, pero en el ámbito laboral principalmente es el uso de fumigantes en forma de polvos, vapores y nebulizaciones lo que coloca a la vía respiratoria como la segunda en importancia (Al-Saleh, 1994).

Los plaguicidas se distribuyen en el organismo a través del torrente sanguíneo. Los compuestos liposolubles se unen a las lipoproteínas, mientras que las moléculas hidrosolubles lo hacen a las proteínas plasmáticas o permanecen disueltas en la sangre. Según su afinidad, el plaguicida se fijará en órganos o tejidos específicos, como el hígado o los riñones y aquellos que son lipofílicos se acumularán en tejidos como el adiposo y el nervioso. El cuerpo humano elimina los plaguicidas por tres vías principales: la orina, las heces fecales y el aire exhalado (Ramírez y Lacasaña, 2001).

II.VI Genotoxicidad por exposición a plaguicidas.

Diversas actividades realizadas por el ser humano, así como también algunos eventos naturales contaminan el ambiente; debido a la liberación de agentes potencialmente tóxicos y genotóxicos. Actualmente constituye una preocupación mundial por los riesgos que afectan la salud humana y los ecosistemas. Desafortunadamente, el desarrollo de la sociedad moderna se basa en la generación de una gran cantidad de productos químicos; muchos de los cuales ocasionan daño a los seres vivos, incluido el ser humano (Cedano *et al.*, 2012).

Dentro de los múltiples efectos de los contaminantes se encuentra el efecto genotóxico, expresado en sus diversas formas, como, por ejemplo: mutagénesis y por supuesto la carcinogénesis. Por lo tanto, un agente genotóxico es todo aquel capaz de lesionar la integridad del material genético y/o sus componentes asociados. Bajo este término se incluyen los agentes que interaccionan directa o indirectamente con el ADN, provocando el aumento de mutaciones (mutagénesis); también los que interfieren en algunos procesos enzimáticos, así como en la

reparación o en la génesis del material proteico involucrado en la segregación cromosómica (Cedano *et al.*, 2012).

Las pruebas de genotoxicidad son ensayos que evidencian éstas alteraciones causadas al material genético, de manera directa o indirecta por agentes ambientales, tanto en células somáticas como germinales. La adecuada determinación de la actividad genotóxica exige la disponibilidad de métodos de detección específicos. El primer paso para realizar los estudios de evaluación genotóxica es la ejecución de ensayos *in vitro* que permiten evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos en tiempo breve. Estos ensayos de genotoxicidad a corto plazo resultan de gran utilidad porque permiten detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño primario a la estructura del ADN, transformaciones celulares u otras afectaciones, las cuales son inducidas por agentes químicos o físicos que abundan en el ambiente (Arencibia y Rosario, 2009).

II. VII Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC).

El análisis de la frecuencia de micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica se usa ampliamente en epidemiología molecular y citogenética para evaluar la presencia y la extensión del daño cromosómico en poblaciones humanas expuestas a agentes genotóxicos o que tienen un perfil genético susceptible. Este ensayo también se ha aplicado con éxito para identificar factores dietéticos y genéticos que tienen un impacto significativo en la estabilidad del genoma. La alta confiabilidad y el bajo costo de la prueba de MN ha contribuido al éxito mundial y la adopción de este ensayo para estudios *in vitro* e *in vivo* de daño cromosómico (Bonassi *et al.*, 2007).

El uso del ensayo de MN como prueba de daño cromosómico sobre cultivos de linfocitos humanos fue propuesto por primera vez en 1976, cuyo único requisito era la elección de tipos celulares con gran actividad mitótica. Más tarde, en 1985, el ensayo fue mejorado consiguiendo frenar el proceso de división celular cuando la

célula sólo se hubiese dividido una vez, para ello desarrollaron la técnica del bloqueo de la citocinesis (CBMN: cytokinesis-block micronucleus) empleando un agente químico (citocalasina-B) a fin de impedir la formación del anillo contráctil. La técnica fue validada a nivel mundial en 1999 por el programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: Human MicroNucleus Project), con la participación de 42 laboratorios (analizando aproximadamente 16500 individuos de diferentes poblaciones del mundo) (Fenech, 2000).

Los MN se originan a partir de fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que no están incluidos en los núcleos hijos principales durante la división nuclear (Figura 4). La formación de MN en las células en división es el resultado de la ruptura cromosómica debida a lesiones de ADN no reparadas o reparadas incorrectamente, o la segregación errónea de cromosomas debido a un mal funcionamiento mitótico. Estos eventos pueden ser inducidos por estrés oxidante, exposición a clastógenos o aneugenos, defectos genéticos en los puntos de control del ciclo celular y/o genes de reparación del ADN, así como deficiencias en los nutrientes requeridos como cofactores en el metabolismo del ADN y en la maquinaria de segregación de cromosomas (Bonassi *et al.*, 2007). Los agentes clastogénicos inducen principalmente fragmentos cromosómicos y los agentes aneugénicos interfieren con el aparato mitótico y conducen principalmente a una mala segregación de cromátidas completas o cromosomas durante la mitosis. En ambos casos, la cromatina no se distribuye adecuadamente a los núcleos hijos y permanece en el citoplasma como un micronúcleo (Hintzsche *et al.*, 2017).

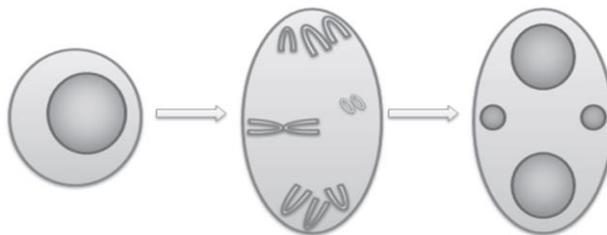


Figura 4. Formación de micronúcleos en el curso de la división celular (modificado de Lobo y Bolaños, 2014).

La asociación entre la inducción de MN y el desarrollo del cáncer se apoya en una serie de observaciones. Los más comprobados incluyen: (i) la alta frecuencia de este biomarcador en pacientes con cáncer no tratados y en sujetos afectados por enfermedades congénitas propensas a padecer cáncer, p. ej. Síndrome de Bloom o ataxia telangiectasia; (ii) la presencia de frecuencias de MN elevadas en la mucosa oral, utilizada como biomarcador de cáncer en los ensayos clínicos de quimioprevención; (iii) la correlación existente entre los agentes genotóxicos inductores de MN y la carcinogenicidad, p. ej. radiación ionizante y ultravioleta y (iv) la correlación inversa entre la frecuencia de MN y la concentración en sangre y/o la ingesta dietética de ciertos micronutrientes asociados con un riesgo reducido de cáncer, como el folato, el calcio, la vitamina E y el ácido nicotínico. Una evidencia adicional, basada en la mecánica y la correlación experimental que existe entre las aberraciones cromosómicas (AC) y los MN, viene de los resultados en estudios recientes de cohortes que, en la mayoría de los casos, demostraron que la frecuencia de AC en sangre periférica de sujetos sanos, es un predictor de riesgo de cáncer (Bonassi *et al.*, 2007).

Los MN en linfocitos en personas sanas no expuestas anormalmente a genotoxinas, generalmente se originan a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos o eventos de pérdida de cromosomas (Tabla 1). En los linfocitos, los MN aumentan con la edad y generalmente las frecuencias son más elevadas en las mujeres que en los hombres. Los cromosomas sexuales contribuyen a la mayoría de los eventos de pérdida de cromosomas con el aumento de la edad. En las mujeres, el cromosoma X puede representar hasta el 72% de MN observados, de los cuales el 37% carece de un cinetocoro funcional, lo que sugiere que puede haber defectos en el ensamblaje del cinetocoro al huso mitótico de dicho cromosoma (Fenech *et al.*, 2011).

Los puentes nucleoplásmicos (PN) son otro biomarcador de daño clastogénico y se originan durante la anafase cuando los centrómeros de los cromosomas dicéntricos

se desplazan a los polos opuestos de la célula durante la mitosis (Tabla 1). En ausencia de ruptura del puente nucleoplásmico, la membrana nuclear eventualmente rodea los núcleos hijos y el puente. Los PN generalmente se rompen durante la citocinesis, pero pueden acumularse en células binucleadas a las que se les ha bloqueado la citocinesis utilizando citocalasina B (Fenech *et al.*, 2011).

Una causa común y un indicador de inestabilidad cromosómica es la formación de PN (Figura 5), estos fueron descritos por primera vez en el maíz por Barbara McClintock como una respuesta al daño del ADN. Se observó que estos puentes se rompen bajo la tensión del aparato mitótico y se vuelven a formar en la siguiente interfase dando lugar a ciclos de rompimiento-fusión-puente. Además de las roturas del ADN, los puentes nucleoplásmicos pueden ser causados por un acortamiento anormal de los telómeros o por cohesión cromatídica persistente (Hoffelder *et al.*, 2004).

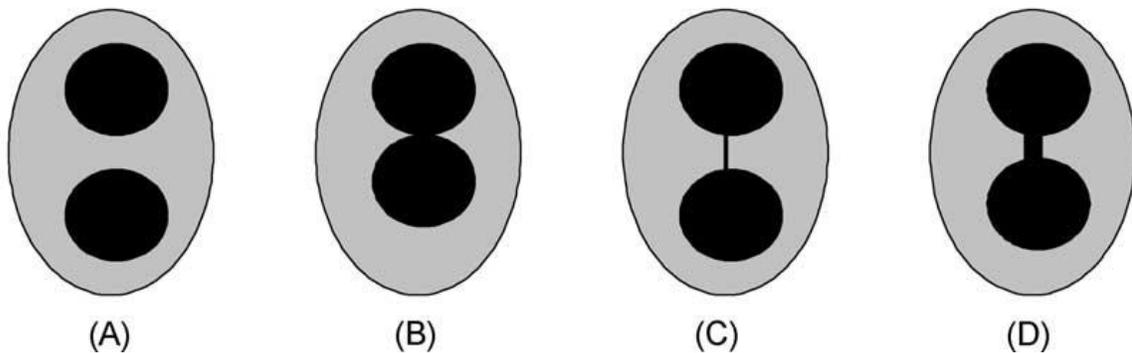


Figura 5. (A) y (B) células binucleadas, (C) y (D) células binucleadas con un puente nucleoplásmico (modificado de Fenech *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que la formación de PN se incrementa en un amplio rango de exposiciones que incluyen oxidantes endógenos, radiación ionizante, hidrocarburos aromáticos policíclicos, el carcinógeno 4- (metilnitrosamina) -1- (3- piridil) -1- butanona del humo del cigarrillo, el pentóxido de vanadio, así como las deficiencias de folato y selenio (Fenech, 2010).

En las últimas décadas, otra anomalía nuclear única conocida como brote nuclear (BrN) se ha asociado con eventos de inestabilidad cromosómica (Tabla 1). Se han observado BrN en cultivos bajo fuertes condiciones selectivas, que inducen la amplificación génica y también una deficiencia moderada de ácido fólico (Crott *et al.*, 2001). Se han desarrollado experimentos *in vitro* en células de mamíferos para mostrar que el ADN amplificado se localiza selectivamente en sitios específicos en la periferia del núcleo y se elimina mediante BrN durante la fase S del ciclo celular (Shimizu *et al.*, 1998). Los BrN se caracterizan por tener la misma morfología que un MN, con la excepción de que están conectados al núcleo por un tallo estrecho o ancho de material nucleoplásmico, dependiendo de la etapa del proceso de formación del brote. Los MN también puede originarse por un proceso de brotación (Fenech *et al.*, 2011).

Existen tres índices que proporcionan información valiosa al ensayo: el Índice de División Nuclear (IDN) y el Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citosinesis (IPBC). Éstos se calculan de la siguiente manera:

- $IDN = (M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)) / N$
- $IPBC = (M1 + 2(M2) + 3(M3 + M4)) / N$

Dónde: M1-M4 representan el número de células con uno a cuatro núcleos y N es el número total de células viables.

El IDN proporciona una medida del estado proliferativo de la fracción de células viables. Por lo tanto, es un indicador de los efectos citostáticos al retardar o impedir la división celular y, en el caso de los linfocitos, también es una evidencia de la respuesta mitogénica que es útil como biomarcador de la función inmune. El valor IDN más bajo posible es 1.0, que ocurre si todas las células viables no se han dividido durante el período de bloqueo de la citocinesis y por lo tanto, todas son mononucleadas. Si las células viables completaron una división nuclear el valor IDN es 2.0. Un valor IDN solo puede ser mayor que 2.0 si una proporción sustancial de

células viables ha completado más de una división nuclear durante la fase de bloqueo de citocinesis y contiene más de dos núcleos. Por ejemplo, si el 50% de las células viables son binucleadas, 10% trinucleadas y 10% cuadrinucleadas, el valor de IDN es 2.2 (Fenech, 2007).

La determinación del Índice de División Nuclear (IDN) aporta información importante sobre las propiedades citostáticas del agente que se está examinando y que es relevante para la evaluación de la toxicidad. En los linfocitos humanos, el IDN también provee una medida de la respuesta del mitógeno, que es un biomarcador útil de la respuesta inmunitaria en los estudios de nutrición y también puede estar relacionado con la exposición genotóxica. El enfoque del ensayo CBMN es importante porque permite apreciar el daño al ADN (MN, PN y BrN en células BN) y citostático (proporciones de células mono, bi y multinucleadas, IDN) eventos que es posible evaluar en un mismo ensayo (Fenech, 2007).

Tabla 1. Criterios definidos por el HUMN-Project para la selección de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN), brotes nucleares (BrN), células apoptóticas (Ap) y células necróticas (Nec) (Fenech *et al.*, 2003).

	CRITERIOS DE SELECCIÓN
MN	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El diámetro oscila entre 1/6 – 1/3 de la media del núcleo principal. ▪ No refractarios. ▪ Intensidad de tinción similar a los núcleos principales. ▪ Forma similar a los núcleos de la célula binucleada. ▪ No conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleada. ▪ Pueden tocar los núcleos de la célula binucleada pero no solaparse con ellos.
PN	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Continuidad entre los dos núcleos principales. ▪ Su ancho no debe exceder ¼ de diámetro de los núcleos principales. ▪ Mismas características de tinción de los núcleos principales. ▪ Raramente puede haber más de un puente. ▪ En la misma célula binucleada puede presentarse también MN
BrN	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mismas características de tinción que los MN. ▪ Conectados al núcleo principal. ▪ Pueden estar unidos por un puente.

III. ANTECEDENTES

III.1 Acetoclor

En 1986, el acetoclor fue clasificado como un carcinógeno del Grupo B2 por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) (Heydens *et al.*, 2010) y como posible carcinógeno por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, 2018). El hipotético mecanismo de carcinogenicidad es mediante la bioactivación de este herbicida a través de varios pasos, lo que finalmente lleva a la formación de un metabolito reactivo al ADN, el 2-metil-6-etilbenzoquinoneimina (MEBQI) (Coleman *et al.*, 2000). En la ruta de degradación, este herbicida es N-desalquilado a 2-cloro-N- (2-metil-6-etilfenilo) acetamida (CMEPA) que luego se convierte en 2-metil-6-etilanilina (MEA) (Dong *et al.*, 2015).

Estudios recientes han indicado que las ratas son capaces de metabolizar el acetoclor a sus productos putativos de benzoquinoneimina reactivos al ADN. La formación de metabolitos reactivos de ADN a partir de acetoclor depende de la producción de MEA. Hay dos maneras posibles para que se formen estas anilinas: a través de la síntesis de CMEPA por P450 seguido de una reacción de arilamidasa, o por conjugación del herbicida con glutatión por desplazamiento del átomo de cloro y la posterior hidrólisis de amida. Se ha sugerido que la formación de MEA a partir de acetoclor en ratas y monos depende de la conjugación del acetoclor con glutatión, la consiguiente circulación enterohepática de este conjugado de glutatión reducido (GSH), la conversión del conjugado de GSH en el metilsulfuro secundario y la hidrólisis de amida del metilsulfuro secundario a MEA (Liu *et al.*, 2006). Asimismo, es capaz de degradar MEA al intermedio 4-OH-MEA que se transforma adicionalmente en imina de 2-metil-6-etil-benzoquinona (MEBQI) (Dong *et al.*, 2015).

Una extensa literatura sugiere que las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) se generan de manera continua a partir de contaminantes

ambientales como herbicidas, metales pesados e insecticidas. Las ROS, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales libres superóxido (O_2^-) y radical hidroxilo (OH), en niveles arriba de lo normal pueden reaccionar produciendo peroxidación y daño al ADN (Liu *et al.*, 2006).

Los metabolitos clave del acetoclor, como la quininamina, pueden inducir la formación de ROS que probablemente conduzcan a estrés oxidante a través del glutatión oxidado. Por lo tanto, si se produce daño en el ADN inducido por el acetoclor, es probable que las ROS estén involucradas (Liu *et al.*, 2006).

El metabolito clave del acetoclor, quininamina, genera ROS que pueden inducir estrés oxidante a través de la oxidación del glutatión (Liu *et al.*, 2006). La quininamina también se ha propuesto como el metabolito reactivo para la hepatotoxicidad resultante de la exposición aguda al acetoclor, aunque éste tiene una toxicidad aguda baja (Ashby *et al.*, 1996).

Un gran número de estudios muestran que las ROS son las principales fuentes de daño en el ADN al causar ruptura de las cadenas, la eliminación de nucleótidos y una variedad de modificaciones de las bases nitrogenadas. Aunque las células han desarrollado mecanismos de reparación para corregir los cambios que ocurren naturalmente en el material genético, el exceso de ROS puede provocar un cambio o daño permanente en el ADN. Además, algunos estudios sugieren que las ROS median el daño al mismo causado por el herbicida (Liu *et al.*, 2006).

III.II Atrazina

La atrazina está clasificada en el grupo 3 por la IARC (2018) y la evidencia indica que no es posible clasificarla como un agente cancerígeno, basado en la información científica disponible. Por ser un compuesto persistente, la atrazina puede representar un peligro para el ambiente y se asocia con riesgos para la salud, dado que se ha encontrado que llega a contaminar cuerpos de agua. En agua, la

atrazina se ha relacionado positivamente con cáncer de estómago en humanos y afectación al sistema endocrino e inmune de ranas. Su exposición también puede darse en el ambiente laboral, ya sea por vía inhalatoria o dérmica. Puede producir reacciones de irritación, así como alteraciones en las funciones de algunos órganos; defectos de nacimiento en seres humanos, problemas de reproducción y alteración en los niveles de hormonas. En diversos países se han establecido restricciones del empleo de la atrazina (Tabla 2). Se observa que su uso es restringido y prohibido en países de Europa, EUA y Australia, mientras que en México y en la mayoría de los países de América Latina y El Caribe, su aplicación está permitida sin restricción alguna (Hansen *et al.*, 2013).

En general, cuando este herbicida se usa solo, los productos de calidad técnica contienen al menos el 94% de atrazina como el único ingrediente activo. Por otro lado, también se debe indicar que, en Europa, EUA y América Latina, la atrazina también se formula en combinación con una gran variedad de otros compuestos (Ribas *et al.*, 1998). La creciente evidencia ha demostrado que este herbicida tiene el potencial de inducir estrés oxidante, daño en el ADN y alteración endocrina en diferentes organismos. De hecho, la atrazina puede ingresar a la vida silvestre y al ser humano a través de distintas vías. En mamíferos, varios estudios indican que la atrazina se metaboliza principalmente por los citocromos P450 y, en un grado mucho mayor, por las glutatión transferasas (GST), a varios productos metabolitos incluyendo desetilatrazina (DEA), desisopropil atrazina (DIA), diaminoclorotriazina (DACT), atrazina-glutatión (ATZ-SG) y atrazina-mercaptopurato (ATZ-mercap) (Jin *et al.*, 2014).

Tabla 2. Restricción del uso de atrazina en diferentes países (modificado de Hansen *et al.*, 2013).

Región	País	Restricción
Norteamérica	Estados Unidos	Restringido
	Canadá	Permitido
	México	Permitido
Europa	Italia, Alemania, Suecia, Austria, Francia, Finlandia, Dinamarca	Prohibido
	Bélgica, Irlanda, Luxemburgo, Reino Unido	Permitido
Asia	Bangladesh, Camboya, China, Indonesia, Malasia, Myanmar, Pakistán, Sri Lanka, Tailandia, Vietnam	Permitido
Oceanía	Australia	Restringido
América Latina y El Caribe	Colombia, Cuba, El Salvador, Honduras, Panamá, Puerto Rico, República Dominicana, Venezuela	Permitido
	Antigua y Barbuda, Bahamas, Barbados, Bermuda, Belice, Costa Rica, República Dominicana, Granada, Guatemala, Guyana, Haití, Jamaica, Nicaragua, Saint Kitts y Nevis, Saint Lucia, San Vicente y las Granadinas, Surinam, Trinidad y Tobago	Permitido

La atrazina produce genotoxicidad al causar rupturas de cadenas sencillas y dobles en el ADN a través de la formación de ROS. El efecto toxicológico de la atrazina se origina a partir de su acción directa como agente oxidante; una vez dentro de la célula y en presencia de reductores celulares, induce una amplia variedad de lesiones de ADN, que incluyen aductos, enlaces cruzados ADN-ADN y ADN-proteína. La fragmentación o las roturas de la cadena de ADN también se consideran un tipo de lesión que es potencialmente premutagénica, la producción de rompimientos en las hebras del ADN está relacionada con las propiedades mutagénicas y carcinógenas de los productos químicos (Song *et al.*, 2009).

Varios estudios indican que la atrazina puede dañar la integridad del ADN y la estabilidad del genoma celular utilizando el ensayo del cometa y el análisis de aberraciones cromosómicas (Huang *et al.*, 2015).

III.III Estudios sobre mezclas de acetoclor y atrazina

Los plaguicidas raramente aparecen en el ambiente como compuestos únicos, son comúnmente comercializados y aplicados como mezclas de diferentes productos químicos. La mayor parte de los estudios reportan resultados sobre los plaguicidas individuales, por lo tanto, es importante considerar el efecto de las mezclas potenciales al evaluar el impacto en la salud humana. Existe evidencia de que las mezclas pueden causar efectos tóxicos más bajos o altos de lo que se esperaría de compuestos individuales (Larsen *et al.*, 2003).

Se han realizado estudios sobre la potenciación de plaguicidas en mezclas para atrazina, clorpirifos, clorotalonil, cipermetrina, quinolfos y linurón. La exposición combinada de dosis no tóxicas de atrazina (triazina) y alaclor (cloroacetamida) indujo frecuencias significativas de fragmentos de cromosomas en células de médula ósea de ratón, mientras que la exposición independiente de dosis similares no indujo efecto significativo (Meinser *et al.*, 1992). Estos estudios indican que las mezclas de plaguicidas muestran aumento en la frecuencia de las aberraciones

cromosómicas, la formación de aductos de ADN y las especies reactivas de oxígeno que pueden alterar la integridad genética y la bioquímica de las vías metabólicas (Dearfield, *et al.*, 1999; Wild, *et al.*, 1975). Se descubrió también, que la atrazina tiene efectos mutagénicos sinérgicos en moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*), moscas domésticas (*Musca domestica*) y larvas de mosquito (*Aedes aegypti*) cuando se combina con plaguicidas como el paratión o el carbofurano (Lichtenstein *et al.*, 1973).

Como se ha dicho anteriormente, los herbicidas triazínicos como la atrazina, estimulan la actividad del citocromo P450 (CYP450) y el acetocloro, que es metabolizado y potencialmente bioactivado por miembros de la familia de enzimas CYP450, CYP2B6 y CYP3A4, al aplicarlos juntos, posiblemente aumenta la bioactivación del acetocloro como resultado de la actividad CYP450 inducida por la atrazina (Lerro *et al.*, 2015).

Otros estudios recientes han demostrado los efectos potenciadores de los herbicidas triazínicos, como la atrazina (el herbicida triazínico más utilizado), a la toxicidad de una variedad de insecticidas organofosforados (OP) (Trimble y Lydy, 2006). Las triazinas pueden estimular la actividad de CYP450 aumentando la tasa de bioactivación de los OP a la forma de oxón. Esta interacción da como resultado la potenciación de la propiedad inhibidora de la colinesterasa de los OP (Belden y Lydy, 2001). En los insectos, se ha demostrado que la atrazina induce no solo CYP450 sino también actividad general de esterasa, que puede aumentar o disminuir la toxicidad de los insecticidas dependiendo de si el metabolito posterior es más o menos tóxico que el compuesto original (Pape-Lindstrom y Lydy, 1997).

IV. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento poblacional y el aumento en la demanda de alimentos ha incrementado el uso de plaguicidas a nivel mundial. Si bien estas sustancias químicas han contribuido considerablemente a la mejora de cultivos, aumentando la producción de alimentos. En México particularmente, se ha visto que la aplicación de los plaguicidas a los cultivos se da en mezclas y los estudios sobre evaluación de daño de plaguicidas generalmente se realizan de manera individual. Por lo tanto, es importante conocer el efecto que estas mezclas de plaguicidas pueden causar en la salud humana.

Los estudios genotóxicos *in vitro*, como lo es el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC) son una herramienta útil para evaluar el daño que estas sustancias son capaces de causar no solo a nivel genotóxico sino también citotóxico. Se considera un primer acercamiento al efecto que puede provocar un agente químico a la integridad del material genético.

Se ha visto que los plaguicidas suelen mezclarse para facilitar su aplicación combinando insecticidas, herbicidas y fungicidas. Además, comercialmente, se venden mezclas de plaguicidas con el fin de ampliar su efecto. Pero es desconocido el daño que esto causa al ambiente y principalmente a la salud de las personas que lo aplican o que indirectamente se encuentran expuestas, por ello es importante evaluar estas mezclas *in vitro*.

Actualmente, uno de los dos ingredientes activos que es la atrazina aún se encuentra considerada como un compuesto “sin suficiente evidencia para clasificarla como un posible carcinógeno” por lo que todavía hace falta estudiarlo, ya que en algunos países su uso se encuentra restringido o prohibido. En el caso de acetoclor, la última actualización sobre su clasificación es de “posible carcinógeno”, por lo que es importante conocer su comportamiento al combinarlo con otro ingrediente activo como la atrazina.

V. HIPÓTESIS

Dado que las frecuencias de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN) y brotes nucleares (BrN) en células binucleadas de linfocitos humanos, son biomarcadores de genotoxicidad, se espera que los dos herbicidas, atrazina y acetoclor, induzcan daño de manera individual, así como un efecto sinérgico en la mezcla comercial al compararse con el testigo negativo.

VI. OBJETIVOS

VI.I Objetivo general

- Evaluar el posible daño genotóxico inducido en linfocitos humanos de sangre periférica *in vitro* por la exposición directa a los herbicidas: acetoclor y atrazina de manera individual, y en combinación comercial bajo el nombre de Harness Xtra.

VI.II Objetivos particulares

- Evaluar el efecto en la frecuencia de MN, PN, BrN del herbicida acetoclor y atrazina de manera individual, y en combinación en tres diferentes concentraciones.
- Evaluar el efecto mitogénico mediante los índices IDN e IPBC de los tres herbicidas antes mencionados.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.I Toma de muestra

La obtención de muestra de sangre periférica se llevó a cabo con una jeringa nueva, estéril y heparinizada tomando de 6-7 mL de sangre del antebrazo a cada una de las dos donadoras que, anteriormente firmaron un consentimiento informado (Anexo), las cuales estuvieron sanas, no fumadoras con edades de entre 20-23 años y en ayuno.

VII.II Cultivo celular

Los cultivos celulares se realizaron por duplicado y se establecieron añadiendo 0.5 mL de sangre periférica heparinizada en 4.5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (Biowest) en un tubo cónico para centrifuga estéril. El cultivo de linfocitos se estimuló agregando 200 µL de fitohemaglutinina (MicroLab). La sangre se añadió por goteo en condiciones de esterilidad para posteriormente incubar a 37 °C durante 24 h.

VII.III Preparación de los plaguicidas

Los plaguicidas se obtuvieron de casas distribuidoras de agroquímicos en la Ciudad de México de las siguientes marcas:

- Surpass (Dow AgroSciences)

Acetoclor: 75.3% de ingrediente activo.

Registro: RSCO-HEDE-0288-302-009-075

Presentación: concentrado emulsionable.

- Gesaprim (Syngenta)

Atrazina: 43% de ingrediente activo.

Registro: HSCO-HEDE-0204-008-043.

Presentación: suspensión acuosa.

- Harness Xtra (Monsanto)

Acetoclor: 46.3 % de ingrediente activo.

Atrazina: 18.3% de ingrediente activo.

Registro: RSCO-MEZC-1245-301- 009-065.

Presentación: concentrado emulsionable.

Todas las concentraciones fueron establecidas con base en ensayos preliminares y literatura (Rayburn *et al.*, 2005). Se utilizó agua estéril para diluir los plaguicidas y fueron empleadas tres concentraciones distintas: para acetoclor se usaron 0.015, 0.03 y 0.06 mM; para atrazina 0.22, 0.44 y 0.66 mM y para Harness Xtra (combinación comercial de atrazina + acetoclor) se usó 0.015, 0.3 y 0.045 mM en relación a acetoclor y 0.0075, 0.015 y 0.022 mM en relación a atrazina.

VII.IV Tratamientos

Pasadas las 24 h de iniciado el cultivo se añadieron los tratamientos usando como testigo positivo 55 μ L (11 μ g/mL) de bleomicina (Teva) y los tres herbicidas en sus tres distintas concentraciones. Como testigo negativo se utilizó agua estéril. Se dejaron incubar 24 h a 37 °C.

VII.V Bloqueo de la citocinesis

Cumplidas las 48 h de iniciado el cultivo se añadió 270 μ L (1 mg/mL) de citocalasina B (Cayman) para el bloqueo de la citocinesis. Los cultivos permanecieron en la incubadora a 37 °C hasta concluir las 72 h.

VII.VI Cosecha celular

Transcurridas las 72 h se llevó a cabo la cosecha celular, la cual consistió en la centrifugación de los cultivos durante diez minutos a 1500 rpm y lavados con fijador Carnoy frío (ácido acético y metanol 3:1). Estos lavados se llevaron a cabo hasta que el botón se tornó blanco y el sobrenadante fue transparente. Los tubos se mantuvieron en refrigeración hasta la elaboración de las laminillas.

VII.VII Elaboración de laminillas y tinción

Las laminillas se realizaron en portaobjetos limpios y a temperatura ambiente deslizando de 2 a 3 gotas del botón celular. Se tiñeron con colorante Giemsa diluido en amortiguador de fosfatos de pH 6.8 en proporción 1:20 durante 3 a 5 minutos, finalmente se enjuagaron con agua de la llave. Es importante mencionar que a las laminillas les fueron asignadas claves aleatorias para evitar subjetividad al momento de la observación.

VII.VIII Observación al microscopio

Se analizaron las laminillas al microscopio óptico (Zeiss) a 40x. Para el cálculo de los índices se contabilizaron 500 células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas para el Índice de División Nuclear (IDN) e Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis (IPBC). Posteriormente, para el análisis genotóxico, se contabilizaron 1000 células binucleadas registrando el número de micronúcleos (MN), los puentes nucleoplásmicos (PN) y los brotes nucleares (BrN). Para el conteo celular y de biomarcadores, se siguieron los criterios de selección antes mencionados por Fenech *et al.* (2003).

VII.IX Análisis estadístico

A partir de los experimentos realizados, se elaboraron pruebas de T para datos pareados con el fin de determinar si existían diferencias intraindividuales significativas entre las repeticiones, obteniendo una $p < 0.05$ y demostrando no ser significativamente distintos, se realizó una segunda prueba para comparar diferencias significativas interindividuales, corroborando así, que no existieron discrepancias, los datos representados a continuación son un conjunto de repeticiones de ambos donadores analizados. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y después una prueba de comparaciones múltiples Newman-Keuls con una significancia del 0.05. Todo el análisis estadístico fue hecho con el programa Statistica 7 y fue elaborado para los datos de los índices de división nuclear (IDN) e índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC); y también para los tres biomarcadores (MN, PN y BrN).

VIII RESULTADOS

Las Figuras 6, 7 y 8 muestran imágenes de células que fueron observadas y tomadas en cuenta para el análisis y que cumplieron con los criterios de clasificación antes descritos.

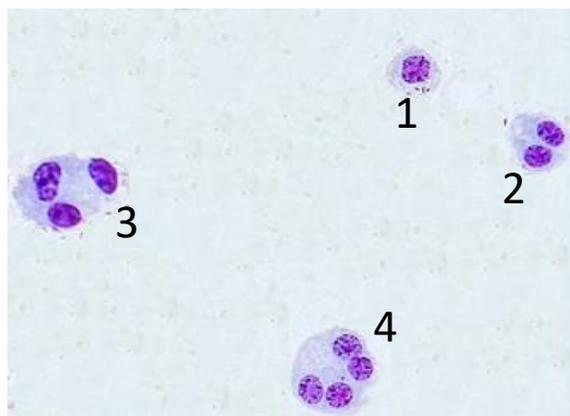


Figura 6. Células que fueron tomadas en cuenta para el cálculo de los índices: se observan una célula mononucleada (1), binucleada (2), trinucleada (3) y tetranucleada (4).

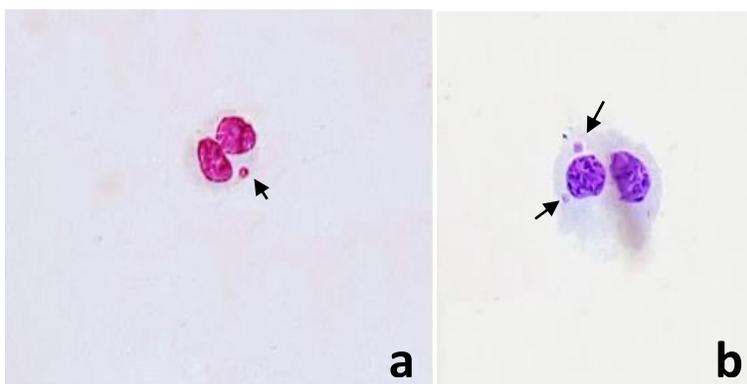


Figura 7. Células binucleadas con micronúcleos señalados con flechas. En donde (a) muestra una célula binucleada con un micronúcleo y en (b) una célula binucleada con dos micronúcleos. Todas cumplen con los criterios de selección según Fenech *et al.* (2003).

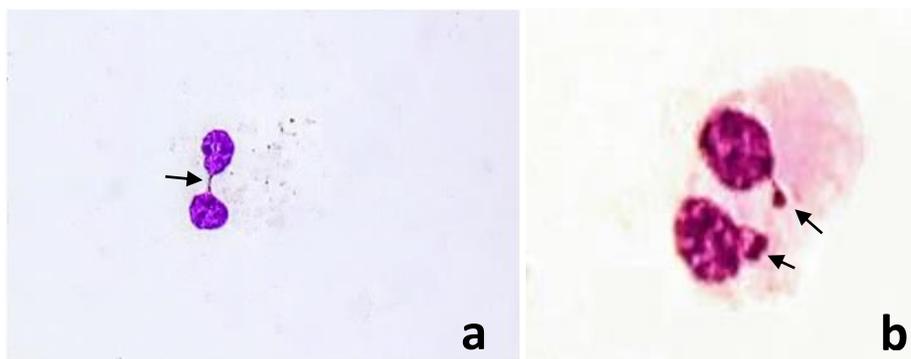


Figura 8. Células binucleada con un puente nucleoplásmico en (a) y en (b) se muestra una célula binucleada con 3 brotes nucleares señalados con flechas.

VII.I Acetoclor

El IDN e IPBC no mostraron resultados estadísticamente diferentes al compararlos con el testigo negativo. En las tres distintas concentraciones de acetoclor se observa una disminución en los índices al compararlos con el testigo negativo, pero estos no fueron significativos (Tabla 3).

Tabla 3. Estadística descriptiva de los tres índices: IDN e IPBC en tres concentraciones diferentes de acetoclor

Tratamiento		IDN Media \pm D.E.	IPBC Media \pm D.E.
Concentración (mM)	% de i.a.**		
Testigo Negativo		1.95 \pm 0.21	1.84 \pm 0.17
Testigo positivo		1.54 \pm 0.23	1.51 \pm 0.23
0.015	0.41	1.87 \pm 0.15	1.76 \pm 0.12
0.030	0.83	1.89 \pm 0.21	1.79 \pm 0.16
0.060	1.67	1.78 \pm 0.16	1.74 \pm 0.14

*Diferencias significativas obtenidas por ANOVA y la prueba de Newman-Keuls con una $p < 0.05$.

**Porcentaje de ingrediente activo para comparar la mezcla comercial.

En cuanto a la frecuencia de micronúcleos, se observa una relación entre el aumento de la concentración del plaguicida y la frecuencia de micronúcleos, ya que a la mayor concentración de plaguicida (0.060 mM y 1.67 % de i. a.) se evidencia una media de 29.25 ± 9.639 micronúcleos en 1000 células binucleadas, lo cual en el análisis estadístico concluyó ser significativamente diferente ($p < 0.05$) al comparar con el testigo negativo.

Al comparar la frecuencia de puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares no fueron significativamente diferentes con el testigo negativo, sin embargo, la frecuencia más alta de BrN fue para la concentración de 0.06 mM con 1.67 % de i. a. de acetoclor (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de micronúcleos, puentes nucleares y brotes nucleares en 1000 células binucleadas en tres diferentes concentraciones de acetoclor.

Tratamiento		MN/Bn	PN/Bn	BrN/Bn
Concentración (mM)	% de i.a.**	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
Testigo Negativo		5 \pm 2.16	0.5 \pm 1	1.75 \pm 2.87
Testigo positivo		19.25 \pm 8.99 *	0.5 \pm 0.58	1.75 \pm 2.87
0.015	0.41	6.25 \pm 3.40	1.5 \pm 1	2 \pm 2.83
0.03	0.83	9 \pm 1.41	0.5 \pm 0.58	2 \pm 1.83
0.06	1.67	29.25 \pm 9.64 *	1.25 \pm 1.26	2.25 \pm 3.30

*Diferencias significativas obtenidas por ANOVA y la prueba de Newman-Keuls con una $p < 0.05$.

**Porcentaje de ingrediente activo para comparar la mezcla comercial.

VII.II Atrazina

Los IDN e IPBC fueron significativamente diferentes al comparar las tres concentraciones de atrazina con el testigo negativo. Se observa que los índices disminuyen conforme aumenta la concentración de atrazina, siendo la de 0.66 mM y 14.4 % de i. a. la que indujo un promedio de 1.265 ± 0.061 , que es más bajo que el testigo negativo e incluso menor que el positivo (Tabla 5).

Tabla 5. Estadística descriptiva para los tres índices: IDN e IPBC en tres concentraciones diferentes de atrazina.

Tratamiento		IDN	IPBC
Concentración (mM)	% de i.a.**	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
Testigo negativo		2.05 ± 0.3	1.92 ± 0.08
Testigo positivo		$1.48 \pm 0.08^*$	$1.48 \pm 0.05^*$
0.22	4.8	$1.77 \pm 0.12^*$	$1.73 \pm 0.10^*$
0.44	9.6	$1.43 \pm 0.06^*$	$1.41 \pm 0.05^*$
0.66	14.4	$1.26 \pm 0.06^*$	$1.26 \pm 0.06^*$

*Diferencias significativas obtenidas por ANOVA y la prueba de Newman-Keuls con una $p < 0.05$.

**Porcentaje de ingrediente activo para comparar la mezcla comercial.

Asimismo, se obtuvo una diferencia significativa de micronúcleos en comparación con el testigo negativo en la concentración más alta (0.66 mM y 14.4% de i. a.) obteniendo una media de 13 ± 5.715 MN en 1000 células BN (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencia de micronúcleos, puentes nucleares y brotes nucleares en 1000 células binucleadas en tres concentraciones diferentes de atrazina.

Tratamiento		MN/Bn	PN/Bn	BrN/Bn
Concentración (mM)	% de i.a.**	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Testigo negativo		4.25 ± 1.26	0 ± 0	0 ± 0
Testigo positivo		21.75 ± 6.13*	0.75 ± 0.96	0.25 ± 0.5
0.22	4.8	3.5 ± 4.51	0.75 ± 0.96	2.25 ± 2.63
0.44	9.6	9 ± 4.83	0.5 ± 1	0.75 ± 0.96
0.66	14.4	13 ± 5.71*	2.25 ± 4.5	0.5 ± 1

*Diferencias significativas obtenidas por ANOVA y la prueba de Newman-Keuls con una $p < 0.05$.

**Porcentaje de ingrediente activo para comparar la mezcla comercial.

Respecto a los PN que no fueron significativamente distintos en el análisis estadístico, se observó una media de 2.25 ± 4.5 puentes por célula binucleada en el conteo de 1000 células, considerada una frecuencia baja para la concentración más alta del plaguicida. En los BrN se observa una tendencia inversa al aumentar la concentración, es decir, para la concentración más baja del plaguicida (0.22 mM y 4.8 % de i. a.) se encontró una frecuencia de 2.25 ± 2.63 que no fue significativamente distinta al testigo negativo (Tabla 6).

VII.III Acetoclor y atrazina

Para la mezcla comercial de atrazina y acetoclor, no hubo efecto significativo en los índices (IDN e IPBC) en comparación con el testigo negativo. Estos muestran una cifra muy similar al testigo negativo (Tabla 7).

Tabla 7. Estadística descriptiva para IDN e IPBC en tres concentraciones diferentes del herbicida Harness xtra (atrazina + acetoclor).

Tratamiento				IDN Media ± D.E.	IPBC Media ± D.E.
Acetoclor		Atrazina			
Concentración (mM)	% de i.a.**	Concentración (mM)	% de i.a.**		
Testigo negativo				2.03 ± 0.21	1.92 ± 0.19
Testigo positivo				1.55 ± 0.13*	1.53 ± 0.11*
0.015	0.41	0.0075	0.16	2.04 ± 0.24	1.90 ± 0.18
0.03	0.82	0.015	0.32	2.01 ± 0.23	1.86 ± 0.16
0.045	1.2	0.022	0.48	1.94 ± 0.26	1.84 ± 0.21

*Diferencias significativas obtenidas por ANOVA y la prueba de Newman-Keuls con una $p < 0.05$.

**Porcentaje de ingrediente activo para comparar la mezcla comercial.

Acerca de la frecuencia de micronúcleos contabilizados en 1000 células binucleadas, en la concentración más alta de la combinación comercial los resultados fueron significativamente diferentes en comparación al testigo negativo; se observó que a 0.045 mM/1.2% de i. a. con respecto a acetoclor, se obtuvo una media de 10.25 ± 0.957 micronúcleos. Para los puentes nucleoplásmicos, no se logra ver un aumento significativo en los tratamientos con el plaguicida, igualmente para los brotes nucleares no hubo diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8).

Tabla 8. Frecuencia de micronúcleos, puentes nucleares y brotes nucleares en 1000 células binucleadas en tres concentraciones diferentes del herbicida Harness xtra (atrazina + acetoclor).

Tratamiento				MN/Bn	PN/Bn	BrN/Bn
Acetoclor		Atrazina		Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Concentración (mM)	% de i.a.**	Concentración (mM)	% de i.a.**			
Testigo negativo				4 ± 2.16	0 ± 0	0.5 ± 0.58
Testigo positivo				20 ± 8.76*	0.75 ± 0.96	1.5 ± 1.91
0.015	0.41	0.0075	0.16	5.25 ± 2.99	0.75 ± 1.5	2.25 ± 2.87
0.03	0.82	0.015	0.32	7 ± 3.16	0.75 ± 0.96	0.75 ± 0.5
0.045	1.2	0.022	0.48	10.25 ± 0.96*	1 ± 0.82	1 ± 1.41

*Diferencias significativas obtenidas por ANOVA y la prueba de Newman-Keuls con una $p < 0.05$.

**Porcentaje de ingrediente activo para comparar la mezcla comercial.

IX DISCUSIÓN

Acetoclor

En los resultados obtenidos en respuesta a la exposición de linfocitos a tres concentraciones distintas de acetoclor con respecto al cálculo de los índices (IDN e IPDN), no se encontró daño citostático, es decir no interfiere en la progresión del ciclo celular puesto que estos índices no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo negativo. Los resultados también mostraron que el herbicida acetoclor en su formulación individual causó daño genotóxico.

Esto puede observarse en la concentración más alta (0.060 mM/1.67 % de i.a.) donde se obtuvo una media de 29.25 ± 9.639 micronúcleos la cual fue significativamente diferente al compararla contra el testigo negativo, siendo incluso mayor el daño al testigo positivo (bleomicina) el cual indujo una media de 19.25 ± 8.995 micronúcleos. Esto es una evidencia de daño genotóxico inducido por el herbicida.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con estudios previos, donde se asocia el uso de acetoclor con cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas y melanoma (Lerro *et al.*, 2015). En estudios con animales, donde se encontraron tumores pulmonares y sarcomas histiocíticos en ratones, mientras que en ratas Sprague-Dawley se observaron tumores olfativos nasales y tumores de células foliculares tiroideas (EPA, 2007) asociados a la exposición de acetoclor. También se han reportado adenomas y carcinomas hepáticos, adenomas renales, sarcomas y tumores ováricos benignos en ratas y ratones (Lerro *et al.*, 2015).

Asimismo, concuerda con los estudios de Ashby *et al.* (1996) donde demuestra que el acetoclor es clastogénico en linfocitos humanos cultivados. Esta actividad clastogénica se observó que es independiente del metabolismo auxiliar (mezcla S9) y fue más marcada cuando se usaron linfocitos aislados en comparación con el

hemocultivo de sangre completa. Estos datos de toxicidad genética *in vitro* son consistentes con el sustituyente cloroacetilo que reacciona preferentemente con los grupos sulfhidrilo (-SH) de los constituyentes celulares como el glutatión (GSH por sus siglas en inglés), a diferencia de los átomos de nitrógeno y oxígeno del ADN *per se*. Cuando estos nucleófilos celulares protectores del ADN se agotan (con dosis crecientes de acetoclor), se produce una reacción en los grupos sulfhidrilo de la cromatina que inducen clastogenicidad (Liu *et al.*, 2006). Por lo que los resultados positivos obtenidos en el presente estudio coinciden con otros publicados anteriormente donde se ha demostrado que el acetoclor puede acelerar la metamorfosis inducida por la hormona tiroidea en *Rana pipiens* y *Xenopus laevis* (Cheek *et al.*, 1999; Crump *et al.*, 2002), conducir a la reducción de la fertilidad (Ashby *et al.*, 1997) y aumentar la aparición de adenomas nasales en ratas (Green *et al.*, 2000), asimismo, se ha mencionado que puede influir en el crecimiento de la lombriz de tierra, la reproducción y mal metabolismo de la celulosa (Xiao *et al.*, 2006) e incluso causar el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos (Hill *et al.*, 1997).

Por otro lado, se ha observado que, en células de hígado de renacuajo, acetoclor causa un aumento de daño al ADN relacionado con estrés oxidante mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (Liu *et al.*, 2006).

En cuanto a los BrN, que de acuerdo con Fenech (2000) corresponden a amplificación génica, no hubo una respuesta positiva al tratamiento con acetoclor, es decir, no se observó que esta alteración fuera causada por el herbicida. Con respecto a los PN los cuales evidencian la inducción de cromosomas dicéntricos, no se obtuvieron resultados significativos en su formación (Fenech *et al.*, 2003).

Atrazina

Se puede observar en los resultados que existe una diferencia estadísticamente significativa en los Índices de División Nuclear e Índice de Proliferación con Bloqueo

de la Citocinesis (IDN e IPBC). Se observó efecto citostático del herbicida dosis-dependiente, ya que, al aumentar su concentración, el valor de los índices mencionados disminuye. Posiblemente el plaguicida esté induciendo efecto dentro del ciclo celular como ha sido sugerido por Ribas *et al.* (1998).

La disminución en el valor de los índices (IDN y el IPBC) en comparación con el testigo negativo, indica que las células están sufriendo un retraso en su ritmo de división; Fenech *et al.* (2007) describen que un valor de 2.0 indica que las células se están duplicando y que la mayoría se han dividido en al menos una ocasión, en este trabajo se encontró una media para el testigo negativo de 2.049 ± 0.296 para el IDN, lo que es el esperado mientras que para la concentración más alta del plaguicida es de 1.265 ± 0.061 , valor considerado bajo, es decir las células están disminuyendo su tasa de división debido al daño causado por el plaguicida, evidenciando efecto citostático. Estos resultados coinciden con estudios hechos en linfocitos humanos donde se encontró daño citostático provocado por este herbicida y se observaron diferencias significativas en el índice de la tasa proliferativa (Ribas *et al.*, 1998). También Flores-Maya (2000) reporta que los herbicidas triazínicos (metribuzina y ametrina) causan daño citotóxico con y sin activación metabólica vegetal en cultivos de linfocitos humanos al aumentar las células de tercera división y a concentraciones altas causa la disminución de las células de primera generación.

En cuanto a los tres biomarcadores (MN, PN y BrN) los resultados mostraron que la atrazina causa daño genotóxico en las condiciones experimentales realizadas en este trabajo, ya que se observó un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos en la concentración más alta (0.66 mM y 14.4 % de i. a.) en la cual se encontró una media de 13 ± 5.715 micronúcleos. Sin embargo, este efecto no fue el mismo en PN y BrN, pues no se obtuvieron diferencias significativas para estos dos biomarcadores.

Contrario a lo que se encontró en los resultados de este estudio, otros autores han reportado que la atrazina no genera rompimientos cromosómicos en linfocitos humanos *in vitro* en una concentración de 0.001 µg/mL agregado a las 4 h de haber iniciado un cultivo de 72 h, ni en linfocitos de ratón *in vivo* en concentraciones de 20 µg/mL a los 90 días de exposición (Roloff *et al.*, 1992). Igualmente, en linfocitos humanos con las técnicas de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos, la atrazina no generó daño genotóxico en concentraciones de 5, 25, 50 y 100 µg/mL agregados a las 24 h de haber iniciado el cultivo de 72 h (Ribbas *et al.*, 1998).

Sin embargo, Meinsner *et al.* (1992) reportaron rompimientos cromosómicos en médula ósea de ratón en concentración de 20 ppm a los 90 días de exposición y linfocitos humanos en concentración de 1 µg/mL agregado a las 4 h de iniciar el cultivo de 72 h, igualmente, Zeljezic *et al.* (2006) reportaron daño genotóxico en linfocitos humanos con el ensayo de difusión del ADN y ensayo cometa en concentraciones de 0.047, 0.47 y 4.7 µg/mL con un tiempo de exposición de 8 h, también Lioi *et al.* (2008) describen daño cromosómico y aumento del estado prooxidante en linfocitos humanos con las técnicas de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y ensayo de G6PD (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) en concentraciones de 5, 8.5, 17, 51 µM agregados al inicio del cultivo de 72 h, finalmente Rayburn *et al.* (2001) informan daño genotóxico significativo en células de ovario de criceto chino a concentraciones 0.014, 0.09 0.14 y 1.4 µM en un cultivo de 48 h. Los datos de la presente investigación concuerdan con estos autores donde atrazina causó daño genotóxico.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, el tiempo de exposición que se usó en los estudios en linfocitos humanos donde se obtuvieron resultados negativos (Ribbas *et al.*, 1998) fueron mucho más cortos o con concentraciones más bajas que los usados tanto en este proyecto como en los estudios donde se reportaron resultados positivos para genotoxicidad (Lioi *et al.*, 2008) por lo que se puede sugerir que atrazina a concentraciones bajas con un tiempo de exposición más largo o a

concentraciones más altas que las reportadas por Ribbas *et al.* (1998) con un tiempo de exposición más corto puede inducir daño al ADN. También, se sugiere que probablemente su efecto genotóxico esté relacionado con estrés oxidante basándose en los resultados obtenidos también por Lioi *et al.* (2008) que observaron un mayor incremento en la actividad de la enzima G6PD relacionada con la formación de intermediarios reactivos de oxígeno.

Mezcla de atrazina y acetoclor

Ya que en los resultados de ambos herbicidas por separado se encontraron efectos diferentes: en el caso de acetoclor, daño genotóxico y en la atrazina daño citostático y genotóxico, en la combinación comercial, los resultados fueron totalmente diferentes a lo esperado.

En cuanto a el IDN e IPBC, se esperaba observar un efecto similar o mayor a los resultados obtenidos con los plaguicidas de manera individual. En el caso de atrazina se presentaron diferencias significativas con el plaguicida individual en estos índices (IDN e IPBC). Sin embargo, en la mezcla de ambos herbicidas no se mostró un aumento significativo en el efecto citostático, lo que se le puede atribuir al porcentaje de ingrediente activo presente en la mezcla comercial de cada plaguicida. Para la exposición del herbicida individual se utilizó 4.8% del ingrediente activo en la concentración más baja (0.22 mM), sin embargo, en la mezcla comercial se encontraba a un porcentaje menor de 0.48% (diez veces más bajo), por lo cual se podría asumir que debido a esa baja concentración no se vio un efecto de la atrazina en los índices mencionados.

En comparación con acetoclor, no se esperaba observar ninguna modificación en los índices ya que de manera individual no indujo efecto citostático. Esta hipótesis se confirmó en la mezcla ya que no se obtuvieron diferencias significativas entre los índices y sus respectivos testigos negativos. Este efecto se le puede atribuir a que (en comparación con atrazina) se tenían los mismos (o similares) porcentajes de

ingrediente activo tanto en la prueba individual como en la mezcla comercial, por lo que el efecto se mantuvo.

Para el caso de la genotoxicidad, acetoclor en su formulación individual indujo la formación de micronúcleos de manera significativa contra el testigo negativo (29.25 ± 9.639 micronúcleos) en la mayor concentración (representando un 1.6% de ingrediente activo), al igual que atrazina que fue significativamente diferente en la concentración más alta (0.66 mM y 14.4 % de i. a), la cual indujo una media de 13 ± 5.715 micronúcleos, por lo que se esperaba que en conjunto (Harness Xtra) ambos herbicidas indujeran una mayor frecuencia de micronúcleos. Sin embargo, tuvo el efecto contrario ya que no se encontró aumento sino una reducción con una media de 10.25 ± 0.957 micronúcleos a pesar de seguir siendo un valor estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo.

La poca inducción de MN podría deberse a que el efecto de acetoclor al encontrarse combinado con la atrazina, se vio afectado dando como resultado una reducción en la frecuencia de micronúcleos. Comportamiento que no se esperaba dado que está comprobado que acetoclor causa rupturas en el ADN (Ashby *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2006). De estos resultados es posible deducir que al estar combinado con atrazina el efecto sinérgico esperado no se observó. Es decir, el comportamiento de la mezcla de estos dos herbicidas fue antagónico y no sinérgico, donde atrazina posiblemente interfirió con el efecto genotóxico de acetoclor observado en la reducción significativa de la frecuencia de micronúcleos. Y de la misma manera es posible explicar cómo es que a pesar de haberse inducido efecto genotóxico con atrazina de manera individual no se observó un efecto sinérgico. Como se mencionó anteriormente, probablemente se requiera una concentración más alta o un tiempo de exposición mayor a concentraciones bajas para poder evidenciar daño genotóxico. En la mezcla, la concentración de atrazina se redujo mientras que el tiempo se mantuvo, por lo que no se obtuvo una respuesta genotóxica esperada que aumentara el valor de micronúcleos observado.

Las interacciones toxicodinámicas ocurren cuando la presencia de dos (o más) compuestos cambia la respuesta sin afectar la dosis en cada uno de los compuestos. Ocurren en el sitio del receptor celular, o en la molécula objetivo, o entre los sitios u objetivos del receptor. Cuando la interacción tiene lugar en el mismo sitio del receptor, esto generalmente produce antagonismo (Reffstrup *et al.*, 2010). Por lo que se ha comprobado que una sustancia puede estimular el metabolismo de una segunda o interferir con su absorción (Hernández *et al.*, 2013). En este caso, probablemente ocurre algo similar, puesto que a pesar de que el porcentaje de atrazina usado en la combinación comercial fue bajo (0.48 %), fue suficiente para reducir el efecto de acetoclor pero no el suficiente para inducir daño genotóxico por sí mismo.

Puede sugerirse que atrazina en combinación con acetoclor, está evitando que éste llegue a causar el daño que se observó de manera individual; ya que también se observó un efecto similar en experimentos anteriores donde herbicidas triazínicos indujeron un efecto antagónico en mezclas con procloraz, un fungicida (Hernández *et al.*, 2013); por lo que posiblemente este efecto antagónico puede ser atribuido a atrazina.

Se ha observado que acetoclor causa estrés oxidante y daño directo al ADN (Ashby *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2006) por lo que se sugiere que atrazina puede afectar su absorción, distribución, metabolismo o eliminación (Reffstrup *et al.*, 2010) llegando a disminuir el efecto genotóxico de acetoclor y así evitando que llegue a interactuar con el ADN. El mecanismo por el cual el efecto antagónico se está observando es incierto, sin embargo, se ha observado que plaguicidas que generan estrés oxidante de manera individual, al estar en mezcla se tiene este efecto, como es el caso de la mezcla de propoxur y permetrina, en el cual se encontró que de manera combinada el efecto genotóxico se redujo (Wang *et al.*, 2017).

Sin embargo, hacen falta más estudios para conocer el mecanismo por el cual se está observando este efecto antagónico en la mezcla de atrazina y acetoclor.

X CONCLUSIONES

- Atrazina aplicada en su forma individual causó un efecto genotóxico al aumentar la frecuencia de micronúcleos y también provocó daño citostático al disminuir significativamente los Índices de División Nuclear e Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis.
- El herbicida acetoclor en su forma individual indujo daño genotóxico al aumentar la frecuencia de micronúcleos, pero no manifestó efecto citostático al no provocar alteraciones en los Índices de División Nuclear e Índice de Proliferación con Bloqueo de la Citocinesis (IDN e IPBC).
- La combinación de acetoclor y atrazina causó daño genotóxico, sin embargo, se observa un efecto antagónico probablemente inducido por atrazina al disminuir el número de micronúcleos que acetoclor induce de manera individual, esto sucede, aunque atrazina se encuentra en una baja concentración reduciendo así el daño que anteriormente demostró causar.

Es muy importante conocer el efecto que los plaguicidas pueden causar a la salud humana y conocer a fondo las interacciones que existen en las mezclas de estos compuestos ya que es de esta manera como generalmente se aplican. También es relevante recalcar la utilidad y facilidad del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, ya que permite saber no solo el efecto genotóxico que una sustancia puede causar, sino también las alteraciones que este podría tener en la división celular.

XI REFERENCIAS

Albert L.A. (2005). Panorama de los plaguicidas en México. *Revista de Toxicología en línea*,

Disponible en:
<https://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=124>

Al-Saleh I.A. (1994). Pesticides: a review article. *Journal of Environmental Pathology. Toxicology and Oncology*, 13:151-161.

Arencibia A.D.F. y Rosario F.L.A. (2009). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*. *Revista de Toxicología en línea*, 1:24-41.

Ashby J., Kier L., Wilson A.G.E, Green T., Lefevre P.A., Tinwell H., Willis G.A., Heydens W.F. y Clapp M.J.L. (1996). Evaluation of the potential carcinogenicity and genetic toxicity to humans of the herbicide acetochlor. *Human and Experimental Toxicology*, 15: 702- 735.

Badii M.H., y Landeros J. (2007). Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *Cultura Científica y Tecnológica / Toxicología de Plaguicidas*, 19: 1-34.

Belden, J.B. y Lydy, M.J. (2001). Effects of atrazine on acetylcholinesterase activity in midges (*Chironomus tentans*) exposed to organophosphorous insecticides. *Chemosphere*, 44: 1685-1689.

Bolognesi C., Creus A., Ostrosky-Wegnam P. y Marcos R. (2011). Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*, 26: 19-26.

Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W.P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Ban S., Barale R., Bigatti M.P., Bolognesi C., Cebulska- Wasilewska

A., Fabianova E, Fucic A., Hagmar L., Joksic G., Martelli A., Migliore L., Mirkova E., Scarfi M. R., Zijno A., Norppa H. y Fenech M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28: 625-631.

Carpenter D.O., Arcaro K. y Spink D.C. (2002). Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environmental Health Perspectives*, 110: 25 -42.

Cedano D.A., Martínez G.S., Escalera V.F., Salgado M.S., Carrillo D.F., Macías C.H. y Peña P.B. (2012). La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos. *Abanico Veterinario*, 2: 43-54.

Cheek A.O., Ide C.F., Bollinger J.E., Rider C.V. y McLachlan J.A. (1999). Alteration of leopard frog (*Rana pipiens*) metamorphosis by the herbicide acetochlor. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37: 70-77.

Coalova I., Mencacci S. y Fassiano V. (2013). Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes? *Acta Toxicológica Argentina*, 21: 5-14.

Coleman S., Linderman R., Hodgson E. y Rose R.L. (2000). Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. *Environmental Health Perspectives*, 108:1151-1157.

Crott J. W., Mashiyama, S. T., Ames B. N. y Fenech M. (2001) Folic acid deficiency increases chromosome breakage and rearrangement, gene amplification and DNA-uracil content in human lymphocytes *in vitro*: effect of MTHFR C677T polymorphism. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 10: 1089-1096.

Crump D., Werry K., Veldhoen N., Van Aggelen G. y Helbing C.C. (2002). Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone-dependent gene expression and

metamorphosis in *Xenopus Laevis*. *Environmental Health Perspectives*, 110: 1199-1205.

Das P.P., Shaik A.P., y Jamil K. (2007). Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology and Industrial Health*, 7: 449-458.

Dearfield, K.L., McCarroll N.E., Protzel A., Stack H.F., Jackson M.A., y Waters M.D. (1999). A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals: II. Mutagenicity and carcinogenicity of selected chloroacetanilides and related compounds. *Mutation Research*, 443: 183–221.

Diez U.P. (2013). Manejo de malezas problema. Modos de acción herbicida. *Red de Conocimiento de Malezas Resistentes*, 52 p.

Dong W., Chen Q., Hou Y., Li S., Zhuang K., Huang F., Zhou J., Li Z., Wang J., Fu L., Zhang Z., Huang Y., Wang F. y Cui Z. (2015). Metabolic pathway involved in 2-Methyl-6-Ethylaniline degradation by *Sphingobium* sp. strain MEA3-1 and cloning of the novel flavin- dependent monooxygenase system meaBA. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 8254-8264.

Environmental Protection Agency. (2007). Evaluation of the carcinogenic potential of acetochlor. *Cancer Assessment Review Committee, Health Effects Division, Office of Pesticide Programs*, 1-66.

Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81-95.

Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2: 1084-1104.

Fenech M. (2010). The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Physics*, 98: 234-243.

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 lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534: 65-75.

Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surralles J., Crott J.W., Parry J., Norppa H., Eastmond D.A, Tucker J.D. y Thomas P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26: 125-132.

Flores-Maya S. (2000). Efectos de los herbicidas metribuzina y ametrina (triazinas) sin y con activación metabólica vegetal *in vivo* sobre la cinética del ciclo celular y el índice mitótico en linfocitos humanos en cultivo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 16: 127-137.

Green T., Lee R., Moore R.B., Ashby J., Willis G.A., Lund V.J. y Clapp M.J.L. (2000). Acetochlor-induced rat nasal tumors: further studies on the model of action and relevance to humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 3: 127-133.

Hansen A.M., Treviño-Quintanilla L.G., Márquez P.H., Villada-Canela M., González-Márquez L.C., Guillén-Garcés R.A. y Hernández-Antonio A. (2013). Atrazina: un herbicida polémico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29: 65-84.

Hernández A.F., Parrón T., Tsatsakis A.M., Requena M., Alarcón R. y López-Guarnido O. (2013). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology*, 307: 136-145.

Heydens W.F., Lamb I.C. y Wilson. A.G.E. (2001). Chloracetanilide. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. *Academic Press*, pp. 1753-1769.

Hill A.B., Jefferies P.R., Quistad G.B.y Casida J.E. (1997). Dialkylquinoneimine metabolites of chloroacetanilide herbicides induce sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 12: 159-171.

Hintzsche H., Hemmann U., Poth A., Utesch D., Lott J. y Stopper H. (2017). Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research*, 771: 85–98.

Hoffelder D.R., Luo L., Burke N.A., Watkins S.C., Gollin S.M. y Saunders W.S. (2004) Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosome*, 112: 389-397.

Huang P., Yang J., Ning J., Wang M. y Song Q. (2015). Atrazine triggers DNA damage response and induces DNA double-strand breaks in MCF-10A cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 14353-14368.

IARC. (2018). Agents classified by de IARC monographs, volumes 1-122. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>

Jin Y., Wang L., Chen G., Li X., Miao W. y Fu Z. (2014). Exposure of mice to atrazine and its metabolite diaminochlorotriazine elicits oxidative stress and endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37: 782-790.

Larsen J.C., Binderup M.-L., Dalgaard M., Dragsted L.O., Hossaini A. y Ladefoged O. (2003). Combined actions and interactions of chemicals in mixtures. The toxicological effects of exposure to mixtures of industrial and environmental chemicals. *Danish Veterinary and Food Administration*, pp. 20-31.

Lerro C.C., Koutros S., Andreotti G., Hines C. J., Blair A., Lubin J., Ma X.,

Zhang Y. y Beane Freeman L. E. (2015). Use of acetochlor and cancer incidence in the Agricultural Health Study. *International Journal of Cancer*, 137: 1167-1175

Lichtenstein E.P., Liang T.T. y Anderegg B.N. (1973): Synergism of insecticides by herbicides. *Science*, 181 :847-849

Liu Y., Zhang Y., Liu J. y Huang D. (2006). The role of reactive oxygen species in the herbicide acetochlor-induced DNA damage on *Bufo raddei* tadpole liver. *Aquatic Toxicology*, 78: 21-26.

Lioi M.B., Scarfi M.R., Santoro A., Barbieri R., Zeni O., Salvemini F., Berardino D.D. y Ursini M. V. (1998). Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32:39-46.

Matheus L.T. y Bolaños A. (2014). Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*. Universidad de Carabobo (Salus) 18: 18-26.

Martínez-Valenzuela C. y Gómez-Arroyo S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 23: 185-200.

Meisner L.F., Belluck, D.A., y Roloff, B.D. (1992). Cytogenetic effects of alachlor and/or atrazine *in vivo* and *in vitro*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 191: 77-82.

OMS. (1992). Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura. *Organización Mundial de la Salud*, 11-13 pp.

Ortega-Ceseña J., Espinosa-Torres F. y López-Carrillo L. (1994). El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: retos ante el Tratado de Libre Comercio. *Salud Pública Mexicana*, 36: 624-632.

Ortíz I., Avila-Chávez M.A. y Torres L.G. (2013). Plaguicidas en México: usos, riesgo y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 4: 26-46.

Pape-Lindstrom P.A. y Lydy, M.J. (1997). Synergistic toxicity of atrazine and organophosphate insecticides contravenes the response addition mixture model. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 2415-2420.

Pérez V.T. (2000). Estudio de evaluación de la efectividad biológica del herbicida harness xtra (acetoclor + atrazina) en el control de maleza de hoja ancha y hoja angosta en maíz. (Tesis de Licenciatura) *Universidad de Guadalajara*, México.

Ramírez J.A. y Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivo de Prevención de Riesgos Laborales*, 4: 67-75.

Rayburn A.L., Bouma J. y Northcott C.A. (2001). Comparing the clastogenic potential of atrazine with caffeine using Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology Letters*, 121: 69-78

Rayburn A. L., Moody D. D., y Freeman, J. L. (2005). Cytotoxicity of technical grade versus formulations of atrazine and acetochlor using mammalian cells. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75: 691–698.

Reffstrup T.K., Larsen J.C. y Meyer O. (2010). Risk assessment of mixtures of pesticides: Current approaches and future strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56: 174-192.

Ribas G., Surralles J., Carbonell E., Creus A., Xamena N. y Marcos R. (1998). Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 416: 93-99.

Roloff B.D., Belluck D.A. y Meisner L.F. (1992). Cytogenetic studies of herbicide interactions *in vitro* and *in vivo* using atrazine and linuron. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22: 267-271.

Sánchez S.E. y Ortiz H.L. (2011). Riesgos y estrategias en el uso de plaguicidas. *Narraciones de la Ciencia*, pp 21-27

Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H. y Wahl, G.M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal Cell Biology*, 140: 1307-1320.

Stoorvogel, J., Jaramillo, R., Merino R. y Sarian K. (2003). Plaguicidas en el medio ambiente. En: Los Plaguicidas: impactos en producción, salud y medio ambiente Carchi. Ecuador: CIP e INIAP, 49-69 pp.

Song Y., Zhu L.S., Xie H., Wang J., Wang J.H., Liu W. y Dong X.L. (2009). Effects of atrazine on DNA damage and antioxidative enzymes in *Vicia faba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 1059-1062.

Trimble A.J., Lydy, M.J. (2006). Effects of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity in *Hyalella azteca*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51: 29-34.

Wild D. (1975) Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutation Research*, 32: 133-150.

Xiao N., Jing B., Ge F. y Liu X. (2006). The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere*, 62: 1366-1373.

Zeljezic D., Garaj-Vrhovac V. y Perkovic P. (2006). Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes *in vitro* using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicology in Vitro*, 20: 923-935.

XII ANEXO

CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA INVESTIGACIÓN

Por medio de la presente, el (la) que suscribe _____,
de manera libre y sin coerción alguna, autorizo a ser sometido (a) a la toma de
muestra de sangre que será practicado el día _____ del mes _____ del año
_____ a las _____ horas, para que se realice en ella el estudio denominado:

Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.

De igual forma, se me informó que no tiene riesgo para mi salud, ya que consiste
en la toma de una muestra sanguínea de 7 mL del antebrazo con materiales nuevos
y estériles.

Nombre y Firma