



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO DE LAS FRACCIONES
MICRO, NANO Y COMPLETA DEL PLAGUICIDA ENCAPSULADO
AMPLIGO MEDIANTE EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN LA
LÍNEA CELULAR NL20

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANDREA ELISA ROLDAN BARRETO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

Ciudad Universitaria, CDMX. 2023





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

Roldan

Barreto

Andrea Elisa

5547618410

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

314241489

2. Datos del tutor

Dra

Sandra Luz

Gómez

Arroyo

3. Datos del sinodal 1

Dr

Juan José

Rodríguez

Mercado

4. Datos del sinodal 2

Dr

Luis Felipe

Jiménez

García

5. Datos del sinodal 3

Dra

Karen Elizabeth

Nava

Castro

6. Datos del sinodal 4

Dra

María Isabel

Rodríguez

Romero

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación del daño genotóxico de las fracciones micro, nano y completa del plaguicida encapsulado Ampligo mediante el ensayo de micronúcleos en la línea celular NL20.

49 p

2023

8. Palabras clave

Nanoplaguicidas, genotoxicidad, micronúcleos

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México que a través del Proyecto IN114220 otorgó el apoyo financiero y la beca de tesis de licenciatura, que fue esencial para culminar este trabajo.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo por el apoyo y la confianza que me brindó para desarrollar este proyecto, por darme la oportunidad tener nuevas experiencias y aprendizajes durante mi estancia en el Laboratorio de Genotoxicología y Mutagénesis Ambientales.

A la Dra. Cynthia Alejandra Paz Trejo, gracias infinitas por tu confianza, tus enseñanzas, paciencia y tiempo otorgados para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Zeltzin Muñoz Juárez por su guía y ayuda para culminar este proyecto.

A la M. en C. Denisse Badillo, M. en C. Norberto Alarcón y la Dra. Paulina Abrica, Jaassiel Hernández y M. en C. Javier Ancona, por hacer de mi estancia en el laboratorio un experiencia enriquecedora, bonita y digna de recordar, por sus enseñanzas, consejos y ayuda para mejorar, por los ánimos y todo lo que compartieron conmigo.

A Victoria Carrillo porque todos sabemos que sin tu presencia en el laboratorio nada se lograría tan bien como lo hace. Gracias por tu cariño, apoyo y ayuda siempre.

A Eduardo Josué, no acabaría si me pusiera a en listar todo lo que tengo que agradecerte. Gracias por compartir tu vida conmigo y lo que has hecho para mejorar la mía, por buscar nuestro bienestar y enseñarme que siempre puede haber un camino diferente para ver y hacer las cosas. Gracias por nuestra vida, por ser mi equipo, por tu amor, tu compañía, el tiempo y el apoyo que me brindas en todo momento. Como dijiste, no es solo por este proceso sino por todo lo que hemos compartido, crecido y aprendido.

A Elena, Betito y Salvador, por darme las herramientas posibles para poder salir adelante. Gracias por cuidarme y creer en mí, por todo su cariño y por todo lo que han hecho durante años para que este bien. A Mónica, Fernando y Adrián por ser mis cómplices, por escuchar mis quejas, por todas las risas y nuestro cariño oculto. A Luis Fernando, Víctor Gael, Luis Daniel y Lucía Miranda, por llenar mi vida de felicidad desde el día 1 de su existencia.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE	
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
PLAGUICIDAS	2
<i>Clasificación de Plaguicidas</i>	2
<i>Importancia de los Plaguicidas</i>	3
<i>Efectos Ambientales del Uso de Plaguicidas</i>	4
<i>Efectos en la Salud del Uso de Plaguicidas</i>	4
NANOTECNOLOGÍA Y PLAGUICIDAS.....	5
<i>Nanoplaguicida Ampligo</i>	7
DAÑO GENOTÓXICO.....	9
BIOMARCADORES DE DAÑO GENOTÓXICO Y ENSAYO DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE CITOCINESIS	10
<i>Micronúcleos</i>	10
<i>Puentes Nucleoplásmicos y Brotes Nucleares</i>	12
<i>Observación de Biomarcadores de Daño Genotóxico</i>	13
LÍNEA CELULAR NL20	17
ANTECEDENTES	18
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVOS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
HIPÓTESIS	22
MATERIALES Y MÉTODO	23
<i>Cultivo Celular</i>	23
<i>Obtención de los Diferentes Tamaños de Partículas del Plaguicida</i>	24
<i>Establecimiento de Concentraciones</i>	24
<i>Diseño Experimental</i>	25
<i>Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de Citocinesis (MNBC)</i>	25
<i>Análisis Estadístico</i>	26
RESULTADOS	27
<i>Ensayo de Viabilidad Celular con Cristal Violeta</i>	27
<i>Evaluación del Daño Genotóxico</i>	28
<i>Evaluación del daño citostático</i>	31
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42

RESUMEN

Los plaguicidas representan un riesgo para la salud humana ya que se ha demostrado que algunos de ellos son capaces de inducir genotoxicidad, estrés oxidante y otros procesos biológicos que pueden derivar en el desarrollo de enfermedades degenerativas. En los últimos años, se han desarrollado nuevas formulaciones de plaguicidas que utilizan la nanotecnología como herramienta para mejorar la eficiencia de los mismos, modificando las propiedades y el comportamiento de los materiales debido a la disminución del tamaño, lo que puede derivar en nuevos mecanismos de toxicidad desconocidos con materiales a mayor escala. Dentro de la categoría de nanoplaguicidas se encuentra Ampligo, un insecticida embebido en micro y nanocápsulas en suspensión acuosa. El objetivo del trabajo fue evaluar, mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis, el posible daño genotóxico y citostático causado por el plaguicida Ampligo en su presentación completa, la fracción nanométrica (FN) y micrométrica (FM), en la línea celular de epitelio bronquial humano NL20. Para ello, las fueron expuestas a tres concentraciones de Ampligo (0.1, 0.5 y 1 μM) por cada fracción, se registró la presencia de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares. También, se obtuvieron el índice de división nuclear y el índice de proliferación por bloqueo de citocinesis, cuantificando la presencia de células mono y multinucleadas para evaluar el estado mitótico después de la exposición las diferentes fracciones de Ampligo. El análisis estadístico, se realizó en GraphPad Prism versión 9.4, empleando las pruebas de Shapiro-Wilks, Krukall Wallis, ANOVA y la prueba de Tukey, para el análisis de genotoxicidad y citostasis. Se consideró significativo valores de $p < 0.05$. En general, el plaguicida completo fue el que mayor daño genotóxico generó en todas sus concentraciones, la FM presentó diferencias significativas sólo en la concentración de 1 μM , mientras que con la FN se mostraron diferencias significativas entre todos los tratamientos. Se registraron diferencias significativas en la frecuencia de brotes nucleares y no se registró la presencia de puentes nucleoplásmicos al exponer las células a Ampligo. Por otra parte, las tres presentaciones empleadas de este compuesto provocaron disminución de los valores de los dos índices analizados, mostrando diferencias significativas vs. el testigo negativo en todas las concentraciones. No se observaron diferencias entre concentraciones ni entre fracciones. La toxicidad de los nanomateriales depende de su tamaño, forma y composición química del producto. En este caso, Ampligo, contiene micro y nanocápsulas que son capaces de generar daño genotóxico en las células de epitelio bronquial, sin embargo, el efecto genotóxico es mayor cuando se utiliza el plaguicida completo, ya que contiene múltiples tamaños de cápsulas. Además, Ampligo tiene efectos citostáticos ya que fue capaz de alterar la tasa de división nuclear independientemente del tamaño de las cápsulas.

INTRODUCCIÓN

I. Plaguicidas

Según el Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (mejor conocida como FAO, por sus siglas en inglés) (2010), los plaguicidas son cualquier sustancia o mezcla de ellas destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades, especies de plantas o animales, que causan perjuicio o interfieren en cualquier actividad de interés. Dentro de éstos se incluyen sustancias reguladoras del crecimiento de los insectos o de las plantas; defoliantes; desecantes; agentes para establecer, reducir o prevenir la caída prematura de la fruta y sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Por tanto, la finalidad de los plaguicidas es destruir ciertos organismos vivos, constituyéndose así como un grupo particular de los biocidas que puede alcanzar una capacidad letal amplia (FAO, 2010). Se consideran como una herramienta económica y eficiente para el manejo de plagas (Singh et al., 2018).

Clasificación de Plaguicidas

El término plaguicida engloba una enorme cantidad de compuestos naturales o sintéticos que pueden clasificarse en función de sus características principales como son toxicidad, vida media del ingrediente activo, persistencia en el ambiente, estructura química, modo de acción y el organismo al que van dirigidos (Mahmood et al., 2016).

La toxicidad es la capacidad del plaguicida de producir daño intenso a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente breve. La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL_{50}) o de la concentración letal media (CL_{50}), los cuales dependen de la presentación del producto, la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad y el sexo (Ramírez y Lacasaña, 2001). Entre todas las categorías de pesticidas, los insecticidas se consideran los más tóxicos, mientras que los fungicidas y herbicidas ocupan el segundo y tercer lugar en la lista de toxicidad (Mahmood et al., 2016).

Por otro lado, la vida media se refiere al lapso requerido para que se degrade la mitad del ingrediente activo del plaguicida aplicado. Mientras que, la persistencia especifica la capacidad del plaguicida de permanecer en el ambiente por un periodo de tiempo limitado después de su emisión, reteniendo sus características físicas, químicas y funcionales (Jáquez et al., 2014).

Conforme a su estructura química, los plaguicidas se clasifican principalmente en compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrinas, piretroides, neonicotinoides y compuestos inorgánicos que contienen azufre, cobre o mercurio, entre otros (Ramírez y Lacasaña, 2001; Mahmood et al., 2016).

Por último, por el organismo blanco se dividen principalmente en: herbicidas que actúan sobre las malezas; insecticidas para el control de insectos, incluyendo huevos y larvas; fungicidas y bactericidas que previenen la propagación de microorganismos causantes de enfermedades (Lira et al., 2018).

Importancia de los Plaguicidas

El uso de plaguicidas es una actividad común alrededor del mundo, ya que son empleados tanto en actividades agrícolas como domésticas, por lo que es relativamente fácil encontrarlos en productos alimenticios y en el ambiente (Mahmood et al., 2016). De acuerdo a información de la Organización Mundial de la Salud (2022), en el mundo son utilizados más de mil diferentes plaguicidas actualmente.

Enfermedades como la malaria, fiebre amarilla, peste bubónica, la fiebre tifoidea, entre otras, se han mantenido bajo control debido al uso efectivo de los plaguicidas. Se estima que estos productos han prevenido la muerte de alrededor de 7 millones de personas en todo el mundo, debido al control de las poblaciones de organismos vectores de enfermedades (Mahmood et al., 2016).

Estas sustancias, también juegan un papel importante en mantener la productividad de los cultivos al prevenir su pérdida provocada por la presencia de algún tipo de plaga (Zhao et al., 2017). Según la FAO (2022), el control de plagas ha restaurado el 30 % de la producción total de productos agrícolas, lo que ha provocado un aumento en el uso de plaguicidas. Solo en 2020, 2.7 millones de toneladas de plaguicida fueron utilizadas alrededor del mundo. Así, mejorar el rendimiento de los cultivos evita la expansión de tierras agrícolas (Mahmood et al., 2016).

Por otra parte, los plaguicidas ayudan a proteger los bosques y hábitats de vida silvestre, de plantas e insectos invasores y otras plagas, incluso, el uso doméstico de insecticidas mejora las condiciones sanitarias de los hogares (Mahmood et al., 2016).

Efectos Ambientales del Uso de Plaguicidas

Para disminuir las pérdidas económicas y mejorar la productividad de los cultivos, los agroquímicos se han empleado de forma excesiva e indiscriminada. En consecuencia, los riesgos asociados al uso de los plaguicidas han superado sus efectos benéficos (Mahmood et al., 2016; Lira et al., 2018).

Por ejemplo, los plaguicidas pueden generar efectos adversos en especies a las que no están destinados, afectando la biodiversidad animal y vegetal, las redes alimentarias y los ecosistemas acuáticos y terrestres (Mahmood et al., 2016). Adicionalmente, el uso descontrolado de plaguicidas conduce al deterioro del suelo, la degradación de ecosistemas, la contaminación del ambiente y la generación de resistencia hacia ciertos plaguicidas de insectos y patógenos (Lira et al., 2018). Por otro lado, los plaguicidas liposolubles hacen que se desarrolle un fenómeno conocido como “bioamplificación”, que se refiere al proceso por el que estas sustancias son absorbidas en los tejidos grasos de los animales y resulta en la persistencia del plaguicida en la cadena alimentaria durante largo tiempo. Por tanto, cuanto mayor sea el nivel trófico, mayor será la concentración de plaguicidas (Mahmood et al., 2016).

Efectos en la Salud del Uso de Plaguicidas

A pesar de que los plaguicidas han contribuido a la disminución de ciertas enfermedades, su uso indiscriminado y a largo plazo ha tenido efectos graves para la salud, ya que la exposición a estos productos químicos ha aumentado considerablemente (Mahmood et al., 2016).

La aplicación de plaguicidas a menudo no es específica, por lo que se producen exposiciones involuntarias de organismos no objetivo incluidos los seres humanos. Los organismos jóvenes y en desarrollo son particularmente susceptibles a los efectos nocivos de los plaguicidas, incluso a niveles muy bajos de exposición. Cada año se registran alrededor de tres millones de casos de intoxicación por plaguicidas y doscientos veinte mil muertes, principalmente en los países en desarrollo (Singh, 2017).

Los efectos de los plaguicidas en la salud son muy variables ya que dependen de la exposición y toxicidad del producto. Pueden aparecer en días y son de naturaleza inmediata o pueden tardar meses o años en manifestarse y, por lo tanto, se denominan efectos crónicos o de largo plazo (Mahmood et al., 2016).

La exposición crónica puede causar daños en el hígado, los pulmones y los riñones, efectos neurológicos, como pérdida de coordinación y memoria, capacidad visual y señalización motora, daños en el sistema inmunológico, alteraciones en los niveles de hormonas reproductivas, lo que da como resultado muerte fetal, defectos de nacimiento, aborto espontáneo e infertilidad (Singh, 2017).

De igual manera, pueden inducir genotoxicidad, inmunosupresión, estrés oxidante, inflamación, generar alteraciones en la modulación de receptores hormonales y otras respuestas biológicas adversas, que son características importantes de los carcinógenos (Leon et al., 2019).

De hecho, se ha encontrado una mayor cantidad de residuos de plaguicidas en el torrente sanguíneo de pacientes con cáncer en comparación con individuos sin la enfermedad. Como resultado, los plaguicidas se han asociado con leucemia, cáncer de cerebro, linfoma, cáncer de mama, próstata, ovarios y testículos (Mahmood et al., 2016).

Por lo tanto, existe la urgente necesidad de cambiar la forma en la que se usan los agroquímicos por otros que sean más amigables a la salud y con el ambiente, puesto que se considera que el nivel actual de conocimiento no es suficiente para comprender los efectos del uso de plaguicidas en la salud humana, su persistencia en el medio, el transporte y la bioacumulación (Amjad et al., 2018; Lira et al., 2018).

II. Nanotecnología y Plaguicidas

Se ha reportado que menos del 0.1 % del total del plaguicida convencional aplicado, llega al objetivo biológico, lo que se traduce en una alta ineficiencia (Zhao et al., 2017). Es por eso que, con el fin de mejorar este problema, la nanotecnología ha sido una herramienta auxiliar en el desarrollo de nuevas formulaciones de plaguicidas.

El término “nanotecnología” describe una gama de metodologías realizadas a escala nanométrica con grandes aplicaciones en diversas industrias. La nanotecnología abarca la fabricación, manipulación y aplicación de materiales, sistemas y procesos que operan a una escala que va desde átomos y moléculas hasta materiales de entre 1 a 100 nanómetros (Organization for Economic Cooperation and Development, sf.).

La nanotecnología ha surgido como un avance tecnológico-científico que puede proporcionar herramientas novedosas en el sector agrícola, en particular, siendo auxiliar en la generación de nuevas formulaciones de plaguicida a escala nano (Lira et al., 2018), aunque también se han creado reguladores del crecimiento vegetal y fertilizantes potencialmente más eficientes que los usados actualmente (Lugo-Medina et al., 2010).

En los últimos años, ha aumentado el uso de nanomateriales debido a que existe una diferencia considerable en las propiedades de las entidades de tamaño nanométrico contra aquellas de mayor tamaño y de igual composición química (Lugo-Medina et al., 2010). Son muy prometedores en la formulación de plaguicidas debido a su tamaño pequeño, gran área de superficie y propiedades modificadas, lo que puede aportar mejoras benéficas en las propiedades y el comportamiento de los plaguicidas, como la solubilidad, dispersión, estabilidad, movilidad y administración en los organismos blanco (Zhao et al., 2017).

Entonces, se considera que un nanoplaguicida es cualquier plaguicida que intencionalmente incluye materiales en el rango de tamaño nanométrico y que se afirma que posee propiedades novedosas asociadas con su tamaño (Kah et al., 2013; Anandhi et al., 2020;). Actualmente, se pueden encontrar a la venta plaguicidas que contienen ingredientes activos nanométricos, y muchas de las principales firmas agroquímicas del mundo como Bayer, DuPont, Syngenta y otras empresas, llevan a cabo investigaciones para el desarrollo de nuevas fórmulas de plaguicidas a nanoescala (ETC group, 2004; Zhao et al., 2017).

Dado que no todas las sustancias pueden manipularse para formar un nanomaterial, en ocasiones, las formulaciones de nanoplaguicidas se desarrollan mediante el uso de un ingrediente activo junto con estructuras nanométricas como nanocápsulas, polímeros o nanopartículas derivadas de metales, óxidos metálicos y arcillas, o reciben tratamientos con surfactantes o tensoactivos para formar nanoemulsiones (Kookana et al., 2014; Kah et al., 2013).

Según Wang et al. (2022), los nanoplaguicidas se pueden clasificar en:

- Tipo 1: son aquellos a base de metales, por ejemplo, Ag, Cu y Ti.
- Tipo 2: aquellos que incluyen materiales en los que los ingredientes activos están encapsulados por nanoestructuras, entre los que se encuentran los polímeros, arcillas y nanopartículas.

Una ventaja de las nuevas formulaciones a escala nano es que liberan los ingredientes activos en respuesta a desencadenantes ambientales y demandas biológicas a través de la entrega dirigida o mecanismos de liberación controlada (Zhao et al., 2017). Por

ejemplo, hay nanocápsulas diseñadas para abrirse en respuesta a la luz solar, el calor o condiciones alcalinas en el tubo digestivo de los insectos (Lugo-Medina et al., 2010). Asimismo, el uso de nanoplaguicidas aumentan la eficacia de los ingredientes activos, extendiendo la duración del efecto, reduciendo la dosis requerida y mejorando la estabilidad de las cargas de plaguicidas al ambiente (Zhao et al., 2017).

En particular, el encapsulamiento de los plaguicidas consiste en atrapar el ingrediente activo dentro de una cubierta polimérica hueca y se ha aplicado a la fabricación de plaguicidas comerciales durante años para producir formulaciones de suspensión de cápsulas con tamaños de partículas promedio en la escala de micras (Meredith et al., 2016).

Sin embargo, al confinar el ingrediente activo en cápsulas de polímero de tamaño nanométrico cambia la distribución biológica y la persistencia de la sustancia química, en relación con partículas de tamaño micrométrico de la misma composición, ya que, es conocido que los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción, están influenciados por el tamaño del xenobiótico. De acuerdo con Zhao et al. (2011) las partículas mayores de 500 nm son absorbidas por fagocitosis, mientras que partículas de menor tamaño son absorbidas por pinocitosis. Además, se ha demostrado que las microesferas poliméricas con diámetro entre 2 y 3 μm aumentan la fagocitosis en comparación con partículas más grandes a esta medida o más pequeñas de la misma composición (Champion et al., 2008).

Por lo tanto, es probable que el encapsulamiento de una sustancia en estructuras de escala nano puede dar lugar a alteraciones en la toxicocinética de los nanomateriales en comparación con aquellas de tamaño micrométrico y las no encapsuladas (Meredith et al., 2016).

En la agricultura, la nanotecnología ha realizado el encapsulamiento de ingredientes activos de fertilizantes, herbicidas, fungicidas, insecticidas y nutrientes (Lira et al., 2018).

Nanoplaguicida Ampligo

Un ejemplo de nanoplaguicida de venta libre es Ampligo, el cual es de los insecticidas de aplicación foliar que contiene dos ingredientes activos, λ -cihalotrina y clorantraniliprol, con distinto modo de acción. Ampligo está conformado por microcápsulas en suspensión, dentro de las cuales se encuentran los ingredientes activos (Syngenta México, 2022).

En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) clasifica a Ampligo en la categoría toxicológica 3, donde su riesgo es

moderadamente tóxico y está autorizado para la aplicación en cultivos de pepino, melón, calabacita, calabaza, sandía, jitomate, chile, papa, tomate, aguacate, nogal, lechuga, manzano, peral, maíz, y sorgo.

Respecto a sus ingredientes activos, λ -cihalotrina pertenece al grupo de los plaguicidas piretroides que se utiliza para el control de insectos como áfidos, larvas y adultos de coleópteros y larvas de lepidópteros (He et al., 2008). Actúa a nivel del sistema nervioso de los insectos, alterando el funcionamiento de las neuronas al interactuar con el canal de sodio (Syngenta México, 2022). Específicamente, penetra en la cutícula del insecto, interrumpiendo la conducción nerviosa en cuestión de minutos, lo que posteriormente lleva a la pérdida de control muscular, parálisis y eventual muerte del insecto (He et al., 2008).

Por otro lado, clorantraniliprol es miembro de las bisamidas o diamidas antranílicas, presenta actividad insecticida sobre un amplio rango de plagas de lepidópteros, dípteros, isópteros, hemípteros y coleópteros (Bentley et al., 2010). Interviene en el proceso de contracción muscular de los insectos, actuando como activador de los receptores de rianodina, activando la liberación de calcio en los músculos y causando letargo, parálisis y muerte del insecto (Maero y Anguiano, 2018).

Ambos compuestos se encuentran contenidos en cápsulas con tecnología Zeon, la cual consiste en la producción de microcápsulas de aproximadamente 2.5 micrómetros de diámetro con paredes de polímeros entrelazados, donde el ingrediente activo permanece dentro de las cápsulas durante su uso, lo que ofrece mayor protección a los usuarios. Se considera que la tecnología Zeon tiene la capacidad de mejorar el rendimiento del plaguicida al mantenerlo encapsulado durante un periodo prolongado y le permite adherirse a la superficie de la planta mejor que su contraparte genérica, además de mejorar su cobertura (Perrin, 2000; Syngenta, 2015).

La pared de la cápsula encierra al ingrediente activo disuelto en una pequeña cantidad de aceite aromático, cuya velocidad de liberación puede controlarse variando el tamaño de las partículas, el grosor y la densidad de reticulación de la pared (Wege et al., 1999).

A pesar de las ventajas reportadas por los fabricantes de nanoplaguicidas, hay riesgo de generar algún tipo de daño en organismos no objetivo como los seres humanos, debido a que las nanoestructuras son capaces de atravesar paredes y membranas celulares por su tamaño, el cual es comparable al de muchas estructuras celulares, biomoléculas u organelos, por lo que es de esperarse que ocurran ciertas interacciones entre ellos y los sistemas biológicos (Yanamala et al., 2013).

No obstante, los efectos y mecanismos de toxicidad de los nanoplaguicidas no se han dilucidado por completo, pero se ha comprobado que están relacionados con la dosis, la nanoestructura, composición, tamaño de partícula y su estructura química (Aslani et al.,

2014; Cano y Mendoza, 2017). Es por eso el interés para investigar los mecanismos por los cuales los nanoplaguicidas ocasionan algún efecto adverso.

Además, varios estudios han establecido asociación entre la exposición ocupacional a plaguicidas y la presencia de aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas y/o micronúcleos, los cuales son considerados biomarcadores de daño genotóxico (Gómez-Arroyo et al., 2000; Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2001; Martínez-Valenzuela et al., 2009).

Por esta razón, el biomonitoreo genotoxicológico en poblaciones humanas es de las herramientas recurridas para estimar el daño al material genético ocasionado por exposición a dichas sustancias. Aunque la OMS establece que ningún plaguicida actualmente empleado en el control de plagas en productos alimenticios es genotóxico, sí considera que se pueden generar efectos adversos cuando se rebasa cierto nivel de exposición (OMS, 2022).

III. Daño Genotóxico

El daño genotóxico se origina como consecuencia de la modificación de la estructura del ADN debido a la interacción con agentes xenobióticos (físicos, químicos o biológicos) que pueden dañar al material genético tanto en la interfase como durante la división celular de las células somáticas o de las células germinales, o de ambas, que resultan en alteraciones en las mismas (Ruiz de Arcaute et al., 2021). En los organismos eucariotas, el daño genético en las células somáticas puede desencadenar procesos carcinogénicos, mientras que en las células germinales puede afectar negativamente a la reproducción o provocar mutaciones hereditarias (Phillips y Arlt, 2009).

Los agentes genotóxicos son capaces de generar aductos, rupturas, mutaciones puntuales, fusiones, inserciones, amplificaciones de genes, reordenamientos cromosómicos, cambios cromosómicos numéricos, defectos en la segregación cromosómica, entre otros procesos (Phillips y Arlt, 2009; Mohamed et al., 2017). Aunque el término genotóxico es más amplio, ya que incluye los agentes que inducen no sólo mutaciones sino cualquier otro tipo de daño relacionado con en el ADN celular (Mudry y Carballo, 2006).

Con el fin de visualizar y cuantificar las alteraciones al material genético relacionadas con la exposición a xenobióticos se pueden llevar a cabo diferentes tipos de pruebas o bioensayos, los cuales ayudan a conocer el potencial de causar genotoxicidad (Ruiz de Arcaute et al., 2021). En esta categoría, se incluyen pruebas que miden la capacidad de las sustancias para dañar el ADN o a los componentes celulares que regulan el genoma,

como el huso mitótico, las topoisomerasas, los sistemas de reparación del ADN y las ADN polimerasas, por mencionar algunos (World Health Organization, 2021).

Particularmente, los estudios de poblaciones humanas expuestas a plaguicidas se han centrado esencialmente en evaluar biomarcadores de daño genotóxico como las aberraciones cromosómicas, la frecuencia de micronúcleos y el intercambio de cromátidas hermanas (Bolognesi, 2003).

Durante la división celular, el ADN contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas. Este proceso puede desarrollarse de manera incorrecta debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y por exposición a agentes genotóxicos, lo que puede derivar en pérdida de material genético. Cuando esto ocurre, el material genético no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija y da lugar a la formación de un nuevo núcleo de menor tamaño que el núcleo principal, denominado **micronúcleo**, MN (Zalacain et al., 2005). La detección de MN es ampliamente utilizada debido a que la metodología es sencilla y la cuantificación es relativamente rápida (Kanagaraj et al., 2017).

IV. Biomarcadores de Daño Genotóxico y Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de Citocinesis

Los biomarcadores son características objetivas y cuantificables de los procesos biológicos (Strimbu y Tavel, 2010). A nivel nuclear, la formación de MN, **puentes nucleoplásmicos** (PN) y **brotos nucleares** (BrN) durante la división celular, son considerados biomarcadores de daño genotóxico.

Micronúcleos

Los MN son estructuras extranucleares morfológicamente similares al núcleo celular principal, rodeadas por una doble membrana dentro de la que se encuentra material genético. Aunque muchos MN muestran una morfología similar, tienen contextos genómicos diferentes y, debido a su pequeño tamaño, no tienen suficiente material cromosómico para formar un genoma funcional (Balmus et al., 2015; Willan et al., 2018).

Los MN se originan a partir de fragmentos de cromátidas o cromosomas acéntricos (CrA), así como de cromátidas o cromosomas completos (CrC). Los CrA se originan por una reparación incorrecta de rupturas de doble cadena del ADN o, en menor proporción, por la ausencia de reparación de dicha ruptura cuando la carga de daño al ADN excede la

capacidad de reparación de la célula dentro de un período de tiempo específico. La propensión a la reparación incorrecta aumenta si la vía de reparación de ADN por recombinación homóloga es disfuncional o si existen defectos en las enzimas de la vía de unión de extremos no homólogos. También se ha demostrado que los MN de fragmentos acéntricos pueden originarse cuando se forman, extienden y rompen PN durante la telofase (Fenech et al., 2011).

Por su parte, los MN derivados de CrC se forman cuando éstos no son incluidos en los núcleos de la progenie al término de la telofase mitótica debido a deficiencias en la segregación cromosómica durante la anafase. Lo anterior ocurre debido a fallas en la unión del cinetocoro con los microtúbulos del huso mitótico, por la ausencia o daño de centrómeros, deficiencias en la polimerización o despolimerización de los microtúbulos del huso, hipometilación de citosinas en secuencias centroméricas y paracentroméricas que alargan las regiones repetidas y disminuyen la tensión entre cinetocoro y microtúbulo, defectos genéticos en las proteínas requeridas para la mitosis y para el punto de control del ensamblaje del huso, duplicación anormal del centrosoma y por configuraciones centroméricas que generan tensión insuficiente en la unión del huso al cinetocoro, o bien, configuraciones centroméricas inactivantes del punto de control del ensamblaje del huso (Cimini et al., 2003; Mateuca et al., 2006; Fenech et al., 2011; Balmus et al., 2015).

La alta exposición a sustancias genotóxicas, radiación ionizante, agentes formadores de aductos de ADN, agentes interferentes centroméricos o inhibidores de la polimerización de microtúbulos, así como una gran producción de metabolitos endógenos resultado del estrés metabólico o una deficiencia de micronutrientes, cofactores de enzimas de replicación y reparación, son factores que pueden promover, de forma individual o sinérgica, la ocurrencia de los errores previamente mencionados que llevan a la generación de CrA, CrC y, finalmente, de MN (Willan et al., 2018; Fenech, 2020).

Una vez formados los MN, hacia el final de la telofase se genera una envoltura nuclear alrededor del cromosoma(s), cromátida(s) o fragmento(s) rezagado(s), que en conjunto y de manera gradual, asumen la morfología del núcleo interfásico, pero con tamaño menor al del núcleo principal de la célula (Fenech, 2000); por lo que en una célula se pueden encontrar uno o más MN.

Frecuentemente, los MN se desarrollan en células de pacientes con trastornos hereditarios, como la ataxia-telangiectasia y la anemia de Fanconi. Aunque también se pueden encontrar en células cancerígenas y en células expuestas a agentes genotóxicos, ya que son un reflejo de inestabilidad cromosómica (Balmus et al., 2015; Chmielewska et al., 2018).

Puentes Nucleoplásmicos y Brotes Nucleares

El fallo en la reparación de roturas de doble cadena de ADN, las fusiones de extremos teloméricos o algunos agentes de daño genotóxico (oxidantes endógenos, radiación ionizante e hidrocarburos aromáticos policíclicos) pueden provocar translocaciones robertsonianas o inversiones paracéntricas que llevan a la fusión de dos segmentos cromosómicos, cada uno con un centrómero, originando un cromosoma dicéntrico que se une a dos cuerpos opuestos del huso durante la división celular (Kravtsov et al., 2000; Nussbaum et al., 2015; Fenech et al., 2011; Hartwell et al., 2011).

Esto ocasiona que los dos centrómeros de una misma cromátida sean jalados hacia cada polo durante anafase, doblándose la región intracentromérica sobre sí misma y formándose así, en la telofase, un puente de cromatina entre los dos núcleos denominado PN. Eventualmente, la membrana nuclear envuelve tanto a los dos núcleos, como al PN. La tensión ejercida sobre el PN ocasionará uno de tres posibles eventos:

- i. Ruptura en fragmentos acéntricos y dicéntricos durante la citocinesis que pueden reorganizarse en el siguiente ciclo celular (generando inestabilidad cromosómica).
- ii. Liberación del cromosoma dicéntrico de uno de los dos polos, arrastrándose hacia el polo opuesto y dejando a una de las dos células hijas con un cromosoma entero, el cual faltará en la otra.
- iii. Liberación del anclaje microtubular de ambos polos y permanencia en el ecuador de la célula, quedando excluido de los núcleos principales e incorporado en un MN (Pampalona et al., 2010; Fenech et al., 2011).

Por otra parte, los BrN pueden ser considerados como un tipo de expansión del núcleo debido a la expulsión de ADN no deseado que puede ser producto de amplificaciones de éste, o bien, que contenga ADN que permaneció libre en citoplasma y que fue capturado por la membrana nuclear, así como ADN excesivo que extruye del núcleo durante la división celular. Asimismo, la rotura de un PN también puede dar origen a un BrN (cuando los fragmentos resultantes se encogen hacia los núcleos). La exposición a radiación gamma o deficiencias de ácido fólico son promotores de la formación de BrN (además de todos los factores mencionados en PN, cuando éstos dan origen a los primeros). Morfológicamente, los BrN son bastante similares a un MN, con la excepción de que contiene fragmentos intersticiales o terminales sin regiones centroméricas o teloméricas y de que se ubica más próximo a un núcleo principal debido a que se encuentra conectado a él mediante una parte de material nuclear (Dutra et al., 2010; Fenech et al., 2011).

Observación de Biomarcadores de Daño Genotóxico

La observación de los biomarcadores de daño genotóxico antes descritos requiere de la finalización de la división celular para que puedan ser distinguidas como entidades separadas de los núcleos de las células hijas. Para ello, Fenech y Morley (1985) desarrollaron el ensayo de MN con bloqueo de citocinesis (MNBC), el cual se basa en la adición de citocalasina B (Cyt-B) que inhibe la polimerización de la actina necesaria para la formación del anillo de microfilamentos que constriñe el citoplasma y divide a los dos núcleos de las células hijas durante la citocinesis, teniendo como resultado la acumulación de células en un estado morfológico binucleado (Fenech, 2020).

El ensayo de MNBC de “citoma” de inestabilidad cromosómica (Figura 1), implica que para cada célula observada habrá una evaluación del estado de citotoxicidad (necrosis, apoptosis), el estado mitótico (mononucleado, binucleado o multinucleado) y el daño cromosómico (MN, PN y BrN) (Fenech, 2007).

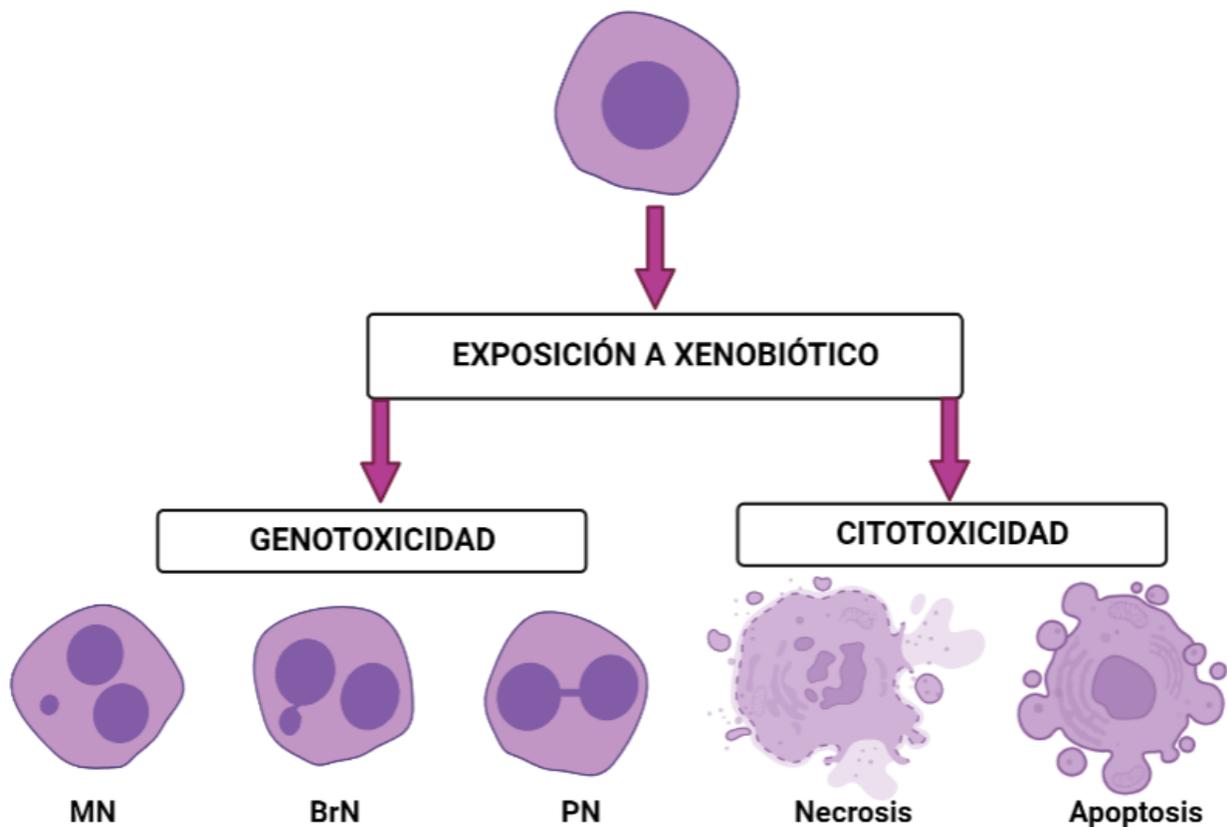


Figura 1. Representación esquemática de los eventos citotóxicos y genotóxicos que pueden ser observados con el ensayo MNBC. Cuando hay daño citotóxico, las células entran en procesos de apoptosis o necrosis, principalmente. Mientras que los agentes genotóxicos provocarán daño homónimo que resultará en la formación de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN) y brotes nucleares (BrN). Más información en Fenech (2007) y Migliore et al. (2014) . Imagen realizada en BioRender.com

Para determinar la citotoxicidad en células expuestas a los xenobióticos, en el ensayo de MNBC se pueden cuantificar células en apoptosis o necrosis. En la primera, las células se caracterizan por la contracción de citoplasma, redondeo celular, pérdida de polaridad, formación de cuerpos apoptóticos, condensación de cromatina contra la envoltura nuclear y fragmentación. En cambio, la necrosis está determinada por aumento del volumen celular, vacuolización de citoplasma, cambios en la morfología nuclear sin condensación de cromatina y ruptura de membrana plasmática (Chaabane et al., 2013).

Para conocer el efecto citostático de ciertas sustancias sobre las células, se pueden calcular el **índice de división nuclear** (IDN), que indica el número de núcleos por célula, y el **índice de proliferación por bloqueo de citocinesis** (IPBC) que indica el promedio de divisiones por célula.

Ambos índices proporcionan una medida del estado proliferativo de las células y los posibles efectos citostáticos de los agentes examinados en el ensayo (Fenech, 2007; Roszak et al., 2016). Para obtener el IDN y el IPBC se realiza el conteo de 500 células en las que se determina la frecuencia de células con uno, dos, tres o cuatro núcleos.

El IDN se calcula de acuerdo con la fórmula propuesta por Eastmond y Tucker (1989):

$$\text{IDN} = (M_1 + 2(M_2) + 3(M_3) + 4(M_4)) / N$$

Mientras que el IPBC se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{IPBC} = (M_1 + 2(M_2) + 3(M_3+M_4)) / N$$

En ambos casos, M_1 , M_2 , M_3 y M_4 representan el número de células que presentan entre uno a cuatro núcleos por célula y N se refiere al número total de células cuantificadas.

El menor valor posible en el IDN es 1, que se obtiene si las células no se han dividido durante el período de bloqueo de citocinesis y, por lo tanto, se encuentran en estado mononucleado. Si las células completaron una división nuclear y, por lo tanto, están en estado binucleado (BN), el valor de IDN debería ser 2. Este valor solo puede ser > 2 si una proporción sustancial de células ha completado más de una división nuclear durante la fase de bloqueo de citocinesis y, por lo tanto, contiene más de dos núcleos (Fenech, 2007). Por lo tanto, valores superiores a 1.8 indican que el ritmo de la división celular es normal, valores < 1.5 indican ritmo bajo de división y, valor de 1 muestra cese en el ritmo de la división celular (Fenech, 2000; Paz- Trejo et al., 2022).

Las ventajas del ensayo de MNBC incluyen:

- Sencillo y rápido de realizar.
- Posee alta confiabilidad y reproducibilidad.
- En líneas celulares, presenta gran poder estadístico debido a que se elimina la variación interindividual al estimarse una gran cantidad de células.
- Evalúa diversos efectos adversos en el material genético: inestabilidad cromosómica, eventos clastogénicos y aneugénicos, proliferación y muerte celular. Sin embargo, debe mencionarse que el ensayo MNBC puede que no llegue a identificar el total de eventos producto de daño genotóxico, como las translocaciones recíprocas simétricas (aunque sí las asimétricas).
- Proporciona una medida del reordenamiento cromosómico en el análisis de PN (Thomas et al., 2003; Mauteca et al., 2006; Fenech, 2007).

Para aumentar la especificidad del ensayo de MNBC, la detección de cinetocoro y de las regiones centroméricas del MN permiten determinar el origen del contenido de MN (CrA o CrC). Lo anterior se realiza a través de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-cinetocoro humano (producido por pacientes con el Síndrome de Crest) y mediante Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés), respectivamente. Cuando una o ambas pruebas resultan negativas, se puede concluir que el MN contiene fragmentos acéntricos (Russo et al., 1992). Otra técnica de evaluación de biomarcadores para PN es el reconocimiento de regiones subtelo méricas en fusiones de telómeros con sondas específicas para la cuantificación de PN producto de fusiones teloméricas, aunque también ayuda a cuantificar los PN resultado de roturas de doble cadena de ADN cuando dicha prueba resulta negativa (Fenech, 2007).

En el Cuadro 1, se enlistan los criterios de selección descritos por Fenech et al. (2003) y Fenech (2007) de células binucleadas (BN) para la evaluación de MN, PN y BrN mediante el ensayo de MNBC, con el fin de obtener un conteo confiable y objetivo del estado celular.

Cuadro 1. Criterios de selección para la evaluación y cuantificación de células binucleadas (BN), micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN) y brotes nucleares (BrN).

BN	MN	PN	BrN
<p>Los núcleos deben tener membranas nucleares intactas y estar dentro del mismo límite citoplasmático.</p>	<p>El diámetro de los MN puede variar entre 1/16 y 1/3 del diámetro de los núcleos principales.</p>	<p>El ancho de un puente nucleoplásmico puede variar, pero por lo general no supera ¼ del diámetro de los núcleos.</p>	<p>Son similares a los MN en apariencia, con la excepción de que están conectados al núcleo a través de un puente que puede ser ligeramente más estrecho que el diámetro del brote.</p>
<p>Los núcleos deben ser de aproximadamente el mismo tamaño, patrón e intensidad de tinción.</p>	<p>Deben tener forma redonda u ovalada.</p>	<p>Debe tener las mismas características de tinción de los núcleos principales.</p>	<p>Generalmente tienen la misma intensidad de tinción que los MN.</p>
<p>Los núcleos pueden estar unidos por un puente nucleoplásmico.</p>	<p>No son refractarios por lo que deben distinguirse fácilmente de estructuras como las partículas colorantes.</p>	<p>Puede haber más de un puente nucleoplásmico dentro de una célula BN.</p>	<p>Ocasionalmente, pueden parecer ubicados dentro de una vacuola adyacente al núcleo.</p>
<p>Los núcleos pueden tocarse, pero lo ideal es que no se superpongan entre sí. Se consideran si los límites nucleares de cada núcleo se distinguen.</p>	<p>No deben estar conectados a los núcleos principales.</p> <p>Pueden tocar a los núcleos principales, pero no superponerse.</p>	<p>Una célula BN con un puente nucleoplásmico puede contener uno o más MN.</p>	<p>Si es difícil determinar si la anomalía nuclear observada es un MN que toca el núcleo o BrN, es aceptable clasificarlo como este último.</p>
<p>La membrana de la célula BN debe estar intacta y claramente distinguible del límite citoplasmático de las células adyacentes.</p>	<p>El límite del MN debe distinguirse del límite nuclear.</p> <p>Deben tener la misma intensidad de tinción que los núcleos principales, aunque la tinción puede ser más intensa.</p>	<p>Los PN se puntúan preferentemente en células BN con núcleos claramente separados porque es difícil observar un PN cuando los núcleos se tocan o se superponen.</p>	

Más información en Fenech et al., 2003 y Fenech, 2007.

V. Línea Celular NL20

La línea celular NL20 (ATCC CRL-2503), cuya morfología se muestra en la Figura 2, es derivada de un bronquio humano sano inmortalizado y por tanto no es tumorigénica (Schiller et al., 1994). Las células fueron inmortalizadas mediante la transfección de un plásmido del antígeno T grande del virus SV40 el cual tiene como función inactivar a las proteínas de los genes p53 y retinoblastoma (Yeager, 1999), con la finalidad de mantener al máximo las propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas en cultivos posteriores (Ortiz, 2019). De acuerdo con su distribuidor, las células conservan sus características y funciones hasta el pase 250 (ATCC, sf.).

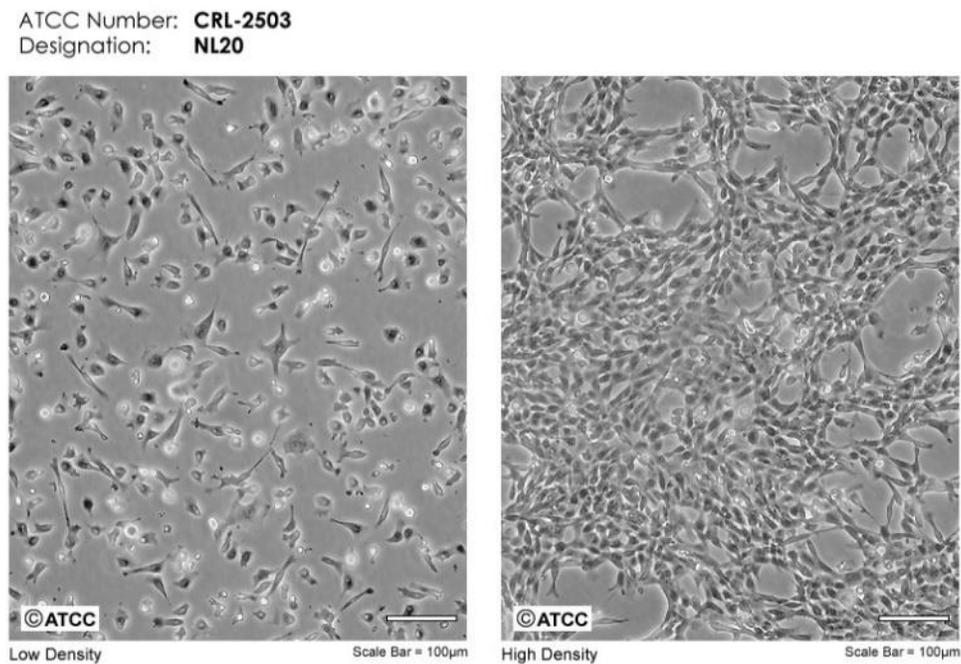


Figura 2. Cultivo de células NL-20. A la izquierda se observa el cultivo de células con baja densidad y a la derecha se observa el cultivo de células con alta densidad (ATCC, sf.).

ANTECEDENTES

Se ha reportado que λ -cihalotrina presenta actividad genotóxica y en particular clastogénica. En células de médula ósea de ratas Wistar expuestas a este químico incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales y de MN (Celik et al., 2003), mientras que *in vitro* la exposición de linfocitos humanos a λ -cihalotrina induce aberraciones cromosómicas y rompimientos en la cadena de ADN (Naravaneni y Jamil, 2005).

De la misma manera, Saleem et al. (2014) con el ensayo de Ames hallaron que λ -cihalotrina presenta actividad mutagénica dependiente de la dosis. Por último, se ha observado que este insecticida disminuye la concentración de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y provoca daño genotóxico en células de la glándula tiroides (Al-Amoudi, 2018).

El insecticida λ -cihalotrina está clasificado por la OMS en la categoría II, como moderadamente tóxico (WHO, 2020). Sin embargo, debido a su riesgo para los organismos acuáticos y artrópodos que no son su objetivo, ha sido prohibido en el mercado europeo desde 2021 (Ganilho et al., 2022).

Por otro lado, Bentley et al. (2010) realizaron varias pruebas *in vitro* e *in vivo* para determinar el potencial genotóxico de clorantraniliprol a diferentes concentraciones. Las pruebas incluyeron ensayos de mutación de genes bacterianos (ensayo de Ames en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*) y de mamíferos (células de ovario de criceto chino), ensayos de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos y de MN en células de ratón, obteniendo resultados negativos en todos los estudios, lo que indica que el clorantraniliprol no causa daño genotóxico. Clorantraniliprol está clasificado por la OMS en la categoría U, improbable que presente toxicidad aguda con uso normal (WHO, 2020).

En el caso de los nanomateriales, al poseer la capacidad de atravesar las membranas biológicas e ingresar a las células, logran interactuar con algunos componentes celulares. Específicamente, pueden penetrar en el núcleo por difusión a través de la envoltura nuclear (si es que su tamaño lo permite), a través de los poros nucleares o ingresar durante la división celular en el momento en que la membrana nuclear se disuelve y luego se regenera en cada célula hija. Al llegar al núcleo, los nanomateriales pueden interactuar de manera directa con el ADN o sus proteínas asociadas y causar daño estructural (Singh et al., 2009). Chen y Vonmikecz (2005), hallaron que las nanopartículas de sílice (SiO₂) son capaces de ingresar en el citoplasma de las células epiteliales. No obstante, solo las nanopartículas de entre 40 y 70 nm de diámetro son capaces de ingresar al núcleo

celular. Ahí, las nanopartículas inducen la formación de agregados de proteínas intranucleares, lo que inhibe la replicación, la transcripción y la proliferación celular.

Por otro lado, el daño al ADN causado por los nanomateriales puede surgir a través de mecanismos indirectos, lo que quiere decir que los nanomateriales no interactúan físicamente con la molécula de ADN, sino con proteínas que inducen respuestas celulares que conducen a la genotoxicidad, entre las que se encuentran el estrés oxidante, inflamación y disfunciones en la señalización celular (Singh et al., 2009). Dentro de los diferentes tipos de nanoestructuras que se han desarrollado, las nanopartículas como el fullereno C₆₀ (molécula conformada por 60 átomos de carbono acomodados de manera esférica (Kharissova y Méndez, 2002)), son capaces de unirse al sitio activo de las enzimas e inhibir su actividad, como en el caso de la enzima glutatión S-transferasa, cuya función está relacionada con el metabolismo de xenobióticos y en la protección del organismo contra los radicales libres, lo cual podría aumentar el estrés oxidante dentro de las células y generar efectos citotóxicos (Yanamala et al., 2013).

De igual manera, las nanopartículas pueden interferir con las funciones de otros componentes celulares como los microtúbulos y centrómeros, lo que resulta en disfunciones del huso mitótico, fragmentación de los cromosomas, formación de células sin núcleo o multinucleadas y generación de mutaciones. También pueden afectar las funciones de otros organelos, ya que su organización y localización en la célula está influenciada por el citoesqueleto, además de tener un papel fundamental en la división celular (Sargent et al., 2009; Yanamala et al., 2013).

Meredith et al. (2016) compararon la toxicidad inducida por λ -cihalotrina en suspensión concentrada, conformada por micro y nanocápsulas, contra los efectos del ingrediente activo sin encapsular, evaluando los efectos neurotóxicos en el pez cebra (*Danio rerio*), considerando la presencia de temblores, alteraciones en el desarrollo embrionario y mortalidad. Ambas presentaciones de λ -cihalotrina provocaron alteraciones en el desarrollo embrionario y mortalidad en los peces, sin presentar diferencias por el tamaño de cápsula. Sin embargo, el ingrediente activo no encapsulado provocó una cantidad significativamente menor de peces que experimentaron temblores, los cuales tuvieron menor duración, en comparación con las fracciones del producto encapsulado. Esto último sugirió, que el tamaño de la cápsula no influía en la respuesta tóxica de la λ -cihalotrina, pero sí la presencia o ausencia de las cápsulas.

Por su parte, Paz-Trejo et al. (2022) realizaron la caracterización química y física de Ampligo, describiendo que el plaguicida está conformado por cápsulas dentro de las cuales se encuentran los dos ingredientes activos, cuya presencia también fue confirmada. Asimismo, empleando microscopía electrónica de transmisión, observaron que las cápsulas presentaban morfología esférica y determinaron que la cubierta de la

cápsula está constituida por el polímero poliurea-formaldehído. Además, mediante centrifugación se logró determinar que Ampligo puede descomponerse en dos fracciones de cápsulas con escala de tamaño diferente: fracción con cápsulas de diámetro en escala micrométrica (fracción micrométrica, FM) y cápsulas de diámetro en la escala nanométrica (fracción nanométrica, FN), presentando un diámetro promedio de las cápsulas de $2.2 \pm 0.123 \mu\text{m}$ y $384 \pm 96 \text{ nm}$, respectivamente.

En este trabajo también evaluaron la capacidad genotóxica de Ampligo con el ensayo cometa y el MNBC, ambos en linfocitos de sangre periférica. Con dicho ensayo encontraron que la presentación completa del plaguicida generó mayor daño genético observado en los parámetros del momento de la cola y del porcentaje de ADN en la cola de los cometas en todas las concentraciones empleadas, en comparación con las dos fracciones de cápsulas contenidas en el plaguicida. Y, en el caso del CBMN, las cápsulas de la FN generó mayor daño genotóxico que las de la FM y que el plaguicida completo.

JUSTIFICACIÓN

El uso de plaguicidas es una práctica común y necesaria para el mantenimiento de los cultivos en el mundo. A pesar de que desde hace varios años se ha señalado que el uso indiscriminado de estas sustancias provoca efectos adversos en el ambiente, en la diversidad de los organismos no objetivo y en la salud humana. Es por eso que las empresas agroquímicas se han dado a la tarea de desarrollar nuevas formulaciones que mejoren la eficacia de los plaguicidas para disminuir su diseminación en el ambiente. Dentro de las estrategias propuestas, los nanoplaguicidas son una herramienta innovadora que promete cumplir con el manejo de las plagas sin las consecuencias ya conocidas de las viejas formulaciones de plaguicidas. Sin embargo, al disminuir el tamaño de los materiales o estructuras a escala nano, éstos adquieren características y comportamientos diferentes a los ya conocidos que, si bien han sido estudiados, no se conoce por completo el tipo de interacciones que tienen en los seres vivos y no se puede suponer que tendrán los mismos efectos que los plaguicidas convencionales.

Lo anterior es preocupante porque existen personas, especialmente los trabajadores agrícolas, que están expuestos a sustancias que contienen entidades que, debido a su tamaño, tienen el potencial de ingresar a las células e interactuar con estructuras o moléculas como el ADN y provocar algún tipo de daño o estrés, que pueden derivar en el desarrollo de enfermedades degenerativas. Hasta el momento, México no cuenta con mecanismos regulatorios sobre los efectos perjudiciales provocados por los nanomateriales hacia la salud de la población y el ambiente (Saldívar, 2022).

El plaguicida Ampligo se comercializa en forma de microcápsulas en suspensión acuosa dentro de las que se encuentran sus dos ingredientes activos. Sin embargo, Paz-Trejo et al. (2022) demostraron que dentro de sus componentes también se pueden encontrar cápsulas de tamaño nanométrico con tendencia a inducir daño genotóxico en linfocitos humanos. De acuerdo a lo anterior, este trabajo pretende evaluar los efectos celulares de Ampligo en otro tipo celular, como es el caso de las células de epitelio bronquial, ya que la inhalación es la vía principal de exposición a los plaguicidas.

Al evaluar el daño genotóxico de Ampligo con el ensayo MNBC, se podrían conocer los posibles efectos del uso de nanoplaguicidas en los organismos y aportar evidencia para la regulación de los nanomateriales ya que en un tópico que debe ser tratado de manera prioritaria. Con el fin de impedir que más personas estén expuestas de manera indiscriminada y desinformada a este tipo de sustancias.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el daño genotóxico y citostático causado por el plaguicida encapsulado Ampligo en su presentación completa, así como en su fracción nanométrica y micrométrica, en la línea celular de epitelio bronquial NL20, mediante el ensayo de MN con bloqueo de citocinesis.

Objetivos particulares

- Obtener las partículas nanométricas y micrométricas presentes en el plaguicida Ampligo.
- Observar y cuantificar la presencia de biomarcadores de genotoxicidad como MN, PN y BN en células NL20 expuestas a las micro y nanocápsulas de Ampligo.
- Evaluar los posibles efectos citostáticos provocados por la exposición a partículas nano y micrométricas de Ampligo mediante los índices de división y proliferación, IDN e IPBC en células NL20.
- Determinar la relación del tamaño de partícula con el daño genotóxico.

HIPÓTESIS

Debido a su tamaño y a su capacidad para ingresar a la célula, las nanocápsulas del plaguicida Ampligo serán capaces de provocar daño genotóxico y citotóxico mayor que las partículas micrométricas o el plaguicida completo, dicho efecto se evidenciará con la formación de MN, PN, BrN y con cambios la proliferación celular.

MATERIALES Y MÉTODO

Cultivo Celular

Para realizar los experimentos se utilizó la línea celular NL20 (ATCC CRL-2503), una línea inmortalizada, no tumorigénica derivada de epitelio bronquial humano.

El cultivo celular se realizó en medio HAM F-12 (In Vitro, S.A., México) complementado con suero fetal bovino (Biowest, EUA) al 5 %, L-glutamina (In Vitro, S.A., México) a 2 mM, aminoácidos no esenciales (In Vitro, S.A., México) a 0.1 mM, penicilina-estreptomicina (In Vitro, S.A., México) al 0.001 mg/mL, insulina (In Vitro, S.A., México) a 0.005 mg/mL, hidrocortisona (Sigma, EUA) a 500 ng/mL y factor de crecimiento epidérmico (GoldBio, EUA) a 10 ng/mL.

El vial de células se mantuvo en congelación hasta el momento de uso. Antes de sembrarse, las células se descongelaron e incubaron en frascos de cultivo de 25 cm² con 5 mL del medio de cultivo suplementado, a 37 °C y 5 % de CO₂, hasta obtener una confluencia mínima del 70–80 % (Figura 3).

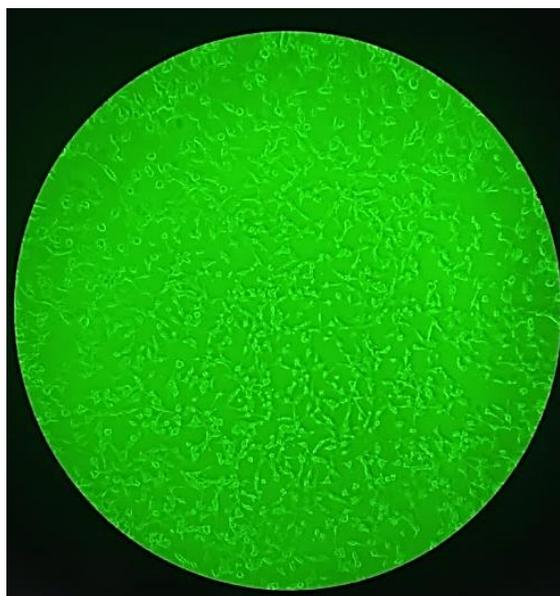


Figura 3. Imagen representativa de células NL20 cultivadas en el laboratorio con una confluencia aproximada del 70 %.

Al alcanzar la confluencia deseada, las células se despegaron del frasco de cultivo agregando 5 mL de una dilución de tripsina-verseno (In Vitro, S.A., México) con solución salina 1:9. Posteriormente, se centrifugaron a 1,600 rpm por 8 minutos, se eliminó el

sobrenadante y el botón de células fue resuspendido en 1 mL de medio suplementado para realizar el conteo celular.

En este paso, se preparó una mezcla con 10 μL de colorante azul tripano, 40 μL de medio de cultivo suplementado y 10 μL de la suspensión de células. Con ayuda de la cámara de Neubauer, se contabilizó el número de células presentes en 10 μL de la mezcla previamente preparada y se determinó el número de μL de la suspensión celular necesarios para sembrar 60,000 células, las cuales fueron expuestas a los diferentes tratamientos experimentales.

Obtención de los Diferentes Tamaños de Partículas del Plaguicida

Las células fueron expuestas al plaguicida Ampligo, cuya formulación está compuesta por λ -cihalotrina al 5 % y clorantraniliprol al 10 %, en suspensión concentrada. Registro: RSCI-INAC-0177-312-085-005.

Con el propósito de separar los diferentes tamaños de partícula de Ampligo®, se utilizó la metodología empleada por Paz-Trejo et al. (2022). Por lo cual, se realizó una dilución del plaguicida con agua Milli-Q filtrada hasta obtener una concentración de 1 g de ingrediente activo/L. En el caso de Ampligo que presenta dos ingredientes activos, las concentraciones se determinaron a partir de la concentración reportada de λ -cihalotrina. Al obtener la concentración de 1 g de λ -cihalotrina/L, la disolución fue centrifugada a 3,050 rpm por 10 min. El sobrenadante representó la fracción nanométrica y el botón resuspendido en agua Milli-Q filtrada constituyó la fracción micrométrica de cápsulas. En cuanto al plaguicida completo, se utilizó la dilución de 1 g de λ -cihalotrina/ L sin centrifugar.

Establecimiento de Concentraciones

Se realizó una curva de concentración-respuesta con el fin de determinar la viabilidad de las células NL20 expuestas al plaguicida completo, la FM y la FN de Ampligo, para establecer las concentraciones para los posteriores experimentos. En una placa de 96 pozos, se sembraron 16,000 células NL20 en cada pozo, las cuales fueron expuestas a 1, 5, 10, 15 y 20 μM de λ -cihalotrina; cada experimento se hizo por triplicado. Después se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular con la tinción de cristal violeta. El porcentaje se estableció a partir de las mediciones de absorbancia de cada pozo determinadas por el lector de placas (H READER 1, HLab) a una longitud de onda de 595 nm.

Diseño Experimental

La exposición al plaguicida se realizó en placas de cultivo de 6 pozos donde, a partir de la curva de concentración-respuesta, se determinó el uso de 1, 0.5 y 0.1 μM como concentraciones para las dos fracciones de cápsulas y para el plaguicida completo. En cada pozo se colocó un cubreobjetos previamente tratado con poli-L-lisina, en el que se sembraron 60,000 células. Cada placa contenía un testigo negativo, un testigo positivo y las tres concentraciones a probar para las dos fracciones de cápsulas y para el plaguicida completo. Como testigo negativo se utilizaron las células NL20 en el medio de cultivo HAM F-12 (In Vitro, S.A., México) suplementado sin presencia de plaguicida. Como testigo positivo, se utilizaron células NL20 expuestas a bleomicina (Teva, México) a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se realizaron en total 6 repeticiones de cada placa por tratamiento.

Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de Citocinesis (MNBC)

En la Figura 4 se muestra la secuencia de pasos desarrollada para el MNBC. Las 60,000 células se dejaron crecer en los cubreobjetos dentro de las placas por 24 h. Pasado ese tiempo, se expusieron a 1, 0.5 y 0.1 μM de Ampligo en presentación completa, la FM y FN. A las 24 h de exposición, se retiró el plaguicida cambiando el medio de cultivo y se agregó Cyt-B (Cayman Chemical, EUA) a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las células se dejaron crecer por 24 h más.

Al término de esas últimas 24 h, las células se fijaron con metanol absoluto para posteriormente llevar a cabo la tinción. De las seis repeticiones realizadas, tres de ellas fueron teñidas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) mediante el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, EU) y las tres restantes se tiñeron con el colorante Giemsa (Merck, EU).

En los cubreobjetos teñidos con DAPI se realizó el conteo de 1,000 células BN que permitieron evaluar la presencia de MN, BrN y PN. Las observaciones se realizaron en el microscopio de fluorescencia (Zeiss) con un filtro de 352–477 nm a 400 aumentos

En los cubreobjetos teñidos con colorante Giemsa se observaron 500 células para evaluar el estado mono y multinucleado de las células con el fin de obtener el IDN y el IPBC. Las observaciones se realizaron en el microscopio óptico de campo claro (Zeiss) a 400 aumentos.

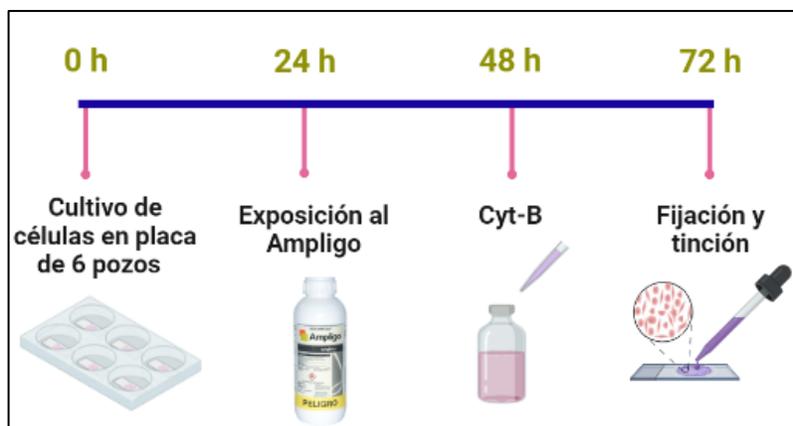


Figura 4. Secuencia de pasos realizados durante el desarrollo del MNBC. La exposición celular se realizó 24 h después del cultivo de células en las placas de 6 pozos. A las 48 h se añadió Cyt-B para inhibir la citocinesis. Finalmente, a las 72 h de cultivo se realizó la fijación y tinción de las células para su posterior observación y conteo. Imagen realizada en BioRender.com

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico, se obtuvo la Media \pm Error Estándar de MN, BrN y PN, así como para el IDN e IPBC. Primero, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk en los dos conjuntos de datos. Los datos de genotoxicidad no presentaron distribución normal, por lo que se llevó a cabo la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis para determinar las diferencias entre las concentraciones y contra el testigo negativo dentro de cada presentación del plaguicida, $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Los índices presentaron distribución normal, por lo que se realizó la prueba ANOVA para determinar las diferencias entre concentraciones vs. el testigo negativo. Todos los análisis se realizaron en el software GraphPad Prism versión 9.4.

RESULTADOS

Ensayo de Viabilidad Celular con Cristal Violeta

En la Figura 5, se muestra la curva de concentración-respuesta, en la cual se evaluó la viabilidad celular con la tinción de cristal violeta. En la gráfica se puede observar que el porcentaje de viabilidad de las células expuestas al plaguicida completo tiende a disminuir conforme aumenta la concentración. Sin embargo, para las fracciones del plaguicida, se observa que a la concentración de 5 μM la viabilidad celular incrementa y posteriormente disminuye conforme aumenta la concentración de los tratamientos. También se muestra que en las concentraciones de 10 μM y 20 μM de la fracción micro, la viabilidad es menor al 50 %. Lo mismo se observa en la concentración de 20 μM del plaguicida completo.

Para los posteriores experimentos, se consideraron las concentraciones en las que el plaguicida completo y las fracciones generaron un porcentaje de viabilidad celular mayor al 50 %, es decir, 1 y 5 μM . Sin embargo, en la concentración de 5 μM no se encontró presencia significativa de daño genotóxico (datos no mostrados), por lo que las concentraciones finales a utilizar para cada tratamiento fueron $\leq 1 \mu\text{M}$; 0.1, 0.5 y 1 μM .

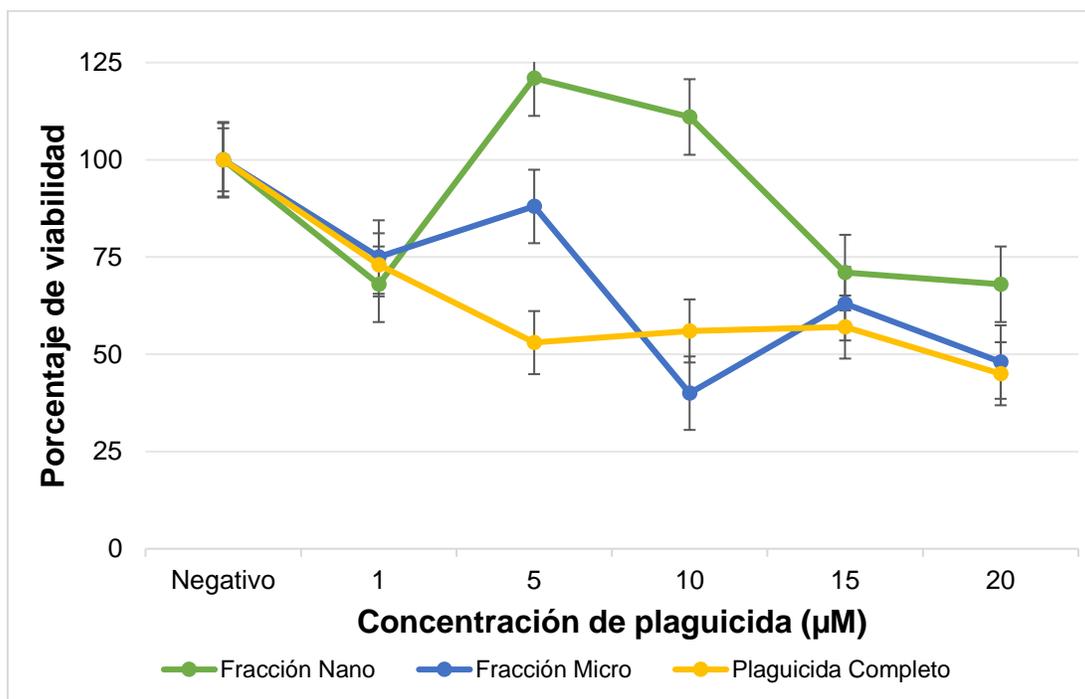


Figura 5. Curva de concentración-respuesta que muestra el porcentaje de viabilidad de las células NL20 expuestas a 1, 5, 10, 15 y 20 μM de Ampligo en su presentación completa (línea amarilla), de la fracción de cápsulas micrométricas (línea azul) y nanométricas (línea verde).

Evaluación del Daño Genotóxico

La Figura 6 muestra imágenes representativas de células NL20 expuestas a Ampligo teñidas con DAPI. En A, B y C, se observan células BN, en D, E y F se señala con las flechas rojas la presencia de células BN con un MN y, en G,H, I se observan células BN con BrN. A pesar de que también se intentó cuantificar la presencia de PN, no se logró la observación de este biomarcador en ninguna de las concentraciones de las tres presentaciones del nanoplaguicida.

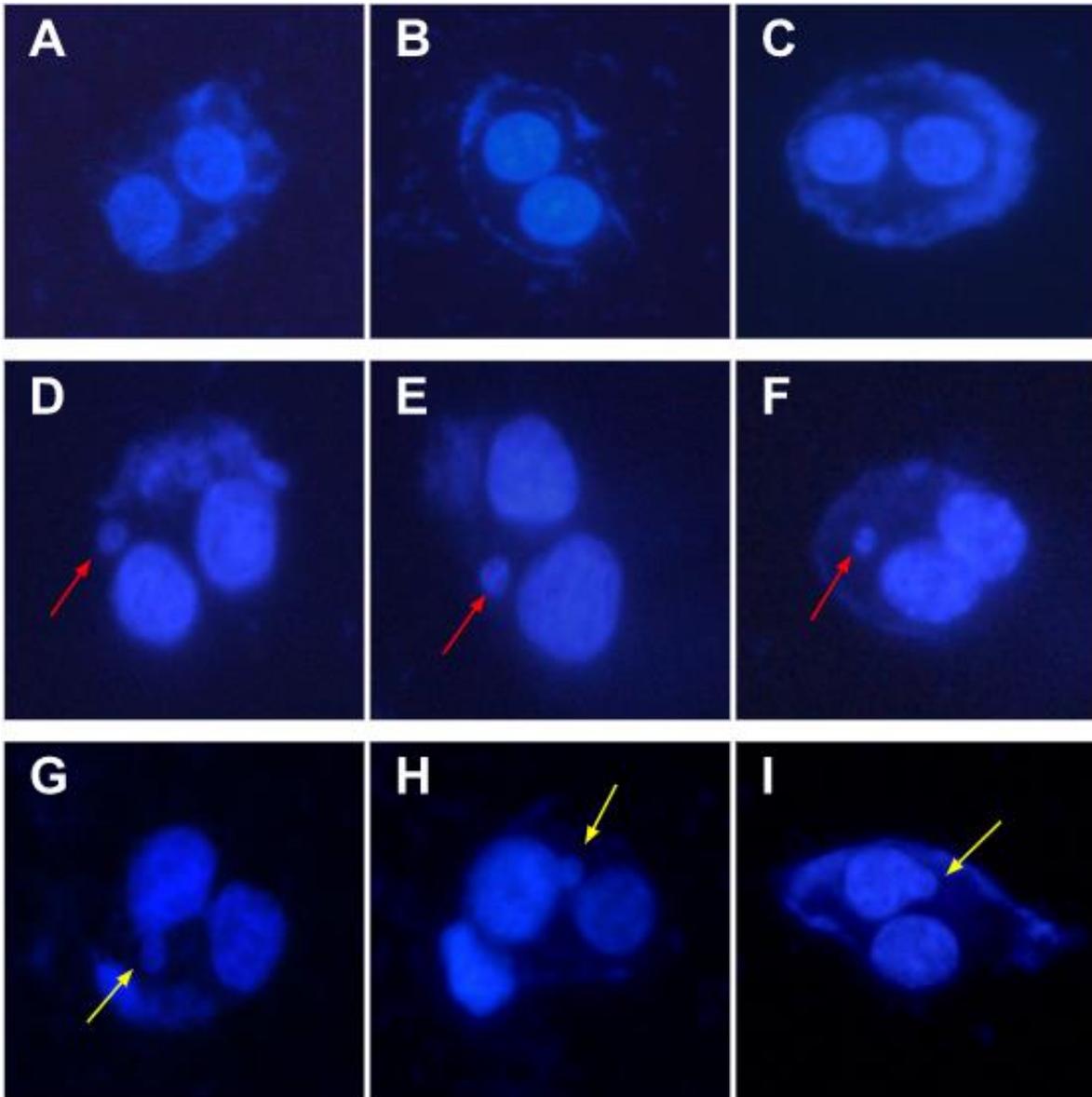


Figura 6. Células NL20 expuestas a Ampligo y evaluadas con el ensayo de MNBC donde se observan: células BN (A, B, C); células BN con un MN, señalados con la flecha roja (D, E, F) y células BN con un BrN, señalado con la flecha amarilla (G, H, I). Las células fueron teñidas con DAPI y las observaciones se realizaron en el microscopio de fluorescencia a 400 aumentos (352–477 nm).

En el Cuadro 2, se muestran las frecuencias de MN, BrN y PN observados en las células expuestas a la presentación completa de Ampligo. Se puede notar que la concentración de 1 μM fue la que provocó mayor cantidad de MN, seguida de la concentración 0.5 μM y 0.1, es decir, conforme aumenta la concentración de Ampligo, incrementa el número de MN. Sin embargo, solo las concentraciones de 1 μM y 0.1 μM evidenciaron diferencias significativas vs. el testigo negativo ($p < 0.05$). En el caso de los BrN, se observó que la concentración 0.1 μM provocó la mayor cantidad de los mismos, además hubo diferencias significativas contra el testigo negativo ($p < 0.05$), sin embargo, la cantidad obtenida de BrN fue muy baja. No se observaron PN en ninguna de las concentraciones de la presentación del plaguicida completo.

Cuadro 2. Frecuencia de micronúcleos (MN), brotes nucleares (BrN) y puentes nucleoplásmicos (PN) inducidos por la exposición a tres concentraciones de la presentación completa de Ampligo en células NL20.

Ampligo		Células BN con MN	Células BN con BrN	Células BN con PN
λ -cihalotrina	Clorantraniliprol	Media \pm E.E.	Media \pm E.E.	Media \pm E.E.
Testigo Negativo		11.33 \pm 0.01	0	0
Testigo Positivo		73.33 \pm 0.13	17.33 \pm 0.25	0.67 \pm 0.01
1 μM	2 μM	31.00 \pm 0.24 ^a	1.67 \pm 0.04	0
0.5 μM	1 μM	28.00 \pm 0.27	1.00 \pm 0.03	0
0.1 μM	0.2 μM	19.00 \pm 0.14 ^{a, b}	2.00 \pm 0.03 ^a	0

^a Indica diferencia significativa vs. el testigo negativo.

^b Indica diferencia significativa vs. 1 μM .

Se consideró $p < 0.05$ como valor estadísticamente significativo.

En el Cuadro 3, se muestran las frecuencias MN, BrN y PN observados en las células expuestas a la fracción de cápsulas micrométricas de Ampligo. En este caso, la media de MN fue mayor en la concentración de 0.1 μM , seguido de 0.5 μM y 1 μM , es decir, la cantidad de MN disminuyó conforme aumentó la concentración de la FM. Solo en 1 μM se evidenciaron diferencias significativas contra el testigo negativo ($p < 0.05$). Como en el caso de las células expuestas a la presentación completa, los BrN solo mostraron diferencias significativas en la concentración de 0.1 μM ($p < 0.05$), aunque con un número pequeño de éstos en la muestra. De la misma forma, no se registraron PN en ninguna de las concentraciones empleadas.

Cuadro 3. Frecuencia de micronúcleos (MN), brotes nucleares (BrN) y puentes nucleoplásmicos (PN) inducidos por la exposición a tres concentraciones de fracción de cápsulas de tamaño micrométrico (FM) de Ampligo en células NL20.

Ampligo		Células BN con MN	Células BN con BrN	Células BN con PN
λ -cihalotrina	Clorantraniliprol	Media \pm E.E.	Media \pm E.E.	Media \pm E.E.
Testigo Negativo		8.33 \pm 0.131	0.33 \pm 0.018	0
Testigo Positivo		54.33 \pm 0.079	18.00 \pm 0.192	0
1 μ M	2 μ M	16.00 \pm 0.031 ^a	0.33 \pm 0.018	0
0.5 μ M	1 μ M	20.67 \pm 0.329	1.33 \pm 0.036	0
0.1 μ M	0.2 μ M	21.33 \pm 0.286	2.00 \pm 0.000 ^a	0

Los datos se muestran como media \pm error estándar.

^a Indica diferencia significativa vs. el testigo negativo.

Se consideró $p < 0.05$ como valor estadísticamente significativo.

En el Cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos de la exposición de las células NL20 a la fracción de cápsulas de Ampligo de tamaño nanométrico. La cantidad de células BN con MN fue mayor en la concentración de 1 μ M y fue disminuyendo a la par de la concentración. En este caso, todas las concentraciones utilizadas provocaron diferencias significativas en la presencia de MN y , además, también se mostraron diferencias entre concentraciones ($p < 0.05$). El número general de BrN aumentó en comparación con las otras dos presentaciones del plaguicida, existiendo diferencias significativas en 1 y 0.5 μ M vs. el testigo negativo pero sin ser lo suficientemente alto su valor ($p < 0.05$). De nueva cuenta, no hubo presencia de PN en ninguna concentración.

Cuadro 4. Frecuencia de micronúcleos (MN), brotes nucleares (BrN) y puentes nucleoplásmicos (PN) inducidos por la exposición a tres concentraciones de la fracción de cápsulas de tamaño nanométrico (FN) de Ampligo en células NL20.

Ampligo		Células BN con MN	Células BN con NBUD	Células BN con PN
λ -cihalotrina	Clorantraniliprol	Media \pm E.E.	Media \pm E.E.	Media \pm E.E.
Testigo Negativo		7.67 \pm 0.048	0.33 \pm 0.018	0
Testigo Positivo		45.50 \pm 0.111	12.00 \pm 0.178	0
1 μ M	2 μ M	19.67 \pm 0.048 ^a	2.67 \pm 0.048 ^a	0
0.5 μ M	1 μ M	15.00 \pm 0.031 ^{a, b}	1.67 \pm 0.018 ^a	0
0.1 μ M	0.2 μ M	14.00 \pm 0.031 ^{a, b, c}	1.33 \pm 0.048	0

^a Indica diferencia significativa vs. el testigo negativo.

^b indica diferencia significativa vs. 1 μ M.

^c indica diferencias significativas vs. 0.5 μ M.

Se consideró $p < 0.05$ como valor estadísticamente significativo.

De acuerdo a los resultados presentados, es posible mencionar que en general la presentación completa de Ampligo fue la que generó mayor cantidad de MN en todas sus concentraciones, resultando ser la más genotóxica. La FN provocó valores altos de MN en comparación con el testigo negativo, aunque con menor cantidad de MN en comparación con el plaguicida completo.

Evaluación del daño citostático.

En la Figura 7 se muestran imágenes representativas de el análisis citostático que se realizó en las células NL20 expuestas a las tres presentaciones de Ampligo a diversas concentraciones. Para el analisis citostático, se realizó el conteo del número de células con uno, dos, tres y cuatro núcleos principales, es decir, células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas, respectivamente.

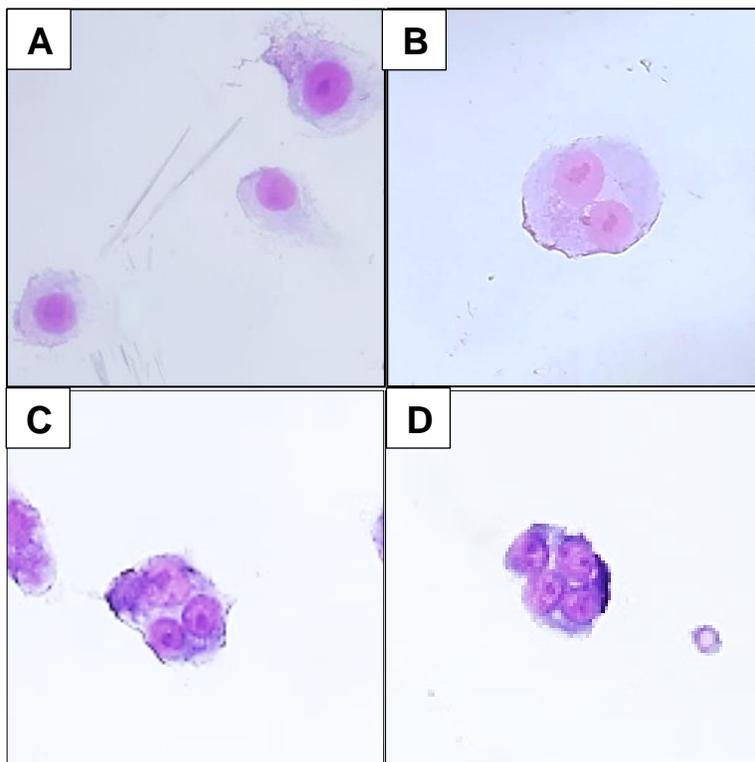


Figura 7. Células NL20 tenidas con colorante Giemsa. En A se observan células mononucleadas, en B se aprecia una célula binucleada, en C se puede ver una célula trinucleada y D muestra una célula tetranucleada. Las observaciones se realizaron en el microscopio óptico a 400 aumentos.

En el Cuadro 5, se muestran los valores obtenidos para el IDN y el IPBC para cada presentación del plaguicida, en sus respectivas concentraciones (media \pm error estándar). En general, se puede observar que al exponer las células a Ampligo completo y a la FN, el valor de ambos índices tiende a aumentar conforme disminuye la concentración, sin embargo, esta tendencia no se observa en la FM.

Todas las concentraciones empleadas para cada fracción y presentación completa de Ampligo, tuvieron valores menores que el testigo negativo, lo cual fue confirmado con el análisis estadístico en donde se observaron diferencias significativas entre las concentraciones vs. el testigo negativo ($p < 0.05$). Asimismo, se notó que el valor de los índices es similar entre fracciones, las cuales no mostraron ser diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

Cuadro5. Índice de división nuclear (IDN) e índice de proliferación por bloqueo de citocinesis (IPCB) de células NL20 expuestas a tres concentraciones de la presentación completa, la fracción de cápsulas micrométricas (FM) y nanométricas (FN) de Ampligo.

Ampligo		IDN			IPBC		
		Completo	FM	FN	Completo	FM	FN
λ - cihalotrina	clorantraniliprol	Media \pm EE					
	Testigo negativo	1.848 \pm 0.002	1.815 \pm 0.000	1.844 \pm 0.002	1.834 \pm 0.002	1.806 \pm 0.000	1.830 \pm 0.001
	Testigo positivo	1.638 \pm 0.000	1.569 \pm 0.001	1.601 \pm 0.001	1.627 \pm 0.000	1.567 \pm 0.001	1.597 \pm 0.000
1 μ M	2 μ M	1.514 \pm 0.001 ^a	1.610 \pm 0.000 ^a	1.598 \pm 0.005 ^a	1.514 \pm 0.001 ^a	1.605 \pm 0.000 ^a	1.596 \pm 0.005 ^a
0.5 μ M	1 μ M	1.596 \pm 0.002 ^a	1.594 \pm 0.000 ^a	1.631 \pm 0.006 ^a	1.592 \pm 0.002 ^a	1.592 \pm 0.008 ^a	1.627 \pm 0.006 ^a
0.1 μ M	0.2 μ M	1.573 \pm 0.002 ^a	1.601 \pm 0.000 ^a	1.673 \pm 0.002 ^a	1.570 \pm 0.002 ^a	1.598 \pm 0.000 ^a	1.670 \pm 0.002 ^a

^a Indica diferencia significativa vs. el testigo negativo.

Se consideró $p < 0.05$ como valor estadísticamente significativo.

DISCUSIÓN

La nanotecnología es una herramienta que le ha permitido a los plaguicidas convencionales la adquisición de nuevas propiedades para mejorar sus efectos en contra de las plagas y el ambiente. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que muchos de los nanomateriales empleados en la formulación de los nanoplaguicidas poseen la capacidad de ingresar a diferentes organismos para los que no fueron diseñados y, en consecuencia, desencadenar efectos adversos en las células y en los componentes celulares.

El significado biológico de la aparición de MN se refiere a alteraciones en la hebra de ADN que conducen a la formación de fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas completos rezagados en la interfase (Fetoui et al., 2013), los cuales pueden emplearse como indicadores de exposición a xenobióticos que, a largo plazo, puede incrementar la posibilidad de desarrollar algún tipo de efecto adverso sobre la salud. Particularmente, la exposición de los sistemas biológicos a los nanomateriales puede inducir genotoxicidad (Singh et al., 2009).

En este trabajo, se evaluó el nivel de daño genotóxico y citostático provocado por el plaguicida Ampligo, el cual, de acuerdo con Paz-Trejo et al. (2022), está constituido por micro y nanocápsulas, dentro de las que se encuentran embebidos los dos ingredientes activos que lo conforman. Esperando que, por su tamaño, las nanocápsulas produjeran mayor daño genotóxico en comparación con las microcápsulas y el plaguicida completo.

Para ello, el primer paso fue determinar las concentraciones a usar en cada tratamiento con el ensayo de viabilidad con cristal violeta, el cual mediante la capacidad de adherencia de las células epiteliales permite determinar de manera indirecta su viabilidad. Cuando una célula muere pierde la adherencia al sustrato y disminuye la cantidad de colorante cristal violeta que se puede detectar por medio del lector de placas, el cual mide la absorbancia de las células que restan en el cultivo, determinando así la cantidad de células vivas después de la exposición al agente citotóxico (Feoktistova et al., 2016).

Como se mostró anteriormente, se tomaron en cuenta las concentraciones de plaguicida que mantuvieron el porcentaje de viabilidad mayor al 50 % en las tres presentaciones de Ampligo a probar, esto de acuerdo a lo recomendado por Kirsch-Volders et al. (2000), donde la concentración más alta a examinar deberá inducir al menos el 50 % de citotoxicidad. Por lo tanto, las concentraciones consideradas fueron de 1 y 5 μM .

Sin embargo, al realizar la evaluación de genotoxicidad en las células expuestas a 5 μM de las tres fracciones, no se observó la presencia de biomarcadores, por lo que se

determinó que esa concentración no era ideal para llevar a cabo el MNBC. El análisis de viabilidad con cristal violeta arrojó información de la citotoxicidad que puede estar ejerciendo Ampligo en las células NL20.

Las pruebas de citotoxicidad evalúan el daño celular debido tanto a cambios intracelulares, como en la proliferación celular, metabolismo celular, integridad de la membrana, morfología celular, necrosis y apoptosis (Drasler et al., 2017). Este análisis no proporciona información sobre el daño al ADN, su importancia radica en determinar el nivel del efecto general dentro de las células, que ayuda al establecimiento de las concentraciones que afectan la viabilidad de las células.

Una vez que se establecieron las concentraciones, se procedió a determinar el daño genotóxico de Ampligo y de las fracciones de cápsulas que lo conforman con el ensayo MNBC. Los resultados mostraron que, en general, el plaguicida completo fue el que provocó mayor daño genotóxico en comparación con las fracciones de cápsulas. Pero, dentro de las fracciones, la FN generó daño significativamente más alto que la FM en las tres concentraciones evaluadas.

Estos resultados contrastan con la información presentada por Paz- Trejo et al. (2022), en cuyo trabajo se expusieron linfocitos de sangre periférica humana a cuatro concentraciones Ampligo (15, 20, 25 y 30 μM) para cada tratamiento. En el ensayo de MNBC, los autores obtuvieron que la presencia de MN fue superior en las células expuestas a la FN y FM en comparación con la presentación completa, la cual no generó MN. Igualmente, observaron mayor presencia de PN y BrNs en linfocitos expuestos a la FN y FM en comparación con el plaguicida completo. No obstante, al evaluar la genotoxicidad de Ampligo con el ensayo cometa, los resultados muestran que el plaguicida completo es el responsable de provocar la mayor cantidad de daño al ADN en comparación con las fracciones de cápsulas. De acuerdo a los autores, esta discrepancia en los resultados se debe a que las nanocápsulas contenidas en el plaguicida llegan a interferir con los análisis de fluorescencia, como el ensayo cometa, e inducen una gran variación en los resultados obtenidos. Además, evaluaron la genotoxicidad inducida por otro plaguicida llamado Karate, el cual tuvo un comportamiento similar al de Ampligo en ambas metodologías (Paz-Trejo et al., 2022).

Recientemente, Paz-Trejo (2023) demostró que al evaluar el daño genotóxico producido por Karate en las células NL20, la inducción de MN fue mayor que la obtenida con los linfocitos, como también se demostró en el presente trabajo.

Otro punto a resaltar, es que las concentraciones empleadas para evaluar a Ampligo en la línea NL20, fueron inferiores a las probadas por Paz- Trejo et al. (2022), lo que puede

deberse a que las células de epitelio bronquial fueron más sensibles al plaguicida que los linfocitos.

De acuerdo a Almutary y Sanderson (2016), las respuestas intracelulares y los mecanismos de toxicidad hacia un mismo tipo de nanomaterial pueden ser diferentes e incluso contradictorias dependiendo del tipo celular, de ahí la importancia que la evaluación de los efectos de los nanomateriales abarque diversos tipos celulares.

La generación de biomarcadores de daño genotóxico derivadas de la exposición a nanoplaguicidas, también ha sido observada por Sundaramoorthy et al. (2016), quienes evaluaron la genotoxicidad y citotoxicidad provocada por el insecticida permetrina en formulación normal y en nanoformulación, encontrando que ambas formas producen daño genotóxico y citotóxico dependiente de la concentración. Ambas formulaciones disminuyeron la viabilidad celular, generaron un aumento en la inducción de MN, BrNs y PN en linfocitos, mientras que en los eritrocitos ambas formulaciones provocaron formas anormales incrementando el conteo de equinocitos.

Da Silva Gündel et al. (2019) determinaron la acción citotóxica y genotóxica derivada de la exposición de células mononucleares de sangre periférica al fungicida Mancozeb encapsulado, el cual provocó aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y daño al ADN, pero no afectó la viabilidad celular en las concentraciones más bajas del producto. Por otra parte, el Mancozeb no encapsulado redujo la generación de ROS y no provocó daño genotóxico, pero disminuyó la viabilidad celular al provocar disfunción mitocondrial.

En el trabajo de Slattery et al. (2019), se realizó la separación de las cápsulas de un insecticida cuyo ingrediente activo es γ -cihalotrina, un estereoisómero de λ -cihalotrina. En este caso, pudieron separar cápsulas de 758 ± 8 nm (cápsulas grandes) y de 449 ± 2 nm (cápsulas pequeñas) y observaron sus efectos tóxicos en una pulga de agua (*Ceriodafnia dubia*) y determinaron que las cápsulas pequeñas provocaron una toxicidad más alta en comparación con las cápsulas grandes y el insecticida no fraccionado, lo cual se traduce en un aumento en la toxicidad dependiente del tamaño de la cápsula.

Song et al. (2012) evaluaron la toxicidad del insecticida Clorfenapir embebido en micro y nanocápsulas de sílice en larvas de gusano y en polilla de la col. En ambos modelos, se obtuvo que el efecto de las nanocápsulas era dos veces más grande que de las microcápsulas.

Otro tipo de nanomateriales como las nanopartículas de plata (AgNP) también han desencadenado aumento en las alteraciones citotóxicas y genotóxicas en células de cebolla, en comparación con las micropartículas de plata. Scherer et al. (2019)

encontraron que después de la exposición de células de *Allium cepa* a AgNP, el índice de MN aumentó conforme disminuyó el diámetro de la nanopartícula, lo cual ocurrió probablemente debido a la incorporación de éstas dentro de las células, debido a que tienen el potencial de interactuar con regiones celulares a las que micropartículas no son capaces de llegar.

Otro tipo de respuesta producida por las AgNP, es el señalado por Carlson et al. (2008) al exponer macrófagos a diferentes tamaños de nanopartícula y encontraron que se produjo una absorción significativa de NP por parte de las células. Además, la viabilidad disminuyó y se observó un aumento en los niveles de ROS en las células expuestas AgNP de menor diámetro, lo que sugiere que la citotoxicidad observada probablemente está mediada por estrés oxidante.

Amjad et al. (2018) expusieron peces de la especie *Channa punctatus* ante nanopartículas de Cipermetrina y evaluaron la inducción de MN en eritrocitos, en donde se encontraron niveles más altos de MN, en comparación con los peces no expuestos. Pero, al comparar dichos efectos con la Cipermetrina convencional, la genotoxicidad de las nanopartículas fue menor.

De acuerdo a la información presentada, los nanomateriales son capaces de ejercer efectos genotóxicos los cuales son potenciados al disminuir el tamaño de las partículas que entran en contacto con las células. Este comportamiento puede explicar porque la FN de Ampligo generó mayor cantidad de MN en comparación con la FM. Esto implicaría que los nanomateriales son capaces de ingresar a las células y producir efectos.

Según lo reportado por Paz-Trejo et al. (2022), la presentación completa de Ampligo evidencia una amplia variedad de tamaños de cápsulas, desde 0.18 nm a 18 μm ; el diámetro promedio de la FM fue de 2.2 μm y la FN tiene un diámetro promedio de 384 nm. Esto es relevante porque ha sido reportado que las nanopartículas que miden alrededor de 100 a 200 nm pueden ser internalizadas por endocitosis mediada por receptor, mientras que las partículas de mayor tamaño lo hacen por fagocitosis o micropinocitosis (Rabinovitch, 1995), lo que demuestra que existen mecanismos por los cuales las nanocápsulas pueden ser asimiladas por las células NL20.

En el estudio de Paz-Trejo (2023), se demostró que las nanocápsulas del insecticida Karate ingresan a las células NL20 por medio de pinocitosis mediada por clatras y macropinocitosis.

Además, dependiendo del tipo celular con el que se trabaje, se modifica la capacidad de internalización de materiales de acuerdo a su tamaño, lo cual ha sido observado especialmente en ensayos *in vitro* (Zauner et al., 2001). Por ejemplo, las células hepáticas

(Hepa 1–6, HepG2) internalizan partículas de entre 93-220 nm y casi ninguna o ninguna microesfera de 560 nm. Otros tipos celulares como ECV 304, HUVEC y HNX son capaces de internalizar partículas de hasta 1 µm de diámetro. También, en la línea KLN 205 (carcinoma de células escamosas de ratón), las células fueron capaces de internalizar partículas grandes, pero solo ocurrió en las células ubicadas en la periferia del cultivo, donde no había mucha confluencia celular. De acuerdo a lo anterior, el tamaño del nanomaterial, el tipo celular y la densidad celular influyen en su ingreso a las células, pero también este proceso puede depender de la densidad celular, puesto que las células confluentes generalmente toman menos material del medio y en algunos casos pierden la capacidad de introducir las partículas más grandes (Zauner et al., 2001).

Esta diferencia en la capacidad de internalizar los nanomateriales, podría explicar la diferencia en los niveles de biomarcadores de genotoxicidad inducida por Ampligo en los resultados presentados por Paz-Trejo et al. (2022) y lo que se ha señalado en el presente trabajo.

Por otra parte, el efecto de los ingredientes activos puede estar relacionado con la inducción de daño a las células NL20. Se ha demostrado que λ-cihalotrina posee actividad mutagénica y también está relacionado con la producción de estrés oxidante. En el estudio de Fetoui et al. (2013), λ-cihalotrina indujo la formación de MN y provocó un aumento de la producción de ROS, cuya presencia puede desencadenar en estrés oxidante, además de peroxidación lipídica y fragilidad osmótica en eritrocitos de sangre periférica de rata Wistar, lo cual indica que es capaz de alterar la integridad y fluidez de la membrana en células de mamíferos (Fetoui et al., 2013). Por su parte, Al-Amoudi (2018) ha señalado que la exposición de células de la tiroides a λ-cihalotrina disminuye la concentración de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) y provocó daño genotóxico.

Paz-Trejo (2023) reportó que las nanocápsulas que contienen λ-cihalotrina presentes en el nanoplaguicida Karate inducen estrés oxidante, sin embargo, el daño genotóxico no está relacionado con la liberación de ROS sino que es posible que las nanocápsulas interactúen de manera directa con la hebra de ADN.

De acuerdo a Bentley et al. (2010) hasta el momento no existe evidencia de que clorantraniliprol sea un agente genotóxico como es el caso de λ-cihalotrina, sin embargo, puede ser que ejerza un efecto sinérgico que aumente la actividad de λ-cihalotrina. El uso de mezclas es una estrategia común para el control de plagas. En particular, los piretroides se usan en combinación con otros grupos químicos debido a su alta eficiencia, el uso de dosis bajas y los efectos sinérgicos (Bynum et al., 1997; Corbel et al., 2003; Martin et al., 2003). Los piretroides preferentemente se combinan con compuestos nuevos, como es el caso de clorantraniliprol, debido a los efectos desfavorables de las

clases de insecticidas más antiguas en la salud humana y ambiental (Wirtz et al., 2009; Bhatti et al., 2013; Darriet y Chandre, 2013; Graily-Moradi et al., 2021).

Dicho lo anterior, se abre la posibilidad de comparar los resultados de genotoxicidad de Ampligo encapsulado con los ingredientes activos que lo conforman sin encapsular, para asegurar con toda la evidencia que el daño observado es por la presencia de las nanocápsulas. No obstante, la encapsulación de los ingredientes activos reduce el daño causado a las células, proceso en el cual pueden estar involucradas la liberación lenta y controlada, que permite que se reduzca la concentración del compuesto a la que está expuesta la célula y evita el contacto directo de las sustancias con los componentes celulares, disminuyendo la toxicidad (Clemente et al., 2014; Frank et al., 2015). Zhang et al. (2019) encontraron que las nanocápsulas que contienen λ -cihalotrina presentaron mayores efectos perjudiciales hacia las plagas que el insecticida convencional y, además, la nano encapsulación redujo significativamente la aparición de MN derivados de la exposición a λ -cihalotrina. A su vez, Grillo et al. (2012) determinaron que las nanocápsulas poliméricas de poli(-caprolactona) que contenían los herbicidas ametrina, atrazina y simazina mostraron efectos genotóxicos menores que las formulaciones no encapsuladas.

Karimi et al. (2018) y Wang et al. (2022) describieron que el mecanismo posible por el que las nanoestructuras interactúan con los componentes celulares. El proceso inicia con la adhesión de la nanoestructura con la membrana, la pared celular o ambas dependiendo el tipo celular. Después, ingresan a la células por difusión, por endocitosis o por combinación de las dos y, dentro de las células, provoca la desnaturalización de proteínas, desestabilización de ribosomas, disfunción mitocondrial, activación y posterior agotamiento de enzimas antioxidantes y producción de ROS, lo que induce citotoxicidad y estrés oxidante. Al llegar al núcleo, interaccionan con el ADN, donde puede ocurrir la ruptura y oxidación de la cadena de ADN y la posterior mutación genética, induciendo genotoxicidad .

Sin embargo, es necesario añadir otras metodologías al estudio de Ampligo para determinar su comportamiento dentro de la célula. Lo que es posible afirmar es que, debido a su tamaño, las nanocápsulas tienen el potencial de ingresar a las células vivas e inducir daño genotóxico.

Una vez determinados los efectos genotóxicos, se prosiguió a evaluar si Ampligo posee efectos citostáticos, es decir, si es capaz de detener o disminuir la proliferación celular. Para lo cual se llevó a cabo la observación y conteo de células mono y multinucleadas, que fueron utilizadas para obtener el IDN y el IPBC. Los resultados mostraron que todas las concentraciones de las dos fracciones y del plaguicida completo disminuyeron los

valores de ambos índices, teniendo diferencias significativas vs. el testigo negativo, lo que indicó que en las células NL20, Ampligo no detuvo la división celular al 100%.

Los valores obtenidos para ambos índices indicaron que están cerca de presentar un ritmo de división baja, de acuerdo con los datos aportados por Fenech (2000) y Paz- Trejo et al. (2022). El IDN proporciona información sobre la capacidad de las células para dividirse después de haber sido expuestas al agente en estudio (Souza et al., 2016). Mientras que el IPBC indica el número de ciclos celulares por célula durante el período de exposición, por lo que ambos índices suelen usarse para evaluar la proliferación celular (OECD, 2010).

Los resultados mostrados en este trabajo, contrastan con los obtenidos por Paz- Trejo et al. (2022) debido a que, en linfocitos la exposición al Ampligo en presentación completa ambos índices indican que se detiene la proliferación celular. Con la FN se logró el mismo efecto, pero en menor medida, mientras que la FM disminuyó el valor de los índices, pero sin alcanzar el mismo nivel de daño que los otros dos tratamientos. Las cápsulas presentes en Karate no provocaron una reducción tan evidente en la proliferación celular, pero se observa que disminuyen al aumentar la concentración del plaguicida. Por otra parte, los efectos de las nanocápsulas de Karate en las células NL20, mostraron una pequeña reducción en los índices que concuerdan con lo publicado por esos autores.

Algunos nanomateriales tienen la capacidad de causar afectaciones en la proliferación celular. Souza et al. (2016) encontraron que la exposición de células CHO-K1 y CHO-XRS5 (células de ovario de criceto chino) a AgNPs de 100 nm de diámetro, ocasionó la disminución del IDN.

Otro parámetro que puede otorgar información sobre la actividad proliferativa de las células es el índice mitótico, el cual indica la proporción de células que se encuentran en división de una población expuesta a alguna sustancia en estudio y se utiliza como un criterio para evaluar la citotoxicidad (Valencia-Quintana et al. 2013; Kato y Haskins, 2023).

Scherer et al. (2019) encontraron que la exposición de células de *Allium cepa* a AgNPs provocó una reducción de alrededor del 50% en el IM, que fue proporcional a la disminución del diámetro de la partícula. Los descensos del IM son indicadores de un aumento del daño celular resultado del estrés inducido por alguna sustancia (Clemente et al., 2014).

Conforme a la evidencia recabada, los datos obtenidos en el presente trabajo y los presentados por Paz-Trejo et al. (2022), se puede observar que Ampligo ejerce efectos

citostáticos, teniendo un efecto superior en los linfocitos de sangre periférica humana, en comparación a las células NL20.

Los plaguicidas como Ampligo, al estar conformado por elementos de escala nanométrica, representan un riesgo para la salud de la población expuesta a ellos. En este estudio se confirmó que en su presentación completa, Ampligo fue capaz de inducir daño genotóxico a concentraciones bajas y, dentro de sus componentes, son las cápsulas nanométricas las que provocaron mayores efectos de daño al ADN.

Es necesario ampliar el estudio de este tipo de sustancias para mostrar evidencia del daño potencial que pueden ejercer, para que en México se comience con la regulación del uso y manejo de los nanoplaguicidas y, en general, de los nanomateriales.

CONCLUSIONES

- Las nanocápsulas presentes en Ampligo ejercen genotoxicidad en concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 μM de Ampligo en las células NL20, sin embargo, el plaguicida completo indujo mayor número de MN a las mismas concentraciones.
- El biomarcador genotóxico de mayor presencia fueron los MN, por lo que la interacción de Ampligo con las células NL20 podría estar generando fragmentos de material genético acéntricos o pérdida de cromosomas completos.
- Ampligo disminuye el ritmo de proliferación celular de las células NL20, independientemente del tamaño de la cápsula.
- El potencial genotóxico de Ampligo está relacionado con el tamaño de las cápsulas, su concentración en el medio y el modelo celular de estudio.

REFERENCIAS

- Al-Amoudi, W. M. (2018). Toxic effects of Lambda-cyhalothrin, on the rat thyroid: Involvement of oxidative stress and ameliorative effect of ginger extract. *Toxicology Reports*, 5, 728–736.
- Almutary, A. y Sanderson, B. (2016). The MTT and crystal violet assays: potential confounders in nanoparticle toxicity testing. *International Journal of Toxicology*, 35(4), 454–462.
- Amjad, S., Sharma, A. K. y Serajuddin, M. (2018). Toxicity assessment of cypermethrin nanoparticles in *Channa punctatus*: Behavioural response, micronuclei induction and enzyme alteration. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 100, 127–133.
- Anandhi, S., Saminathan, V., Yasotha, P., Saravanan, P. y Rajanbabu, V. (2020). Nano-pesticides in pest management. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8, 685–690.
- Aslani, F., Bagheri, S., Muhd, N., Juraimi, A., Hashemi, F. y Baghdadi, A. (2014). Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an Overview. *The Scientific World Journal*, 2014, 641759.
- ATCC. (sf.). NL20. CRL-2503™ Tomado de: <https://www.atcc.org/products/crl-250>.
- Balmus, G., Karp, N., Ng, B., Jackson, S., Adams, D. y McIntyre, R. (2015). A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability screening in mice. *Nature Protocols*, 10(1), 205.
- Bentley, K., Fletcher, J. y Woodward, M. D. (2010). Chlorantraniliprole. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, 2231–2242.
- Bhatti, S.S., Ahmad, M., Yousaf, K. y Naeem, M. (2013). Pyrethroids and new chemistry insecticides mixtures against *Spodoptera litura* (Noctuidae: Lepidoptera) under laboratory conditions. *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 1(2), 45–50.
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 543(3), 251–272.
- Bynum Jr., E.D., Archer, T.L. y Plapp Jr., F.W. (1997). Comparison of banks grass mite and twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae): responses to insecticides alone and in synergistic combinations. *Journal of Economic Entomology*, 90(5), 1125–1130.
- Cano, F. y Mendoza, A. (2017). Nanoplaguicidas, ¿un verdadero avance para la agricultura?. *Revista Bio Ciencias*, 4(3), 164–178.
- Carlson, C., Hussein, S., Schrand, A., Braydich-Stolle, L., Hess, K., Jones, R. y Schlager, J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry*, 112(43), 13608–13619.
- Celik, A., Mazmanci, B., Camlica, Y., Aşkin, A. y Cömelekoglu, U. (2003). Cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. *Mutation Research*, 539(1-2), 91–97.

- Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J. y Los, M. J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1), 43–58.
- Champion, J. A., Walker, A. y Mitragotri, S. (2008). Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharmaceutical Research*, 25, 1815–1821.
- Chen, M. y Vonmikecz, A. (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO nanoparticles. *Experimental Cell Research*, 305(1), 51–62.
- Chmielewska, M., Dedukh, D., Haczkiwicz, K., Rozenblut-Kościsty, B., Kaźmierczak, M., Kolenda, K., Serwa, E., Pietras-Lebioda, A., Krasikova, A. y Ogielska, M. (2018). The programmed DNA elimination and formation of micronuclei in germ line cells of the natural hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus*. *Scientific Reports*, 8(1), 7870.
- Cimini, D., Moree, B., Canman, J. y Salmon, E. (2003). Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *Journal of Cell Science*, 116(20), 4213–4225.
- Clemente, Z., Grillo, R., Jonsson, M., Santos, N. Z., Feitosa, L. O., Lima, R. y Fraceto, L. F. (2014). Ecotoxicological Evaluation of Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules Containing Triazine Herbicides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(7), 4911–4917.
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (sf.) Consulta de Registros Sanitarios de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y LMR. Consultado en <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>.
- Corbel, V., Raymond, M., Chandre, F., Darriet, F. y Hougard, J. (2003). Efficacy of insecticide mixtures against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids and carbamates. *Pest Management Science*, 60, 375–380.
- da Silva Gündel, S., dos Reis, T., Copetti, P., Favarin, F., Sagrillo, M., da Silva, A., Segat, J., Baretta, D. y Ourique, A. (2019). Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity of nanoemulsions containing Mancozeb and Eugenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 207–215.
- Darriet, F. y Chandre, F., (2013). Efficacy of six neonicotinoid insecticides alone and in combination with deltamethrin and piperonyl butoxide against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science*, 69, 905–910.
- Drasler, B., Sayre, P., Steinhäuser, K. G., Petri-Fink, A. y Rothen-Rutishauser, B. (2017). *In vitro* approaches to assess the hazard of nanomaterials. *NanoImpact*, 8, 99–116.
- Dutra, A., Pak, E., Wincovitch, S., John, K., Poirier, M. C. y Olivero, O. (2010). Nuclear bud formation: a novel manifestation of Zidovudine genotoxicity. *Cytogenetic and genome research*, 128(1-3), 105–110.
- Eastmond, D. y Tucker, J. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13(1), 34–43.

ETC group. (2004). Down on the farm: the impact of nano-scale technologies on food and agriculture. ETC group. Consultado en: https://www.etcgroup.org/sites/www.etcgroup.org/files/publication/80/02/etc_dotfarm2004.pdf

Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 81–95.

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

Fenech, M. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay evolution into a more comprehensive method to measure chromosomal instability. *Genes*, 11(10), 1203.

Fenech, M., Chang, W., 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/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2), 65–75.

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T. Surralles, J., Crott, J., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A. Tucker, J. y Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132.

Feoktistova, M., Geserick, P. y Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), pdb.prot087379.

Fetoui, H., Feki, A., Salah, G. B., Kamoun, H., Fakhfakh, F. y Gdoura, R. (2013). Exposure to lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid, increases reactive oxygen species production and induces genotoxicity in rat peripheral blood. *Toxicology and Industrial Health*, 31(5), 433–441.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators – Global, regional and country trends, 1990–2020. FAOSTAT Analytical Briefs, 46.

Frank, L., Contri, R., Beck, R., Pohlmann, A. y Guterres, S. (2015). Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7(5), 623–639.

Garaj-Vrhovac, V. y Zeljezic, D. (2001). Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology*, 165(2-3), 153–162.

Ganilho, C., da Silva, M., Paiva, C., de Menezes, T., dos Santos, M., Pereira, C., Pereira, R. y Andreani, T. (2022). Environmental Safety Assessments of Lipid Nanoparticles Loaded with Lambda-Cyhalothrin. *Nanomaterials*, 12(15), 2576.

Gómez-Arroyo, S., Díaz-Sánchez, Y., Meneses-Pérez, M. A., Villalobos-Pietrini, R. y De León-Rodríguez, J. (2000). Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 466(1), 117–124.

Graily-Moradi, F., Hejazi, M. J., Enayati, A. y Hamishehkar, H. (2021). Evaluation of co-nanoencapsulation process on the toxicity and biochemical metabolism of imidacloprid and lambda-cyhalothrin in *Myzus persicae* (Sulzer). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101974.

Grillo, R., dos Santos, N., Maruyama, C., Rosa, A., de Lima, R. y Fraceto, L. (2012). Poly(ϵ -caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials*, 178, 153–162.

Hartwell, L., Hood, L., Goldberg, M., Reynolds, A. E. y Silver, L. M. (2011). *Genetics: from genes to genomes*. McGraw-Hill.

He, L., Troiano, J., Wang, A. y Goh, K. (2008). Environmental Chemistry, Ecotoxicity, and Fate of Lambda-Cyhalothrin. En D.M. Whitacre (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 195, pp.75). Springer.

Jáquez, M., González, L. Irigoyen, R. y Ortega, V. (2014). Comportamiento de plaguicidas persistentes en el medio ambiente. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372–87.

Kah, M., Beulke, S., Tiede, K. y Hofmann, T. (2013). Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(16), 1823–1867.

Kanagaraj, K., Raavi, V., Visweswaran, S., Selvan, T., Dhanashekar, S. y Perumal, V. (2017). Technical note on cytokinesis-arrested binucleated cell and micronucleus assay. *Journal of Radiation and Cancer Research*, 8(4), 180.

Karimi, M., Sadeghi, R. y Kokini, J. (2018). Human exposure to nanoparticles through trophic transfer and the biosafety concerns that nanoparticle-contaminated foods pose to consumers. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 129–145.

Kato, T. y Haskins, J. (2023). Mitotic Index Analysis. *Methods in Molecular Biology*, 2519, 17–26.

Kharissova, O. y Méndez, U. (2002). La estructura del fullereno C60 y sus aplicaciones. *Ciencia UANL*, 5(4), 475.

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. y Wakata, A. (2000). Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 167–172.

Kookana, R., Boxall, A., Reeves, P., Ashauer, R., Beulke, S., Chaudry, Q., Cornelis, G., Fernandes, T., Gan, J., Kah, M., Lynch, I., Ranville, J., Sinclair, C., Spurgeon, D., Tiede, K. y Van den Brink, J. (2014). Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4227–4240.

Kravtsov, V. Y., Fedortseva, R. F., Starkova, Y. V., Yartseva, N. M. y Nikiforov, A. M. (2000). Tailed nuclei and dicentric chromosomes in irradiated subjects. *Applied Radiation and Isotopes*, 52(5), 1121–1127.

Leon, M., Schinasi, L., Lebaillly, P., Beane Freeman, L., Nordby, K., Ferro, G., Monnereau, A., Brouwer, M., Tual, S., Baldi, I., Kjaerheim, K., Hofmann, J., Kristensen, P., Koutros, S., Straif, K., Kromhout, H. y Schüz, J. (2019). Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: a pooled analysis from the AGRICOH consortium. *International Journal of Epidemiology*, 48(5), 1519–1535.

Lira, R., Méndez, B., De los Santos, G. y Vera, I. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria*, 28(2), 9–24.

Lugo-Medina, E., García-Gutiérrez, C. y Ruelas-Ayala, R. D. (2010). Nanotecnología y nanoencapsulación de plaguicidas. *Ra Ximhai*, 6(1), 63–67.

Maero, E. y Anguiano, O. (2018). Efecto de la exposición al insecticida clorantraniliprol sobre biomarcadores de estrés oxidativo en adultos de *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 77(1), 1–10.

Mahmood, I., Imadi, S., Shazadi, K., Gul, A. y Hakeem, K. (2016). Effects of Pesticides on Environment. En K. Hakeem, M. Akhtar y S. Abdullah (Eds), *Plant, Soil and Microbes* (pp 253–269). Springer, Cham.

Martin, T., Ochou, O.G., Vaissayre, M. y Fournier, D. (2003). Organophosphorus insecticides synergize pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: noctuidae) from West Africa. *Journal of Economic Entomology*, 96, 468–474.

Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Calderón-Segura, M., Félix-Gastélum, R. y Álvarez-Torres, A. (2009). Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environmental International*, 35(8), 1155–1159.

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I. y Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88(11), 1515–1531.

Meredith, A., Harper, B. y Harper, S. (2016). The influence of size on the toxicity of an encapsulated pesticide: a comparison of micron- and nano-sized capsules. *Environment international*, 86, 68–74.

Migliore, L., Di Bucchianico, S. y Uboldi, C. (2014). The In Vitro Micronucleus Assay and FISH Analysis. En L. Sierra y Gaivão, I. (eds), *Genotoxicity and DNA Repair. Methods in Pharmacology and Toxicology*. Human Press. EUA.

Mohamed, S., Sabita, U., Rajendra, S. y Raman, D. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, testing guidelines and methods. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*, 1, 1–6.

Mudry, M. y Carballo, M. (2006). *Genética Toxicológica*. Editorial De los Cuatro Vientos pp. 672.

Naravaneni, R. y Jamil, K. (2005). Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on human lymphocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19(5), 304–310.

Nussbaum, R., McInnes, R. y Willard, H. (2015). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. Elsevier Health Sciences.

Organización Mundial de la Salud. (2022). Residuos de plaguicidas en los alimentos. Consultado en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>

Organization for Economic Co-operation and Development. (sf.) Small sizes that matter: Opportunities and risks of Nanotechnologies Report in co-operation with the OECD International Futures Programme. Consultado en: <https://www.oecd.org/science/nanosafety/37770473.pdf>

OECD. (2010). OECD Guideline For The Testing Of Chemicals. Proposal for updating Test Guideline 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test. Consultado en: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/50108793.pdf>

Ortiz, D. (2019) Evaluación del daño genotóxico en la línea celular NL-20 provocado por extractos de musgos expuestos a contaminantes atmosféricos, en cinco zonas de la Ciudad de México y área metropolitana. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Pampalona, J., Soler, D., Genesca, A. y Tusell, L. (2010). Whole chromosome loss is promoted by telomere dysfunction in primary cells. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 49(4), 368–378.

Paz-Trejo, C. (2023). Evaluación de los mecanismos de daño provocados por los nano-plaguicidas. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Paz-Trejo, C., Jiménez-García, L., Arenas-Huertero, F. y Gómez-Arroyo, S. (2022). Comparison of the genotoxicity of two commercial pesticides by their micro and nano size capsules. *Toxicology and Industrial Health*, 38(10), 675–686.

Perrin, B. (2000). Improving insecticides through encapsulation. *Pesticide Outlook*, 11(2), 68–71.

Phillips, D. y Arlt, V. (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. En A. Luch (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. (Vol. 1, pp. 87–110). Basel: Birkhäuser Verlag

Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in cell biology*, 5(3), 85–87.

Ramírez, J. y Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*, 4(2), 67–75

Rozsak, J., Catalán, J., Järventausta, H., Lindberg, H. K., Suhonen, S., Vippola, M., Stępnik, M. y Norppa, H. (2016). Effect of particle size and dispersion status on cytotoxicity and genotoxicity of zinc oxide in human bronchial epithelial cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 805, 7–18.

Ruiz de Arcaute, C., Laborde, M., Soloneski, S. y Larramendy, M. (2021) Genotoxicidad y carcinogénesis. En P. Carriquiriborde (Ed), *Principios de Ecotoxicología* (pp. 148–183). Libros de Cátedra.

Russo, A., Stocco, A. y Majone, F. (1992). Identification of kinetochore-containing (CREST+) micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes. *Mutagenesis*, 7(3), 195–198.

Saldívar, L. (2022). Recomendaciones de política pública de nanociencia y nanotecnología en México: privilegiar el bienestar humano y ambiental. *Mundo nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 15(28).

Saleem, U., Ejaz, S., Ashraf, M., Omer, M., Altaf, I., Batool, Z., Fatima, R. y Afzal, M. (2014). Mutagenic and cytotoxic potential of Endosulfan and Lambda-cyhalothrin—*In vitro* study describing individual and combined effects of pesticides. *Journal of Environmental Sciences*, 26(7), 1471–1479.

Sargent, L., Shvedova, A., Hubbs, A., Salisbury, J., Benkovic, S., Kashon, M., Lowry, D., Murray, A., Kissin, E., Friend, S., McKinstry, K., Battelli, L. y Reynolds, S. (2009). Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50(8), 708–717.

Scherer, M., Sposito, J., Falco, W., Grisolia, A., Andrade, L., Lima, S., Machado, G., Nascimento, V., Gonçalves, D., Wender, H., Oliveira, S. y Caires, A. R. (2019). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: A close analysis of particle size dependence. *Science of the Total Environment*, 660, 459-467.

Schiller, J., Sabatini, L., Bittner, G., Pinkerman, C., Mayotte, J., Levitt, M. y Meisner, L. (1994). Phenotypic, molecular and genetic-characterization of transformed human bronchial epithelial-cell strains. *International Journal of Oncology*, 4, 461–470.

Singh, N., Gupta, V. K., Kumar, A. y Sharma, B. (2017). Synergistic Effects of Heavy Metals and Pesticides in Living Systems. *Frontiers in Chemistry*, 5, 70.

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G., Griffiths, S., Williams, P., Maffei, T., Wright, C. y Doak, S. (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30(23-24), 3891–3914.

Singh, N., Sharma, R., Parween, T. y Patanjali, P. K. (2018). Pesticide contamination and human health risk factor. En M. Oves, M. Zain y I. Ismail (Eds). *Modern Age Environmental Problems and their Remediation* (pp. 49–68). Springer, Cham.

Slattery, M., Harper, B. y Harper, S. (2019). Pesticide Encapsulation at the Nanoscale Drives Changes to the Hydrophobic Partitioning and Toxicity of an Active Ingredient. *Nanomaterials*, 9(1), 81.

Song, M., Cui, S., Gao, F., Liu, Y., Fan, C., Lei, T. y Liu, D. (2012). Dispersible silica nanoparticles as carrier for enhanced bioactivity of chlorfenapyr. *Journal of Pesticide Science*, 37(3), 258–260.

Souza, T., Franchi, L., Rosa, L., da Veiga, M. y Takahashi, C. (2016). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 795, 70–83.

Strimbu, K. y Tavel, J. (2010). What are biomarkers?. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466.

Sundaramoorthy, R., Velusamy, Y., Balaji, A. P., Mukherjee, A. y Chandrasekaran, N. (2016). Comparative cytotoxic and genotoxic effects of permethrin and its nanometric form on human erythrocytes and lymphocytes in vitro. *Chemico-biological Interactions*, 257, 119–124.

Syngenta. (2015). Zeon Technology Enhances Insecticide's Performance. Consultado en: syngenta-us.com/thrive/production/zeon-technology-insecticide-performance.html

Syngenta México. (2022). Ampligo. Consultado en: <https://www.syngenta.com.mx/product/crop-protection/insecticida/ampligor>

Thomas, P., Umegaki, K. y Fenech, M. (2003). Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 18(2), 187–194.

Valencia-Quintana, R., Alarcón, J., Gómez-Arroyo, S., Eslava, J., Waliszewski, S., Fernández, S. y Villalobos-Pietrini, R. (2013). Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 133–157.

Wang, D., Saleh, N., Byro, A., Zepp, R., Sahle-Demessie, E., Luxton, T., Ho, K., Burgess, R., Flury, M., White, J. y Su, C. (2022). Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security. *Nature Nanotechnology*, 17(4), 347–360.

Wege, P., Hoppe, M., Bywater, A., Weeks, S. y Gallo, T. (1999). A microencapsulated formulation of lambda-cyhalothrin. En W. Robinson, F. Rettich, y G.W. Rambo (Eds). *Proceedings of the 3rd international conference on urban pests* (pp. 301–310). Grafické závody.

Willan, J., Cleasby, A., Flores-Rodriguez, N., Stefani, F., Rinaldo, C., Pisciotanni, A., Grant, E., Woodman, P. y Ciani, B. (2018). ESCRT-III accumulates in micronuclei with ruptured nuclear envelopes. *BioRxiv*, 476630.

Wirtz, K., Bala, S., Amann, A. y Elbert, A. (2009). A promise extended-future role of pyrethroids in agriculture. *Bayer CropScience Journal*, 62 (2), 145–157.

World Health Organization. (2020). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, edición 2019. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005662>

World Health Organization. (2021). Hazard Identification and Characterization: Toxicological and Human Studies. En *Environmental Health Criteria 240, Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food*, (2° edición, pp. 484–493).

Yanamala, N., Kagan, V. y Shvedova, A. (2013). Molecular modeling in structural nano-toxicology: interactions of nano-particles with nano-machinery of cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (15), 2070–2077.

Yeager, T. (1999). Constructing immortalized human cell lines. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 465–469.

Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 227–236.

Zauner, W., Farrow, N. A. y Haines, A. M. (2001). *In vitro* uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *Journal of Controlled Release*, 71(1), 39–51.

Zhang, W., Tang, G., Dong, H., Geng, Q., Niu, J., Tang, J., Yang, J., Huo, H. y Cao, Y. (2019). Targeted release mechanism of lambda-cyhalothrin nanocapsules using dopamine-conjugated silica as carrier materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178, 153–162.

Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C. y Zhao, Y. (2011). Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials. *Small*, 7(10), 1322–1337.

Zhao, X., Cui, H., Wang, Y., Sun, C., Cui, B. y Zeng, Z. (2017). Development Strategies and Prospects of Nano-based Smart Pesticide Formulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (26), 6504–6512.