



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis toxicológico de embriones de Pez cebra (*Danio rerio*) expuestos
al plaguicida neonicotinoide Poncho (Clotianidin).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

BERENYCE GONZALEZ MARIN

TUTORA
DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA

MÉXICO, D. F. ABRIL, 2015.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Dra. María Elena Calderón Segura por formar parte fundamente en mi desarrollo profesional, por su valiosa colaboración como tutora, por el tiempo dedicado a desarrollo en el trabajo experimental y escrito de la presente investigación.

Al Dr. Ernesto Maldonado Olvera por haber proporcionado todos los organismos para la realización de la presente investigación, así como su valiosa colaboración en la realización del proyecto aportando ideas para el desarrollo del mismo.

Al técnico laboratorista José Luis Ramos Balderas por su valiosa colaboración en el cuidado de los peces y mantenimiento de los embriones.

Al Instituto de Fisiología Celular por permitir el desarrollo de una parcial de la presente investigación.

Al Centro de Ciencias de la Atmosfera por proporcionar la infraestructura necesaria para la realización de la presente investigación.

A los miembros del jurado; Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz, Dra. María Isabel Rodríguez Romero, Dr. Miguel Ángel Palomino Garibay, M. en C. Gabino De la Rosa Cruz, los cuales realizaron valiosas observaciones para el mejoramiento del trabajo escrito.

A cada uno de ustedes gracias.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

A mis amados padres por estar conmigo, por apoyarme incondicionalmente estos cuatro años, por alentarme a seguir adelante, por sus consejos y su amor.

A mis amadas hermanas Tania y Cinthia, gracias por su apoyo, por no permitir que me rindiera en ningún momento por sus valiosos consejos, su amor y su apoyo incondicional.

A mí querido amigo Adán, por escucharme apoyarme y estar conmigo en todo momento.

A mí querida amiga Marian por compartir esta maravillosa experiencia a mi lado.

A mí querida amiga Lorena por estar conmigo en toda esta travesía tan especial e importante.

A mí querida Dra. María Elena Calderón Segura, por haberme enseñado tanto por guiarme durante estos años, gracias por su apoyo incondicional y por creer en mí en todo momento.

A cada uno de ustedes mil gracias....

Dedicatorias.

A mi amado padre.

Papá te dedico mi esfuerzo que es compartido contigo y mi amada hermana Tania, ustedes han sido una fuente de inspiración para mí, este trabajo representa todas las cosas maravillosas que me has enseñado, el ejemplo de vida que me has dado de ser una persona constante, responsable y trabajadora, sin duda nunca hubiera llegado a este punto sin todas tus enseñanzas eres la persona que más amo en el mundo y agradezco profundamente que siempre estuvieras a mi lado dándome lecciones de vida, lecciones que hoy en día me permiten estar en este punto tan maravilloso e importante de mi vida, gracias por formarme como persona gracias por todo tu amor y por siempre estar presente a mi lado gracias por ser siempre mi héroe.

A mi amada hermana Tania.

Tania amada hermana, te dedico este trabajo escrito como una forma de agradecerte y mostrarte lo mucho que significas para mí, eres la mujer más valiente que conozco la mujer que más me ha inspirado en realizar todas las cosas buenas que he hecho, eres un ejemplo a seguir para mí, te amo profundamente gracias por todo.

Gracias.....

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	2
I. Introducción	3
1.1 Plaguicidas: historia y usos	4
1.2. Clasificación de los plaguicidas	6
1.2.1 Clasificación por su naturaleza	7
1.2.1.1 Plaguicidas biológicos	7
1.2.1.2 Plaguicidas químicos	8
1.2.3 Clasificación por su persistencia en el ambiente	9
1.2.4 Clasificación química	9
1.3. Efectos tóxicos de los plaguicidas	10
1.4 Efectos tóxicos de los plaguicidas en los ecosistemas acuáticos	12
1.4.1 Efectos ecológicos de los plaguicidas en ecoistemas acuáticos	14
II. Antecedentes	18
2.1. Insecticidas neonicotinoides	18
2.1.1. Mecanismo de acción	22
2.1.2. Efectos tóxicos	23
2.2. Poncho® (Clotianidin), insecticida neonicotinoide comercial	24
2.3. Mecanismo de acción de Clotianidin	25
2.4 Metabolismo del Clotianidin	26
2.5. Biomarcadores	27
2.6 Pez cebra (<i>Danio rerio</i>) como modelo animal	30
2.6.1 Estadios del desarrollo de pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	36
2.7 Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa alcalino)	43
III. Justificación	45
IV. Objetivos	47
V. Hipótesis	48
VI. Materiales y métodos	49
6.1. Elaboración de la solución patrón del insecticida	49
6.2 Obtención y selección de los embriones de pez cebra (<i>Danio reiro</i>)	49
6.3 Esquema de tratamiento de embriones de pez cebra (<i>Danio rerio</i>) expuestos al insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin)	50
6.4. Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa alcalino	51
6.5. Análisis estadístico	52
VII. Resultados	53
	53

7.1 Alteraciones morfológicas en los estadios embrionarios 6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec de pez cebra (<i>Danio rerio</i>) expuestos al insecticida Poncho® (Clotianidin).	
7.1.1. Estadio embrionario 6 somitas.	53
7.1.2. Estadio embrionario 26 somitas	55
7.1.3. Estadio embrionario Prim 6	57
7.1.4. Estadio embrionario High pec	59
7.2 Genotóxicidad y apoptosis <i>in vivo</i> del insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin) en células de la cola de embriones en estadio de desarrollo (6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec) de pez cebra (<i>Danio rerio</i>).	61
7.3 Gráficas de los tres parámetros evaluados (frecuencia de cometas, longitud de la cauda, momento de la cauda) y apoptosis en núcleos de células de la cola de embriones de 6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec de pez cebra.	63
7.4 Gráficas de comparación de los tres parámetros genotóxicos y apoptosis de los cuatro estadios embrionarios de pez cebra 6 somitas 26 somitas Prim 6 y High pec expuestos al insecticida Poncho®.	71
VII. Discusión	73
IX. Conclusión	77
X. Referencias	78

RESUMEN

En el presente estudio se investigaron los efectos morfológico, genotóxico y apoptótico mediante el ensayo cometa alcalino del insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin) en cuatro estadios embrionarios (6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec) de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos a las concentraciones de 3.75×10^{-3} mg/ml, 7.5×10^{-3} mg/ml y 0.015 mg/ml del insecticida neonicotinoide Poncho® por 2 h a 28.5°C. El análisis morfológico de los organismos después de la exposición a las tres concentraciones de este insecticida neonicotinoide demuestran que Poncho® induce en los embriones en el estadio de 6 somitas: degeneración del surco somítico, del primordio óptico, de la notocorda y de la cola; en los estadios de 26 somitas, Prim 6 y en High pec produce degradación de la cola, de la notocorda, alteración morfológica de las somitas, inhibición de la locomoción y disminución del ritmo cardíaco, pero además en este último el estadio embrionario ocasiona degeneración de la aleta caudal. Todos los organismos después de la exposición al insecticida murieron con respecto a los organismos del grupo testigo, los cuales tuvieron desarrollo normal y sobrevivencia del 100%. Los resultados genotóxicos y de apoptosis del tejido de la cola de los organismos expuestos a las tres concentraciones del insecticida Poncho® evidencian que este plaguicida neonicotinoide es un agente inductor de daño al ADN y de apoptosis comparado con el grupo testigo. Al comparar las acciones de las tres concentraciones del insecticida neonicotinoide Poncho® sobre los cuatro estadios embrionarios observamos que a mayor concentración del plaguicida (0.015 mg/ml) se producen más alteraciones en el desarrollo comparado con las concentraciones bajas (3.75×10^{-3} mg/ml y 7.5×10^{-3} mg/ml).

Los resultados de esta investigación aportan datos a niveles morfológico, genotóxico y apoptótico del insecticida neonicotinoide Poncho® en otro modelo animal como el pez cebra (*Danio rerio*), los cuales apoyan que este plaguicida es de gran riesgo para los organismos de ecosistemas acuáticos.

Abstract

In study present investigated morphological, genotoxic and apoptotic effects through of alkaline comet assay of neonicotinoid insecticide Poncho® (Clothianidin) in four embryonic stages (6 somites, 26 somites, Prim 6 and High pec) of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 3.75×10^{-3} , 7.5×10^{-3} and 0.015 mg/ml of insecticide Poncho f or 2 hour at 28.5°C.

Morphological analysis of organisms after exposure to 3.75×10^{-3} , 7.5×10^{-3} and 0.015 mg/ml of insecticide Poncho evidenced degeneration of the notochord, somitic furrow, optic primordium and tail as well as inhibition of locomotion and decreased cardiac rate compared with normal development of control groups. In embryonic stages of 26 somites, *Prim 26 y High pec* induced degeneration of the notochord and tail, alterations in somites, inhibition of locomotion and decreased cardiac rate compared with normal development of control groups. Therefore in the *High pec* organisms showed modification in caudal fin. These alterations produced death to all organisms with respect to control group. Comparing actions of three concentrations of Poncho (Clothianidin) on development in four embryonic stages observed that high concentration (0.015 mg/mL) of this pesticide produced more morphological alterations compared with low concentrations (3.75×10^{-3} and 7.5×10^{-3} mg/mL).

The genotoxic and apoptosis results of tail tissue of all organisms exposed to three concentrations of Poncho (clothianidin) showed that insecticide is a genotoxic and apoptotic agent evidenced by significant increase in apoptosis and comets frequencies, in the tail length and tail moment of comet with relation to control group values.

Results of this investigation report data to levels morphologic, genotoxic and apoptotic of this insecticide neonicotinoid Poncho in other animal model as zebrafish (*Danio rerio*), which support that this pesticide is the high risk to organisms health of the aquatic ecosystems.

I INTRODUCCIÓN

La preocupación por la contaminación en mantos freáticos, aguas superficiales y mares debido a compuestos químicos naturales o sintéticos ha estimulado a realizar estudios para evaluar los daños ocasionados en los organismos acuáticos (Damastra, 2002). Las aguas continentales han sido el medio más utilizado para eliminar los productos de desecho. Hasta hace poco el poder auto depurador de los cuerpos de agua en la naturaleza era suficiente para restaurar y mantener el equilibrio acuático. Sin embargo, las emisiones y vertidos incontrolados de la industria y de la actividad humana han sobrepasado rompiendo el ciclo hidrológico y afectando a las comunidades acuáticas. Esto ha provocado la transformación de las aguas de lagos, ríos y mares en depósitos de residuos en los que el equilibrio natural está severamente perturbado y en muchos casos en desaparición (Cabonetto, 2004). Algunas de las sustancias que pueden presentar alta toxicidad en medios acuáticos son los plaguicidas, que son efectivos para erradicar diversas plagas, pero con efectos indeseables para los ecosistemas y para la salud humana (Cabonetto, 2004). La necesidad de rentabilizar al máximo posible la tierra ha favorecido el uso intensivo de plaguicidas, bajo esta denominación se incluyen una serie amplia de sustancias que no tienen ningún parentesco químico (Costa, 1997). El uso de los plaguicidas se ha relacionado de manera no constante con una serie de efectos a largo plazo, como el desarrollo de diferentes tipos de cáncer tales como; leucemias, linfomas, mielomas, sarcomas, cérvix, próstata, ovario, pulmón, estómago, hígado, colón y mama, (Priyadarshi *et al.*, 200) y afecciones del sistema nervioso (polineuropatías, Parkinson y demencias), (Baldi *et al.*, 1998). También se han relacionado con alteraciones de la reproducción tales como esterilidad, aborto espontáneo, mortalidad fetal, parto prematuro, retraso del crecimiento y malformaciones congénitas (Baldi *et al.*, 1998).

1.1 Plaguicidas: Historia y usos.

Según la FAO/ OMS (1992) se considera plaguicida o pesticida a toda sustancia que se emplea para combatir las plagas agrícolas durante la producción, mercado o elaboración de los alimentos o a toda sustancia que pueda administrarse por aplicación interna a los animales para destruir insectos o arácnidos; no incluyéndose abonos. Un plaguicida se define como una sustancia o mezcla en cualquier estado físico cuya finalidad sea la de controlar, combatir y/o prevenir plagas o enfermedades y en general tiene el objetivo de proteger al hombre de organismos que afectan su ambiente, animales y/o alimentos (Estrada, 1998; Robledo, 1998; Ortiz *et al.*, 1997). La palabra pesticida y plaguicida abarca todos los productos que se emplean en la lucha contra los roedores y otros organismos causantes de plagas y pestes (Pumarola *et al.*, 1987).

Los plaguicidas son compuestos sintéticos, constituidos de uno o más ingredientes activos y otros componentes químicos con diversas presentaciones como disolventes, emulsificantes y amortiguadores, entre otros (Bolognesi, 2003; Tomizawa y Casida, 2005).

El surgimiento y la aplicación de los plaguicidas coincide con la llamada *era química*, que ha transformado la sociedad desde el decenio de 1950. Según la base de datos de la American Chemical Society, en 1993 se habían identificado más de trece millones de productos químicos a los que se le sumaban cada año 500 000 compuestos (FAO, 1992). La síntesis de compuestos orgánicos tóxicos por el hombre y su liberación en el ambiente natural, asumió proporciones de mayor significado en el siglo XX, después de la segunda guerra mundial la actividad química industrial era relativamente pequeña y el mayor impacto provenía de los compuestos cíclicos aromáticos. Sin embargo, con el progreso de la industrialización y la aparición de nuevas sustancias para el control de organismos dañinos para el hombre, la emisión de contaminantes

se potenció a niveles mayores, haciendo evidentes los efectos nocivos de estos productos al hombre y a los ecosistemas (Perry, 1997). El empleo del arsénico de cobre como insecticida para combatir escarabajos en Estados Unidos en 1900 y su amplia extensión, promovió la realización de la primera legislación sobre la aplicación y el manejo de los plaguicidas. En 1939, se demostró la actividad del insecticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), el cual fue utilizado desde 1942 y hasta 1972. El hexaclorociclohexano (HCH) fue sintetizado en 1925, empleado como arma en la 1ª Guerra Mundial y usado como insecticida en 1942. A partir de la 2ª mitad del siglo XX, se aceleró la síntesis de productos organofosforados (dimefox en 1949, malatión en 1950) y de carbamatos (carbaryl en 1956, aldicarb en 1965), debido a su gran efectividad contra las plagas (Ferrer, 2003). En 1990, el consumo aproximado de agroquímicos fue del 43% para herbicidas, 32% de insecticidas, 19% de fungicidas y un remanente de 6% dividido entre reguladores de crecimiento y otros compuestos.

En la última década se han generado diversos tipos de plaguicidas en el mercado, ocasionando diferentes problemas, los cuales van desde accidentes leves hasta muerte por toxicidad (Mense *et al.*, 2006). Desde que inicia el empleo de plaguicidas en 1838 y hasta 1948, alrededor de 38 agentes químicos fueron utilizados y en 1995 su volumen ascendió a 54 000 toneladas (INEGI, 1998). Para el año 2006, la producción de plaguicidas fue de 29 922 toneladas y de los cuales 14, 641 toneladas corresponden a insecticidas (INEGI, 2008) y su importación se elevó al 28%. Según el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), las intoxicaciones agudas por agroquímicos han mostrado una tendencia ascendente, reportándose 4849 casos en el año 2010, cifra que se incrementó a 5902 en el 2012 (Hernández y Jiménez, 2012). En México el estado con más casos reportados de intoxicación es Nayarit con 227, seguido por el Estado de México con 145, Michoacán con 115, Jalisco con 112, Guerrero con 99 y Morelos con 88 (SS, 1993). En la actualidad no puede concebirse una agricultura productiva, de altos rendimientos, sin la utilización de los plaguicidas sintéticos (Dierksmeier, 2001).

Por desgracia, los beneficios aportados por los mismos han ido acompañados de una serie de perjuicios. En el caso de los plaguicidas, como cualquier otro tóxico, su utilización está asociada a un riesgo (Avery, 1998). Los plaguicidas han sido deliberadamente adicionados al ambiente causando serios efectos en este medio. La falta de especificidad de algunos plaguicidas y el irresponsable uso de los agroquímicos en ciertas regiones han originado diversos daños. Además de los efectos ecológicos en la zona de aplicación, es preciso tener en cuenta las consecuencias que se producen en lugares alejados (Carvalho, 1998). Expertos han estimado que solamente una pequeña fracción del plaguicida aplicado alcanza el sustrato de interés. El exceso de plaguicidas se mueve a través del ambiente contaminando los suelos, el aire, el agua y la biota (Carvalho, 1993). Pese a numerosos esfuerzos encaminados a una utilización más racional de los plaguicidas, los abusos y usos indebidos de los productos químicos agrícolas continúan siendo un grave problema en numerosos países, sobre todo de América Latina, Asia y Europa oriental (Dierksmeier, 2001).

1.2 Clasificación de los plaguicidas.

La regulación del empleo de plaguicidas se ha establecido con base en la actividad del ingrediente activo y su toxicidad, de esta forma se ha dividido a los plaguicidas en dos grupos:

a) De aplicación general (GUP, General Use Pesticide), que de acuerdo con la EPA (Environmental Protection Agency, EUA) pueden ser utilizados por el público en general, no es necesario estar certificado y son de uso no restringido.

b) Los de uso restringido (RUP; Restricted Use Pesticide), estos son de venta y de obtención restringida a aplicadores certificados o personas bajo supervisión directa de expertos (Kamrin, 1997).

Las palabras señal o de riesgo (Signal word) están basadas en la clasificación de su toxicidad según la EPA y éstas se incluyen en la legislación para los niveles de precaución hacia el

ingrediente activo contenido en los productos (Tabla 1) y en la probable toxicidad aguda en los seres humanos (determinada por ensayos en animales), daño potencial en ojos y piel, además de los efectos ecológicos como impacto en suelo y agua superficial (Kamrin, 1997).

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas con base en su toxicidad y señal de precaución (EPA, 2003)			
Clase de toxicidad	Rango de toxicidad	Palabra señal	Características de toxicidad aguda en animales experimentales ^a
I	Toxicidad elevada	Peligro de envenenamiento	LD ₅₀ oral: 0-50 mg/kg LD ₅₀ dérmica: 0-200 mg/kg LD ₅₀ inhalación: 0-0.2 mg/L Irritación en piel/ojos: severa
II	Toxicidad moderada	Advertencia	LD ₅₀ oral: >50-500 mg/kg LD ₅₀ dérmica: >200-2000 mg/kg LD ₅₀ inhalación: >0.2-2.0 mg/L Irritación en piel/ojos: moderada
III	Toxicidad leve	Precaución	LD ₅₀ oral: 500-5000mg/kg LD ₅₀ dérmica: >2000-20,000 mg/kg LD ₅₀ inhalación: >2.0-20 mg/L Irritación en piel/ojos: leve
IV	No tóxico	No requiere	LD ₅₀ oral: >5000 mg/kg LD ₅₀ dérmica: >20,000 mg/kg LD ₅₀ inhalación: >20 mg/L Irritación en piel/ojos: ninguna

^aCon relación a la toxicidad aguda e irritación de piel y ojos (Kamrin, 1997)

1.2.1 Clasificación por su naturaleza.

1.2.1.1 Plaguicidas biológicos.

Son seres vivos o productos derivados de éstos, que han mostrado ser eficaces para combatir organismos nocivos, entre éstos se encuentran especies que se comportan como enemigos naturales o depredadores, insecticidas virales, plaguicidas bacterianos y fúngicos, feromonas, hormonas de crecimiento y de la metamorfosis de insectos (Ferrer, 2003).

1.2.1.2 Plaguicidas químicos.

Naturales: Son extractos de plantas de tipo alcaloide (estricnina, nicotina) o no (piretrina, rotenona), aunque su uso ha sido reemplazado por productos químicos sintéticos.

Sintéticos: Según Reigart, 1999, dentro de los plaguicidas más utilizados en la actualidad, se destacan:

- a) **Carbamatos (ditiocarbamatos, tiocarbamatos):** en general son inhibidores de la enzima acetil colinesterasa; son fungicidas, herbicidas e insecticidas: carbaril, aldicab, molinate, propoxur, etc.
- b) **Compuestos nitrofenólicos y nitrocresólicos:** constituyen un grupo de fenoles substituidos, chermox PE, acetato de dinoseb, endoscan. Éstos son usados como herbicidas y muchos de los registros de éstos han sido cancelados por su impacto en la salud humana.
- c) **Piretroides sintéticos:** el grupo se distingue por que causan el síndrome T (tremor) y CS (coreoatetosis/salivación) en animales, algunos ejemplos de estos insecticidas son: aletrina, cipermetrina, permetrina, resmetrina, tetrametrina, ciflutrina.
- d) **Neonicotinoideos:** son derivados sintéticos de la nicotina y actúan en el sistema nervioso central de insectos, los principales compuestos son el imidacloprid, clotianidin, tiametoxam, acetamipridy tiacoprid.
- e) **Derivados bipiridílicos:** son herbicidas orgánicos de contacto; los más aplicados son: paraquat y diquat.
- f) **Derivados dicumarínicos:** son de tipo anticoagulante, derivados de la hidroxicumarina y sus análogos, como: difenacoum, warfarina, con acción raticida.

g) Derivados de los ácidos tetrónicos: Son de síntesis lipídica, y regulación del crecimiento, inhibidores de la acetil CoA carboxilasa, como spirodiclofén, spiromesifén, spirotetramat.

h) Anilino pirimidinas: Son funguicidas que funcionan como disruptores de la síntesis de aminoácidos y proteínas tales como: switch y scala.

1.2.2 Clasificación por su persistencia en el ambiente

Los plaguicidas que permanecen más tiempo en el ambiente tienen mayor probabilidad de interactuar con elementos bióticos y abióticos como el suelo, agua y aire. Si la vida media y la persistencia de los plaguicidas es mayor a la frecuencia con la que se aplican, tienden a acumularse tanto en los suelos como en la biota (Kamrin, 1997).

De acuerdo con Kamrin, 1997, los plaguicidas se clasifican con base a su periodo de persistencia en el ambiente como:

- a) ligeramente persistentes (menos de cuatro semanas).
- b) poco persistentes (de cuatro a 26 semanas).
- c) moderadamente persistentes (de 26 a 52 semanas).
- d) muy persistentes (más de un año y menos de 20 años).
- e) permanentes (más de 20 años).

1.2.3 Clasificación química

Esta clasificación se basa con mayor frecuencia en sus propiedades químicas y las plagas que eliminan. En general, se tiende a hacer clasificaciones mixtas por ambos criterios (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas por uso y grupo químico

INSECTICIDAS	HERBICIDAS	FUNGICIDAS
Organofosforados	Bipiridílicos	Organomercuriales
Organoclorados	Organoclorados	Metoxiacrilatos
Carbamatos	Tiocarbamatos	Triazoles
Piretroides	Sulfitos	Bencimidazoles
Neonicotinoides	Imidazolinonas	Derevados del benceno
Dicumarínicos	Triazinas	Ditiocarbamato
Nitroguanidinas	Acetanilidas	
	Benzonitrilos	

1.3 Efectos tóxicos de los plaguicidas

Los plaguicidas por sí mismos son tóxicos, pero el riesgo a la salud humana y animal varía dependiendo de diversos actores como el ingrediente activo, los componentes de mezclas; el tiempo de exposición, dieta, el estilo de vida entre otros. En este rubro se pueden distinguir dos tipos de riesgo:

- a) Envenenamiento agudo, que generalmente se da en su manejo y aplicación.
- b) Riesgos crónicos, por exposición a largo plazo en pequeñas concentraciones, ya sea por ingestión o contacto.

Los efectos genotóxicos de los plaguicidas en los animales incluyendo los seres humanos están dados por diversos factores tales como, tipo de compuesto químico, dosis, tiempo de exposición, ruta de entrada o absorción al cuerpo (Whitaker, 2004). Los riesgos a la salud pública de los plaguicidas no dependen solo de sus compuestos activos, sino también de otros factores como el nivel socio-económico de las personas, su estado de salud, entre otros (Whitaker, 2004).

Los grupos potencialmente expuestos a los plaguicidas según Mansour, 2004 son:

- a) Granjeros y/o agricultores
- b) Trabajadores y obreros de fábrica de plaguicidas.
- c) Población que habita en áreas de aplicación intensa de agroquímicos o cercanas a su producción.
- d) Población expuesta a alimentos contaminados por bioacumulación.

Datos epidemiológicos evidencian relación entre la exposición a los plaguicidas y efectos adversos a la salud como ceguera, enfermedades del hígado, alergias, asma, (Duramad *et al.*, 2007), inducción de malformaciones congénitas, alteraciones en la estructura del ADN como intercambios de cromátidas hermanas (Calderón-Segura *et al.*, 1999), aberraciones cromosómicas, aductos (Grove *et al.*, 2001), micronúcleos (Martínez *et al.*, 2009) y mutaciones (Mansour, 2004; Karabay y Oguz, 2005; Bull *et al.*, 2006).

Se ha publicado que la exposición a los herbicidas ácido fenóxicil y otros plaguicidas inducen linfoma de no-Hodgkin, sarcomas, cáncer en diversos órganos, leucemias (asociada a inmunosupresión), múltiples mielomas y tumores (Mansour, 2004). Algunos son disruptores endócrinos, los cuales están relacionados con desórdenes reproductores e inmunosupresión (Engel *et al.*, 2005). Se ha observado que algunos plaguicidas producen cáncer pulmonar y pancreático, sin embargo, son pocos los reconocidos como carcinogénicos directos por la Agencia para la Investigación sobre Cáncer (IARC), la mayoría se consideran activadores indirectos de cáncer (Caballo *et al.*, 1992; Agarwal *et al.*, 1994; Alavanja *et al.*, 2004; Mansour, 2004).

La población que probablemente tiene mayor riesgo a recibir los efectos de los plaguicidas es la ocupacionalmente expuesta. Según estimaciones anuales de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO por sus siglas en inglés) a nivel mundial, en la década de los ochenta se presentó un millón de casos graves no intencionales; de éstos el 70% ocurrió por exposición laboral (Hernández, 2007). Se ha documentado que en obreros de fábricas de plaguicidas, los índices de genotoxicidad son más elevados que en poblaciones no expuestas (Bull *et al.*, 2006). Por otro lado, los aplicadores y los floricultores tienen mayor riesgo al daño genético que los granjeros, como consecuencia de las condiciones de trabajo y manejo de los plaguicidas (Sailaja *et al.*, 2006). No solo existen casos de intoxicación por plaguicidas debido a factores ocupacionales o directos; estas sustancias químicas también contaminan los ambientes

terrestres y los acuáticos. Los suelos y la biota son los más afectados cuando se aplican directamente o se precipitan de la atmósfera, como consecuencia de las aspersiones aéreas, y por el riego se contamina los mantos acuíferos. Si la persistencia es mayor a la frecuencia con la que se aplica, el compuesto químico tiende a acumularse tanto en los suelos, mantos acuíferos así como en la biota, lo cual puede generar bioacumulación de agentes tóxicos en la cadena alimenticia incluyendo al ser humano (Badii *et al.*, 2006).

1.4 Efectos tóxicos de los plaguicidas en los ecosistemas acuáticos.

Los ecosistemas acuáticos son de suma importancia para el desarrollo de la vida, pues proporcionan el hábitat para la fauna y flora acuática, además de que son fuente de alimento y agua. Sin embargo, son altamente vulnerables por su tendencia a acumular contaminantes provenientes de los ecosistemas terrestres a su alrededor, así como las entradas directas (descargas), por lo que, independientemente de la fuente de la que provengan los contaminantes, los sistemas acuáticos son a menudo depósitos para una gran variedad de contaminantes (Ahmed *et al.*, 2011). La contaminación de estos ambientes puede tener efectos negativos sobre la vida acuática por ejemplo, la alteración de la reproducción de estos organismos y la disminución en las poblaciones de las especies, lo que amenaza la seguridad de las cadenas tróficas, y afecta directa o indirectamente a la población humana. La actividad agrícola se encuentra dentro de aquellas actividades que influyen en el deterioro de la calidad de las aguas. Los campos de cultivos generalmente están asociados a llanuras costeras y valles cruzados por ríos, por diferentes vías (Orta-Arrazcaeta, 2002). A estos ríos y zonas costeras llegan los residuos de los plaguicidas empleados en la protección de esos cultivos. En 1989 se estimó que el río Mississippi transportó hacia el Golfo de México, 430 toneladas de atrazina, a partir de los campos de cultivos de maíz ubicados cerca de la zona (Carvalho, 1998). La contaminación de los ecosistemas acuáticos por plaguicidas puede ser directa, por la aplicación

directa de plaguicidas usados en agricultura, o indirecta, por la movilidad de los compuestos aplicados desde el aire o directamente a los suelos. Esta contaminación puede alcanzar en ocasiones un elevado riesgo para la flora y la fauna de los ecosistemas acuáticos, produciendo la desaparición de especies y, como consecuencia, la pérdida de equilibrio en las cadenas tróficas. Además, puede provocar la reducción de la calidad del agua, como recurso utilizable, y la contaminación de los acuíferos, o de otros compartimentos ambientales, como el suelo (Barberá, 1989a). El ambiente acuático es altamente complejo y diverso, incluye distintos tipos de ecosistemas, corrientes de agua, lagos, ríos, estuarios, costas marinas y las aguas profundas de los océanos. Todos ellos tienen diferentes componentes bióticos y abióticos con características únicas (Rand, 1995). Los plaguicidas pueden llegar a estos ecosistemas por diferentes vías:

- a) deposición atmosférica.
- b) Efluentes industriales.
- c) Escorrentía.
- d) Lixiviación.
- e) Precipitación.
- f) descargas de corrientes de aguas.

La movilización de los plaguicidas con las aguas superficiales de ríos, arroyos y torrentes, permite el desplazamiento de estos compuestos hasta distancias considerables, respecto de la zona de aplicación. Además se producen procesos de acumulación, que tienen lugar cuando el contaminante transportado entra en los lagos, donde la corriente es menor y la sedimentación de los sólidos en suspensión se halla favorecida. La evolución de los plaguicidas en los ambientes

acuáticos está significativamente influenciada por factores abióticos (fotólisis, volatilización, hidrólisis y absorción) y bióticos (bioacumulación y biotransformación). El empleo incontrolado de estos compuestos puede sugerir grave riesgo y efectos negativos, tales como los residuos de plaguicidas, y sus metabolitos, en el ambiente y en los alimentos (Cebrián *et al.*, 1988). La presencia de estos residuos depende en gran medida del grado de persistencia de los plaguicidas, que es muy diverso; mientras unos se degradan con rapidez, otros son muy persistentes y para su desaparición, precisan de amplios periodos de tiempo. En muchos casos, el suelo y las aguas subterráneas se convierten en reservas ambientales de estos residuos, desde los cuales se pueden desplazar, a través de una gran variedad de rutas, a la atmósfera, aguas y organismos vivos, donde generan diferentes procesos de acumulación, degradación y disipación (Goodman *et al.*, 1992).

Los ecosistemas acuáticos se adaptan mediante una gran variedad de mecanismos físicos, químicos y biológicos a situaciones de estrés, como supone la presencia de sustancias tóxicas, sin serias implicaciones para la biota endémica, pero cuando la concentración de contaminantes tóxicos alcanzan niveles superiores a la capacidad de asimilación de los ecosistemas, aparecen importantes efectos en la supervivencia, desarrollo, reproducción o conducta (movilidad) de los organismos (Goodman *et al.*, 1992).

Hay que tener en cuenta que la contaminación de los ecosistemas acuáticos, por plaguicidas, produce una gran variedad de efectos, los cuales dependen de algunos factores básicos como la concentración de plaguicida, el tiempo de exposición, las características ambientales del ecosistema y la presencia de otros tóxicos. De igual manera, el efecto producido sobre la biota variarán según las especies de las que se trate, de la edad y de las condiciones de los organismos expuestos (Rand, 1995). Si dichos efectos son directos pueden producir la muerte y reducción del número de organismos afectados en un corto periodo de tiempo. Si por el contrario

los efectos son indirectos, su nivel de afectación se observa al transcurrir un cierto intervalo de tiempo tras la exposición, provocando la reducción de la densidad y competencia intra-específica, migración, recolonización y cambios en la diversidad de las especies del ecosistema.

1.4.1 Efectos ecológicos de los plaguicidas en ecosistemas acuáticos.

En un ecosistema acuático, los plaguicidas afectan particularmente a la base de la cadena trófica, los productores primarios, que son utilizados como alimento por los organismos filtradores (Ware *et al.*, 1970). El impacto completo o parcial de los plaguicidas sobre la población de una especie conduce a un desequilibrio de otras unidades del ecosistema que están en interacción (Mulla *et al.*, 1981).

La evaluación de los riesgos de los plaguicidas en ambientes acuáticos precisa información sobre su toxicidad. Los efectos ecológicos que producen dependen de su actividad biológica y de su estabilidad, que cambian en las diferentes condiciones ambientales. En ecosistemas naturales, próximos a zonas agrícolas, es probable que ciertos plaguicidas estén presentes a concentraciones bajas pero persistentes, causando efectos subletales (reproducción, desarrollo entre otros) en un gran número de especies del ecosistema. Sin embargo, hay que tener presente, que las complejas interacciones entre los plaguicidas y los componentes abióticos y bióticos del ecosistema pueden favorecer o disminuir su toxicidad sobre los organismos acuáticos (Mulla *et al.*, 1981).

Según Ran, 1995, la vulnerabilidad de un ambiente acuático a un compuesto químico depende de varios factores:

- a) Propiedades físico-químicas del compuesto y de sus productos de degradación.
- b) La concentración del compuesto en el medio acuático.

- c) Duración y tipo de entrada (aguda o crónica, descarga intermitente o continua).
- d) Propiedades del ecosistema.

La repercusión ecológica de estos contaminantes puede ir desde pequeños trastornos hasta grandes daños ecológicos, con repercusiones en los peces, las aves y mamíferos, y sobre la salud humana (Pimentel, 1997).

Los efectos ecológicos de los plaguicidas (y otros contaminantes orgánicos) son muy variados y están con frecuencia interrelacionados. Estos efectos varían según el organismo sometido a investigación y el tipo de plaguicida. Los distintos plaguicidas provocan efectos muy diferentes en la vida acuática, por lo que es difícil formular afirmaciones de alcance general. Lo importante es que muchos de estos efectos son crónicos (no letales), pasan con frecuencia desapercibidos al observador superficial, y sin embargo, tienen consecuencias en toda la cadena trófica, estos efectos son los siguientes:

- a) Inhibición o fracaso reproductor.
- b) Supresión del sistema inmune.
- c) Efectos teratogénicos.
- d) Problemas de salud.
- e) Efectos intergeneracionales.

Estos efectos no son causados necesariamente ni de forma exclusiva por la exposición a los plaguicidas u otros contaminantes orgánicos, pero pueden estar asociados a una combinación de factores ambientales que conllevan a que se originen dichos efectos (Fasulo *et al.*, 2010). Evaluar el impacto de la contaminación de origen humano en una población puede ser difícil por diferencias en la biodisponibilidad de contaminantes y las interacciones bioquímicas y

toxicológicas que pueden existir entre ellos (Fasulo *et al.*, 2010). Por lo que los organismos de vida silvestre pueden ser usados para revelar la presencia de contaminación ambiental y representan un buen modelo para realizar estudios de exposición y efecto a diferentes plaguicidas o a mezclas de ellos, ya que las mezclas de estos generan respuestas a cada uno de los grupos de contaminantes presentes en ellas (McKim y Lien, 2001), así como, revelar el riesgo en que se encuentran los organismos en su hábitat natural o en sitios potencialmente contaminados (Espinosa, 2009). Para poder evaluar el impacto de la contaminación en especies acuáticas, se deben seleccionar de acuerdo a los siguientes criterios: fácil mantenimiento y manipulación, biología conocida, amplia distribución geográfica, ciclo de vida corto y conocido, relaciones genéticas con otro grupos (Bozo *et al.*, 2007).

Los peces son comúnmente utilizados para el biomonitoreo de contaminantes en ecosistemas acuáticos, debido a que son vertebrados acuáticos que bioacumulan sustancias tóxicas, a través de la ingesta de sedimentos o alimentos contaminados (Osman *et al.*, 2012), tienen una amplia distribución, aunado a la diversidad e importancia que tienen en estos ambientes, ocupan diferentes niveles tróficos y están en contacto directo con los contaminantes (Osman *et al.*, 2012). Se ha visto que responden con gran sensibilidad a cambios en el ambiente acuático y a bajas concentraciones de contaminantes ambientales son especialmente sensibles a disruptores endocrinos (Wheeler *et al.*, 2005).

Estos organismos constituyen parte de la dieta de mamíferos acuáticos y aves, al igual que proporcionan una importante fuente de proteínas en la dieta humana (Oropesa, 2008). La toxicidad de los peces es la culminación de una serie de eventos relacionados con diversos procesos físicos, químicos y biológicos. Como se mencionó en párrafos anteriores los productos químicos que entran al ecosistema acuático provienen de diversas fuentes: efluentes industriales, deposición atmosférica, escorrentía; estos se distribuyen a lo largo de la columna de agua y sedimento, contaminando el alimento de los peces y a ellos mismos a través del contacto

con el agua y el sedimento (Oropesa, 2008). Se han realizados múltiples ensayos donde se ha utilizado a diversas especies de peces para el biomonitoreo de contaminantes en ecosistemas acuáticos.

II ANTECEDENTES

2.1 Insecticidas neonicotinoides.

Los neonicotinoides son la clase de insecticidas orgánicos sintéticos más importante en la última década, con una aplicación mundial en el 2005 del 17% del total de insecticidas procesados. Desde su aparición en 1991 en EUA, las ventas han sido estimadas en mil millones de dólares americanos (Matsuda *et al.*, 2001; Tomizawa y Casida, 2005). Estos insecticidas fueron sintetizados a partir de nicotinoides sintéticos derivados de la nicotina, que es un alcaloide del tabaco, el cual ha sido usado como insecticida minoritario principalmente en China. Debido a su poca eficacia y selectividad se realizaron intentos de mejorar su actividad, lo que condujo al descubrimiento de los neonicotinoides. El (2-di bromo-nitrometil-3-metilpiridina), fue descubierto en 1970 por la *Sell Development Company* en California, al modificar su estructura molecular optimizaron su acción, culminando con el plaguicida Niatiazin, insecticida de gran efectividad y superior a la del metilparation para el combate de la mosca casera (*Musca domestica*). Sin embargo, su foto inestabilidad provocó que decayera su comercialización como ingrediente activo de trampas para mosca (Tomizawa, 2003). Nihon Tokoshu Noyaku Seizo en Japón (Bayer Cropscience Japón), introdujo el grupo cloropiridinilmetileno, después de varios intentos se descubrió el insecticida neonicotinoide imidacloprid por Kabu en 1979 y fue patentado por Bayer Agrochem Japón en 1985 (Tomizawa y Casida, 2005), iniciando una nueva era en la producción de insecticidas neonicotinoides. Éstos insecticidas son utilizados principalmente como compuestos sistémicos para la protección de los cultivos agrícolas, estructuralmente

similares a los insecticidas nicotinoides, la diferencia primaria radica en la sustitución de una amina básica ionizable o imina en los nicotinoides, mientras que los neonicotinoides suelen tener sustituyentes nitrometileno ($C=CHNO_2$), nitroguanidina ($C=NNO_2$) y cianoamidina ($C=NCN$) (Tomizawa y Casida, 2005). Con base en estas diferencias los neonicotinoides se han subdividido en varios grupos: (a) Cloropiridinilos o cloronicotinilicos de primera generación, (b) los Clorotiazolicos de segunda generación y (c) los Tetrahidrofuranilos (Fig. 1).

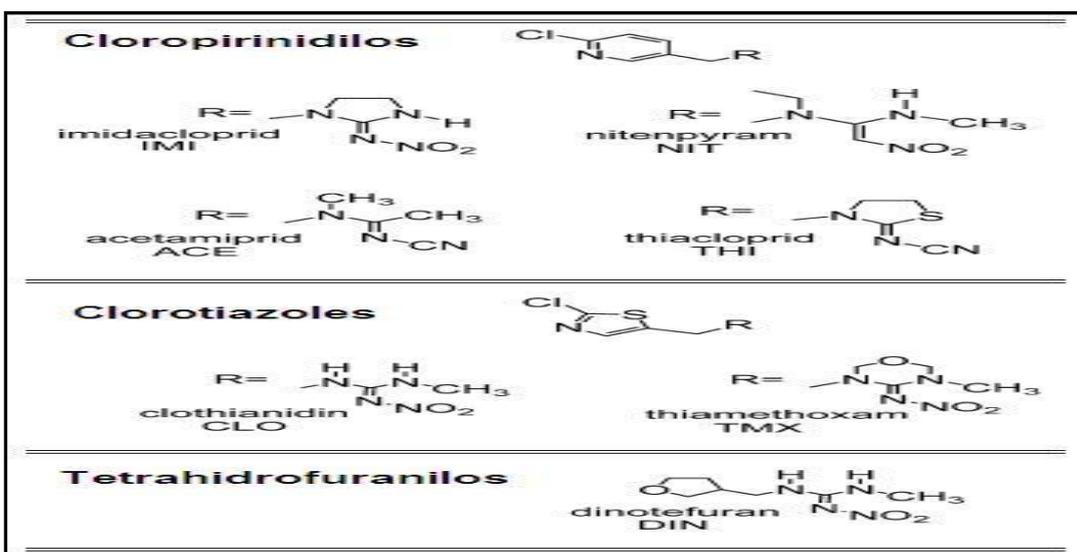


Figura 1. Grupos de insecticidas neonicotinoides: cloronicotinilicos; IMI, THI, NIT, ACE; clorotiazoles como CLO y TMX y tetrahidrofuranilos como el DIN (Ford y Casida, 2008).

El grupo de los insecticidas neonicotinoide cloropiridinil o cloronicotinilicos son empleados principalmente para cultivos agrícolas y control de ectoparásitos como áfidos, pulgas entre otros. Este grupo está representado por el imidacloprid, tiacloprid y acetamidaprid, insecticidas que tienen en común el grupo pirindilmetileno pero difieren por el grupo sustituyente nitroguanidina y cianoamidina en la porción acíclica o cíclica (Fig. 2). Los clorotiazoles, agrupan al clotianidin que es aplicado a semillas para el control del gusano trozador, la gallina ciega y el tiametoxam empleado principalmente en tratamiento foliar y en el suelo para combatir áfidos, mosca blanca, entre otros y los tetrahidrofuranilos como el dinitefuran que es un insecticida de amplio espectro

usado en vegetales y en interiores, y el nitempiram es aplicado para eliminar pulgas en perros y gatos (Ford y Casida, 2008).

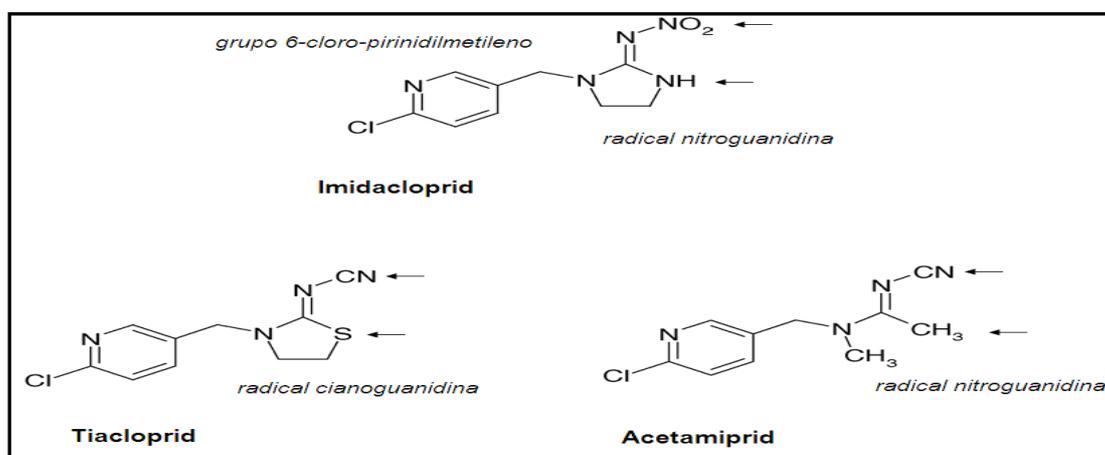


Figura 2. Estructuras químicas del imidacloprid, tiacloprid y acetamiprid, éstos tienen en común el grupo pirindilmetileno pero difieren por el grupo sustituyente nitroguanidina y cianoamidina en la porción acíclica o cíclica (Ford y Casida, 2006).

Los neonicotinoides actualmente son la mejor clase de insecticidas, debido a su baja toxicidad en mamíferos, nula acumulación en tejidos animales y en el ambiente, por lo cual el registro de nuevos neonicotinoides en diferentes presentaciones se ha elevado (Tabla 3).

Tabla 3. Neonicotinoides registrados o están por ser registrados.			
Ingrediente Activo	Nombre común	Compañía	Usos
Imidacloprid	Admire	Bayer	En el surco (al sembrar)
	Gaicho	Gustafson	Tratamiento de semillas
	Génesis	Gustafson	Tratamiento de semillas
	Provado	Bayer	Foliar
	Leverage ¹	Bayer	Foliar
Tiamethoxam	Pasada, Alias	Makhteshim	Foliar y suelo
	Couraze	Cheminova	Foliar y suelo
Acetamiprid	Assail	Cerexagri	Foliar
	Calypso	Bayer	Foliar y en suelo
	Poncho	Bayer	Tratamiento de semillas
Clotianidin	Belay ²	Arvesta	En el surco (al sembrar)
	Clutch ²	Arvesta	Foliar
	Venom ²	Valent	En el surco (al sembrar)/ foliar

¹ (mezcla con ciflutrina), ² (aún no registrado)
(National Potato Council, 2006).

Los beneficios que tienen los insecticidas neonicotinoides son (Bolboaca y Jäntschi, 2005):

- a) Pocos efectos tóxicos para los seres humanos y para el ambiente.
- b) Son asperjados sobre superficies a bajas concentraciones por acre.
- c) Son solubles en agua y altamente sistémicos en semillas.
- d) Son de gran eficacia para controlar y/o erradicar insectos.
- e) La forma de aplicación ayuda a minimizar los posibles efectos al ambiente.
- f) Son de fácil aspersión y manipulación ya que no requieren de equipo especial.
- g) Sin problemas para ser transportados y/o almacenados.
- h) No tienen olores desagradables.
- i) Son de bajo costo.

Los principales insectos blanco de los neonicotinoides son: pulgón, escarabajo y moscas blancas, tanto de plantas como de animales. Su eficacia es debida a su movilidad en la planta (sistémico) y a su solubilidad en el agua (Tomizawa y Casida, 2003). Al aplicar un neonicotinoide a semillas, suelo o follaje, la planta es capaz de absorber y transportar el plaguicida hacia los tallos en crecimiento, produciendo mayor protección a largo plazo contra los insectos, permaneciendo en la planta hasta por 40 días (Tomizawa y Casida, 2005).

A pesar de los múltiples beneficios que se han mencionado de esta clase de insecticidas, también se han registrado alteraciones en el ambiente donde esta clase de insecticida es utilizada. Un estudio reciente de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) describió un informe de insecticidas de Bayer, tales como el imidacloprid y clotianidin, como un riesgo para numerosos animales. El estudio reveló que estos productos químicos pueden potencialmente causar efectos tóxicos para los polinizadores que no son objetivos de estos plaguicidas, así como para animales como mamíferos, peces, aves y otras especies de invertebrados. Los estudios de laboratorio han demostrado que estos productos químicos

pueden causar la pérdida de sentido de dirección, afectar la memoria y el metabolismo cerebral, y mortalidad por las causas mencionadas.

Debido a su alto nivel de persistencia, los neonicotinoides pueden permanecer en el suelo durante varios años. Por lo tanto, los cultivos sin tratar con el insecticida, sembrados en campos donde los insecticidas fueron utilizados anteriormente pueden adquirir las toxinas del suelo a través de sus raíces.

En 2008 en Baden-Wuerttemberg, en el sur de Alemania, dos tercios de la población de abejas a lo largo del río Rin, murió cuando se aplicó clotianidín en el tratamiento de semillas de maíz en campos vecinos de maíz. Esto dio lugar a una pérdida media de 17.000 euros para los apicultores afectados. Las pruebas en las abejas muertas mostraron que el 99 por ciento tenía una acumulación de clotianidín, así como otros animales de la zona tales como mariposas, y diversos polinizadores, estos estudios enmarcan el riesgo de utilizar insecticidas neonicotinoides para diversas especies. (AGRO - PRENSA, 2012).

2.1.1 Mecanismo de acción

Los neonicotinoides actúan de modo selectivo e irreversible sobre los receptores nicotínicos de la acetilcolina en las células nerviosas de los insectos, paralizándolos y provocando su muerte.

Son una clase de plaguicidas que están químicamente relacionados con la nicotina, la mayoría de los neonicotinoides son insecticidas de amplio espectro que actúan por contacto o por ingestión.

Los insecticidas neonicotinoides tienen acción sobre el sistema nervioso central como agonistas parciales, súper agonistas y antagonistas del receptor de la acetilcolina-nicotínico (nAChR) de insectos y mamíferos. La acetilcolina (ACh) es el antagonista endógeno y neurotransmisor del sistema nervioso colinérgico (Tomizawa y Casida, 2003). Los neonicotinoides interactúan a nivel

de receptores nicotínicos post-sinápticos en el dominio extracelular del complejo nAChR y del canal iónico, posteriormente un cambio conformacional abre el canal promoviendo la entrada de Na^+ y la salida de K^+ . En los insectos el nAChR, está distribuido extensamente en el sistema nervioso central (Ihara *et al.*, 2007).

La acción de los neonicotinoides en este complejo produce una respuesta bifásica de descarga espontánea que es seguida de un bloqueo completo en la propagación del impulso nervioso que lleva a la acumulación de acetilcolina, lo cual genera parálisis y la muerte (Karabay y Oguz, 2005). Así los neonicotinoides son más afines al receptor de acetilcolina-nicotina que la misma acetilcolina y tienen mayor selectividad para los insectos que para mamíferos (Tomizawa *et al.*, 2000). No obstante se ha observado que algunos metabolitos resultantes del imidacloprid son menos selectivos para insectos que el compuesto original (Tomizawa *et al.*, 2000).

2.1.2 Efectos tóxicos.

Se ha demostrado que los insecticidas neonicotinoides tienen mayor afinidad por los insectos que por los mamíferos; sin embargo, las aves y los peces son extremadamente sensibles a los neonicotinoides, teniendo la LD_{50} de 49 mg/kg y en peces de 31 mg/kg comparada con la LD_{50} de 640 mg/kg en ratones. Una desventaja es que varios neonicotinoides son extremadamente dañinos para abejas por contacto directo y por ingestión, lo que afecta tanto a la apicultura como a los ecosistemas (Tomizawa y Casida, 2005). La toxicidad en mamíferos es similar a la de los insecticidas nicotinoides, su acción antagónica y afinidad a los receptores nAChR determina su órgano blanco, el cerebro. A exposiciones crónicas, los insecticidas neonicotinoides y algunos de sus metabolitos, autorregulan los niveles del nAChR, alterando los sitios de unión, además modifican las vías de traducción de señales intracelulares tales como la cascada de la proteína cinasa C (Tomizawa y Casida, 2005).

Por otro lado, se ha observado que esta clase de plaguicidas causan tumores en tiroides, útero de rata y en ovarios de ratón a dosis de 1.2 mg/kg por día, por lo que se les considera como potentes carcinógenos a exposiciones continuas, además de tener efectos genotóxicos *in vitro* (Caderón-Segura *et al.*, 2012) e *in vivo* (Calderón-Segura *et al.*, 2015) y mutagénicos (Tomizawa y Casida, 2005). El tiacloprid y el tiametoxam son clasificados como carcinógenos en humanos (Tomizawa y Casida, 2005), el imidacloprid induce malformaciones espermáticas en *Eisenia fetida* (Zang *et al.*, 2000), es potencialmente clastogénico e incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas en médula ósea de rata, intercambio de cromátidas hermanas y es positivo en la prueba de micronúcleos en cultivo de linfocitos humanos (Karabay y Oguz, 2005), se ha reportado que producen micronúcleos en eritrocitos de rana y daño al ADN detectado por el ensayo cometa alcalino (Feng *et al.*, 2004). El acetamiprid es genotóxico y citotóxico en linfocitos humanos *in vitro* (Kocaman y Topaktas, 2007).

2.2. Poncho® (Clotianidin), insecticida neonicotinoide comercial.

Poncho® es un insecticida que tiene como ingrediente activo el clotianidin -C₁₀H₉ClN₄S- (Fig. 3), que fue patentado por CropScience Bayer EUA, en 1985, junto con otros neonicotinoideos como el imidacloprid. El clotianidin es un insecticida neonicotinoide comercializado también en otras presentaciones como: Belay y Cloch, TI-435, Clotianidin 600 FS. Pertenece al subgrupo de los clorotiazoles con un grupo guanidina. Su nombre químico es (E)-1-(2-Cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-3-metil-2-nitroguanidina (IUP) (EPA, 2003). Poncho es un insecticida de acción sistémica y de contacto para el tratamiento de semillas de maíz; es utilizado en México, por los agricultores del Bajío, La Ciénega y el Occidente; es de amplio espectro para plagas de insectos (National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals 2001; (Tomizawa y Casida,

2005) para erradicar al gusano trozador *Agrotis sp.* (*Gallina ciega*) y *Phyllophaga spp.* (Bayer CropScience México, 2008).

Después de la ingestión, poncho es rápidamente absorbido, metabolizado por el cuerpo y excretado principalmente en la orina. Es moderadamente tóxico por ingestión oral y por inhalación, poco agudo en toxicidad dérmica, no irrita la piel, pero es ligeramente dañino para los ojos (NRAAVC 2001; Tomizawa y Casida, 2005). El hígado es el principal órgano blanco de Poncho en mamíferos, donde es metabolizado y produce alteraciones de la actividad de algunas hormonas esteroides. También tiene efectos en las glándulas tiroides y adrenales, como consecuencia, incrementa la actividad hepática. Se ha observado gran incidencia de tumores en útero, ovarios y tiroides en ratas y ratones expuestos al tiacloprid sin embargo, no existe información concluyente sobre su efecto genotóxico (NRAAVC, 2001; Tomizawa y Casida, 2005).

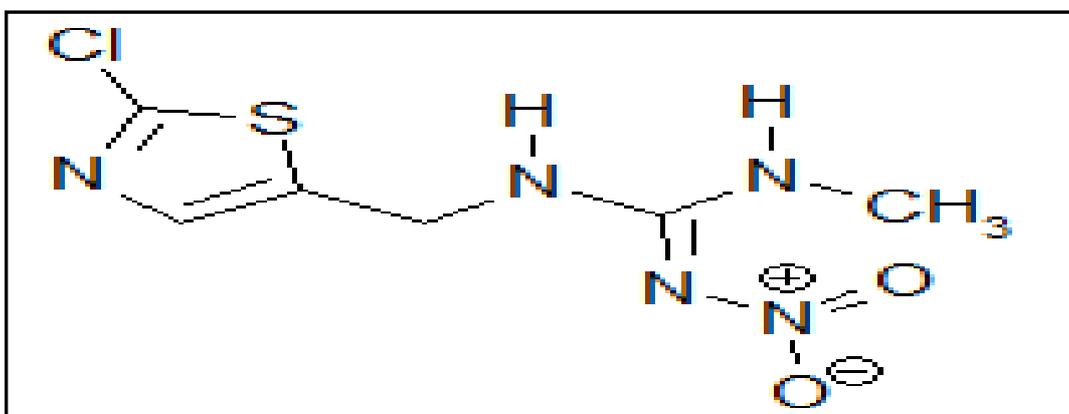


Figura 3. Estructura química de los insecticida neonicotinoide Clotianidin (CLO) Tomizawa y Casida, 2005).

2.2.1 Mecanismo de acción de Clotianidin.

El Clotianidin es un insecticida desarrollado por Takeda Chemical Industries y Bayer AG. Similar a tiametoxam y el imidacloprid. Los neonicotinoides son una clase de insecticidas que son químicamente similares a la nicotina, que se ha utilizado como un plaguicida desde finales de

1700. Clotianidin y otros neonicotinoides actúan sobre el sistema nervioso central de los insectos como un agonista de la acetilcolina, el neurotransmisor que estimula nAChR, apuntando el mismo sitio del receptor y los receptores de acetilcolina de post-sinápticos de activación pero no la inhibición de la AChE. Se ha pensado que la ventaja de clotianidin y otros neonicotinoides es que son menos propensos a degradarse en el ambiente. Estudios recientes muestran que el polvo de agroquímicos liberados en el período de siembra puede persistir en los campos cercanos durante varios años y ser tomado por las plantas no diana, que luego se polinizaban por abejas y otros insectos.

2.2.2 Metabolismo de Clotianidin.

La ruta metabólica de clotianidin esta descrita con base en pruebas experimentales realizadas en ratones expuestos a 20 mg/kg de chlorothiazolymethyl (clotianidin CLO) durante 4 horas, para la caracterización de los metabolitos se realizó una análisis farmacocinético en hígado y orina (Yokuta, 2003).

El compuesto original CLO es excretado en un 19% a un 55% sin metabolizar y está presente en cantidades más grandes que los metabolitos por lo menos los primeros 60 minutos posteriormente es excretado como un metabolito (desmetil-clotianidin CLOdm) (Figura 4). Los principales metabolitos a los 120 min se generan de la siguiente manera: de clotianidin (CLO) a desmetil-clotianidin (CLO-dm), a clotianidin-nitrosoguanidina derivado (CLO-NNO), a clotianidin-urea (CLO-urea), a chlorothiazolymethyl (CTM) y finalmente a chlorothiazolecarboxaldehído (CTM-a) (Ford y Casida, 2006b).

Se estableció que el metabolismo de CLO, implica la interacción del citocromo P450s para la reducción de CLO a CLO-NNO. La toxicidad de clotianidin se atribuye principalmente a su acción como agonista nicotínico de manera directa o en forma de metabolito. En donde CLO y el metabolito CLO-dm son muy persistentes en el hígado, ambos pueden interactuar e inducir

hepatotoxicidad, principalmente CLO-dm a través de la inhibición de la sintasa, el mecanismo de inhibición es desconocido pero de gran relevancia toxicológica (Ford y Casida, 2006b).

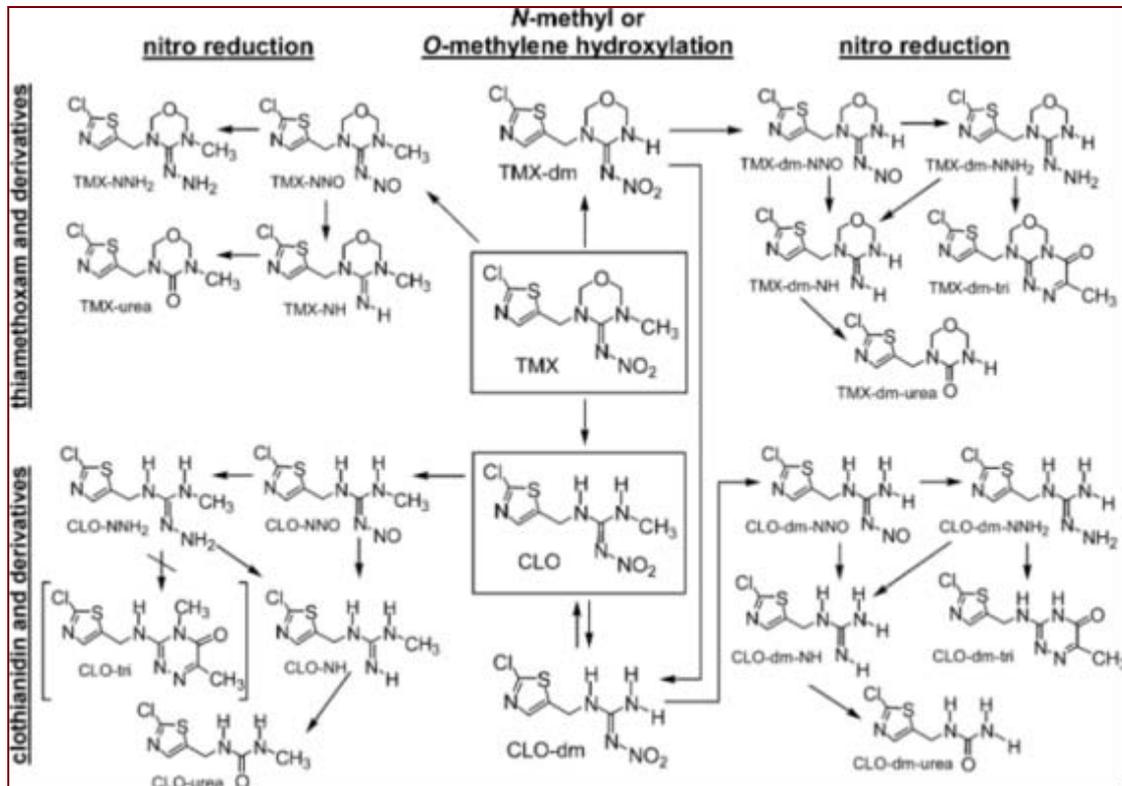


Figura 4. Metabolismo de clotianidin CLO Ford y Casida, 2006b.

2.3 Biomarcadores.

Un biomarcador es una respuesta biológica a un químico o químicos que da una medida de la exposición, y algunas veces también del efecto tóxico (Handy *et al.*, 2003). Los biomarcadores son los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o marcador de la exposición a un agente tóxico (Handy *et al.*, 2003; Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

El monitoreo ambiental a través de los parámetros de evaluación de biomarcadores en diferentes especies es una herramienta útil. Tiene la ventaja de proporcionar una respuesta cuantitativa, así como valiosa información de relevancia ecológica sobre los efectos crónicos adversos causados

por la contaminación del agua (Handy *et al.*, 2003). Las dos características más importantes de los biomarcadores son la identificación de las interacciones entre el contaminante y el organismo, y la medición de efectos subletales.

Por análisis químico solo puede medirse una fracción de los contaminantes presentes sin evidenciar los efectos adversos. Los biomarcadores, por su parte, indican la presencia de contaminantes tanto conocidos como no identificados (Bozo *et al.*, 2007).

Aunque algunos de los biomarcadores pueden ser difíciles de clasificar, suelen separarse en biomarcadores de exposición, biomarcadores de efecto y biomarcadores de susceptibilidad (Bozo *et al.*, 2007).

Un biomarcador de la exposición puede ser un compuesto exógeno que se introduce en el cuerpo, un producto interactivo entre el compuesto y un componente endógeno, o cualquier otro hecho relacionado con la exposición. Lo más habitual es que los biomarcadores de exposición a compuestos estables, como los metales, comprendan mediciones de las concentraciones del metal en muestras apropiadas, como la sangre, el suero o la orina. En el caso de las sustancias volátiles puede evaluarse su concentración en el aire espirado (tras la inhalación de aire libre de contaminación). Si el compuesto se metaboliza en el cuerpo, pueden elegirse uno o varios metabolitos como biomarcadores de la exposición; los metabolitos suelen determinarse en muestras de orina (Handy *et al.*, 2003).

Los biomarcadores de efecto pueden ser componentes endógenos o medidas de la capacidad funcional, o cualquier otro indicador del estado o equilibrio del cuerpo o de un sistema orgánico afectado por la exposición. Los biomarcadores de efecto pueden ser específicos o no específicos. Los específicos son útiles porque indican un efecto biológico de una exposición concreta, por lo que aportan datos que pueden ser valiosos de cara a la prevención. Los biomarcadores no específicos no indican una causa individual del efecto, pero pueden reflejar el

efecto total integrado debido a una exposición combinada. No hay una distinción clara entre biomarcadores de la exposición y del efecto. Los biomarcadores de efecto suelen indicar cambios en las funciones de las células, de los tejidos o del cuerpo en su conjunto (Bozo *et al.*, 2007).

Biomarcador de susceptibilidad sea heredada o inducida, es un indicador de que el individuo es especialmente sensible al efecto de un compuesto o a los efectos de un grupo de compuestos. Se ha hecho hincapié sobre todo en la susceptibilidad genética, aunque hay otros factores que pueden tener al menos la misma importancia. La hipersusceptibilidad puede deberse a un rasgo heredado, a la constitución del individuo o a factores ambientales.

De acuerdo con Schlenk *et al.*, 2008, los usos potenciales de los biomarcadores en estudios de campo son;

- a) Para evaluar el efecto de un químico desconocido o una mezcla de productos químicos.
- b) Para demostrar biodisponibilidad o ausencia.
- c) Para demostrar el curso temporal de la absorción.
- d) Proporcionar oportunidades *in vitro* de comprensión de mecanismos.
- e) Priorizar sitios, contaminantes o muestras que requieran futuros análisis.
- f) Para evaluar el curso temporal o éxito de remediación.
- g) Para llevar a cabo vigilancia de los contaminantes presentes.

Las ventajas y limitaciones de los biomarcadores frente a los análisis químicos convencionales se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Ventajas y limitaciones del uso de biomarcadores (Bozo *et al.*, 2007).

Ventajas	Limitaciones
Proveen una medida integrada de la biodisponibilidad de los contaminantes en el tiempo.	Imposibilidad de controlar cambios en las variables ambientales.
Ayudan a establecer la importancia de diferentes rutas de exposición.	En algunos casos baja especificidad del biomarcador.
Permiten la integración de interacciones de mezclas de contaminantes para rendir una expresión del efecto acumulativo a nivel molecular, celular o tisular.	Es necesario contar con experiencia técnica y equipos adecuados para obtener e interpretar los resultados.
El potencial de integración en los diferentes niveles de organización biológica puede predecir, a corto plazo, los efectos ecológicos que se producirán a largo plazo.	Muchas veces no está claramente establecida la relación dosis-respuesta.
Permiten detectar la exposición a tóxicos y metabolitos rápidamente metabolizables y eliminados.	En algunos casos no hay comprensión del mecanismo involucrado.
Son el reflejo de la exposición a contaminantes ambientales.	

2.4 Pez cebra (*Danio rerio*) como modelo animal.

El pez cebra (*Danio rerio*) está siendo cada vez más utilizado como un sistema para estudiar los efectos de los contaminantes, especialmente por mezclas de compuestos químicos, como los plaguicidas y para la evaluación del efecto de fármacos. Es muy apropiado para estudios de genética, embriología, desarrollo, biología celular y para estudiar enfermedades en humanos debido a que tiene homólogos cercanos a muchas proteínas humanas y genes con homología a rutas apoptóticas en mamíferos (Parrng *et al.*, 2002)

El pez cebra habita naturalmente los ríos del norte de India, Paquistán y Nepal, pertenece a la familia *Cyprinidae*, actualmente es un pez ornamental encontrándose difundido por todo el

mundo con fines experimentales (Parrng *et al.*, 2002). Es un organismo modelo ideal para estudiar la genética y el desarrollo de algunos vertebrados debido a que la embriogénesis ocurre externamente, además de que los embriones son transparentes lo que permite observar en el microscopio todos los estadios de su desarrollo y seguir con detalle las primeras divisiones celulares y la formación de las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) (Maldonado, 2003). El desarrollo de este organismo es rápido y a las 24 horas ya se aprecia la diferenciación del sistema nervioso como el tubo neural, la notocorda y las somitas (precursores de músculo y esqueleto). Para los cinco días de desarrollo se han formado órganos sensoriales como los ojos y los oídos. Asimismo, han aparecido el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además de que los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales. En este momento el pez es perfectamente capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos y comienza a nadar buscando alimento (Kimmel *et al.*, 1995).

Los análisis genéticos y la disponibilidad de material biológico se facilitan por la cantidad de embriones (entre 100 y 200 individuos) que una sola pareja de peces puede producir cada semana. El pez cebra es diploide y con ciclos generacionales cortos (de 2 a 3 meses), los adultos tienen un tamaño de 3 centímetros, por lo que en un laboratorio acondicionado con 50 tanques se puede albergar una colonia de al menos 500 peces. Aunado a esto, el genoma completo del pez cebra se está secuenciando y ya existen mapas muy precisos de marcadores genéticos (Maldonado, 2003). Las características anteriormente mencionadas han popularizado el uso de esta especie como modelo biológico, siendo empleado para la evaluación y el biomonitoreo de contaminantes en ecosistemas acuáticos. Estas pruebas pueden ser realizadas en un formato miniaturizado, que reduce las cantidades de productos químicos para desplegar el volumen de residuos potencialmente peligrosos (Lammer *et al.*, 2009).

El pez cebra es un modelo ampliamente utilizado (para estudiar diversas enfermedades humanas así como un marcador de contaminación, evaluación de fármacos, formación del

sistema nervioso, definición de los ejes embrionarios, entre otros que ha permitido el entendimiento de varios fenómenos biológicos en los vertebrados (Maldonado, 2003). Existen diversos ensayos donde se ha utilizado al pez cebra como modelo biológico para la evaluación de la toxicidad de plaguicidas, en donde se ha validado a este modelo como un sistema que puede responder a diversos contaminantes (Tabla 5).

Tabla 5. Ensayos con pez cebra (*Danio rerio*) como modelo biológico para la evaluación de la toxicidad de plaguicidas.

PLAGUICIDA	CLASE Y FORMULA QUIMICA	RESULTADOS	REFERENCIA
Acetofenona (insecticida)	$C_8H_8O/C_6H_5COC H_3$	Embriones en estadio de (blástula) fueron expuestos durante 96 horas a 2 ml del insecticida acetofenona, los cuales mostraron edema pericárdico, el eje central curvado y frecuencia cardíaca media en comparación con los testigos negativos	Xu <i>et al.</i> , 2008
Aldrin (insecticida)	Organoclorados $C_{12}H_8Cl_6$	Jóvenes expuestos durante 7 días con recambios del compuesto cada 24 horas, a las concentraciones de 1.0, 10.0 $\mu g/l$, del insecticida aldrin, mostraron alteraciones en la proliferación celular, anomalías del epitelio y dilatación de los capilares en las agallas comparados con el grupo testigo negativo	Eler <i>et al.</i> , 2007
Atrazina (herbicida)	Triazinas $C_8H_{14}CLN_5$	Embriones de 30 hpf, expuestos durante 28 días a 0.3, 3, 30 y 90 g/L del herbicida atraz.na, manifestaron aumento en los niveles de antioxidantes endogenos como súper oxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), catalasa CAT, glutatión S-transferasa (GST) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), con respecto al testigo negativo.	Blahová <i>et al.</i> , 2013.

Bifentrina (insecticida)	Piretroide sintético $C_{23}H_{22}ClF_3O_2$	Embriones de 3 estadios de desarrollo expuestos durante 96 horas a 50, 100 y 200 mg/L bifentrina mostraron movimientos incontrolados de la cola, curvatura del eje del cuerpo y edema pericárdico comparados con el grupo testigo.	Jin <i>et al.</i> , 2009.
Carbaril (insecticida)	Carbamatos $C_{12}H_{11}NO_2$	Embriones de desarrollo temprano expuestos durante 144 horas con observaciones cada 24 horas, a diluciones 1/1000, 1/750, 1/500, y 1/250 ppm del insecticida carbaril, mostraron retraso en el desarrollo embrionario comparado con el grupo testigo.	Todd <i>et al.</i> , 2001
Cipremetrina (insecticida)	Piretroide sintético $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	Adultos de 2, 4 y 8 días fueron expuestos durante 2 horas a 0.1, 0.3 y 3 g/L ⁻¹ , del insecticida cipermetina, mostraron inducción de daño en el ADN, apoptosis vía estrés oxidante en hepatocitos.	Jin <i>et al.</i> , 2010.
Clorpirifos (insecticida)	Organofosforado $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	Adultos hembras y machos expuestos durante 5 días a 0.01, 0.1 y 1 mg/L ⁻¹ , del insecticida clorpirifos, incremento de la actividad del citocromo P450 en ambos sexos con reducción de la actividad de enzima catalasa e incremento de especies reactivas de oxígeno en hepatocitos comparado con los grupos testigos.	Wang <i>et al.</i> , 2014
Deltametrina (insecticida)	Piretroide sintético $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	Embriones de 3 hpf expuestos durante 21 horas, a una proporción de (1: 10.000) del insecticida deltametrina mostraron, edema pericárdico, curvatura del eje y malformaciones cranofaciales comparados con el grupo testigo.	Ademicco <i>et al.</i> , 2009.

Diazinon (insecticida)	Organofosforado $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	Cigotos expuestos durante 96 horas a 0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg/L del insecticida diazinon, las alteraciones mostrados fueron disminución significativa de la frecuencia cardiaca, edema pericárdico, curvatura anormal de la columna y la tasa de eclosión se vio afectada en comparación con los peces grupo testigo negativo.	Scheil <i>et al.</i> , 2008.
Diclorvos (D.D.V.P) (insecticida)	Organofosforado $C_4H_7Cl_2O_4P$	Embriones de 1 hpf expuestos por 96 hpf a 5, 10, 25, 50, 100 mg/L ⁻¹ del insecticida diclorvos evidenciaron edema pericárdico, deformaciones en cola y reducción significativa en la actividad de la natación comparado con el grupos testigo.	Tsis man <i>et al.</i> , 2010
Dicloroanilina (herbicida)	$C_6H_5Cl_2N$	Cigotos expuestos durante 96 horas a 0.5, 0.7, 1.0, 1.5 y 3 mg/L del herbicida dicloroanilina, mostraron al término de la exposición; edema pericárdico y curvatura anormal de la columna comparado con los grupos testigos.	Scheil <i>et al.</i> , 2008.
Difenoconazole (Fungucida)	Triazoles $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	Embriones de pez cebra de 1 hpf, larvas y adultos expuestos durante 24 horas a 0.5, 1, 1.5, 2.0 2.5, y 3 mg/L, del fungicida difenoconazole, produjeron disminución del ritmo cardiaco, reducción de la longitud del cuerpo y disminución del movimiento comprado con el grupo testigo.	Mua <i>et al.</i> , 2012.
Endosulfan (insecticida)	Organoclorado $C_9H_6Cl_6O_3S$	Se utilizaron células hepáticas de machos y hembras adultos de pez cebra expuestos a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 1 µg/L ⁻¹ del insecticida endosulfan, se observó que la actividad de las enzimas CAT y SOD de células hepáticas aumento, así como la se presentó un aumento de ROS e inducción de daño al ADN comparado con los grupos de los testigos.	Bo Shao <i>et al.</i> , 2012.

Fenvalerato (insecticida)	Piretroide $C_{25}H_{22}ClNO_3$	Adultos de 8 dpf fueron expuestos durante 24, 48, 72 y 96 horas a las concentraciones finales de 0, 6, 25, 12, 5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/L}$, del insecticida fenvalerato, al término de la exposición se observó una curvatura anormal del eje central de los peces, alteración de la actividad de la enzima súper oxido dismutasa (SOD) y apoptosis principalmente en el cerebro comparado con los grupos testigos.	Aihua Gu <i>et al.</i> , 2010.
Finopril (insecticida)	Fenilpirazola $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$	Embriones de 30 y 48 hpf expuestos durante 8 horas a la concentración de 0.5 mg/L del insecticida Finopril mostraron; reducción de la longitud del cuerpo, degeneración de la notocorda, morfología anormal del musculo axial y defectos en la función sensoriomotora comparado con los grupos testigos.	Carla M <i>et al.</i> , 2006.
Hexaconazole (funguicida)	Triazol $C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$	Embriones de estadio blástula expuestos hasta las 120 hpf a 0.625, 1.25, 2.5 mg/L del fungicida hexaconazole, para medir la actividad de la hormona tiroidea T3 y T4, redujeron significativamente los niveles de T4 y aumento en las concentraciones de T3 a elevadas concentraciones del fungicida comparados con los grupos testigos.	Yua <i>et al.</i> , 2013
Pentaclorofenol (insecticida)	Organoclorado C_6HCl_5O	Adultos fueron expuestos durante 96 horas a 0.05, 0.10, 0.12, 0.14, 0.18, 0.20 y 0.25 mg/L de pentaclorofenol indujeron mutaciones del gen P53 en hepatocitos y células de la aleta caudal comprado con los testigos.	Yin <i>et al.</i> , 2006.

Permetrina (insecticida)	Piretroide $C_{12}H_{20}Cl_2O_3$	Embriones de 3 hpf, expuestos durante 24 horas a 100, 200, 300, 400, 600, 800, $\mu\text{g L}^{-1}$ del insecticida permetrina, ocasionaron edema pericárdico, curvatura de la cola, espasmos incontrolados, y anomalías en la vejiga natatoria, los efectos observados fueron dependientes de la concentración	Yang <i>et al.</i> , 2013.
Propoxur (insecticida)	Carbamato $C_{11}H_{15}NO_3$	Cigotos expuestos durante 5 días a 25, 50, 100, 200, 400 y 800 $\mu\text{g/ ml}$ del insecticida propoxur, mostraron desaceleración de la epibolia comparado con el grupo testigo, a las 12 hpf causaron edema del saco vitelino, edema pericárdico, alteraciones en la forma del cuerpo apoptosis y daño en ADN.	Raj <i>et al.</i> , 2013.
Toxafeno (insecticida)	Organoclorado $C_{10}H_{10}Cl_8$	Hembras adultas expuestas durante 2 semanas a 1.5, 15 y 150 μg del insecticida toxafeno, mostraron afecciones en el índice gonodosomatico, disminución de la tasa de ovoposición y alteraciones en el desarrollo comparados con el grupo testigo.	Goverdina <i>et al.</i> , 1996

2.4.1 Estadios del desarrollo de pez cebra (*Danio rerio*).

Según lo descrito por Kimmel *et al.*, 1995, el desarrollo embrionario de pez cebra se ha dividido en 7 periodos; cigoto, segmentación (en donde se llevan a cabo las divisiones tempranas), blástula, gástrula, segmentación, faríngrula y eclosión. El periodo de cigoto comprende desde que el huevo es fertilizado hasta que ocurre la primera división celular, alrededor de 40 minutos después de que ocurre la fertilización, el periodo de segmentación (de divisiones tempranas), se considera a partir de la primera división celular, estas divisiones son sincrónicas y el citoplasma experimenta una división meroblástica (división celular incompleta) debido a que los blastómeros

quedan conectados por puentes citoplasmáticos este periodo tiene una duración aproximada de 0.75 a 2.25 hpf. Blástula (2.25 – 5.25 hpf) inicia a partir de que el blastodisco (parte superior del citoplasma que se segrega del vitelo hacia el polo animal) toma una forma de circular hasta la gastrulación. La gastrulación (5.25 – 10.33 hpf) se define por la presencia de movimientos morfogénéticos que permiten formar las capas germinales primarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) y los ejes embrionarios. En la fase de segmentación (10.33 – 24 hpf), se comienza a formar las somitas precursores del músculo y el esqueleto desde el tronco hasta la cola, siendo visibles los primordios de algunos órganos, este periodo contiene las siguientes etapas (Kimmel *et al.*, 1995).

Etapas 1-4 somitas (10.33 hpf): Se observan las primeras formas del surco somítico, después de la finalización de la epibolia comienza la aparición de cola y de la placa neural (Kimmel *et al.*, 1995).

Etapas 6 somitas (11.6 hpf): Se pueden observar la formación de los primeros pares de 5 a 6 somitas que se desarrollan alrededor de 3 por hora, la longitud del embrión es de aproximadamente 0.8 mm. El primordio del cerebro comienza a hacer su aparición en la quilla neural y comienza a distinguirse el primordio óptico desde una vista lateral-dorsal (Kimmel *et al.*, 1995).

Etapas 14 a 19 somitas (16 hpf): Se pueden distinguir fácilmente cuatro subdivisiones prominentes del cerebro, el telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo y el rombencéfalo. Las somitas se forman ahora a una tasa de alrededor de 2 por hora y se comienzan a desarrollar los miotomos, los cuales toman la apariencia en forma de V, se inicia la futura división de los miotomas en la región dorsal (epaxial) y ventral (hipaxial), se genera un desarrollo miofibrilar y la diferenciación de los pioneros de las células musculares. La notocorda se vuelve más distinguible de la parte ventral y se genera el alargamiento en la región posterior del vitelo donde termina el brote de la cola (Kimmel *et al.*, 1995).

Etapa 20 a 25 somitas (19 hpf): La morfogénesis asociada con la constricción del vitelo comienza a enderezar el tronco posterior y el desarrollo continuo de la cola, se produce un marcado aumento en la longitud del embrión. El primordio de la línea lateral o posterior reside como placoda ectodérmica entre la vesícula óptica y la primer somita. Una parte sustancial del primordio pronto comienza a emigrar posteriormente, para la diferenciación de las neuronas, incluyendo las motoneuronas espinales primarias, neuronas del ganglio trigémino (Kimmel *et al.*, 1995). Ahora la mayoría de las somitas del tronco exhiben una forma peculiar de V, los miotomas del tronco producen contracciones musculares débiles (movimiento). Las primeras contracciones implican miotomas individuales (unilaterales) correlacionándose con el crecimiento interno de los axones de las neuronas motoras del desarrollo primario. Progresivamente las contracciones empiezan a involucrar a más series de miotomas con lo que se generarán contracciones más fuertes, coordinadas y frecuentes (Kimmel *et al.*, 1995). El conducto proneurótico se extiende a través de la longitud del tronco y alrededor de la extensión del vitelo, con lo que se indica el desarrollo del ano en la línea media ventral (a nivel de la somita 17), lo cual servirá para definir el límite entre el tronco y la cola, más tarde debido a reordenamientos morfogenéticos, la posición del ano se desplaza al nivel de la somita 15 (Kimmel *et al.*, 1995).

Etapa 26 somitos (22 h): El enderezamiento del tronco posterior está casi completo, el primordio del cerebro es prominente y se pueden reconocer los rudimentos tanto de la epífisis y el hipotálamo en el diencéfalo. Se hacen presentes las placodas olfativas y se pueden apreciar los otolitos de cada vesícula ótica. El desarrollo de las últimas somitas es más lento y el número total que eventualmente se forma es variable, desde 30 hasta 34 pares somíticos. Se hace más evidente la división y diferenciación de las células sanguíneas. Las contracciones espontáneas de los miotomas ahora producen un movimiento de lado a lado y su frecuencia aumenta

transitoriamente al retirar el corión, con esta etapa concluye el periodo de segmentación iniciando el periodo de faríngrula (Kimmel *et al.*, 1995).

El periodo de la faríngrula (24 - 48 hpf) se refiere al tiempo al que el embrión se ha desarrollado hasta el estadio filotípico (estadio del desarrollo donde los embriones de diferentes especies presentan características morfológicas comunes) según lo citado por Kimmel *et al.*, 1995 se divide en cuatro etapas; Prim 5, Prim 15, Prim 16 y High pec. Las etapas denominadas Prim refieren a la migración del primordio de la línea lateral a través de las somitas depositando primordios celulares, que posteriormente darán origen a línea lateral la cual proporcionará el sistema sensorial del pez (Kimmel *et al.*, 1995)

Etapas Prim 5 (24 h): El primordio de la línea lateral se encuentra ubicado en el par de somitas 5, hay alrededor de 30 somitas desarrolladas, 13 de ellas en la cola el resto en el tronco, el pliegue de aleta media es fácilmente reconocible y a las 26 hpf (prim-8) se comienza el desarrollo de los brotes de la aleta pectoral que se ubicara en la tercer somita del tronco. La formación del pigmento comienza en las células del epitelio retinal y posteriormente en los melanóforos ubicados en la epidermis de la región dorso lateral. El corazón es visible por primera vez como un tubo en forma de cono profundo, en la parte superior del vitelo, posteriormente será más prominente y desarrollara un saco pericárdico en la región más anterior del vitelo, el corazón comienza a latir en esta etapa, sin un ritmo aparente definido. Alrededor de las 24-26 hpf algunas células sanguíneas se mueven hacia la región entre el vitelo y la notocorda, donde los principales vasos sanguíneos que irrigan el tronco y la cola se están formando, las células sanguíneas comienzan a ocupar el vitelo sobre regiones muy definidas y amplias que anuncian el desarrollo de las venas cardinales comunes, las células sanguíneas comenzarán su por primera vez en el vitelo. En esta etapa el embrión continúa exhibiendo espontáneas contracciones de lado a lado que ahora implican al tronco y la cola, las contracciones a menudo

se producen en ráfagas a una tasa de alrededor de 8 episodios por minuto (Kimmel *et al.*, 1995). En esta etapa los circuitos reflexivos sensorial-motores son cada vez más funcionales, sin embargo en esta etapa no se puede distinguir claramente la capacidad de respuesta a estímulos sensoriales del embrión descorionado, posiblemente debido a un nivel bastante alto de contracciones espontáneas. Sin embargo alrededor de las 28 hpf (prim-10), se reducen las contracciones espontáneas y se pueden generar las primeras respuestas táctiles, las cuales son consistentes (Kimmel *et al.*, 1995).

Etapa Prim-15 (30 h): El primordio de la línea lateral se encuentra ubicado en el par de somitas 15, el embrión ahora comienza a disminuir su tasa global de alargamiento y la morfogénesis de la cola llega a su fin (Kimmel *et al.*, 1995).

Las células de toda la capa pigmentada de la retina desarrollan gránulos de pigmento visibles, se puede distinguir ahora muy fácilmente una gran cantidad de células epiteliales pigmentadas, así como los melanóforos mesenquimales de pigmentación oscura. Una agrupación dorsal distintiva de melanóforos presagia la formación de la banda dorsal media que cubre las cimas de las miotomas que se extiende posteriormente hasta la somita 12. Se genera la aparición de nuevos melanóforos en la cabeza, donde algunos de ellos están presentes recubriendo el mesencéfalo dorsal y ocasionalmente al cerebro anterior (Kimmel *et al.*, 1995).

El corazón es aún un tubo recto y su ritmo es cada vez más definido, hay un único arco aórtico y el sistema arterial se completa entre la faringe y la cola a través del cual la sangre circula lentamente. La frecuencia de las contracciones espontáneas del cuerpo ahora disminuye a 1-2 episodios por minuto. Los estímulos sensoriales generan respuestas más rápidas, sin embargo el embrión no puede moverse todavía efectiva con su cuerpo a través del agua (Kimmel *et al.*, 1995).

Etapa Prim-25 (36 h): El primordio de la línea lateral se encuentra ubicado en el par de somitas 25, el corazón previamente un tubo recto, ahora se dobla ligeramente, aunque la cavidad

pericárdica no es todavía un lugar bien definido, la circulación sanguínea se hace más rápida el sistema arterial entre la faringe y la cola.

Los reflejos a estímulos sensoriales ahora son más ágiles y con mayor duración, con lo que el embrión se puede mover de manera efectiva y con mayor rapidez a través de su cuerpo en el agua (Kimmel *et al.*, 1995).

Etapas de High pec (42 h): En esta etapa así como para los dos siguientes, se aprecia la aparición de los rudimentos de las aletas pectorales. Los arcos mandibulares e hioides (el primer y segundo arco faríngeo) están bien definidos, posterior la faringe se desarrolla en la región anterior del vitelo. El primordio del hígado y probablemente de la vejiga gaseosa hace su aparición a lo largo del tracto intestinal. La curva en el corazón es ahora prominente y marca la división entre la aurícula y el ventrículo, el corazón late (alrededor de 180 por minuto) con el ritmo auricular anterior al ventrículo. Todavía hay sólo un par de arcos aórticos, la vena cardinal común en el saco vitelino es muy amplia y prominente, las arterias segmentarias y venas están presentes a lo largo del tronco y cola, estos vasos son profundos en los miotomos y son los más fáciles de reconocer ya que recubren la médula espinal. Los embriones sin corión tienen etapas de reposo, donde se les observa en una posición de lado dorsal hacia arriba, sin embargo la respuesta a estímulos es más rápida, con esta etapa termina el periodo de faríngula iniciando el periodo de eclosión (Kimmel *et al.*, 1995).

El periodo de eclosión (después de 48 hpf) está definido por la liberación del embrión de su corión, con un desarrollo completo de todas las estructuras del organismo, en esta etapa el vitelo del embrión ha dejado de ser la fuente principal de su alimento y este es capaz de nadar en busca de comida a través de estímulos olfativos, este periodo se divide en dos etapas Long pec (48 hpf) y Pec fin (60 hpf) estas etapas refieren al alargamiento y desarrollo de las aletas pectorales del pez (Kimmel *et al.*, 1995). *Ver imagen 5 estadios de desarrollo de pez cebra (Danio rerio).*

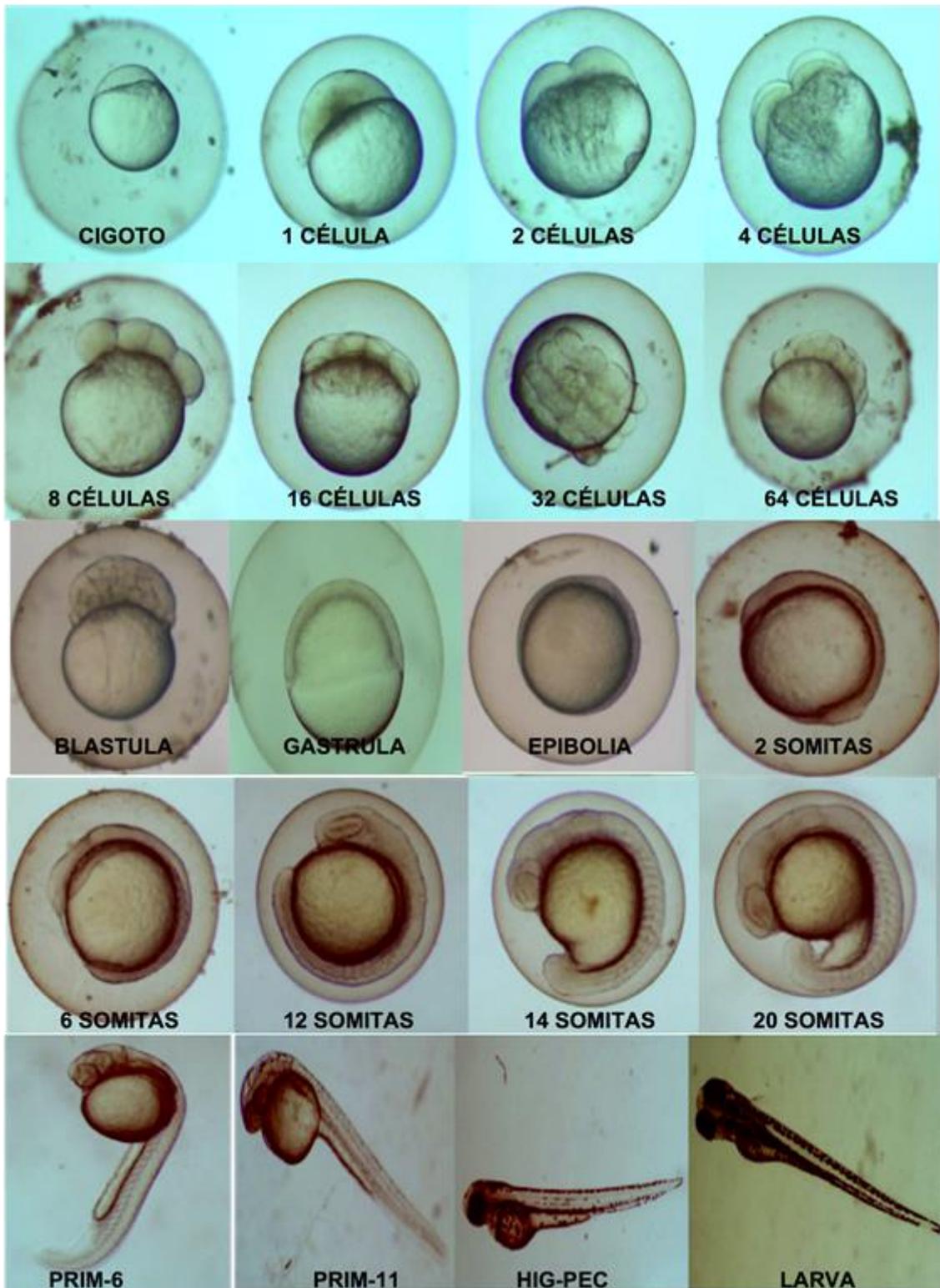


Figura 5. Estadios embrionarios de pez cebra (*Danio rerio*) imágenes tomadas por González-Marín 2014.

2.5 Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa alcalino).

Los xenobióticos son capaces de generar rupturas en el ADN, ya sea de cadena doble o sencilla en los sitios de reparación retardada del ADN, así como en regiones álcali-lábiles. El ensayo cometa se basa en que el ADN fragmentado adquiere una carga neta negativa que le permite migrar hacia el ánodo de un campo eléctrico y dependiendo del tamaño de los fragmentos sus velocidades serán diferentes, de esta manera se puede observar los núcleos no dañados como un círculo brillante (Fig. 6A), mientras que las células dañadas forman la figura de un cometa (Fig. 6B), de igual manera se pueden apreciar núcleos con apoptosis los cuales se observaran con forma de nubes donde todo el núcleo se encuentra completamente fragmentado (Fig. 6C).

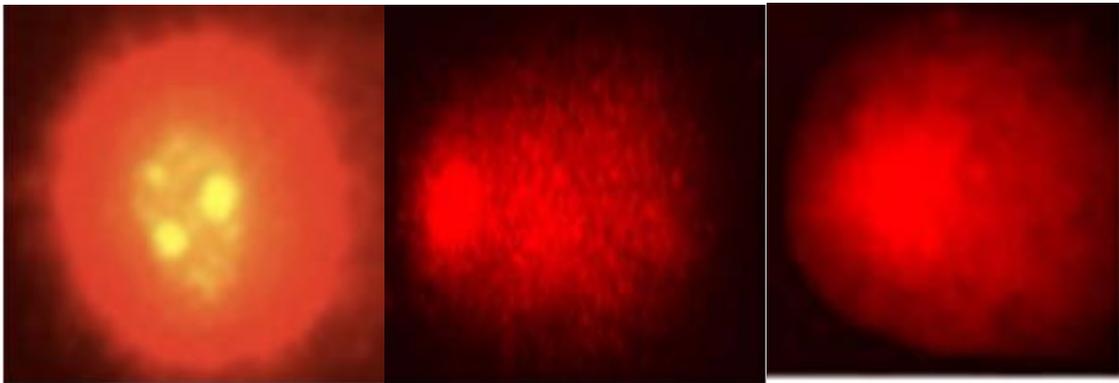


Figura 6. Núcleos; (A) sin daño al ADN, (B) con daño al ADN (cometa), (C) con apoptosis (nube), imágenes tomadas por González-Marín 2014.

El ensayo cometa o electroforesis unicelular fue introducido originalmente por Östling y Johanson en 1984 como una técnica micro-electroforética para visualizar el daño del ADN en células individuales obtenidas de biopsias en pacientes con cáncer sometidos a terapia con radiación. Ellos suspendieron las células en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, formando un microgel que posteriormente sumergieron en una solución de lisis para romper las células y poder visualizar los núcleos, los gels se sometieron a una electroforesis neutra, para evidenciar la fragmentación de cadena sencilla de ADN y posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio para observar los núcleos con daño al genoma. Las imágenes obtenidas de estos núcleos fueron llamadas “cometas” por su semejanza a estos (Fairbairn *et al.*, 1995). En 1988, Singh *et al.*,

mejoraron la técnica introduciendo una electroforesis alcalina ($\text{pH}>13$), que a diferencia de la neutra mejora el desenrollamiento del ADN y la separación de proteínas asociadas, incrementando la movilidad y visualización de los fragmentos de ADN, debido a esto se pueden observar rupturas de cadena sencilla y doble; lesiones en los sitios sensibles al álcali y en sitios de reparación retardada del ADN; ofreciendo mayor sensibilidad para detectar agentes genotóxicos (Fairbairnet *et al.*, 1995). La versión alcalina ($\text{pH}>13$) de la electroforesis en el ensayo cometa, fue considerada la mejor y aceptada por el panel Internacional *Workshop on Genotoxicity Test Procedures* como el ensayo de genotoxicidad más sensible, en comparación con otros y recientemente se ha usado esta técnica para detectar apoptosis y diferenciarla de la necrosis (Rojas *et al.*, 1999).

Las ventajas del ensayo cometa alcalino según Tice *et al.*, 2000.

- a) Los datos son obtenidos de células individuales, lo que hace posible identificar diferentes poblaciones celulares en una misma muestra, además permite observar respuestas mixtas de cada célula en la población.
- b) Se requiere un número pequeño de células para llevar a cabo el ensayo.
- c) Se puede aplicar en cualquier célula eucariota.
- d) Es una prueba muy sensible, reproducible, simple y de bajo costo.
- e) Los datos experimentales se obtienen en poco tiempo.
- f) No se necesitan células en proliferación o división celular.

Los parámetros para evaluar el daño en el ADN, según Woods *et al.*, 1999 pueden ser:

- a) El porcentaje de células con daño al ADN (con cometa)
- b) Longitud y porcentaje de ADN en la cauda (longitud y frecuencia de rompimientos de la cadena)
- c) El momento de la cauda entre otros.

Los parámetros pueden usarse en conjunto o por separado, siendo más utilizados la longitud de la cauda, momento de la cauda y el porcentaje de células con cometa (Hellman *et al.*, 1995).

III JUSTIFICACIÓN

Los plaguicidas neonicotinoides representan el 17% del total de los insecticidas del mercado global (Casida, 2008), debido a su baja persistencia en el ambiente, no se acumulan en tejidos de animales y son menos tóxicos para los mamíferos con respecto a los otros grupos de vertebrados, representan una nueva opción de agroquímicos “menos peligrosos” (Bolboaca y Jantschi, 2005; Elbert *et al.*, 2008; Jeschke y Nauen, 2008). Sin embargo, se sabe que los peces y las aves son especies sensibles a esta clase de plaguicidas representando un riesgo para estos grupos si su utilización no es la adecuada.

Actualmente México, no cuenta con normas de seguridad para la comercialización de nuevos productos de uso agrícola, por lo que la introducción de plaguicidas es muy fácil, sin que haya información suficiente sobre su capacidad de causar toxicidad. La información proporcionada por la industria productora es mínima y los experimentos que confirmen su bioseguridad no se realizan o son omitidos. Además, las metodologías para determinar los efectos tóxicos no están estandarizadas o no se cuenta con modelos animales que permitan realizar su valoración. Por lo que es necesario evaluar sus efectos tóxicos con sistemas biológicos *in vivo* o modelos animales para extrapolar sus posibles efectos en la salud de los seres humanos y su impacto en los ecosistemas que tiendan a acumular compuestos químicos que pueden mezclarse entre sí y alterar el ambiente, tales como los sistemas acuáticos.

La utilización de modelos biológicos nos permite extrapolar los posibles efectos a otros organismos que se encuentren en contacto directo con los contaminantes, tales como los insecticidas. Actualmente se encuentran bien estandarizados modelos animales con los que es

posible evaluar las probables alteraciones generadas por la exposición a plaguicidas o contaminantes. El pez cebra está demostrando ser cada vez más útil como un sistema modelo para identificar nuevos mecanismos de toxicidad para el desarrollo en los vertebrados (Hill *et al.*, 2005) y en los peces en particular (Hinton *et al.*, 2005). Esto es debido a su organogénesis, y otros procesos de desarrollo que se encuentran bien estandarizados en el pez cebra con relación a otras especies de peces.

También es relevante el uso de marcadores biológicos que permiten saber si existe riesgo a la salud por exposición a productos químicos, tales como los plaguicidas. Actualmente están disponibles varios biomarcadores de exposición y de efecto para evaluar los posibles efectos genotóxicos de los agentes químicos ambientales, los cuales se basan principalmente en pruebas genéticas como el intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas, la formación de micronúcleos y el ensayo cometa alcalino entre otros (Tice *et al.*, 2000). El ensayo cometa alcalino es eficaz para detectar fragmentación del ADN y en comparación con otras pruebas citogenéticas como las anteriormente mencionadas, es una prueba muy rápida para evaluar agentes genotóxicos ambientales, ya que no requiere de células en proliferación, es aplicable a cualquier célula eucariota y en poco tiempo se obtienen resultados con gran reproducibilidad (Speit y Hartmann, 2005).

Por tales antecedentes el presente estudio evaluó los efectos morfológicos en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) de cuatro estadios de desarrollo (6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec) expuestos a tres concentraciones del insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin) por 2 h a 28.5°C. Paralelamente se analizaron sus acciones genotóxica y apoptótica del insecticida, mediante el ensayo cometa.

IV OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos morfológicos, genotóxicos y apoptóticos en los estadios embrionarios (6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec) de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos al insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin).

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Realizar experimentos con tres diferentes concentraciones del insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin), en los estadios desarrollo (6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec) de pez cebra (*Danio rerio*) para analizar las alteraciones morfológicas.
- b) Determinar las alteraciones en el desarrollo embrionario de los cuatro estadios de desarrollo de pez cebra expuestos al insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin).
- c) Evaluar los efectos genotóxico y apoptótico en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos al insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin) mediante el ensayo cometa alcalino.

V HIPÓTESIS

Estudios recientes han demostrado que la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin) provoca daño al ADN y apoptosis vía estrés oxidante en palomas y en ratones entonces la exposición de plaguicida a embriones de pez cebra (*Danio rerio*) inducirá daño al ADN, apoptosis y alteraciones morfológicas afectando su desarrollo.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Elaboración de la solución patrón del insecticida.

Con el objeto de realizar los ensayos de exposición en embriones de pez cebra (*Danio rerio*), se prepararon tres diluciones, con las siguientes concentraciones 0.015 mg/ml, 7.5×10^{-3} mg/ml y 3.75×10^{-3} mg/ml del insecticida Poncho (Clotianidin), disueltas en medio de embrión (NaCl, KCl, Na_2HPO_4 anhidro, KH_2PO_4 , CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 ajustada a un pH de 7.4). El insecticida neonicotinoide Poncho® fue donado por Bayer CropScience México, con registro (RSCO-INAC-0191-003-014-012) el cual contiene 600 g/L de ingrediente activo (Clotianidin).

6.2 Obtención y selección de los embriones de pez cebra (*Danio rerio*).

Se colocaron cruces de adultos de pez cebra (*Danio rerio*) de cepas silvestres, criadas en el acuario del Instituto de Fisiología Celular, mantenidos en agua de acuario con azul de metileno al 0.1% a pH de 7.4, temperatura de 30°C, con un periodo de 12 horas de luz/obscuridad, las cruces de adultos fueron colocados en una pecera con una red de atrape de ovocitos, los cuales una vez fertilizados se retiraron cuidadosamente de la pecera, fueron lavados con una solución de agua de acuario con azul de metileno al 0.1% y se transfirieron a cajas petri de cristal con medio de embrión, (60 embriones por caja).

Se realizó una serie de experimentos preliminares con diferentes estadios de desarrollo embrionario a diversos tiempos de exposición y de concentraciones del plaguicida Poncho®. Con base a los datos de los experimentos preliminares se calculó la dosis letal (LD) (0.125 mg/ml del insecticida poncho), la dosis letal media (LD_{50}) (0.02375 mg/ml del insecticida poncho), y se determinaron los parámetros experimentales; estadios de desarrollo embrionario (6 somitas,

26 somitas, Prim 6 y High pec), concentración (3.75×10^{-3} mg/ml, 7.5×10^{-3} mg/ml y 0.015 mg/ml, del insecticida Poncho®) y tiempo de exposición (2 horas).

6.3 Esquema de tratamiento de embriones de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos al insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin).

Se utilizaron 40 embriones por estadio de desarrollo (6 somitas, 26 somitas Prim 6 y High pec).

Los cuales fueron agrupados en 4 grupos con 10 organismos cada uno de la siguiente manera: grupo experimental 1) 10 embriones en 6 somitas, 10 en 26 somitas Prim 6 y 10 High pec fueron expuestos a 3.75×10^{-3} mg/ml; grupo experimental 2) 10 embriones en 6 somitas, 10 en 26 somitas Prim 6 y otros 10 High pec fueron expuestos a 7.5×10^{-3} mg/ml y grupo experimental 3), 10 embriones en 6 somitas, 10 en 26 somitas Prim 6 y otros 10 High pec fueron expuestos a 0.015 mg/ml del insecticida Poncho®, durante dos horas a 28.5°C en viales de cristal, y por último en grupo testigo se colocó 10 embriones en 6 somitas, 10 en 26 somitas Prim 6 y otros 10 High pec fueron colocados en medio de embrión bajo las mismas condiciones. Tres experimentos independientes se realizaron para cada estadio embrionario y concentración.

Después de las dos horas de exposición se realizaron tres lavados consecutivos con 500 μ L de medio de embrión para la eliminación del plaguicida, posteriormente fueron transferidos con ayuda de una pipeta a una caja petri de cristal con 5 ml de medio de embrión, de manera inmediata se realizó su observación en el microscopio estereoscópico con un aumento de 20X y 40X, para la determinación de alteraciones morfológicas de los embriones, retirando el corion de los embriones para la captura de las imágenes mediante una cámara fotográfica Cannon adaptada al ocular del microscopio estereoscópico. Paralelamente se tomó una muestra de la región afectada de cola de cada individuo de todos los grupos experimentales y de los testigos de los cuatro estadios embrionarios (6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec), para la

realización del ensayo cometa alcalino para analizar el daño en el ADN y frecuencia de apoptosis.

.6.4 Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa alcalino.

Con el objeto de analizar daño en el ADN de las células de la cola de los embriones de los tres grupos experimentales y de los testigos se realizó el ensayo cometa alcalino, bajo la siguiente metodología. Se mezcló 50 μ L de medio de embrión y de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA 0.5% Gibco) a 28.5°C, con células de la cola de cada grupo experimental y testigo, hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla fue colocada en un portaobjetos esmerilado (Fisher, EUA), el cual contenía una monocapa de agarosa normal (1%, Gibco). Los portaobjetos se dejaron solidificar a 4°C durante 5 minutos y de manera inmediata los geles fueron sumergidos durante 1 h a 4°C, en una solución fresca de lisis final fría, la cual está hecha a base de 2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 1% Triton X-100 y 10% DMSO, 10 mM Tris, ajustada a pH=10. Posteriormente, los geles fueron transferidos a una cámara de electroforesis horizontal (Bioselect) con amortiguador alcalino frío (300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH=13), durante 20 minutos para el desenrollamiento del ADN, a continuación se aplicó una corriente de 25 V, 300 mA durante 20 minutos para la migración de los fragmentos del ADN. Una vez concluidos los 20 minutos los portaobjetos fueron retirados de la cámara de electroforesis y lavados durante tres veces consecutivas con amortiguador neutralizante (0.4 M Tris a pH 7.5) durante 5 minutos, se fijaron en metanol absoluto frío durante 10 minutos y fueron secados al aire en oscuridad y guardados en una caja negra para poder ser analizados posteriormente.

Los geles de todos los grupos experimentales, así como, los testigos, fueron teñidos con 100 μ g/mL de gel red, para examinar el daño sobre el ADN con un objetivo micrométrico a 40X en un microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Zeiss), equipado con filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se analizaron tres parámetros indicadores de daño al ADN:

a) la frecuencia de núcleos con y sin daño al ADN (con y sin cometa); b) la longitud de la cauda del cometa en micrómetros (de la región nuclear terminal hasta el final de la cauda) y c) el momento de la cauda con el software Cometa IV (Calderón-Segura *et al.*, 2007).

6.5 Análisis de la frecuencia de apoptosis.

Paralelamente, al análisis genotóxico se evaluó la acción apoptótica del insecticida neonicotinoide Poncho® en el mismo tejido de la cola de todos los organismos de los grupos experimentales y de los testigos, cuantificando en 100 núcleos consecutivos el número de núcleos apoptóticos de tres experimentos independientes.

6.6 Análisis estadístico.

Los valores promedios de la frecuencia de núcleos con daño al ADN (cometa), la longitud de la cauda del cometa, el momento de la cauda y apoptosis fueron obtenidos del tejido de la cauda de los cuatro estadios embrionarios expuestos a 0.015 mg/ml, 7.5×10^{-3} mg/ml y 3.75×10^{-3} mg/ml del insecticida Poncho® y del grupo testigo y expresados como promedios \pm error estándar (E.E). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA, así como una prueba de comparación múltiple Tukey, para las diferencias significativas entre los grupos experimentales y testigo de cada estadio embrionario (6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec) mediante el software Graphpad Prisma.

VII RESULTADOS

7.1 Alteraciones morfológicas en los estadios embrionarios 6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos al insecticida Poncho® (Clotianidin).

7.1.1 Estadio embrionario 6 somitas.

El análisis morfológico de los organismos en el estadio embrionario de 6 somitas expuestos a 3.75×10^{-3} mg/ml, 7.5×10^{-3} mg/ml y 0.015 mg/ml del insecticida Poncho®, de 3 experimentos independientes después de dos horas mostraron degeneración del surco somítico, del primordio óptico, de la notocorda y de la cola, sin embargo, estas alteraciones fueron mayores en el grupo experimental 1 que en los grupos 2 y 3 (Figura 7. B, C, D). Los embriones del grupo testigo mostraron desarrollo normal del surco somítico (SS), del primordio óptico (PO), de la notocorda (N), y de cola (C) (Figura 7. A).

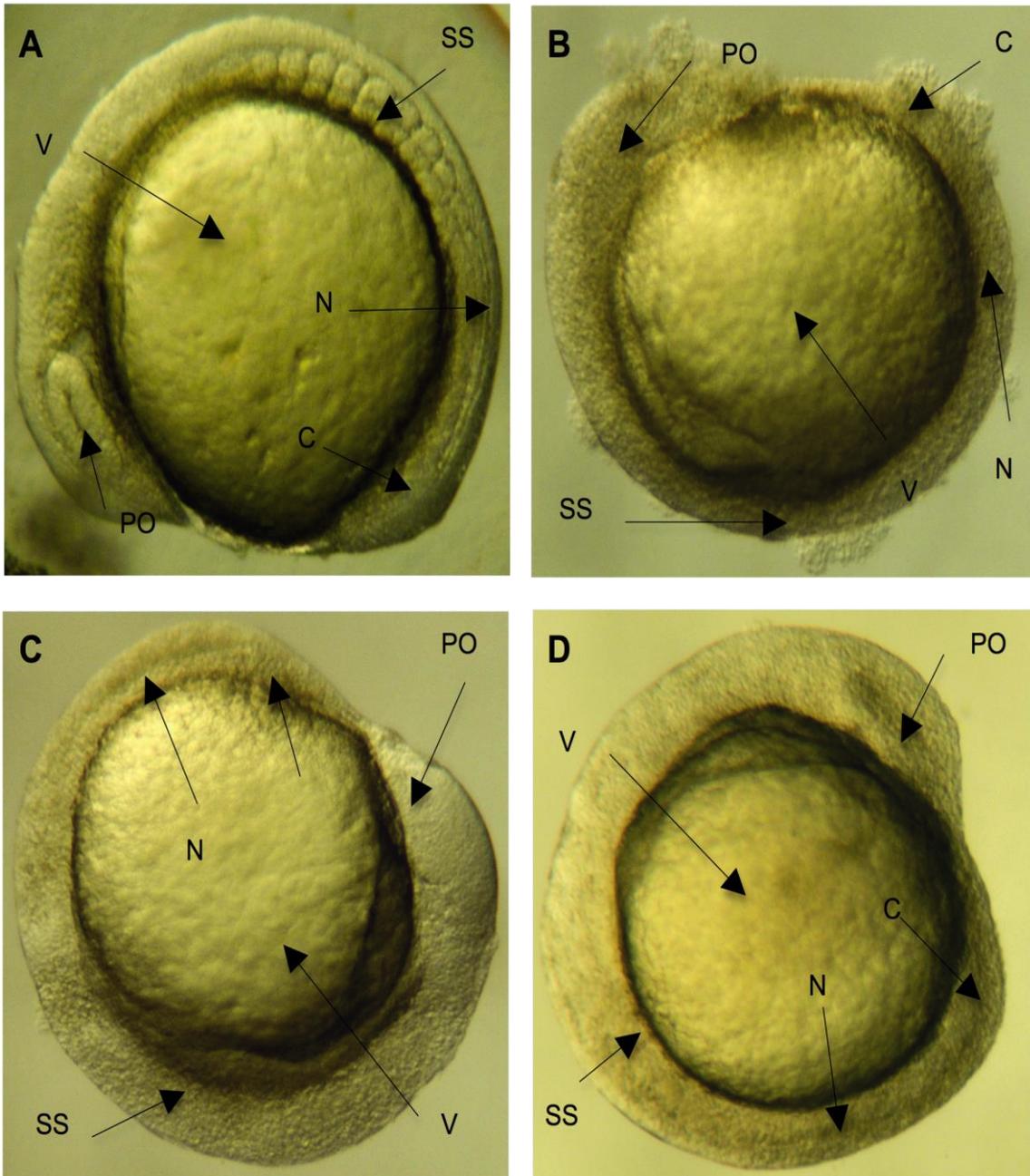


Figura 7. Embriones de pez cebra de estadio embrionario 6 somitas. **A)** Embrión de grupo testigo con desarrollo embrionario normal, las flechas señalan estructuras como surco somítico (SS), primordio óptico (PO), notocorda (N), cola (C) y vitelo (V). Embriones de los grupos experimentales las flechas señalan la degeneración del surco somítico (SS), primordio óptico (PO), notocorda (N), cola (C). **B)** Embrión del grupo experimental 3, mayor grado de degeneración. **C)** Embrión del grupo experimental 2, grado medio de degeneración. **D)** Embrión del grupo experimental 1, menor grado de degeneración.

7.1.2 Estadio embrionario 26 somitas.

El análisis morfológico del estadio embrionario 26 somitas de los tres grupos después de 2 horas de exposición a, 3.75×10^{-3} mg/ml 7.5×10^{-3} mg/ml y 0.015 mg/ml del insecticida Poncho®, de 3 experimentos independientes, mostró ausencia de movimiento y de la respuesta a estímulos táctiles, degeneración de la cola y de la notocorda, alteraciones de las somitas y disminución del ritmo cardíaco. Sin embargo la degeneración de la notocorda y cola de los organismos del grupo experimental 3 fue mayor con respecto a los grupos experimentales 2 y 1 (Figura 8. B, C, D). Los organismos del grupo testigo presentaron desarrollo normal de la cola (C) y notocorda (N), así como presencia de movimiento, respuesta a estímulos táctiles y ritmo cardíaco normal (Figura 8A).

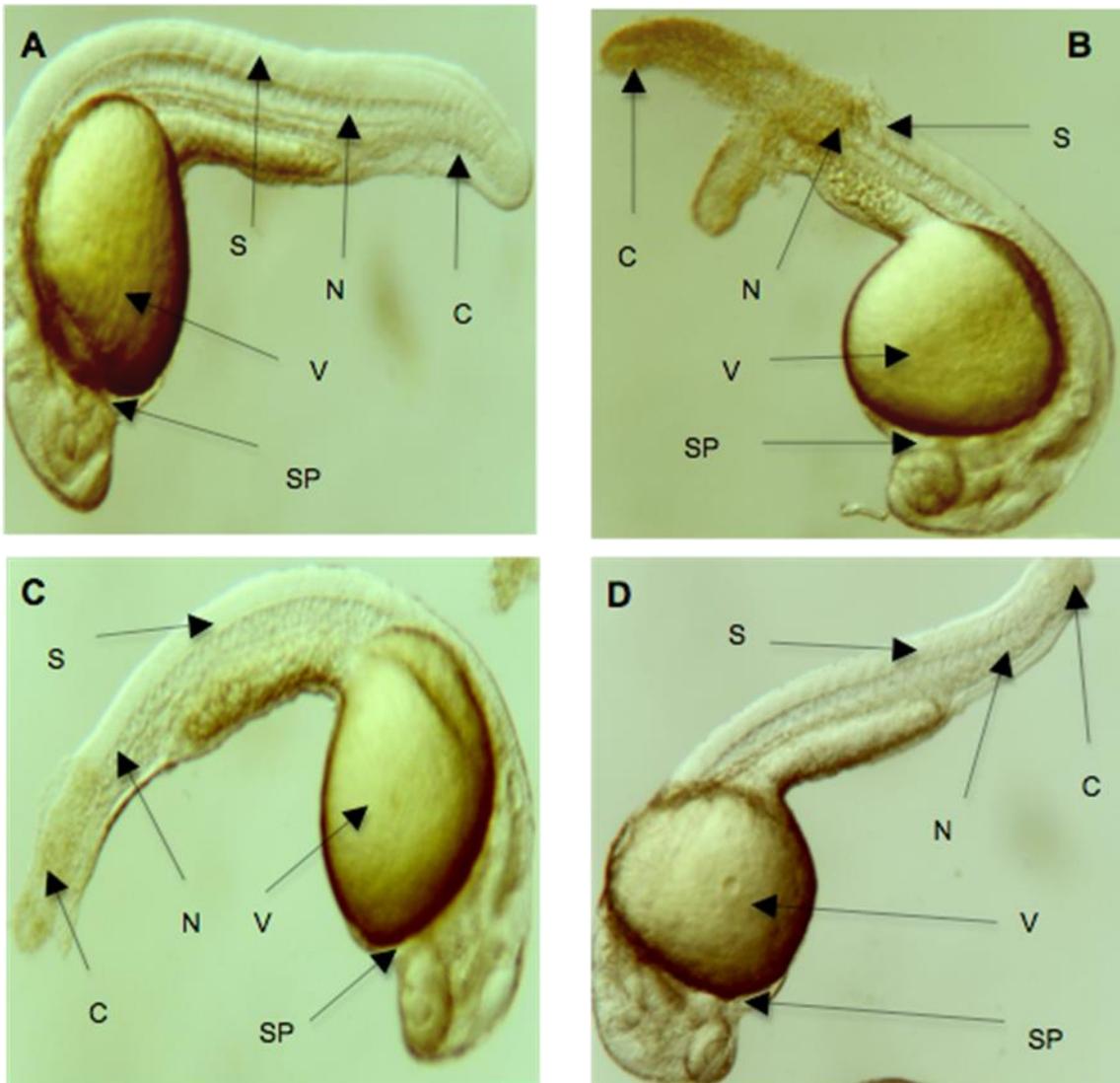


Figura 8. Embriones de pez cebra en estadio embrionario 26 somitas. **A)** Embrión de grupo testigo con desarrollo embrionario normal, las flechas señalan estructuras como saco pericárdico (SP), notocorda (N), cola (C), somitas (S) y vitelo (V). Embriones de los grupos experimentales las flechas señalan la degeneración de notocorda y cola. **B)** Embrión del grupo experimental 3 mayor grado de degeneración. **C)** Embrión del grupo experimental 2 grado medio de degeneración. **D)** Embrión del grupo experimental 1 menor grado de degeneración de la notocorda y cola.

7.1.3 Estadio embrionario Prim 6.

El análisis morfológico del estadio embrionario Prim 6 de los tres grupos después de 2 horas de exposición a, 3.75×10^{-3} mg/ml 7.5×10^{-3} mg/ml y 0.015 mg/ml del insecticida Poncho®, de 3 experimentos independientes, evidenciaron ausencia movimiento, respuesta a estímulos táctiles, degeneración de la cola y notocorda, modificación de las somitas y disminución del ritmo cardíaco. Sin embargo la degeneración de la notocorda y cola de los organismos del grupo experimental 3 fue mayor con respecto al grupo experimental 2 y 1 (Figura 9. B, C, D). En los organismos del grupo testigo se observó desarrollo normal de la cola (C) y notocorda (N), somitas (S), así como presencia de; movimiento, respuesta a estímulos táctiles y ritmo cardíaco normal (Figura 9. A).

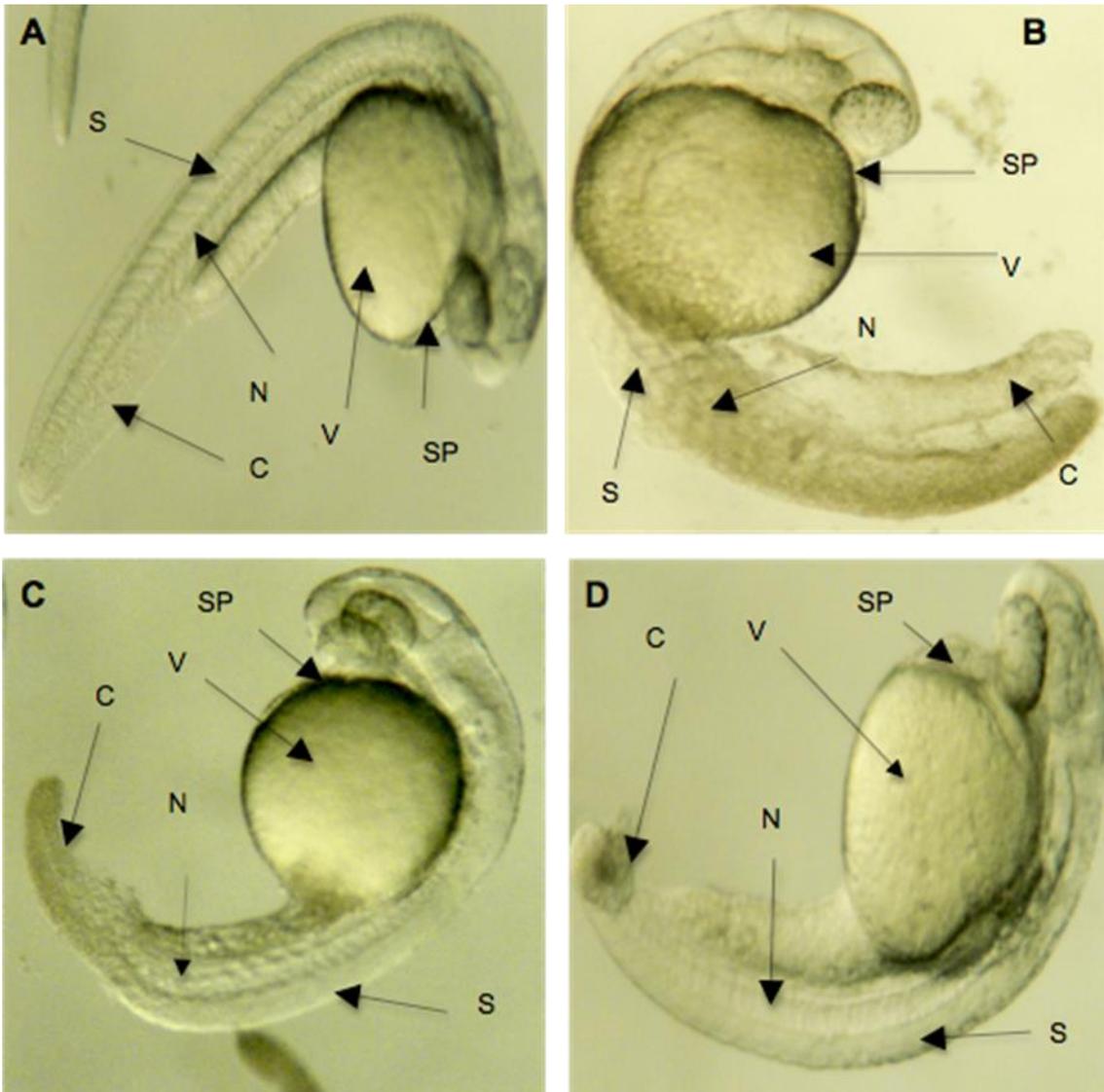


Figura 9. Embriones de pez cebra en estadio embrionario Prim 6. **A)** Embrión de grupo testigo con desarrollo embrionario normal, las flechas señalan estructuras como saco pericárdico (SP), notocorda (N), cola (C), somitas (S) y vitelo (V). Embriones de los grupos experimentales las flechas señalan la degeneración de la notocorda (N), cola (C) y alteración en la somitas (S). **B)** Embrión del grupo experimental 3 mayor grado de degeneración. **C)** Embrión del grupo experimental 2 grado medio de degeneración. **D)** Embrión del grupo experimental 1 menor grado de degeneración.

7.1.4 Estadio embrionario High pec.

El análisis morfológico del estadio embrionario High pec de los tres grupos después de 2 horas de exposición a, 3.75×10^{-3} mg/ml 7.5×10^{-3} mg/ml y 0.015 mg/ml del insecticida Poncho®, de 3 experimentos independientes, evidenció reducción de la longitud del cuerpo, degeneración de la notocorda, cola y aleta caudal, disminución del ritmo cardíaco, ausencia de movimiento y de respuesta a estímulos táctiles. Sin embargo la reducción del tamaño del embrión, la degeneración de la notocorda, de la cola y de la aleta caudal de los organismos del grupo experimental 3 fue mayor con respecto al grupo experimental 2 y 1 (Figura 10. B, C, D). En los organismos del grupo testigo, se observó desarrollo normal de la notocorda (N), de la cola (C) y de la aleta caudal (AC), así como presencia de movimiento, respuesta a estímulos táctiles y ritmo cardíaco normal (Figura 10. A).

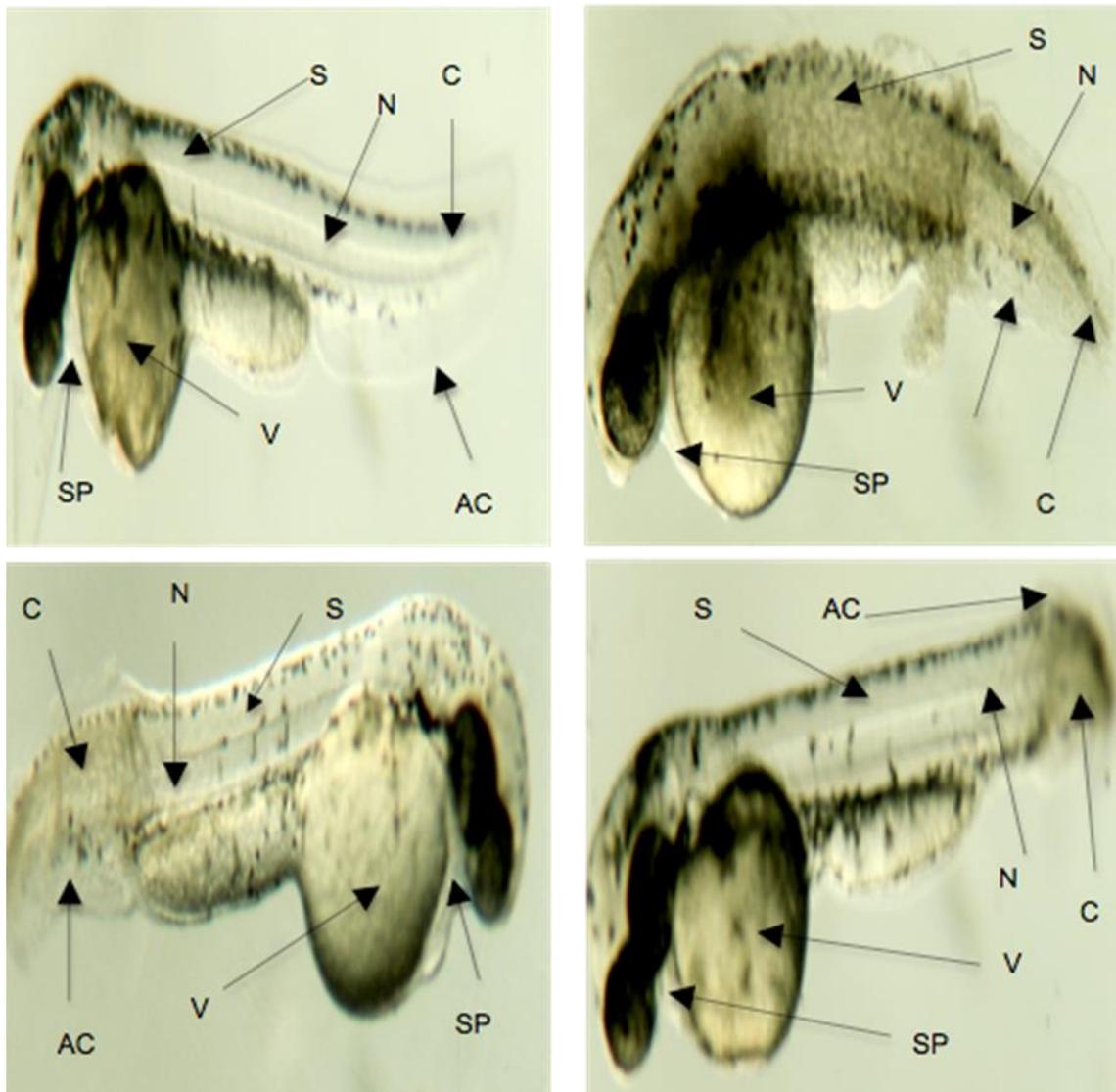


Figura 10. Embriones de pez cebra en estadio embrionario High pec. **A)** Embrión de grupo testigo con desarrollo embrionario normal, las flechas señalan estructuras como saco pericárdico (SP), notocorda (N), cola (C), aleta caudal (AC) y vitelo (V). Embriones de los grupos experimentales las flechas señalan la degeneración de la cola (C), aleta caudal (AC) y notocorda (N), reducción en la longitud del cuerpo. **B)** Embrión del grupo experimental 3, mayor grado de degeneración. **C)** Embrión del grupo experimental 2, grado medio de degeneración. **D)** Embrión del grupo experimental 1, menor grado de degeneración.

7.2 Genotóxicidad y apoptosis del tejido de la cola de los embriones en estadio de desarrollo (6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec) de pez cebra (*Danio rerio*) después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin).

La Tabla 6 y las Gráficas (1-20) muestran los resultados del análisis genotóxico y de apoptosis mediante ensayo cometa alcalino del tejido de la cola de los estadios embrionarios (6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec) de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición a 3.75×10^{-3} mg/ml, 7.5×10^{-3} mg/ml y 0.015 mg/ml del insecticida Poncho® durante 2 h a 28.5°C, demostrando incremento significativo de los tres parámetros genotóxicos: frecuencia de cometas, longitud de la cauda del cometa y momento de la cauda, así como aumento significativo de la frecuencia de apoptosis con respecto a los valores de los grupos testigos.

Tabla 6. Promedios de los parámetros genotóxicos y de la frecuencia de apoptosis del tejido de la cola de embriones (6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec) de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.

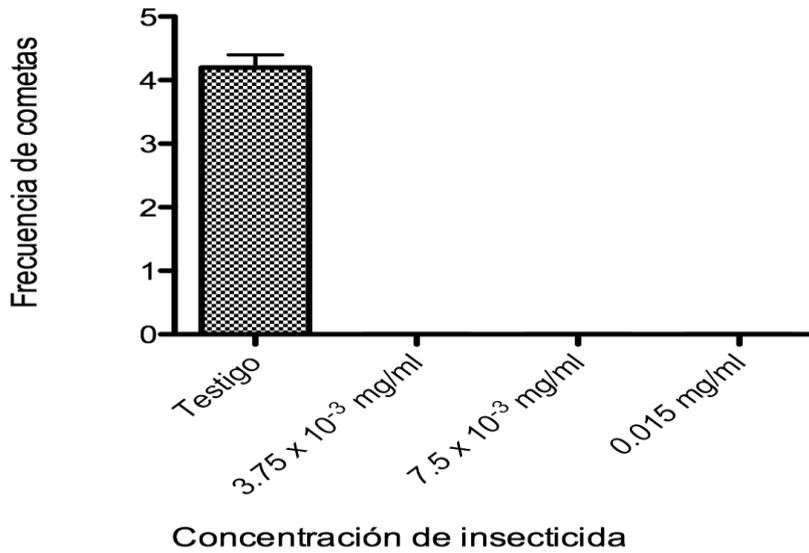
Embriones	Frecuencia de cometas ^a (%)			Longitud de Cauda ^a (µm)			Momento de Cauda ^a (%)			Frecuencia de apoptosis ^a (%)		
	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE	\bar{X}	±	EE
6 somitas^b												
(mg/ml)												
0.0	4.3	±	0.2	13.01	±	0.94	0.23	±	0.07	0.0	±	0.0
3.75 x 10 ⁻³	0.0*	±	0.0	0.0*	±	0.0	0.0*	±	0.0	100*	±	0.0
7.5 x 10 ⁻³	0.0*	±	0.0	0.0*	±	0.0	0.0*	±	0.0	100*	±	0.0
0.015	0.0*	±	0.0	0.0*	±	0.0	0.0*	±	0.0	100*	±	0.0
26 somitas^b												
(mg/ml)												
0.0	3.8	±	0.3	9.7	±	0.6	0.1	±	0.0	0.0	±	0.0
3.75 x 10 ⁻³	9.9*	±	0.1	139.2 *	±	0.7	3.2*	±	0.1	90.1*	±	0.1
7.5 x 10 ⁻³	10*	±	0.0	179.0*	±	2.6	4.5*	±	0.1	90.0*	±	0.0
0.015	3.9	±	0.2	212.0*	±	5.4	6.5*	±	0.1	96.1*	±	0.2
Prim 6^b												
(mg/ml)												
0.0	2.0	±	0.2	16.2	±	1.0	0.4	±	0.1	0.0	±	0.0
3.75 x 10 ⁻³	7.8*	±	0.3	123.5*	±	1.7	3.7*	±	0.2	92.7*	±	0.473
7.5 x 10 ⁻³	7.3*	±	0.5	168.6*	±	1.3	4.6*	±	0.1	92.7*	±	0.473
0.015	2.2	±	0.2	193.3*	±	1.4	5.6*	±	0.1	97.9*	±	0.233
High pec^b												
(mg/ml)												
0.0	2.9	±	0.2	10.3	±	0.6	0.4	±	0.0	0.0	±	0.0
3.75 x 10 ⁻³	8.0*	±	0.3	97.88*	±	0.4	3.8*	±	0.1	92.0*	±	0.258
7.5 x 10 ⁻³	6.3*	±	0.2	191.0*	±	0.9	5.6*	±	0.1	93.7*	±	0.153
0.015	2.3	±	0.2	249.9*	±	9.0	6.9*	±	0.2	97.7*	±	0.213

^a Promedio de un experimento n= 100 células

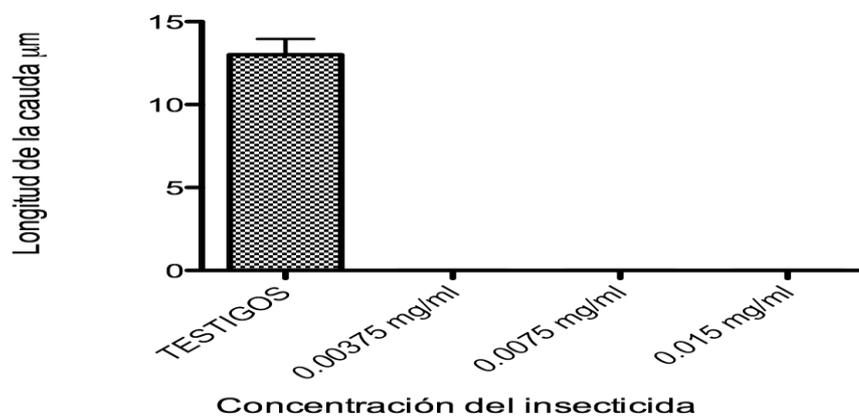
^b Estadios embrionarios de pez cebra (*Danio rerio*) evaluados para genotoxicidad y apoptosis n=10

* Diferencias significativas de los grupos experimentales de cada estadio embrionario con respecto a su grupo testigo mediante el análisis de varianza (ANOVA) y de Tukey (P<0.001).

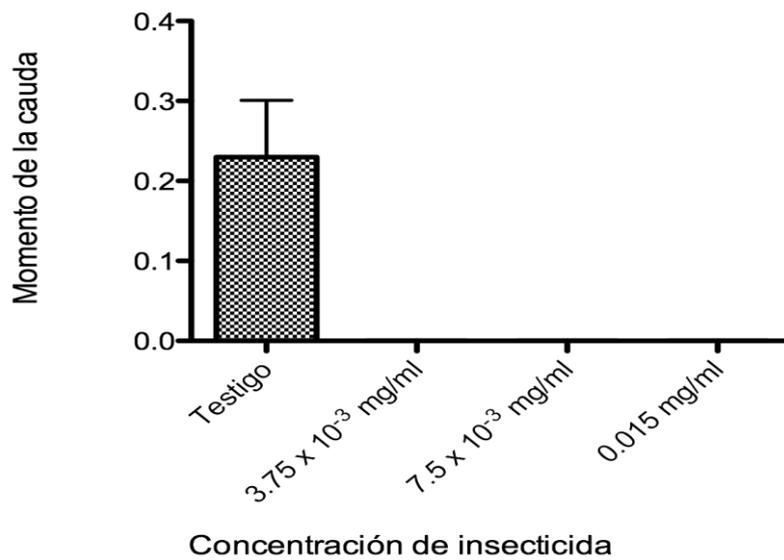
Estadio embrionario 6 somitas



Gráfica 1. Promedios de frecuencia de cometas del tejido de la cola de embriones en estadio 6 somitas de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.



Gráfica 2. Promedios de la longitud de la cauda de los cometas del tejido de la cola de embriones en estadio embrionario 6 somitas de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.

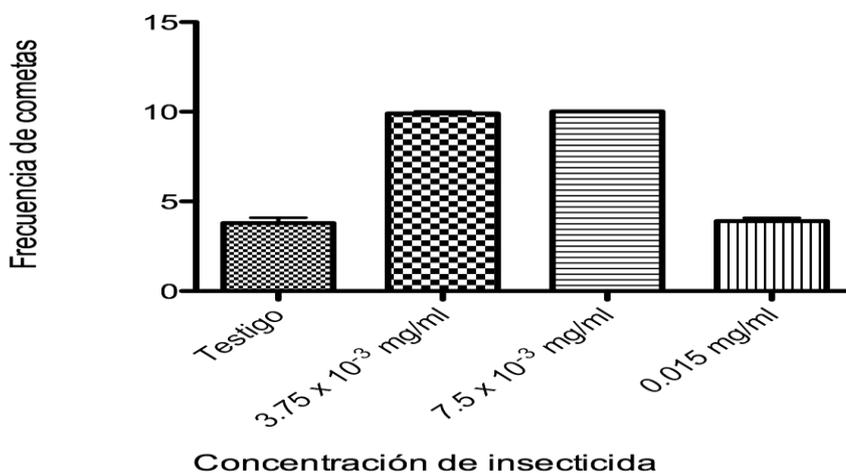


Gráfica 3. Promedios del momento de la cauda de los cometas del tejido de la cola de embriones en estadio embrionario 6 somitas de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.

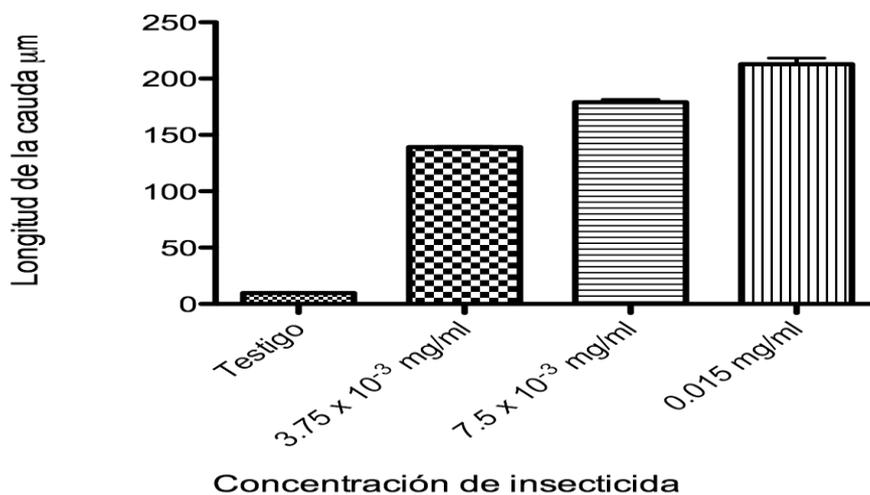


Gráfica 4. Promedios de la frecuencia de apoptosis del tejido de la cola de los embriones en estadio 6 somitas de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.

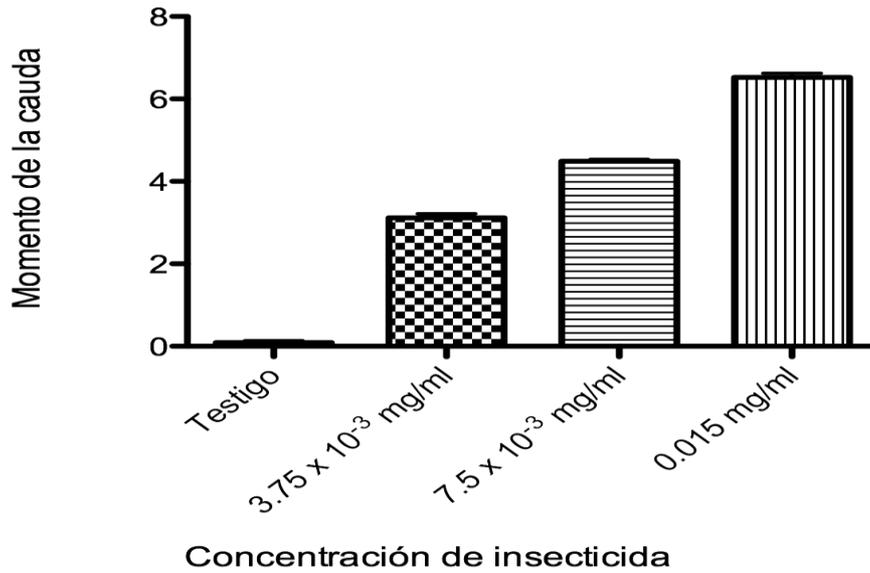
Estadio embrionario 26 somitas



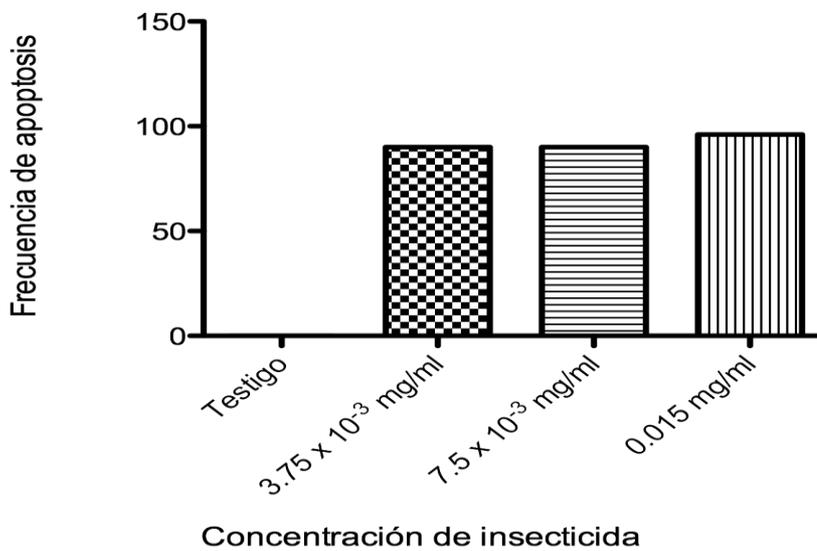
Gráfica 5. Promedios de núcleos con cometa, del tejido de la cola de embriones en estadio 26 somitas de pez cebra (*Danio rerio*) después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.



Gráfica 6. Promedios de la longitud de la cauda de los cometas del tejido de la cola de embriones en estadio embrionario 26 somitas de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.

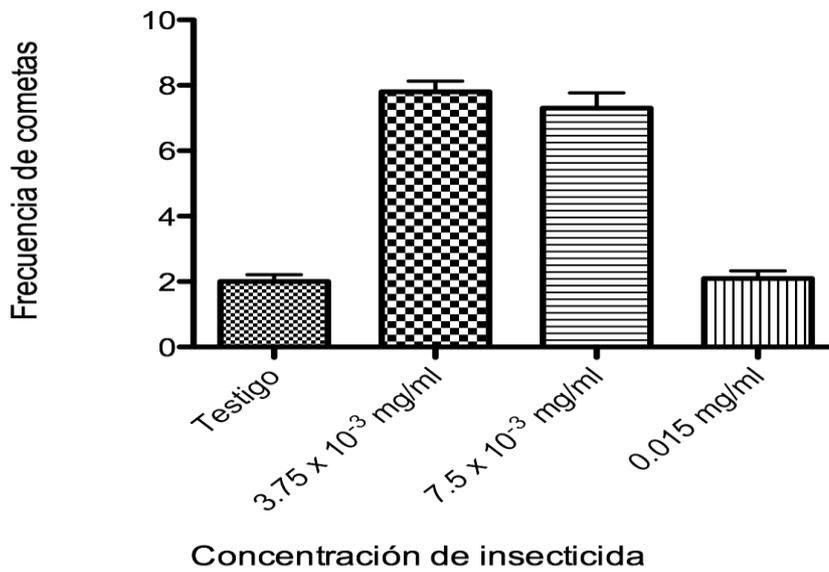


Gráfica 7. Promedios del momento de la cauda de los cometas del tejido de la cola de embriones en estadio embrionario 26 somitas de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.

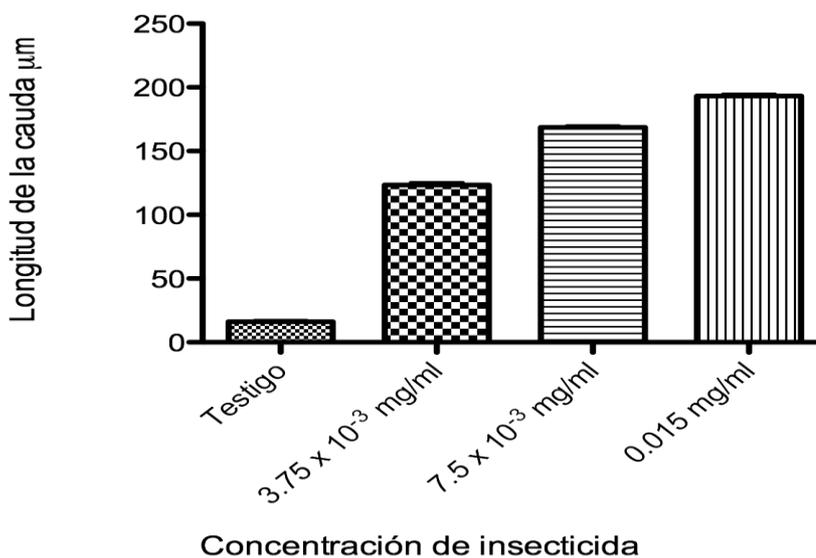


Gráfica 8. Promedios de la frecuencia de apoptosis del tejido de la cola de embriones en estadio 26 somitas de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.

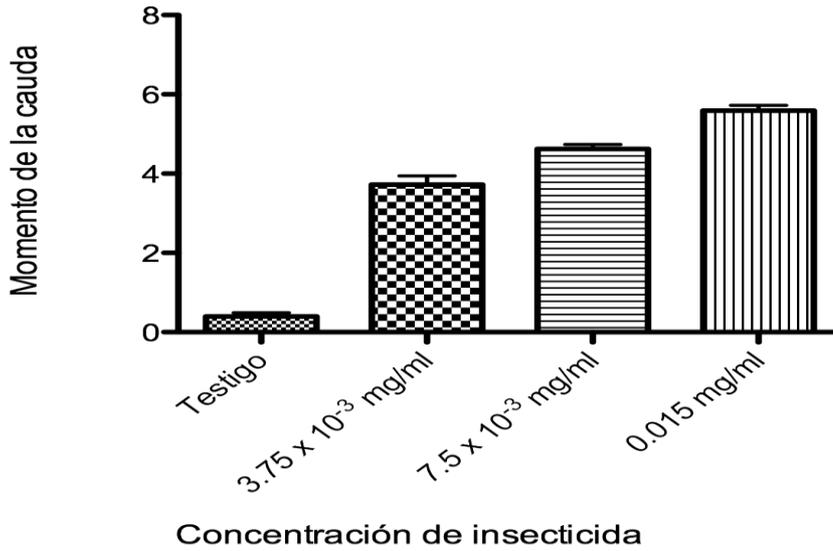
Estadio embrionario Prim 6



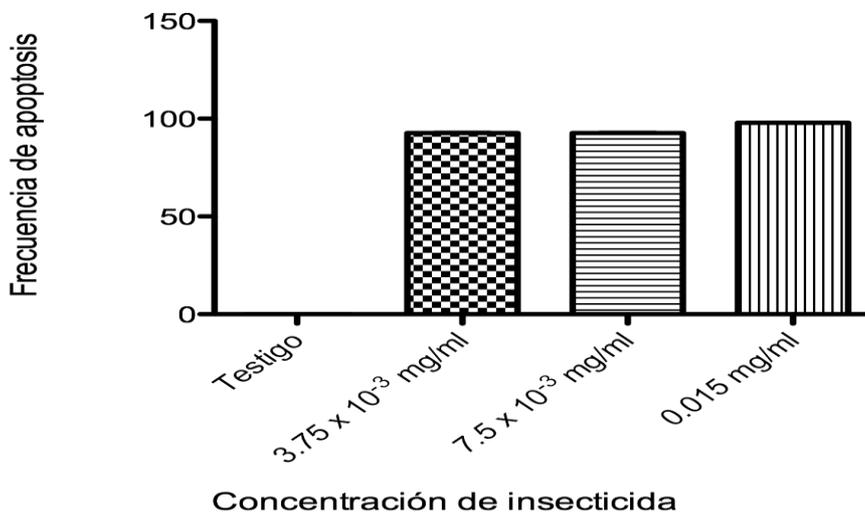
Gráfica 9. Promedios de la frecuencia de apoptosis del tejido de la cola de embriones en estadio Prim 6 de pez cebra (*Danio rerio*) después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.



Gráfica 10. Promedios de la frecuencia de apoptosis del tejido de la cola de embriones en estadio embrionario Prim 6 de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.

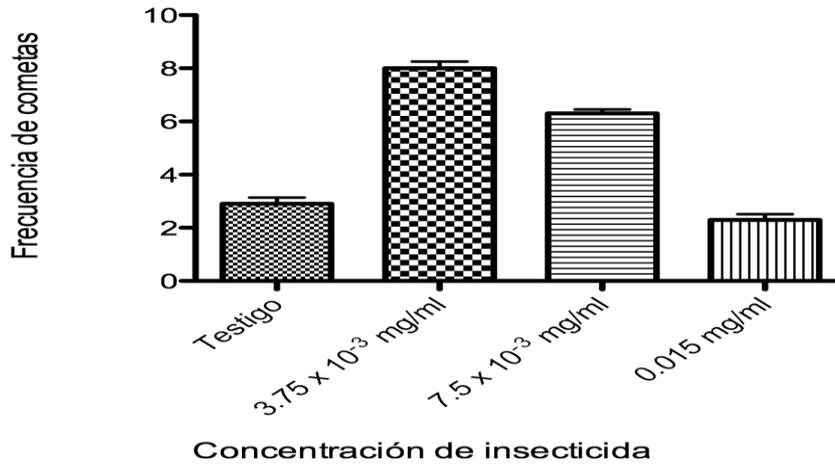


Gráfica 11. Promedios del momento de la cauda de los cometas del tejido de la cola de embriones en estadio embrionario Prim 6 de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.

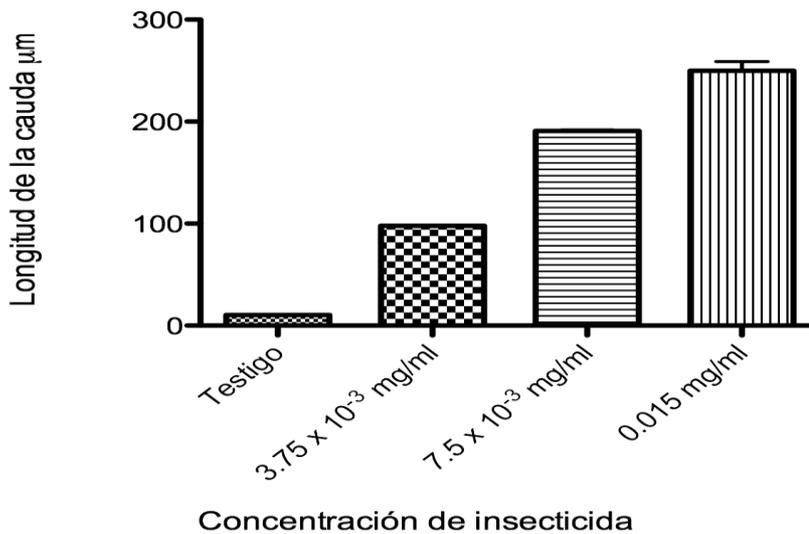


Gráfica 12. Promedios de la frecuencia de apoptosis del tejido de la cola de embriones en estadio Prim 6 de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.

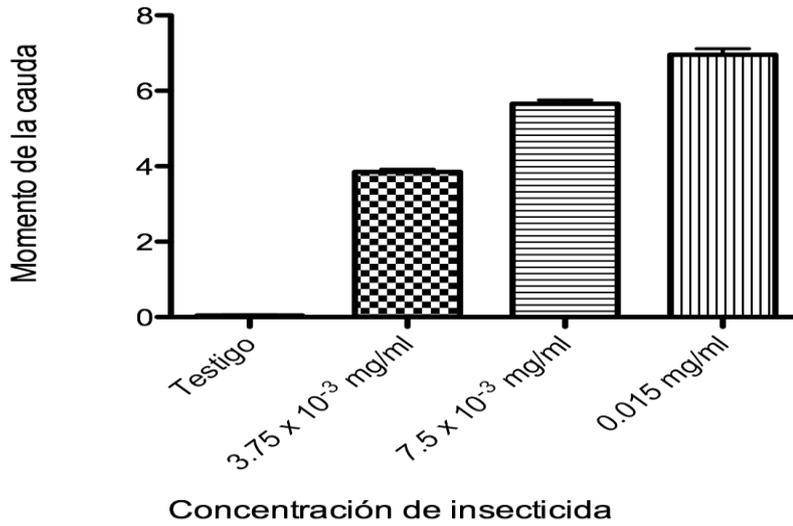
Estadio embrionario High pec



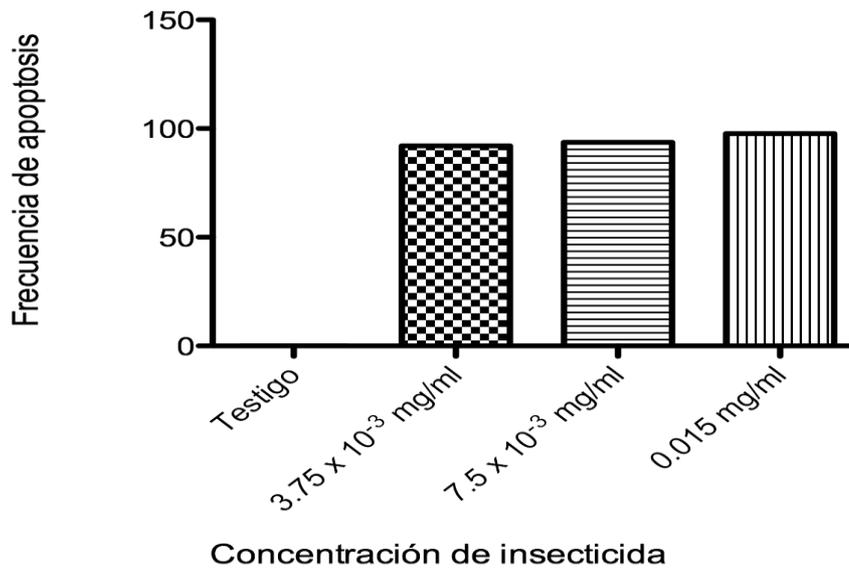
Gráfica 13. Promedios de la frecuencia de cometas del tejido de la cola de embriones en estadio High pec de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.



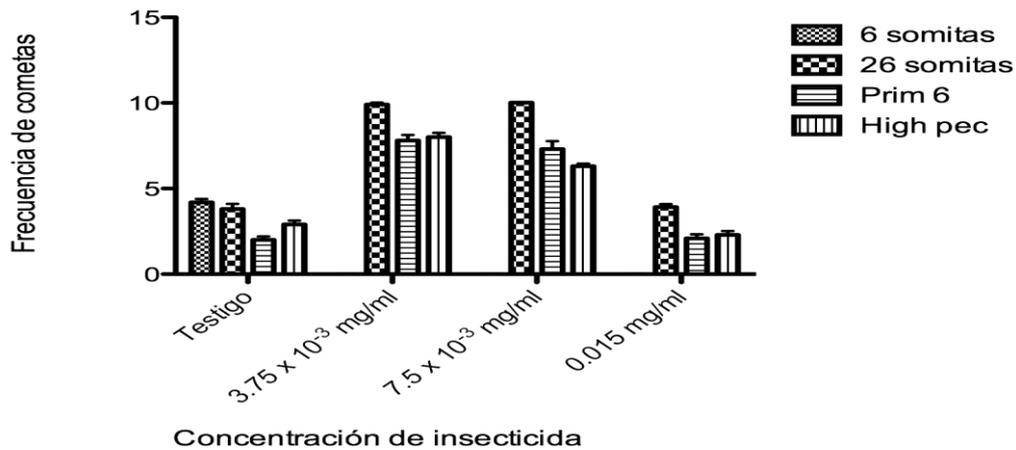
Gráfica 14. Promedios de la longitud de la cauda de los cometas del tejido de la cola de embriones en estadio embrionario High pec de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.



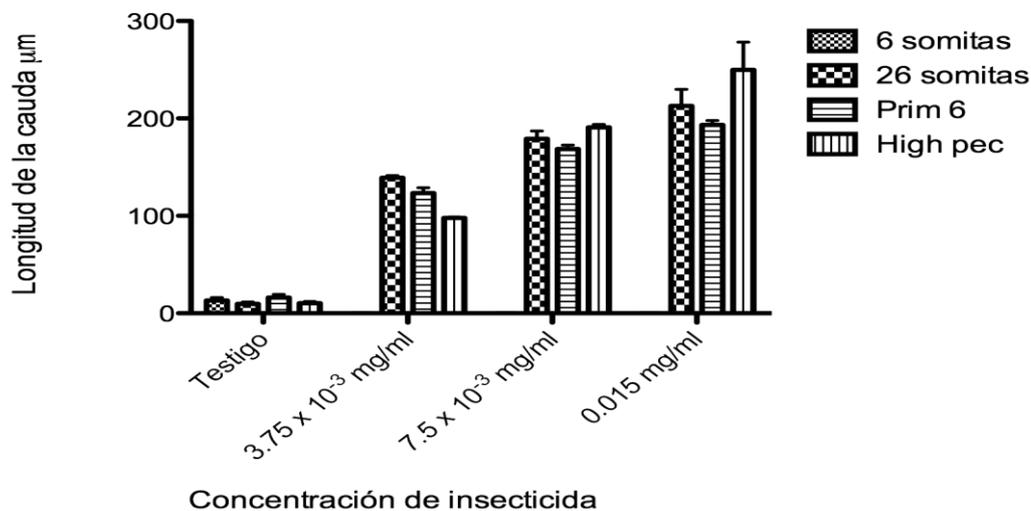
Gráfica 15. Promedios del momento de la cauda de los cometas del tejido de la cola de embriones en estadio embrionario High pec de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.



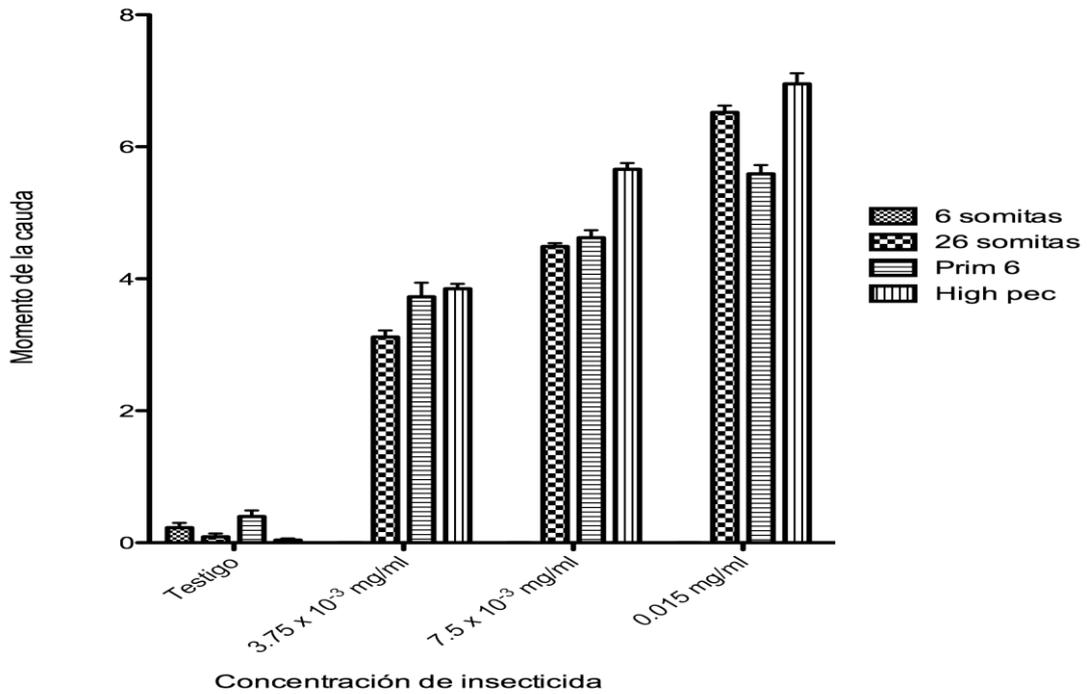
Gráfica 16. Promedios de la frecuencia de apoptosis del tejido de la cola de embriones en estadio High pec de pez cebra (*Danio rerio*) después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.



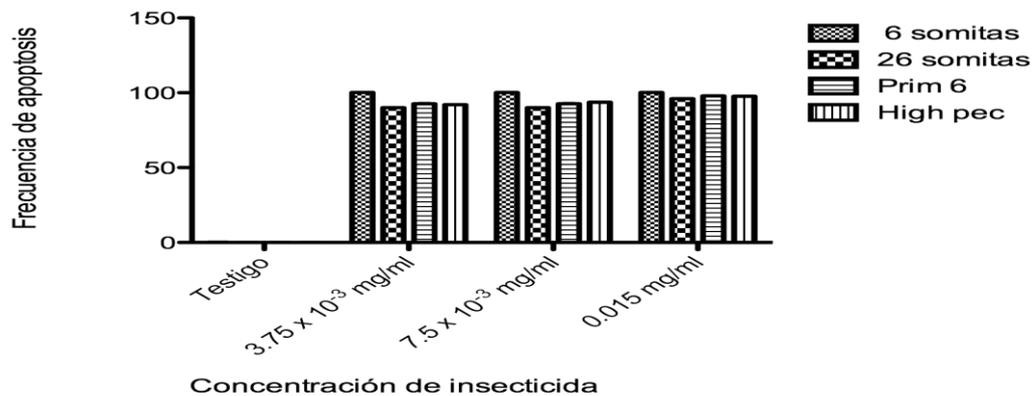
Gráfica 17. Comparación de los promedios de la frecuencia de cometa del tejido de la cola de embriones en los estadios 6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec de pez cebra (*Danio rerio*) después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.



Gráfica 18. Comparación de los promedios de la longitud de la cauda de los cometas del tejido de la cola de los embriones en los estadios embrionarios de 6 somitas, de 26 somitas Prim 6 y de High pec de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.



Gráfica 19. Comparación de los promedios del momento de la cauda de los cometas del tejido de la cola de embriones en estadios embrionarios de 6 somitas, de 26 somitas Prim 6 y de High pec de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.



Gráfica 20. Comparación de los promedios de la frecuencia de apoptosis del tejido de la cola de los embriones en estadios de 6 somitas, de 26 somitas, de Prim 6 y de High pec de pez cebra (*Danio rerio*), después de la exposición al insecticida neonicotinoide Poncho®.

VIII DISCUSIÓN

Poncho® es un insecticida comercial con el derivado neonicotinoide clotianidin como ingrediente activo, el cual se emplea en México para el tratamiento de las semillas de maíz, estudios recientes han demostrado que este insecticida, altera la función reproductora e induce daño en el ADN de células germinales de ratones (Yokuta, 2003) y en aves (Tokumoto *et al.*, 2013), en células periféricas sanguíneas (Calderón-Segura *et al.*, 2015), sin embargo, no hay estudios al respecto en peces.

Con base a lo anterior este estudio fue diseñado para analizar los efectos en el desarrollo embrionario de pez cebra (*Danio rerio*), así como su asociación con el daño al ADN e inducción de apoptosis en los estadios embrionarios de 6 y 26 somitas, en Prim 6 y en High pec expuestos a 3.75×10^{-3} , 7.5×10^{-3} y 0.015 mg/ml, y del insecticida Poncho® (Clotianidin) durante 2 h. Los resultados del análisis morfológico de los cuatro estadios embrionarios expuestos al insecticida neonicotinoide Poncho®, evidenciaron que este insecticida produce degeneración de la cola, de la notocorda, de la aleta caudal, del primordio óptico; reducción de la respuesta motora, anomalías en las somitas, disminución de la longitud del cuerpo y del ritmo cardíaco. Estas alteraciones indujeron la muerte de todos los organismos de los cuatro estadios embrionarios en un periodo de tiempo corto después de la exposición al plaguicida comparados con los grupos testigos de los cuatro estadios embrionarios que no presentaron alteraciones en el desarrollo embrionario.

De manera paralela el ensayo cometa alcalino del tejido de la cola de los embriones de los estadios de desarrollo demostró después de la exposición al insecticida se produjo daño significativo en ADN, aumentando los tres parámetros genotóxicos evaluados; (frecuencia de cometas, longitud de la cauda del cometa y momento de la cauda), así como la frecuencia de apoptosis del tejido de la cola de cada organismo de todos los grupos experimentales

comparados con los valores de los grupos testigo. El daño en el ADN y apoptosis se relaciona de manera directa con las alteraciones fenotípicas manifestadas en los embriones, donde se infiere que el insecticida neonicotinoide Poncho® induce degeneración de las estructuras relacionadas con la región caudal (somitas, notocorda, cola y aleta caudal), con alteraciones en el sistema nervioso y cardiovascular, donde se disminuyeron o inactivaron las vías de señalización neuromusculares para la locomoción y nado, así como la afección del ritmo cardíaco de los embriones. Se conoce que el insecticida Poncho® tiene acción sobre el sistema nervioso central como agonista parcial, súper agonista y antagonista del receptor de la acetilcolina-nicotínico (nAChR) de insectos y mamíferos (Tokumuto *et al.*, 2013), el cual interactúa a nivel de receptores nicotínicos post-sinápticos en el dominio extracelular del complejo acetilcolina-nicotínico (nAChR) y del canal iónico, lo que posteriormente da un cambio conformacional el cual abre el canal promoviendo la entrada de K⁺ y la salida de Na⁺ (Díaz *et al.*, 2006). De esta manera se propone que el insecticida neonicotinoide Poncho® funciona como un agonista y antagonista en el sistema neuromuscular, el cual podría estar evitando las señalizaciones de los músculos desarrollados en la cola que a su vez afecta el comportamiento motor. Las alteraciones en el aparato cardiovascular también se asocian con el receptor de la acetilcolina-nicotínico (nAChR) el cual es capaz de disminuir el impulso cardíaco en algunos vertebrados (Díaz *et al.*, 2006).

Las alteraciones morfológicas inducidas por el insecticida Poncho® en los cuatro estadios embrionarios de pez cebra concuerdan con lo reportado por Carla *et al.*, (2006), quienes reportan, que embriones de pez cebra a las 30 hpf, expuestos continuamente a 0.23 µg del insecticida Finopril, se genera reducción de la longitud del cuerpo, degeneración de la cola, notocorda, anomalías e hipercontractilidad del músculo axial. Otros estudios donde se expusieron embriones de pez cebra a diversas clases de insecticidas, asocian deformaciones en la notocorda y reducción significativa en la actividad de la natación en embriones de pez cebra

de estadio blástula expuestos a 2 ml del insecticida Acetofenona (Xu *et al.*, 2008). Otros ensayos realizados con embriones de pez cebra de 3 hpf, expuestos durante 24 horas a 100, 200, 300, 400, 600, 800, µg/L del insecticida Permetrina, demostraron la incidencia de edema pericárdico, curvatura de la cola, espasmos incontrolados, y anomalías en la vejiga gaseosa de los organismos expuestos (Yang *et al.*, 2013).

Adicionalmente, los resultados del ensayo cometa, evidencian que el insecticida Poncho® es un agente genotóxico, al incrementar significativamente los tres parámetros genotóxicos (frecuencia de núcleos con cometa, longitud de la cauda, momento de la cauda) y la frecuencia de apoptosis. Estudios con el insecticida Endosulfan, reportaron un incremento de especies reactivas de oxígeno (eROS), en células hepáticas de adultos de pez cebra expuestos a 0.001, 0.1 y 1 mg/L del insecticida Endosulfan (Bo Shao *et al.*, 2012). Otro estudio realizado con el insecticida Fenevalerato reportó que adultos de pez cebra a las 8 hpf expuestos durante 24, 48, 72 y 96 horas a 100 µg/L al Fenevalerato, muestran incremento de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) y apoptosis en células cerebrales (Aihua *et al.*, 2010). Ensayos realizados con el insecticida Propoxur, mostraron que en embriones de pez cebra expuestos durante 5 días a 25 y 50 µg/ml de Propoxur se indujo daño en el ADN mediante estrés oxidante y apoptosis evaluado mediante el ensayo cometa alcalino (Raj *et al.*, 2013). Con base en los estudios mencionados, donde se manifiesta la tendencia de algunos insecticidas a inducir daño en el ADN y apoptosis vía estrés oxidante sin importar su clase química, se infiere que el insecticida Poncho® puede ser inductor de estrés oxidante, a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (eROS), generadas mediante el metabolismo del mismo compuesto, donde el aumento de estrés oxidante en embriones de pez cebra, pudo inducir daño en el ADN, lo que posteriormente produjo apoptosis en las células de la cola de los organismos. Los datos obtenidos en este ensayo concuerdan con lo publicado por Tokumoto *et al.*, 2013, quienes reportaron que a concentraciones de 0.02, 1.0 y 10 mg/kg de peso corporal de

Clotianidin se induce fragmentación del ADN en hepatocitos y en células germinales de codorniz hembra y macho vía estrés oxidante (Tokumuto *et al.*, 2013). En ratones expuestos a 20 y a 50 mg/kg de peso corporal de Clotianidin por 90 días produce daño en el genoma y apoptosis en células germinales. En ratones machos CD1 expuestos por 21 días con 20, 40 y 80 mg/kg de peso corporal de Clotianidin produce apoptosis y daño en el ADN en células periféricas sanguíneas (Calderón-Segura *et al.*, 2015)

Aun cuando el mecanismo molecular por el cual los insecticidas neonicotinoides inducen genotoxicidad es parcialmente desconocido, se hipotetizo que existe un mecanismo molecular multifactorial en el cual el insecticida neonicotinoide Poncho®, podría ser un agente genotóxico de acción directa para la generación de radicales libres tales como las especies reactivas de oxígeno (eROS), e indirectamente mediante su biotransformación con la formación de intermediarios metabólicos que produjeron daño al genoma y apoptosis en células de la cola de embriones de pez cebra y consecuentemente alteraciones en las vías de señalización y diferenciación celular de esta estructura embrionaria reflejando en la morfología anormal de los organismos lo que finalmente condujo a su muerte. Esta hipótesis es apoyada parcialmente con otros resultados obtenidos para los insecticidas neonicotinoides como acetamiprid e imidacloprid los cuales han demostrado aumentar significativamente los niveles de (eROS) o radicales libres con daño oxidante en el ADN de células germinales y sanguíneas en mamíferos y aves (Tokumuto *et al.*, 2013; Calderón-Segura *et al.*, 2015).

Tanto los mamíferos como los peces exhiben respuestas celulares muy similares ante el estrés oxidante (Kelly SA, 1998, Fraga CG, 1996), no obstante, existe variación entre las especies y en los individuos debido a diferentes factores tales como la repuesta y la capacidad de las enzimas antioxidantes presentes en el organismo (Pedrajas, 1995), el metabolismo, el polimorfismo genético, el estatus nutricional entre otros. Diversos estudios han demostrado la importancia de

las defensas antioxidantes para proteger los sistemas celulares del estrés oxidante inducido por xenobióticos (Días Bairy, 1996).

Por otro lado, se ha comprobado también que los insecticidas neonicotinoides muestran un mecanismo común de biotransformación en los grupos de vertebrados desde los peces hasta los mamíferos, donde se implica la interacción del citocromo P450s para la reducción de Clotianidin (CLO) a su principal metabolito desmetil-clotianidin (CLO-dm). La toxicidad de CLO y CLO-dm, se atribuye principalmente a su acción como agonistas nicotínicos directamente en sistema nervioso. CLO y CLO-dm son metabolitos muy persistentes en el hígado, mismos que pueden interactuar e inducir hepatotoxicidad principalmente por CLO-dm a través de la inhibición de la enzima sintasa. Sin embargo, se desconoce por completo el mecanismo de inhibición (Ford y Casida, 2006b), por lo cual las rutas metabólicas en los animales podrían representar otro factor de riesgo adicional para la salud humana y animal (vía cadena trófica). Ya que se ha sugerido que los animales al consumir alimentos contaminados con residuos de plaguicidas y/o sus metabolitos podrían ser biotransformados y/o activados por las enzimas del tracto digestivo, interaccionando con macromoléculas celulares como el ADN y ARN ocasionado alteraciones moleculares, celulares y diversas enfermedades (Calderón-Segura *et al.*, 2007).

Los resultados de esta investigación a niveles morfológico, genotóxico y apoptótico en embriones de pez cebra expuestos al insecticida neonicotinoide Poncho® contribuyen con nuevos datos toxicológicos de esta nueva clase de insecticida el cual es ampliamente usado en el tratamiento de las semillas y del cultivo de maíz en nuestro país y apoyan que este plaguicida es de riesgo potencial para la salud de los organismos acuáticos y quizás para los seres humanos, sin embargo, es necesario continuar con los estudios a nivel molecular, bioquímico y morfo-fisiológicos en este organismo y en otros modelos animales para identificar los mecanismos por los cuales el insecticida neonicotinoide Poncho® (Clotianidin), induce alteraciones genotóxicas, morfológicas y apoptótica.

IX CONCLUSIONES

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

- a) El insecticida neonicotinoide Poncho® induce alteraciones morfológicas, genotóxicas y apoptótica en los estadios embrionarios; 6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec de pez cebra (*Danio rerio*).
- b) El insecticida neonicotinoide Poncho® afecta de manera específica la región caudal de los organismos expuestos y de manera paralela disminuye el ritmo cardíaco, inhibe el movimiento que afectan a los organismos ocasionando su muerte.
- c) El insecticida neonicotinoide Poncho® induce daño al ADN y apoptosis en el tejido de la cola de los embriones en los estadios desarrollo (6 somitas, 26 somitas, Prim 6 y High pec) de pez cebra (*Danio rerio*).

X REFERENCIAS

Agarwa DK, Chauhan LKS, Gupta SK, Sundararaman V. (1994). Cytogenetic effects of deltamethrin on rat bone marrow. *Mutat. Res.* 311: 133-138.

Ahmed S, Safarzadeh-Amiri A, Fowlie P, Kazi AI, Siraj S. (2011). Validation of analysis of arsenic in water samples using Wagtech Digital Arsenator. *Sci Total Environ.* 1; 409(13):2662-7.

Aihua Gu, Xiangguo Shi, Chen Yuan, Guixiang Ji, Yong Zhou, Yan Long, Ling Song, Shoulin Wang, Xinru Wang. 2010. Exposure to fenvalerate causes brain impairment during zebrafish development.

Alavanja M, Dosemeci M, Samanic C, Lubin J, Lynch C, Knott C, Barker J, Hoppin JA, Sandler DP, Coble J, Thomas K, Blair A. (2004). Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. *Am. J. Epidemiol.* 160: 876-885.

Albertini R. J., Nicklas J. A., O'Neill J. P. (1996). Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ. Health Perspect. Cary*, v. 104, suppl. 3, p. 503-510.

Altman SA, Rao G. (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol. Prog.* 9: 671-674.

Amer SM, Ibrahim A, El-Sherbeny KM. (1993). Induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in vivo and in vitro by the insecticide cypermethrin. *J. App. Toxicol.* 13: 341-345.

Arend W.P., Dayer J.M. (1995). Inhibition of the production and effects of JL1 and TNF-a in rheumatoid arthritis. *Arthritis-Rheum*; v.38: 151-160.

Avishai N, Rabinowitz C, Rinkevich B. (2003). Use of the comet assay for studying environmental genotoxicity: comparisons between visual and image analyses. *Environ. Mol. Mutagen.* 42: 155-165.

Badii M, Garza V, Landeros J. (2006). Efecto de los plaguicidas en la fauna silvestre. *CUICYT.* 14-15: 22-44.

Baldi I, Lebailly P, Devaux A, Pottier D, De Meo M, Andre V, , Severin F, Bernaud J, Durand B, Henry-Amar M, Gauduchon P. (2003). Urine mutagenicity and lymphocyte DNA damage in fruit growers occupationally exposed to the fungicide captan. *Occup Environ Med.* 60(12):910-7.

Barberá C. (1989a). Los pesticidas agrícolas y su formulación. En: Pesticidas agrícolas. Cap.1. Omega, Barcelona, pp. 9- 26.

Barberá C. (1989b). Insecticidas piretroides. En: Pesticidas agrícolas. Cap. 10. Omega, Barcelona, pp. 202- 216.

Bayer CropScience México. (2008). <http://www.bayercropscience.com.mx/>. (2008).

Benova DK, Rupova IM, Iagova AKh, Bineva MV. (1989). Mutagenic effect of pesticides fastac 10 EK and durs ban 4E studied in a micronucleus test in mouse bone marrow cells. *Genetika* 25: 2266–2268.

Bernard A. y Lauwerys, R. (1986). Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals. *J. Occup. Med.* v.28: 559-562.

Bhunya SP, Pati PC. (1988). Genotoxic effects of a synthetic pyrethroid insecticide, cypermethrin, in mice in vivo. *Toxicol. Lett.* 41: 223-230.

Bian Q, Xu LC, Wang SL, Xia YK, Tan LF, Chen JF. (2004). Study on the relationship between occupational fenvalerate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occup. Environ. Med.* 61: 999-1005.

Bolboaca SD, Jäntschi L. (2005). Molecular descriptors family on structure activity relationships 2. Insecticidal activity of neonicotinoid compounds. *Leonardo J. Sci.* 4: 78-85.

Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543: 251-272.

Bolt HM, Foth H., Hengstler JG., Gisela H. Degen GH. 2004. Carcinogenicity categorization of chemicals—new aspects to be considered in a European perspective. *Toxicology Letters* 151, 29–41.

Bull S, Fletcher K, Boobis AR, Battershill JM. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis* 21:93-103.

Bo Shao, Lusheng Zhu, Miao Dong, Jun Wang, Jinhua Wang, Hui Xie, Qingming Zhang, Zhongkun Du, Shaoyuan Zhu. 2012. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology*. 21. 1533-1540.

Bozo L, Fernández M, López M, Reyes R, Suárez P (2007) Biomarcadores de la contaminación química en comunidades microbianas. *Interciencia* 32: 8-13.

Carballo C, Herrera A, Barrueco C, Santa-Maria A, Sanz F, De La Peña E. (1992). Analysis of cytogenetic damage induced in CHO cells by the pyrethroid insecticide fenvalerate. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 12: 243-249.

Cabral JRP, Galendo D. (1990). Carcinogenicity study of the pesticide fenvalerate in mice. *Cancer. Lett.* 49: 13-18.

Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Espinosa-Ramírez M. (1999). In vivo and in vitro promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 13: 438:81-88

Calderón-Segura ME, López L, Zúñiga R, Sanchez J, Gómez S, Villalobos R, Molina B, Frías S. (2007). Metabolic activation of herbicides products by *Vicia faba* detected in human peripheral lymphocytes using alkaline single cell gel electrophoresis. *Toxicol. In Vitro* 19: 243-251.

Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ, Dulout FN. (1999). Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of fish *Cheirodon interruptus*. *Mutat. Res.* 438: 155-161.

Carbonell E, Puig M, Xamena N, Creus A, Marcos R. (1989). Mitotic arrest induced by fenvalerate in human lymphocyte cultures. *Toxicol. Lett.* 48: 45-48.

Carbonetto S, Harrison M, Chin E, Robin N, Bernard J. (2004) Stimulation of calcineurin signaling attenuates the dystrophic pathology in mdx mice. *Human Molecular Genetics*, Vol. 13, No 4.

Carvalho, F Nhan, C. Zhong, T. Tarares, S. Klaine. (1998). Tracking Pesticides in the Tropics *Bulletin IAEA.* 40 (3): 24-30,

Carla M. Stehr, Tiffany L. Linbo, John P. Incardona, and Nathaniel L. Scholz. 2006. Notochord Degeneration and Locomotor Defects in Zebrafish Embryos and Larvae.

Cebrián ME, Hernández-Zavala A, Del Razo LM, Aguilar C, García-Vargas GG, Borja VH, (1998). Alteration in bilirubin excretion in individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Toxicol Lett.* 99(2):79-84.

Çelik A, Mazmanci B, ÇamLica Y, Askin A, Çömelekoglu U. (2003). Cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. *Mutat. Res.* 539: 91-97.

Çelik A, Mazmanci B, ÇamLica Y, Çömelekoglu U, Askin A. (2005a). Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow by gavage administration. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61: 128-133.

Çelik A, Mazmanci B, CamLica Y, Askin A, Cömelekoglu U. (2005b). Induction of micronuclei by lambda-cyhalothrin in Wistar rat bone marrow and gut epithelial cells. *Mutagenesis* 20:125-129.

Chauhan LKS, Agarwal DK, Sundararaman V. (1997). In vivo induction of sister chromatid exchanges in mouse bone marrow following oral exposure to commercial formulations of alpha-cyano pyrethroids. *Toxicol. Lett.* 93:153-157.

Chauhan LKS, Chandra S, Saxena PN, Gupta SK. (2005). In vivo cytogenetic effects of a commercially formulated mixture of cypermethrin and quinalphos in mice. *Mutat. Res.* 587: 120-125.

Chauhan LKS, Dikshith TSS, Sundararaman V. (1986). Effect of deltamethrin on plant cells. I. Cytological effects of Deltamethrin on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Mutat. Res.* 171: 25-30.

Chauhan LKS, Kumar M, Paul BN, Goel SK, Gupta SK. (2007). Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoprothuron on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 48: 636-643.

Chauhan LKS, Saxena PN, Gupta SK. (1999). Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environ. Exp. Bot.* 42: 181-189.

Chen HY, Xiao JG, Hu G, Zhou JW, Xiao H, Wang XR. (2002). Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 65:1419-1435.

Choi JS, Soderlund DM. (2006). Structure-activity relationships for the actions of 11 pyrethroids insecticides on rat Nav1.8 sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211: 233-244.

Costa C, Silvari V, Melchioni A, Cataniab S, Heffronc JJ, Trovatob A, De Pasqualeb R. (2009). Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat. Res.* 672: 40-44.

Corsini E., Viviani B., Birindelli S., Gilardi F., Torri A., Codecà I., Lucchi L., Bartesaghi S., Galli C.L., Marinovich M., Colosio C. (2006) Molecular mechanisms underlying mancozeb-induced inhibition of TNF-alpha production. *Toxicol Appl Pharmacol.* Oct 15; 208(2):178-85.

Cui Y, Guob J, Xua B, Chena Z. (2006). Potential of chlorpyrifos and cypermethrin forming DNA adducts. *Mutat. Res.* 604: 36-41.

Damastra, S. Page, J L Herrman. (2002) Meredith Persistent organic pollutants: potential health effects. *Journal Epidemiol Community Health* 2002; 56:824–82

Das GP, Shaik AP, Jamil K. 2006. Estimation of apoptosis and necrosis caused by pesticides in vitro on human lymphocytes using DNA diffusion assay. *Drug Chem Toxicol.* 29, 147-156.

Dealtry G.B., Naylor M.S., Fiers W., Balkwi F.R. (1987) DNA fragmentation and cytotoxicity caused by TNF is enhanced by interferon- γ . *Fur J Immunol*; 17:689- 693.

Demia G, Vlastos D, Goumenou M, Matthopoulos DP. (2007). Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. *Mutat. Res.* 634: 32-39.

Dias Bainy AC. Oxidative stress as a biomarker of polluted aquatic sites. In: Physiology and biochemistry of fishes of the amazon. Edited by AL Val, MF Almeida-Val and DJ Randall. 1996; 331-34.

Dianovsky J, Sivikova K. (1995). In vivo and in vitro cytogenetic effect of supermethrin. *Biomed. Environ. Sci.* 8: 359–366.

Dich J, Zahm SH, Hanberg A, Adami HO. (1997). Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control.* 8(3):420-43.

Di Giulio RT, Benson WH, Sanders BM, Van Veld PA. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand G, editor. *Fundamentals of aquatic toxicology, effects, environmental fate, and risk assessment.* London: Taylor & Francis; 1995. p. 523-61.

Dorval J, Hontela A. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003; 192:191-200.

Duramad P, Tager IB, Holland NT. (2007). Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. *Toxicol. Lett.* 172: 48-59.

El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. (2004). Role of α -tocopherol and β -carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hematobiochemical parameters and semen quality of male rats. *J. Environ. Sci. Health B.* 39: 443-459.

Engel LS, Hill DA, Hoppin JA, Lubin JH, Lynch CF, Pierce J, Samanic C, Sandler DP, Blair A, Alavanja MC. (2005). Pesticide use and breast cancer risk among farmer's wives in the agricultural health study. *Am. J. Epidemiol.* 161: 121-135.

EPA (Environmental Protection Agency, USA). (2003). Tiacloprid; pesticide tolerance. *Fed.Reg.* 68: 55503-55513.

EPA (Environmental Protection Agency, USA). (2005). Cyfluthrin; pesticide tolerance. *Fed.Reg.* 70: 53944-53953.

Espinoza-Gómez, Sergio Pérez-Sicairos, Shui Wai Lin , Rosa M. Félix-Navarro. (2009). Rejection of As (III) and As (V) from arsenic contaminated water via electro-cross-flow negatively charged nanofiltration membrane system. *Desalination* volume 249, Issue 2. Pages 458–465

European commission Directorate general health for health and consumer protection (2002). Review report for the active substance *beta-cyfluthrin*. http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/ph_ps/pro/eva/existing/list1_en.htm. (2009).

Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L. (1995). The comet assay: *A comprehensive review*. *Mutat. Res.* 339: 37-59.

Fasulo, S., Marino, S., Mauceri, A., Maisano, M., Giannetto, A., D'Agata, A., Parrino, V., Minutoli, R., De Domenico, E., 2010a. A multibiomarker approach in *Coris julis* living in a natural environment. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 73, 1565–1573.

FAO (Food and agriculture organization of the United Nations). (1999). FAO specifications and evaluations for plant protection products: beta-cyfluthrin, pp. 19.

FAO/WHO (2001). Amount of poor-quality pesticides sold in developing countries alarmingly high, press release, 1 February. <http://www.who.int/inf-pr-2001/en/pr2001-04.html>. (2009).

Fairbairn W, Olive P, O'Neill K. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339: 37-45.

Feng S, Kong Z, Wang X, Zhao L, Peng P. (2004). Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana n. hallowell*. *Chemosphere* 56: 457-463.

Feng S, Kong Z, Wang X, Peng P, Zeng EY. (2005). Assessing the genotoxicity of imdacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic test. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 61: 239-246.

Ferrer A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales. Sis. San Navarra* 26: 155-171.

Ford KA, Casida JE. (2006a). Chloropyridinyl neonicotinoid insecticides: diverse molecular substituents contribute to facile metabolism in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 944-951.

Ford KA, Casida JE. (2006b). Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 1549-1556.

Ford KA, Casida JE. (2008). Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10168-10175.

Forshaw PJ, Ray DE. (1993). A voltage-dependent chloride channel in niel 15 neuroblastoma cells is inactivated by protein kinase C and also by the pyrethroid deltamethrin. *J Physiol.* 467: 252.

Fraga CG, Cavanagh E, Carrasquedo F, Lotiti, Lucesoli F, Oteiza P. (1996). Antioxidants defensas and mechanisms of protection. *Toxicology and Pharmacology* 13; 57-149.

Gandhi G, Chowdhury J, Sareen P, Dhillon V. (1995). Genotoxic effects of deltamethrin in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat. Res.* 346: 203-206.

García JE. (1998). Intoxicaciones agudas con plaguicidas: costos humanos y económicos. *Pan. Am. J. Pub. Health* 4: 383-387.

Giray B, Gurbay A, Hincal F. (2001). Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicol. Lett.* 118: 139-146.

Gil F. y Pla A. (2001). Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 21: 245-255.

Ghosh AK, Sharma A, Talukder G. (1992). Cytotoxic effects of sumicidin, a type II synthetic pyrethroid, on mice in vivo at 6, 12 and 24 h after exposure. *Cytobios* 71: 85-91.

Gómez-Arroyo S, Calderón ME, Cortés J, Villalobos R, Flores S. (2006). Contribución del metabolismo vegetal sobre el efecto genotóxico de plaguicidas. En: *Tópicos de Genética. Sociedad Mexicana de Genética y la Universidad Autónoma del Estado de México*, pp. 95-118.

Gomez-Eyles JL, Svendsen C, Lister L, Martin H, Hodson ME, Spurgeon DJ. (2009). Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and tiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 71-79.

González M, Capote B, Rodríguez E. (2001). Mortalidad por intoxicaciones agudas causadas por plaguicidas. *Rev. Cubana Higiene Epidemiol.* 39: 136-43.

Goodman, L.R., Hansen, D.J., Coppage, D.L., Moore, J.C. & Matthews, E. (1979) Diazinon: Chronic toxicity to, and brain acetylcholinesterase inhibition in the sheepsheadminnow, cyprinodon variegates, *Trans. Am. Fish. Soc.* Vol. 108: 479-488.

Goverdina E. Fabraus V., Payne J. (1996). Efficacy of toxaphene on reproduction of fish. *Chemosphere.* 34. Pp. 855-867.

Grandjean P., Brown S.S., Reavey P., Young D.S. (1994). Biomarkers of chemical exposure: *State of the art. Clin. Chem.* 40: 1360-1362.

Green T, Toghil A, Lee R, Waechter F, Weber E, Noakes J. (2005a). Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 1: mode of action studies in the mouse. *Toxicol. Sci.* 86: 36-47.

Green T, Toghil A, Lee R, Waechter F, Weber E, Peffer R, Noakes J, Robinson M. (2005b). Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 2: species differences in response. *Toxicol. Sci.* 86: 48-55.

Györfy E., Anna L., Kovács K., Rudnai P., Shoket B. (2008). Correlation between biomarkers of exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adducts. *Mutagenesis* 23: 1-18.

Hadnagy W, Seemayer NH, Kuhn KH, Leng G, Idel H. (1999). Induction of mitotic cell division disturbances and mitotic arrest by pyrethroids in V79 cell cultures. *Toxicol. Lett.* 107: 81-87.

Handy, R.D. 2003. Review: Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135: 25-38.

Hellman B, Vaghef H, Boström B. (1995). The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 336:123-131.

Hernández M, Jiménez C. (2007). Caracterización de las intoxicaciones agudas por plaguicidas: perfil ocupacional y conductas de uso de agroquímicos en una zona agrícola del estado de México, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23: 159-167.

Heudorf U, Angerer J. (2001). Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environ. Health. Perspect.* 109: 213-217.

Idrovo AJ. (1999). Intoxicaciones masivas con plaguicidas en Colombia. *Biomédica (Bogota)* 19: 67-76.

Ihara M, Shimomura M, Ishida C, Nishiwaki H, Akamatsu M, Sattelle DB, Matsuda K. (2007). A hypothesis to account for the selective and diverse actions of neonicotinoid insecticides at their molecular targets, nicotinic acetylcholine receptors: catch and release in hydrogen bond networks. *Invert. Neurosci.* 1: 47-51.

Ila H, Topaktas M, Rencuzogullari E, KayraldizA, DonbakL, Kenan Y. (2008). Genotoxic potential of cyfluthrin. *Mutat. Res. / Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* 656: 49-54.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). (1998). Informe 1997. Estadística del medio ambiente. México.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). (2008). <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mamb91&c=6102>.(2009)

Ishmael J, Litchfield MH. (1988). Chronic toxicity and carcinogenic evaluation of permethrin in rats and mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 11: 308-322.

Kale M, Rathore N, Jone S, Bhatnagar D. (1999). Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen specie. *Toxicol. Lett.* 105: 197-205.

Kamrin MA. (1997). Introduction and profile description. En: *Pesticide profiles: toxicity, environmental impact, and fate*. Cap. 1. Lewis, pp: 3-11.

Kaneko H, Miyamoto J. (2001). Pyrethroids Chemistry and Metabolism. En: *Handbook of Pesticide Toxicology, Agents*. Vol. 2. Cap. 58. Academ. Press, pp. 1263-1288.

Karabay UN, Oguz MG. (2005). Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides imidacloprid and methamidophos. *Genet. Mol. Res.* 4: 653-662.

Kelly SA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. *Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems environmental health perspectives*; 1998. p. 106-7.

Keith D, Irina V. Ustyugo, Kathleen M. Brundage, John B. Barnnett, and Rosana Schafer. (2007). A review of the immunotoxicity of the pesticide 3, 4-dichloropropionanilide. Submitted to journal of Toxicology and environmental health, part B (2007). 630-654.

Kimmel C.B. Ballard W.W., Kimmel S. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*: 203253-310.

Kocaman AY, Topaktas M. (2007). In vitro evaluation or the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 48: 483-490.

Kocaman A. Topaktas M. (2009). The in vitro genotoxic effects of a commercial formulation of α -cypermethrin in human peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 50: 27-36.

Lammer E., H.G. Kamp V. Hisgen, M. Koch, D. Reinhard, (2009). Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology in Vitro*, volume 23, Pages 1436–1442

Laskowski DA. (2002). Physical and chemical properties of pyrethroids. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 174: 49-170.

Laskowski DA. (2002). Physical and chemical properties of pyrethroids. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 174: 49-170.

Liu W, Gan J. (2004). Separation and analysis of diastereomers and enantiomers of cypermethrin and cyfluthrin by gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 52: 755-761.

Liu W, Quin S, Gan J. (2005). Chiral stability of synthetic pyrethroid insecticides. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3814-3820.

Liu H, Zhao M, Zhang C, Ma Y, Liu W. (2008). Enantioselective cytotoxicity of the insecticide bifenthrin on a human amnion epithelial (FL) cell line. *Toxicology* 253: 89-96.

Li Q. 2007. New Mechanism of Organophosphorus Pesticide-induced Immunotoxicity *J Nippon Med Sch.* 74, 92-105.

Livingstone DR. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue Méd. Vét.* 2003; 154(6):427-30.

Nakadai A, Li Q, Kawada T. 2006. Chlorpyrifos induces apoptosis in human monocyte cell line U937. *Toxicology* 224, 202—209.

Maldonado E. (2003). Experimentación en el pez-cebra, un modelo de biología del desarrollo. Mensaje Bioquímico, Vol XXVII. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>) (ISSN-0188-137X).

Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 573-580.

Mani U, Islam F, Prasad AK, Kumar P, Suresh Kumar V, Maji BK. (2002). Steroidogenic alterations in testes and sera of rats exposed to formulated fenvalerate by inhalation. *Hum. Expl. Toxicol.* 21: 593-597.

Mansour SA. (2004). Pesticide exposure- egyptian scene. *Toxicology* 198: 91-115.

McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.* 288: 47-63.

McKim, J.M., Lien, G.J., 2001. Toxic responses of the skin. In: Schlenk, D., Benson, W.H. (Eds.), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts Organs*, vol. 1. Taylor & Francis, London/New York, pp. 225/268.

Meacham C, Brodfuehrer P, Watkins J, Shafer T. (2008). Developmentally-regulated sodium channel subunits are differentially sensitive to α -cyano containing pyrethroids. *Tox. App. Pharm.* 231: 273-281.

Mense SM, Sengupta A, Lan C, Zhou M, Bentsman G, Volsky DJ, Whyatt RM, Perera FP, Zhang L. (2006). The common insecticides cyfluthrin and chlorpyrifos alter the expression of a subset of genes with diverse functions in primary human astrocytes. *Toxicol. Sci.* 93: 125-135.

Millar NS, Denholm I. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert. Neurosci.* 1: 53-66.

Mino CP, Bustamante G, Sanchez ME, Leone P. (2002). Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environ. Health Perspect.* 110: 1077-1080.

Moller P. (2006). The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98: 336-345.

Mulla, M. S., Mian, L. S. & Kawacki, J. A. (1981). Distribution, transport, and fate of the insecticides Malathion and parathion in the environment. *Residue Reviews* 81, 1-172.

Nadda G, Saxena PN, Srivastava G. (2005). Effects of beta-cyfluthrin on white and sepia mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Environ. Biol.* 26: 363-367.

Evaluation of the new active tiacloprid in the new product Calypso 480 SC insecticide. NRA, Camberra.

Naravaneni R, Jamil K. (2005). Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on human lymphocytes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19: 304-310.

Östling O y Johanson KJ. (1984). Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 291-298.

Osman K., A. Akesson, M. Berglund, K. Bremme, A. Schutz, K. Ask, M. Vahter. (2000). Toxic and essential elements in placentas of Swedish women. *Clin. Biochem.*, 33 (2000), pp. 131-138.

Orta Arrazcaeta, Lissette (2002). Contaminación de las aguas por plaguicidas químicos. *Fitosanidad*, vol. 6, núm. 3 pp. 55-62

Oropesa A., L. Jiménez. (2008) Disruptores endocrinos en el medio ambiente: Caso del 17 α -etinil-estradiol. Unidad de Toxicología. Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria (UEX 68) *Observatorio Medioambiental* vol. 11 63-76

Pang Yefei, Peter Thomas. (2009). Involvement of estradiol-17 β and its membrane receptor, G protein coupled receptor 30 (GPR30) in regulation of oocyte maturation in zebrafish, *Danio rario*. *General and Comparative Endocrinology*. Pages 58-61

Patel S, Bajpayee M, Pandey A, Parmar D, Dhawan A. (2007). In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicol. In Vitro* 21: 1409-1418.

Patel S, Pandey A, Bajpayee M, Parmar D, Dhawan A. (2006). Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. *Mutat. Res.* 607: 176-183.

Pass H.I., Mew D., Pass H.A., Temeck P. (1995). The macrophage, TNF, and other cytokines. *Chest Surg Clin North Am*: 5:73-90.

Pedrajas J, Peinado J, López-Barea J. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu-Zn superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chemico-biological interactions* 1995; 98:267-282.

Perry AS, Yamamoto I. (1997). Introduction. En: *Insecticides in agriculture and environment: retrospects and prospects*. Cap. 1. Springer, Berlín, pp.1-3.

Pine MD, Hiney JK, Lee B, Les Dees W. (2008). The pyrethroid pesticide esfenvalerate suppresses the afternoon rise of luteinizing hormone and delays puberty in female rats. *Environ. Health Perspect.* 116: 1243-1247.

Pimentel D. (1997). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University, Ithaca, NY 14853-0901.

Prasamthi K, Muralidhara-Rajini PS. (2005). Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food Chem. Toxicol.* 43: 299-306.

Priyadarshi Rajeev Nayan, Bindey Kumar, Chiranjeev Khandelwal, Utpal Anand (2013). Diagnosis and management of giant choledochal cysts complexities compared to smaller cysts. *Indian J Gastroenterol* 32(4):262: 267

Puig M, Carbonell E, Xamena N, Creus A, Marcos R. (1988). Analysis of cytogenetic damage induced in cultured human lymphocytes by the pyrethroid insecticides cypermethrin and fenvalerate. *Mutagenesis* 4: 72-74.

Raj M., Guo H. (2014). Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and embryotoxicity of insecticide propoxur using flounder gill (FG) cells and zebrafish embryos. *Toxicology in Vitro.* 28. 340-353.

Rand, M. Cary (1995). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Cap.1, Second Edition.

Ray D. (2001). Pyrethroids insecticides: mechanisms of toxicity, systemic poisoning syndromes, paresthesia and therapy. En: Handbook of pesticide toxicology, agents. Vol 2. Cap. 59. Academic Press, pp. 1281-1303.

Ray D, Forshaw PJ. (2000). Pyrethroid insecticides: poisoning syndromes, synergies, and therapy. Clin. Toxicol. 38: 95-101.

Reigart RJ, Roberts RJ. (1999). Herbicidas Nitrofenólicos y Nitrocresólicos. En: Reconocimiento y Manejo de los Envenenamientos por Pesticidas. Cap. 11. EPA, pp. 118-121.

Repetto R., Baliga, S.S. (1996). Los plaguicidas y el sistema inmunitario: riesgos para la salud pública. World Resources Institute (WRI), Washington, D.C. 112.

Restrepo I. (1992). Algunos impactos de los plaguicidas en el ser humano y el ambiente. En: Los plaguicidas en México. Comisión Nacional de Derechos Humanos México. Amanuense, pp. 35-74.

Rojas E, Lopez MC, Valverde M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J. Chromatogr. B. 722: 225-254.

Rojas A., Ojeda M. y Barraza X. (2000). Malformaciones congénitas y exposición a pesticidas. Rev. Med. Chile 128: 399-404.

Rudek Z, Rozek M. (1992). Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* and *Xenopus laevis* by the pyrethroid fastac 10 EC. Mutat. Res. 298: 25-29.

SS (Secretaría de Salud). (1993). Anuario estadístico. Dirección general de estadística, informática y evaluación. Octubre.

Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Vuyyuri SB, Danadevi K, Hussain S, Grover P. (2006). Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. Mutat. Res. 609:74-80.

Saleh AM, Vijayasarathy C, Masoud L, Kumar L, hahin A, Kambal A. 2003a. Paraoxon induces apoptosis in EL4 cells via activation of mitochondrial pathways. Toxicol Appl Pharmacol. 190, 47-57.

Saleh AM, Vijayasarathy C, Fernandez-Cabezudo M, Taleb M, Petroianu G. 2003b. Influence of paraoxon (POX) and parathion (PAT) on apoptosis: a possible mechanism for toxicity in low-dose exposure. J Appl Toxicol. 23, 23-29.

Sandermann H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. Trends Biochem. Sci. 17: 82-84.

Saxena PN, Chauhan LKS, Gupta SK. (2005). Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology* 216: 244-252.

Schlenk D, Yeung C and Rettie A. (2008) Unique monooxygenation pattern indicates novel flavin containing monooxygenase in liver of rainbow trout. *Marine Environmental Research* 58, 499–503.

Schulz-Jander D, Casida J. (2002). Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicol. Lett.* 132: 65-70.

Sepici-Dinçel A, Çağlan K, Selvi M, Sarikaya R, Sahin D, Ayhan O, Erkoç F. (2009). Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72:1433-1439.

Shafer T, Meyer D, Crofton K. (2005). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ. Health. Perspect.* 113: 123-136.

Shah J., Lagueux S., Kapur P., Levallois P., Ayotte S., *et al.*(1997). "Determination of genotoxicity of the metabolites of the pesticides Guthion, Sencor, Lorox, Reglone, Daconil and Admire by ³²P-postlabeling," *Molecular and Cellular Biochemistry*. vol. 169: 84-184.

Shukla Y, Yadav A, Arora A. (2002). Carcinogenic and cocarcinogenic potential of cypermethrin on mouse skin. *Cancer Lett.* 182: 33-41.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.

Singh NP, Srivastava AK, Singh AK. (2008). Cell cycle stage specific application of cypermethrin and carbendazim to assess the genotoxicity in somatic cells of *hordeum vulgare* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81: 258-261.

Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargen D, Stevens JT, Weiner ML. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicol.* 171: 3-59.

Soderlund DM, Bloomquist JR. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroids insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 77-96.

Sorensen M., Autrup H., Moller P., Hertel O., Solvang J.S., Vinzents P., Knudsen L.E., Loft S. (2003). Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat. Res.* 544: 255-271.

Speit G, Hartmann A. (2005). The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 113: 203-212.

Sudakin DL. (2006). Pyrethroid insecticides: advances and challenges in biomonitoring. *Clin. Toxicol.* 44: 31-37.

Suman G, Naravani R, Jamil K. (2006). In vitro cytogenetic studies of cypermethrin on human lymphocytes. *Indian. J. Exp. Biol.* 44: 233-239.

Surrallés J, Carbonell E, Puig M, Xamena N, Creus A, Marcos R. (1990). Induction of mitotic micronuclei by the pyrethroid insecticide fenvalerate in cultured human lymphocytes. *Toxicol. Lett.* 54: 151-155.

Surrallés J, Xamena N, Creus A, Catalan J, Norppa H, Marcos R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in wholeblood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 341: 169-184.

Schluz-Jander D., y Casida J. E. (2002). Imidacloprid Insecticide Metabolism: Human Cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicol. Letters.* 132:65-70.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221.

Tisch M, Faulde M, Maier H. (2005). Genotoxic effects of pentachlorophenol, lindane, transfluthrin, cyfluthrin, and natural pyrethrum on human mucosal cells of the inferior and middle nasal conchae. *Am. J. Rhino.* 19: 141-151.

Tisch M, Schmezer P, Faulde M, Groh A, Maier H. (2002). Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 259: 150-153.

Tokumoto J. Danjo M., Kobayashi Y. (2013). Effects of Exposure to Clothianidin on the Reproductive System of Male Quails. *Toxicology.* 657-8501.

Tomita K., Shirai H y Flakoshima L. (1990). X-Ray structural studies of tumor necrosis factor. In: *Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action, Role of Disease and Therapy.* Basel; 38-42.

Tomita K., Shirai H y Flakoshima L. (1990). X-Ray structural studies of tumor necrosis factor. In: *Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action, Role of Disease and Therapy.* Basel; 38-42.

Tomizawa M, Casida JE. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 339-364.

Tomizawa M, Casida JE. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanism of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 247-268.

Tomizawa M, Lee D, Casida JE. (2000). Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. *J. Agric. Food. Chem.*48: 6016-6024.

Undeğer U, Başaran N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch. Toxicol.* 79: 169-176.

Valverde B.E., Merayo A., Fonseca J. F., Alvarez T. y Riches C.R (1999a). Validation of integrated methods to control itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) in corn with subsistence growers in Costa Rica. *WSSA Abstracts* 39: 308.

Valko C. J. Rhodes J., Moncol M., Izakovic y Mazu M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. vol. 160 1-40.

Van Cauteren H., de Kok, M.C.M., Van Schooten, F. J. (1996). Cancer risk evaluation. In: *Toxicology. Principles and applications*. CRC, New York, 384-413.

Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. *Assessment Environmental Toxicology and Pharmacology* 2003; 13:57-149.

Van Maele-Fabry G., Libotte V., Willems J y Lison D (2006). Review and meta-analysis of risk estimates for prostate cancer in pesticide manufacturing workers. *Cancer Causes Control* 17, 353-373.

Vodeb L, Petanovska-Ilievska B. (2006). HPLC–DAD with different types of column for determination of β -cyfluthrin in pesticide formulations. *Acta Chromatograp.* 17:188-201.

Waliszewski SM, Villalobos-Pietrini R, Gómez-Arroyo S, Infazón RM. (2003). Persistent organochlorine pesticide levels in cow's milk samples from tropical regions of Mexico. *Food Adit. Contam.* 20: 270-275.

Ware G, Calhill W., Gerhardt P. (1970). Pesticide drift IV. On target deposit from aerial application of insecticides. *J Entomol.* 63 (6)

Wheeler AJ, Bett BJ, Billett DSM, Masson DG, Mayor D. (2005). The impact of demersal trawling on NE Atlantic deep-water coral habitats: the case of the Darwin Mounds, UK. In: Barnes P (ed) *Benthic Habitats and the Effects of Fishing*. Amer Fish Soc, Bethesda, Maryland, USA

Whitaker G. (2004). Toxicity and Hazards of Pesticides. En: *The Pesticide Book*. Cap. 21. WH Freeman (ed.), pp. 233-256.

WHO. (2003). Intensifies Commitment to Reduce Poisoning from Acute Toxic Pesticides - Closing Press Release. En: Forum IV: Global Chemicals Meeting. http://www.who.int/ifcs/documents/forums/ forum4/ en/clos_pres.pdf. (2009).

Wolansky MJ, Harrill JA, (2008). Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. *Neurotoxicol. Teratol.* 30: 55-78.

Wolansky MJ, McDaniel KL, Moser VC, Crofton KM. (2007). Influence of dosing volume, on the neurotoxicity of bifenthrin. *Neurotoxicol. Teratol.* 29: 377-384.

Woods JA, O'Leary KA, McCarthy RP, O'Brien NM. (1999). Preservation of comets assay slides: comparison with fresh slides. *Mutat. Res.* 429: 181-187.

Xia YK, Bian Q, Xu LC, Cheng SP, Song L, Liu JY. (2004). Genotoxic effects on human spermatozoa among pesticide factory workers exposed to fenvalerate. *Toxicology* 203: 49-60.

Xia Y, HanY, Wu B, Wang S, Gu A, Lu N, Bo J, Song L, Jin N, Wang X. (2008). The relation between urinary metabolite of pyrethroid insecticides and semen quality in humans. *Fert. Ster.* 89: 1743- 1750.

Xie Y.C., Schafer R., Barnett J.B. (1997).The immunomodulatory effects of the herbicide propanil on murine macrophage interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production. *Toxicol Appl Pharmacol*, 145: 184– 191.

Xu LC, Sun H, Chen JF, Bian Q, Song L, Wang XR. (2006). Androgen receptor activities of p, p 0-DDE, fenvalerate and phoxim by androgen receptor reporter gene assay. *Toxicol. Lett.* 160: 151-157.

Yang Y., Ma Huihui. Zhou J. (2014). Join toxicity of permethrin and cypermethrin at sublethal concentrations to the embryo-larval zebrafish. *Chemosphere.* 96. 146-154.

Yin D., Ying G., Yan L. (2006). Pentachlorophenol treatment in vivo elevates point mutation rate in zebrafish p53 gene. *Science Direct* 609. 92-101.

Yao H., Min H. Z. (2006). Response of superoxide dismutase, catalase, and ATPase activity in bacteria exposed to Acetamiprid, " *Biomedical and Environmental Sciences.* 19, pp. 309-314.

Yu L., Chen M., Liu Y. (2013). Thyroid endocrine disruption in zebrafis larvae following exposure to hezaconazole and tebuconazole. *Aquatic Toxicology.* 138. 35-42.

Yousef MI, Awad TI, Mohamed EH. (2006). Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology* 227: 240-252.

Zang Y, Luo Y, Kong ZM. (2000). Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.* 108: 271-278.

Zhang J, Zhu W, Zheng Y, Yang J, Zhu X. (2008). The antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides cyfluthrin and β -cyfluthrin. *Reprod. Toxicol.* 25:491–496.

Zegura B, Lah TT, Filipic M. (2004). The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology* 200: 59-68.