



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO OCASIONADO
POR PLAGUICIDAS EN UNA POBLACIÓN EXPUESTA
DE LA CIÉNEGA DE CHAPALA, MICHOACÁN,
MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ZELTZIN MUÑOZ JUÁREZ



**TUTORA:
DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO**

2016

Ciudad Universitaria, D. F.



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.

1. Datos del alumno
Muñoz
Juárez
Zeltzin
5539060820
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
308211894

2. Datos del tutor
Dra.
Sandra Luz
Gómez
Arroyo

3. Datos del sinodal 1
Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

4. Datos del sinodal 2
Dr.
Pedro Rafael
Valencia
Quintana

5. Datos del sinodal 3
M en C.
Ana Rosa
Flores
Márquez

6. Datos del sinodal 4
Dra.
María Isabel
Rodríguez
Romero

7. Datos del trabajo escrito
Evaluación del daño genético ocasionado por plaguicidas en una población expuesta de la
ciénega de Chapala, Michoacán, México.
50 p.
Año 2016

AGRADECIMIENTOS

El más grande reto de mi vida académica ha sido el escribir la tesis de licenciatura. Este arduo camino fue posible gracias al apoyo de todas aquellas personas que me acompañaron.

Mi más sincero agradecimiento a mi Directora de tesis

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Por el consejo, enseñanza y dedicación que me ha brindado durante estos años, no hubiera sido posible sin usted. La admiro.

A mis sinodales por haber dedicado parte de su valioso tiempo a la revisión de éste trabajo:

Dr. Luis Felipe Jiménez García.
Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana
M. en C. Ana Rosa Flores Márquez
Dra. María Isabel Rodríguez Romero

Agradezco a la Dra. María Antonieta Ochoa Ocaña por toda la ayuda que me proporcionó para la realización de éste proyecto.

A Denisse, Xime, Julio, Gaby, Gabs por su compañía en nuestras travesías por Michoacán. Especialmente quiero agradecer a Pao por siempre ayudar y por supuesto a **Adriana** que has estado a mi lado en cada una de las hazañas del laboratorio.

A la M en C. Ana Rosa y a Victoria Carrillo (Vicky) por siempre estar dispuestas a escuchar y ayudar.

A la Dra. Jose, le agradezco la asistencia otorgada en el laboratorio.

Agradezco el apoyo financiero otorgado por el Centro de Ciencias de la Atmósfera a través de la beca de Apoyo para término de la licenciatura.

Un agradecimiento muy especial a cada una de las personas que han hecho la travesía de mi tesis mucho más divertida:

Xime, Julio y Gabs, por todo!

July (por la escucha), Adri y Pao (por estar dentro y fuera del lab), Yu (por el drama).

Ridículas son lo máximo!

Cris, por tu amistad, te quiero!

Y POR ÚLTIMO QUIERO RECONOCER Y DAR GRACIAS INFINITAS A MI FAMILIA:

TÍO MARCELO POR TODO EL APOYO Y CARÍÑO BRINDADO SIEMPRE.

MOMMY ERES LA MEJOR, TE AMO Y TE DOY LAS GRACIAS POR SIEMPRE ESTAR AHÍ: EN LAS MUY BUENAS, BUENAS, MALAS Y MUY MALAS. SIN TI YO NO SERÍA QUIEN SOY.

HERMANO, TE AMO. GRACIAS POR SER SIEMPRE MI APOYO.

PAPÁ....TE QUIERO Y EXTRAÑO.

ÍNDICE DE CONTENIDOS.

RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1.0 Clasificación de los plaguicidas.....	8
1.1 Uso de plaguicidas en México.....	12
2.0 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC).....	13
2.1 Micronúcleos (MN).....	14
2.2 Puentes nucleoplásmicos (PN).....	15
2.3 Brotes nucleares (bN).....	16
2.4 Necrosis y apoptosis.....	16
2.5 Ritmo de la división celular. Índice de división nuclear (IDN) e índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC).....	16
3.0 Estudios de biomonitoreo citogenético en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas.....	17
3.1 Lugar de estudio.....	19
II. JUSTIFICACIÓN.....	21
III. HIPOTESIS.....	21
IV. OBJETIVOS.....	21
V. METODOLOGÍA.....	22
5.0 Selección y muestreo de la población.....	22
5.1 Cultivos celulares.....	22
5.2 Inhibición de la citocinesis.....	23
5.3 Cosecha celular.....	23
5.4 Preparación de laminillas.....	23
5.5 Observación y conteo celular.....	24
5.6 Análisis estadístico.....	25
VI. RESULTADOS.....	26
6.0 Datos acerca de las poblaciones expuestas a plaguicidas.....	26
6.1 Exposición directa.....	28
6.2 Exposición indirecta.....	28
6.3 Observación y registro celular.....	29
6.4 IDN e IPBC.....	31
6.5 Frecuencias de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (PN) y brotes nucleares (bN).....	32
6.6 Correlaciones.....	33
VII. DISCUSIÓN.....	35

VIII. CONCLUSIONES.....	41
IX. REFERENCIAS.....	43

RESUMEN

Con el fin de erradicar y controlar las plagas que causan perjuicios a las poblaciones humanas y a la agricultura se aplican grandes cantidades de pesticidas, actualmente se conoce que la salud de las personas en contacto puede ser afectada por estas sustancias, diversos estudios relacionan la exposición a plaguicidas con enfermedades cardiovasculares y respiratorias así como con la reducción de funciones renales, inmunes y reproductoras, también se ha asociado a diabetes y cáncer.

En México, el territorio del estado de Michoacán, en su mayoría, está destinado a la producción agrícola por tanto se encuentra en el sexto lugar con mayor consumo de agroquímicos. En el presente trabajo se evaluó el daño genético ocasionado por pesticidas en 68 individuos de dos municipios de la ciénega de Chapala, Cojumatlán de Régules (población expuesta) y Sahuayo de Morelos (población testigo) a través del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en linfocitos, para tal efecto se realizaron cultivos de la muestra sanguínea con la variante de que a las 48 h del inicio del mismo se le agregó citocalasina-b sustancia que inhibe la formación del anillo contráctil durante la citocinesis, posteriormente se hicieron laminillas y se observaron al microscopio óptico, se realizó un conteo celular de 500 células polinúcleadas y 1000 binúcleadas, en estas últimas se registró la presencia de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares. Los datos fueron analizados a través de análisis de varianza, la prueba de comparación múltiple Newman-Keuls y correlaciones con el coeficiente de Pearson.

Se detectaron diferencias significativas entre los grupos expuestos y el testigo en cuanto a las frecuencias de micronúcleos. Los puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares no demostraron diferencias en ninguna de las poblaciones estudiadas. A partir de las correlaciones realizadas se identificó que ni el tiempo de exposición así como tampoco la

edad tienen efecto sobre el daño genético analizado. Los resultados indican que la exposición directa o indirecta a plaguicidas afecta la integridad del ADN de las células ocasionando la vulnerabilidad de las mismas y poniendo en riesgo la salud de los individuos expuestos.

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo al Diccionario de la Real Academia Española una plaga es cualquier aparición masiva y repentina de seres vivos de la misma especie que provoca graves daños a poblaciones animales o vegetales por ejemplo una enfermedad causada por vectores en seres humanos, como el dengue, o un animal, planta u hongo que cause la pérdida de un cultivo agrícola para el consumo o de importancia comercial. Es por tales motivos que la eliminación de las plagas se convirtió en una necesidad apremiante para los seres humanos.

Con el fin de erradicar o controlar las plagas que causan perjuicios indirecta o directamente a las poblaciones humanas se desarrollaron sustancias químicas especializadas: los plaguicidas. La aplicación de estos productos tuvo éxito eminente debido a que su uso incrementó la supervivencia de cultivos o la erradicación de enfermedades graves para el hombre.

Con el paso del tiempo y debido al aumento de la población en el mundo, su empleo se ha ido incrementando. Sin embargo, se ha observado que estos agentes no solo atacan a los objetivos para los cuales fueron creados sino que muchos de ellos también dañan el ambiente, esto se debe a que no son de fácil degradación, son persistentes en suelo, agua subterránea y agua superficial.

Asimismo, se conoce que la salud humana puede ser afectada por estas sustancias (WHO, 1990). Diversos estudios relacionan la exposición a plaguicidas con enfermedades cardiovasculares y respiratorias así como con funciones renales, inmunes y reproductoras reducidas, también se ha asociado con el incremento en la incidencia de diabetes y cáncer (Aktar-Wasim *et al.*, 2009) o produciendo alteraciones tanto en células germinales como somáticas. El aumento de alteraciones en el material hereditario de las células germinales

(óvulos, espermatozoides) y las células que las originan, pueden provocar un aumento en la ocurrencia de enfermedades genéticas, cromosómicas y multifactoriales. Además, existe una estrecha relación entre las alteraciones del ADN de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas (Aiassa *et al.*, 2012).

1.0 Clasificación de plaguicidas.

Con el incremento de la producción agrícola surgió la apremiante necesidad de controlar químicamente las plagas lo que favoreció el surgimiento de los pesticidas sintéticos, sin embargo a su vez se hicieron evidentes los efectos adversos que estos productos traían al ambiente, a los organismos no blanco y a la salud humana. Según la base de datos de la American Chemical Society, en 1993 se habían identificado más de 13 millones de productos químicos, a los que se suman cada año 500,000 nuevos compuestos. Actualmente, miles de éstos se comercializan en todo el mundo, sin que sus efectos nocivos sean obstáculos que limiten su producción, puesto que existe una inmensa gama de sustancias comercializándose alrededor del mundo es importante que la clasificación de los pesticidas se realice en función de algunas de sus características principales, como son toxicidad aguda, vida media (VM), estructura química, su uso y organismos que controlan.

Por su VM, los plaguicidas se clasifican en permanentes (VM: indefinida), persistentes (VM : varios meses hasta 20 años), moderadamente persistentes (VM 1 a 18 meses) y no persistentes (VM: días hasta 12 semanas). De acuerdo a su estructura química (Tabla 1), los plaguicidas se agrupan en diversas familias que incluyen desde los compuestos organoclorados y organofosforados hasta inorgánicos (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su estructura química.

<i>Familia química</i>	<i>Características</i>
Organoclorados	Absorción por inhalación, ingestión y vía cutánea, se acumulan en tejidos ricos en grasas, se biomagnifican en las redes tróficas. Mecanismo de acción al interferir con el flujo de los cationes a través de las membranas nerviosas, incrementando la irritabilidad neuronal. Toxicidad aguda
Organofosforados	Se absorben por inhalación, ingestión y vía cutánea, su mecanismo de acción es por inhibición de la acetilcolinesterasa. Toxicidad grave
Carbamatos	Se absorben por inhalación, ingestión y solo algunos por vía cutánea, mecanismo de acción por inhibición de la acetilcolinesterasa, pero a diferencia de los organofosforados esta unión es reversible, por lo que las afectaciones son de menor duración. Toxicidad moderada
Piretroides	Absorción a través del intestino y de la membrana pulmonar y muy poco vía dérmica. Debe considerarse que los piretroides casi siempre se mezclan con algunos organofosforados o carbamatos, los cuales son principalmente los que interfieren en la toxicidad de la mezcla. Toxicidad baja
Fenilpirazoles	Se absorben por vía cutánea. Su mecanismo de acción consiste en bloquear los canales de Cl regulados por GABA en la membrana de las células del sistema nervioso central. Toxicidad baja
Fosfina	Vía de absorción por ingestión, inhalación y contacto dérmico. Mecanismo de acción a través de la formación de radicales hidroxilo. Toxicidad aguda
Bipiridilos	Se absorben por ingestión e inhalación principalmente en menor grado por contacto dérmico a menos que éste sea prolongado. Generan radicales libres de oxígeno provocando la peroxidación de lípidos ocasionando de esta forma la destrucción de las células. Toxicidad moderada

De acuerdo con el Catálogo de Plaguicidas de la CICOPLAFEST la clasificación de estos compuestos puede realizarse en función de los organismos que controlan, los grupos formados son: insecticida, acaricida, fungicida, bactericida, antibiótico, herbicida, rodenticida y molusquicida.

En 1975, la 28° Asamblea Mundial de la Salud aprobó por primera vez la clasificación de plaguicidas peligrosos recomendada por la OMS, es hasta 3 años después, en 1978, cuando los lineamientos para la clasificación fueron publicados y desde entonces han sido revisados y reeditados cada pocos años. La categorización está basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida como la capacidad del plaguicida de producir daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un tiempo relativamente corto. La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL_{50}) o de la concentración letal media (CL_{50}). Ambos parámetros varían conforme a diversos factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo), la vía de contacto con el individuo (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el género. La clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación actual de acuerdo a la guía de recomendación de la Organización Mundial de la Salud (2010).

<i>Clasificación OMS (WHO)</i>		<i>DL₅₀ para rata (mg/kg de peso)</i>	
		Oral	Dérmico
Ia	Extremadamente peligroso	<5	<50
Ib	Altamente peligroso	5-50	50-200
II	Moderadamente peligroso	50-2000	200-2000
III	Ligeramente peligroso	Por encima de 2000	Por encima de 2000
U	No presenta riesgo agudo	5000 o más alto	

También es posible encontrar una clasificación de acuerdo a la carcinogenicidad, tanto de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés) así como otra realizada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, 2015, por sus siglas en inglés) ambas se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a la EPA e IARC.

<i>EPA</i>		<i>IARC</i>	
Grupo A	Carcinogénico para los seres humanos (suficiente evidencia en los animales)	Grupo 1	Carcinogénico para seres humanos
Grupo B1	Probable carcinogénico para los seres humanos (insuficiente evidencia en animales)	Grupo 2A	Probable carcinogénico para los seres humanos
Grupo B2	Posible carcinogénico para los seres humanos	Grupo 2B	Posible carcinogénico para los seres humanos
Grupo C	No clasificable como carcinogénico para seres humanos	Grupo 3	No clasificable como carcinogénico para seres humanos
Grupo D	No clasificable como carcinogénico para seres humanos	Grupo 4	Es probable que no sea carcinogénico para seres humanos
Grupo E	No hay evidencia de carcinogenicidad para seres humanos		

La clasificación del Catálogo de Plaguicidas de la CICOPALAFEST utiliza la agrupación de acuerdo a toxicidad de la OMS no actualizada, como puede apreciarse en la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de plaguicidas de la CICOPALAFEST, 2004.

<i>Toxicidad</i>	<i>CICOPALAFEST</i>	<i>WHO (actual)</i>
Extremadamente peligroso	I	Ia
Altamente peligroso	II	Ib
Moderadamente peligroso	III	II
Ligeramente peligroso	IV	III

Es importante mencionar que a partir de las clasificaciones antes descritas existen tratados, convenios, normas y leyes en las que ya se prohíbe el uso de una gran cantidad de pesticidas debido a la intensa información que hay sobre el daño que causan a la salud humana, el ambiente y a otras especies. Uno de los convenios mejor establecidos en el cual se reproducen diversos lineamientos para reducir el impacto que tienen los contaminantes en las poblaciones humanas y en el ambiente es el Convenio de Estocolmo sobre los Contaminantes Orgánicos Persistentes el cual actualmente ha sido ratificado por 172 países entre los cuales se encuentra México (SEMARNAT, 2012).

En la República Mexicana la regulación de los plaguicidas es de acuerdo a su formulación, fabricación, aplicación, comercialización e importación, para ello existen diversos ordenamientos, tales como la Ley Federal de Sanidad Vegetal, Ley General de Salud e incluso la Ley General de Equilibrio Ecológico y de Protección al Ambiente. Las dependencias que están involucradas en cualquier asunto con referencia de plaguicidas son la Secretaria de Salud, Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y la de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

1.1 Uso de plaguicidas en México.

En el país se han utilizado plaguicidas agrícolas desde fines del siglo XIX pero la aplicación intensa de productos sintéticos se inició hacia 1948 con la introducción del DDT y otros organoclorados, seguidos de organofosforados, carbamatos, herbicidas y fungicidas, inicialmente todos los plaguicidas sintéticos se importaban en México pero poco a poco se fue obteniendo la tecnología para fabricarlos (Albert, 2005).

Desde entonces y actualmente según datos del INEGI durante 2014 se elaboraron alrededor de dos millones de toneladas de plaguicidas convirtiéndolo así en un negocio que aporta alrededor de 13 mil millones de pesos anualmente, por lo que es necesario la regulación del uso, fabricación y comercialización de estas sustancias en el país para lo cual existe la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) organismo que agrupa diversas Secretarías tales como la de Salud (a través de la Comisión Federal de Protección Contra Riesgos Sanitarios, COFEPRIS), Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Agricultura,

Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y de Economía. Sin embargo aun existiendo un organismo específico para la regulación de los agroquímicos, en México se utilizan plaguicidas restringidos y prohibidos, su uso incrementa el riesgo de exposición y por tanto su potencial actividad genotóxica (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

De acuerdo con el análisis de extensionismo agrícola de 2011 en México, la agricultura proporciona empleo a alrededor de unos 3.3 millones de agricultores y 4.6 millones de trabajadores asalariados y familiares no remunerados, de mayor relevancia aún para el desarrollo territorial es el hecho de que aproximadamente 24% de la población total vive en las zonas rurales cercanas a cultivos por lo que estas personas se encuentran expuestas a cada uno de los plaguicidas que se aplican. Su mal uso es un riesgo muy alto para la salud de las poblaciones directa o indirectamente expuestas. El manejo inadecuado de los envases vacíos crea contaminación tanto en el ambiente como para las personas que no tienen contacto directo con estos compuestos (Gómez-Arroyo *et al.*, 2013).

Sin dar importancia o debido a que no se conocen los daños que causan los plaguicidas, su uso sigue en aumento por lo que es necesario el estudio de estas poblaciones empleando ensayos de diagnóstico temprano que permitan la identificación del daño genético que pueda estar causando esta exposición en los individuos, el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis, cumple con ese objetivo.

2.0 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (MNBC).

La frecuencia de micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica con citocinesis bloqueada se ha convertido en uno de los mejor establecidos biomarcadores para estudiar el daño al ADN que ocurre en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas (Fenech y Bonassi, 2011; Gentile *et al.*, 2012). Además el ensayo de micronúcleos está considerado como una prueba práctica, universalmente validado, accesible tecnológicamente y útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos (Zalacain *et al.*, 2005), es posible evidenciar a través de un análisis microscópico simple, rápido y objetivo: pérdida, rompimiento o rearrreglo cromosómico, amplificación génica, ritmo de la división

celular y muerte celular, tal como se observa en la figura 1 (Fenech, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

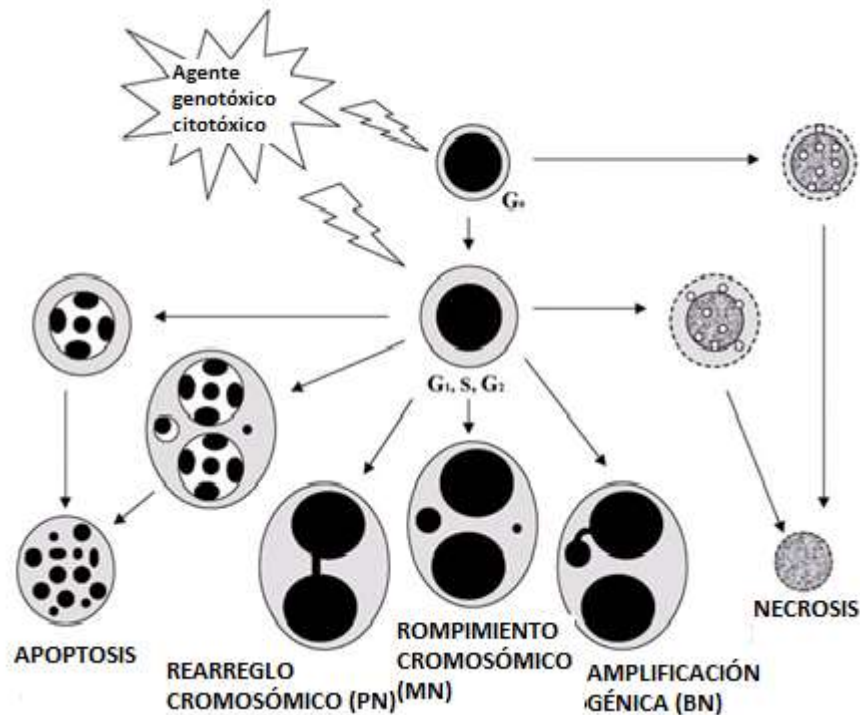


Figura 1. Diferentes formas de daño genético en células observadas a través del ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis y su significado (tomado de Fenech, 2006).

El ensayo de MNBC fue originalmente desarrollado como un sistema ideal para medir la frecuencia de MN, su conteo únicamente se lleva a cabo en aquellas células que han pasado por una división celular, las cuales se reconocen por su apariencia binucleada debido a que los filamentos de actina son inhibidos por la citocalasina-b (cit-b), sin embargo esta técnica también puede ser utilizada para medir puentes nucleoplásmicos (PN), brotes nucleares (bN), necrosis o apoptosis (Fenech, 2006).

2.1. Micronúcleos (MN).

Los MN pueden estar constituidos por fragmentos de cromosomas acéntricos, formados por rompimientos de doble cadena del ADN que no fueron reparados o por cromosomas rezagados durante la segregación en la mitosis, su origen puede observarse en la figura 2 (Fenech y Morley, 1986; Fenech, 2000). Estos fragmentos o cromosomas completos son

embebidos en una envoltura nuclear y gradualmente van adquiriendo la apariencia de un núcleo de interfase con la excepción de que son más pequeños que el núcleo principal (Fenech y Morley, 1986).

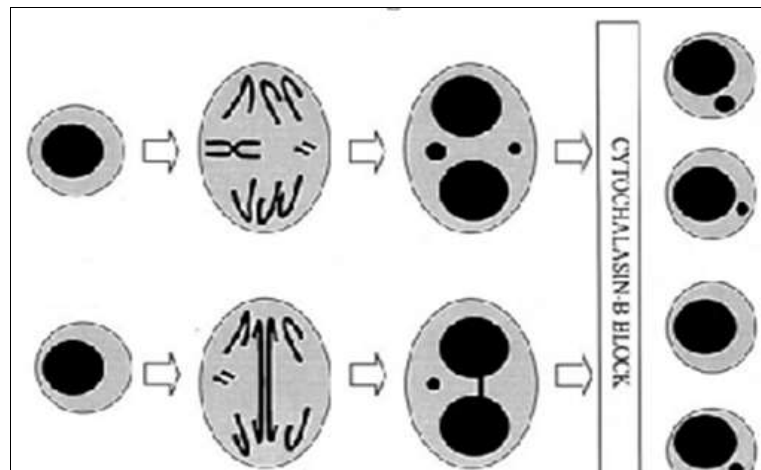


Figura. 2. Formación de micronúcleos durante el ensayo por bloqueo de citocinesis (tomado de Fenech, 2000).

La mayoría de los MN que se observan en células binúcleadas se han formado en el cultivo celular a partir de fragmentos cromosómicos y lesiones de ADN preexistentes en vivo (Catalán *et al.*, 2006), también se ha considerado que frecuencias elevadas de micronúcleos son un biomarcador de estados tempranos de enfermedades como cáncer (Bonassi *et al.*, 2007).

2.2 Puentes nucleoplásmicos (PN).

Se asume que los puentes nucleoplásmicos se forman cuando los centrómeros de cromosomas dicéntricos son jalados a polos opuestos durante la anafase. Pocas veces se pueden observar puentes anafásicos dicéntricos antes de que la membrana nuclear se forme, debido a que las células pasan de anafase a telofase rápidamente, completando la citocinesis ocasionando el rompimiento de los PN una vez que las células hijas se separan. Sin embargo en el ensayo de MNBC, las células BN con PN se acumulan pues la citocinesis es inhibida y la membrana nuclear se forma alrededor de los cromosomas que constituyen los puentes permitiendo de esta manera que se puedan observar.

La importancia del conteo de los PN no debe ser infravalorado porque provee evidencia directa de daño por una mala reparación de las rupturas al ADN que no es posible deducir con el conteo de MN (Fenech, 2006).

2.3 Brotes nucleares (bN).

El proceso de la formación de los brotes nucleares ocurre durante la fase de síntesis del ciclo celular, cuando el núcleo elimina el exceso de ADN amplificado colocándolo en la periferia del núcleo, tras lo cual, este excedente de material genético se expulsa y la célula forma un pequeño lazo entre este brote y el núcleo principal (Fenech, 2006).

2.4 Necrosis y apoptosis.

Cuando el daño producido por el agente genotóxico es muy fuerte las células no logran recuperarse por lo que la maquinaria de división y reparación de ADN no concluye su trabajo llevando a la célula a una muerte inminente provocando así que en el ensayo de MN por bloqueo de citocinesis se pueda evaluar la citotoxicidad del agente que se estudia a través de la muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis.

2.5 Ritmo de la división celular. Índice de división nuclear (IDN) e índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis (IPBC).

Debido a que la expresión de los MN, PN y bN depende de la división celular, la cuantificación de la proliferación y muerte celular debe ser evaluada para conocer la cinética celular a través de dos índices. El IDN que indica un acercamiento al promedio del número de núcleos por células y el IPBC, que permite conocer el número de veces que las células han completado la división. Su cálculo se realiza de la siguiente forma:

- $IDN = N1 + 2(N2) + 3(N3) + 4(N4) / 500$
- $IPBC = N1 + 2(N2) + 3(N3 + N4) / 500$

En donde N1 es el número de células mononucleadas, N2 binucleadas, N3 trinucleadas y N4 tetranucleadas (Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

3.0 Estudios de biomonitorio citogénico en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas.

La exposición a pesticidas puede ocurrir cuando se vive en áreas agrícolas en las que se aplican los agroquímicos, por contacto ocupacional, como el ser recolectores, agricultores y asperjadores o por el contacto indirecto a los plaguicidas debido a que los familiares trabajen en los cultivos. La población en riesgo constituye un porcentaje muy alto en la mayoría de los países debido a que la agricultura hoy en día es una actividad comercial fundamental para el mundo entero, por tal motivo el análisis a través de la prueba de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, tanto en personas expuestas como *in vitro*, va en aumento. Los resultados obtenidos son diversos.

En Grecia se describe que la exposición *in vitro* de linfocitos de sangre periférica a diversas concentraciones (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 $\mu\text{g/mL}$) de metalaxyl e imidacloprid no presentan diferencias significativas en las frecuencias de MN en contraste con los cultivos no expuestos (Vlastos *et al.*, 2005), en el mismo país pero en un estudio realizado a personas ocupacionalmente expuestas los resultados fueron similares pues las frecuencias de micronúcleos no son diferentes estadísticamente entre los individuos expuestos y sin exposición (Pastor *et al.*, 2001a). Sin embargo, en Italia, en un estudio realizado por Bolognesi *et al.* (1993), a floricultores de la región de Liguria se identificó que las frecuencias de MN en linfocitos es significativamente mayor en personas expuestas a pesticidas en contraste con los individuos testigo. En Croacia, Garaj-Vrhovac y Zeljezic (2001), analizaron la diferencia de los valores de aberraciones cromosómicas, intercambios en cromátidas hermanas y de MN en individuos expuestos a una mezcla de plaguicidas compuesta por atrazina, alaclor, cianazina, 2,4-diclorofenoxiacético y malatión, encontraron que las frecuencias de los tres biomarcadores estudiados son mayores en las personas expuestas. En Turquía se analizó la frecuencia de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos, brotes nucleares e índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis en individuos ocupacionalmente expuestos a plaguicidas y sin exposición, se notaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a los valores de MN y bN, lo que indica que la exposición no solo implica rompimiento cromosómico sino también amplificación génica (Coskum *et al.*, 2011). La relación entre las elevadas frecuencias de

MN, PN y bN y la exposición a plaguicidas indican que la cercanía a estos compuestos representan un riesgo genotóxico alto.

En el continente americano también se han efectuado investigaciones para evaluar el daño genotóxico en individuos expuestos, por ejemplo en EUA, Tope *et al.* (2006) realizaron una comparación entre la frecuencia de MN, la concentración de la superóxido dismutas (SOD) y el glutatión en plasma, se identificó que el 76% de los individuos expuestos a plaguicidas muestran aumento en los valores de MN en contraste con el grupo testigo, en Canadá, Davies *et al.* (1998) también encontraron un aumento en la frecuencia de MN de recolectores de bayas de la Columbia Británica, sin diferencias significativas con el grupo testigo. Asimismo, en América latina y de acuerdo a Gómez-Arroyo *et al.* (2013), se han realizado trece estudios aplicando el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica, de los cuales solo uno de ellos de México, Levario-Carrillo *et al.* (2005) arrojó resultados negativos de acuerdo al tiempo de exposición a los plaguicidas, los otros 12 corresponden a Brasil (2007 y 2011), Argentina (2011 y 2012), México (2012), Chile (1998 y 2005), Colombia (2003 y 2009) y Costa Rica (2001 y 2008) todos ellos reportan que el tiempo de exposición a los pesticidas tiene efecto negativo sobre la salud de los individuos expuestos, ocasionando daño genético reportado a través de las frecuencias de MN, PN y bN en células binucleadas, también se identificó que el manejo de los plaguicidas es incorrecto puesto que el deshecho de los recipientes vacíos de los agentes químicos es erróneo, las medidas de seguridad que deben tomar las personas que los aplican no son conocidas por ellos. El uso actual de los pesticidas que se encuentran incluidos en la lista de altamente peligrosos propicia que las consecuencias a dichas actividades sean muy graves tal como intoxicaciones, muerte, incidencia de cáncer o enfermedades crónicas debido al daño genético ocasionado y no solo para aquellas personas en contacto directo a las sustancias sino también a sus familiares.

3.1 Lugar de estudio.

La ciénega de Chapala está ubicada al noroeste del estado de Michoacán y Jalisco declarada oficialmente como región Lerma-Chapala en el Plan Estatal de Desarrollo de 2003 a 2008 la constituyen los municipios de Briseñas, Chavinda, Cojumatlán de Régules, Ixtlán de los Hervores, Jacona, Jiquilpan, Marcos Catellanos, Pajacuarán, Purépero, Sahuayo, Tangamandapio, Tangancícuaro, Tlazazalca, Venustiano Carranza, Villamar, Vista Hermosa y Zamora. La región tiene una extensión de 4,347 km² (el 6% del territorio michoacano) y en el 2010 es habitada por 575,964 personas (13% de la población de Michoacán). Una de sus características principales es que varios de sus municipios están ubicados junto a la laguna de Chapala, llamados municipios ribereños, además es atravesada por el río Lerma.

En la región el 12% de su población es analfabeta, además mientras que el 29% de los michoacanos abandona sus estudios primarios, en esta región el 36% de sus niños no termina la educación primaria. Por otra parte, el 45% de sus habitantes perciben como máximo dos salarios mínimos para una familia de siete integrantes en promedio. El alto porcentaje de abandono escolar en la región tiene su explicación, en parte, en el elevado número de emigrantes que abandonan los municipios, el 29% de las personas nacidas en esta zona viven en los Estados Unidos (Aguilar-Ortega, 2014).

En cuanto a las actividades económicas de la zona, se establece que la superficie regable de la región Lerma-Chapala es de 1585 ha. Los principales cultivos son maíz, trigo, sorgo, cártamo, hortalizas y garbanzo con la mayor superficie sembrada y en menor proporción otros como alfalfa, frijol, cebolla, forrajes, jitomate, caña, fresa y árboles frutales. El maíz del ciclo primavera/verano es el cultivo más importante en cuanto a la superficie establecida, con poco más de 5000 ha en promedio al año, seguido del trigo, cártamo y sorgo. Por ello, se puede afirmar que la región es básicamente productora de granos, ya que de 2000 a 2010, se destinó aproximadamente el 74% de la superficie regada a estos cuatro cultivos. Mientras que la producción hortofrutícola representa 12% del total. La actividad hortícola se ubica sobre todo en las áreas contiguas al lago, en los municipios de

Cojumatlán de Régules y Venustiano Carranza (Sandoval-Moreno y Ochoa-Ocaña, 2010), en donde se registran los niveles más altos de uso de plaguicidas.

II. JUSTIFICACIÓN

La cantidad de estudios referentes a la exposición a pesticidas es mínimo tanto en América Latina como en México, es por tal motivo que las investigaciones de biomonitorio nacionales son de vital importancia.

En el estado de Michoacán en la región de la ciénega de Chapala el territorio, en su mayoría, está destinado a la producción agrícola por lo que se encuentra en el sexto lugar con mayor consumo de agroquímicos, lo que localiza a su población dentro de las más expuestas a plaguicidas y que por tanto muy probablemente estén incrementando significativamente la susceptibilidad a padecimientos como el cáncer o enfermedades crónicas, por lo que es importante que se realicen estudios de biomonitorio genético en las personas que tienen contacto con plaguicidas para así determinar si los individuos expuestos se encuentran en riesgo de desarrollar algún padecimiento.

III. HIPÓTESIS

El contacto constante a plaguicidas en la población expuesta de la ciénega de Chapala, Michoacán, incrementará el daño genético en linfocitos de sangre periférica en contraste con una población no expuesta.

IV. OBJETIVOS

Detectar daño genético en personas expuestas a plaguicidas, directa e indirectamente, a través del ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis en linfocitos de sangre periférica.

Correlacionar la frecuencia de micronúcleos en las poblaciones expuestas con la edad y el tiempo de exposición a plaguicidas.

V. METODOLOGÍA

5.0 Selección y muestreo de la población.

El trabajo se llevó a cabo en 2 municipios pertenecientes a la ciénega de Chapala, Michoacán, Cojumatlán de Régules y Sahuayo de Morelos, la primera principalmente dedicada a la agricultura por lo que en su mayoría los participantes que pertenecen al grupo expuesto son de Cojumatlán, teniendo así un total de 30 individuos expuestos directamente y 8 expuestos indirectamente y al grupo testigo corresponden 30 individuos que en su mayoría viven en Sahuayo, todos ellos de condiciones socioeconómicas semejantes pero sin contacto con plaguicidas, una vez reunidos los individuos interesados en participar en el estudio, se procedió a comunicar el objetivo del trabajo y a los que voluntariamente aceptaron formar parte del proyecto se les aplicó un cuestionario con el fin de obtener información necesaria y relevante tal como: tiempo de exposición a los plaguicidas, uso de equipos de protección durante la aplicación, limpieza después del empleo de plaguicidas, síntomas posibles de intoxicación, enfermedades que presenten, toxicomanías y estilo de vida.

También firmaron una carta de consentimiento informado de la toma de muestra sanguínea y del uso de la información obtenida. Posterior a la entrega del cuestionario y firma del consentimiento, a cada individuo se le tomó una muestra de sangre periférica heparinizada de 5 mL con jeringa y aguja estériles nuevas.

Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Genotoxicología Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, para dar inicio al procedimiento para el ensayo MNBC, de acuerdo a la metodología descrita por Fenech (2000), cada uno de los pasos se realizan con estricta esterilidad.

5.1 Cultivos celulares.

De cada una de las muestras de sangre, se depositaron por goteo de 8 a 10 gotas (500 μ L), en tubos cónicos para centrifuga de 15 mL previamente preparados con 4.5 mL de medio RPMI 1640 con L-Glutamina y bicarbonato (MicroLab) suplementado con 0.2 mL de

fitohemaglutinina (MicroLab), para estimular la división celular en los linfocitos. Posteriormente, los tubos se colocaron en la incubadora a 37 °C.

5.2 Inhibición de la citocinesis.

A las 48 horas de la siembra se agregaron 270 µL de cit-b (concentración final de 600 µg/mL) a cada tubo. Los cultivos se regresan a la incubadora a 37 °C.

5.3 Cosecha celular.

Veinticuatro horas más tarde, es decir, a las 72 h del inicio, el cultivo se detuvo para lo cual los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió delicada y perfectamente el botón celular. Posteriormente, se realizó la fijación de las células, proceso con el cual se tiene como objetivo la eliminación de eritrocitos y detrito celular, para esto se preparó fijador MAA (metanol-ácido acético) en proporción 3:1 frío. A cada uno de los tubos, se adicionaron 5 mL de fijador, se mezcló rápidamente y los cultivos se colocaron nuevamente en centrifuga por 10 minutos a 1500 rpm, transcurrido el tiempo de centrifugación se retiró el sobrenadante, se resuspendió el botón celular y se adicionaron 10 mL de fijador, los pasos anteriores se repitieron hasta obtener un sobrenadante transparente y un botón celular de color blanquecino. Al término los cultivos se llevaron a refrigeración (4-8 °C).

5.4 Preparación de laminillas.

Los tubos se centrifugan a 1500 rpm durante 10 minutos se retira el sobrenadante y se resuspende cuidadosamente el botón celular, se toman unas cuantas gotas y delicadamente se deslizan en portaobjetos limpios, secos y a temperatura ambiente para cuidar que el citoplasma de las células permanezca intacto y se facilite el conteo celular, se hicieron 3 laminillas por individuo. Las preparaciones se dejan secar al aire. Una vez secas por completo se tiñen con una mezcla de amortiguador de fosfatos y colorante Giemsa (Sigma-Aldrich) de 3 a 5 minutos, transcurrido el tiempo se les dio un enjuague rápido en agua. Por cada 10 laminillas se prepara colorante nuevo.

5.5 Observación y conteo celular.

Cada laminilla se analizó al microscopio óptico en campo claro a 40x. Se contaron al azar 1000 células binucleadas consecutivas para así obtener la frecuencia de MN, PN y bN también se registraron las primeras 500 células multinucleadas, ya sean mononucleadas (MONO), binucleadas (BN), trinucleadas (TRI) y tetranucleadas (TETRA) con la finalidad de obtener el IDN y el IPBC, los criterios para contabilizar las células se basan en la descripción detallada del proyecto humano de micronúcleos (HUMN project) propuesta por Fenech *et al.* (2003). Las principales características se describen a continuación:

- **Células binucleadas (BN).**

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

- **Micronúcleos (MN)**

1. Deben ser muy similares al núcleo principal.
2. Diámetro usualmente entre 1/16 y 1/3 del núcleo principal y alrededor de 1/9 de la célula completa.
3. Forma ovalada o circular
4. No son refráctiles.
5. No deben estar conectados con el núcleo principal.
6. Los MN pueden tocar el núcleo principal pero su membrana debe ser completamente distinguible de la membrana de los núcleos principales.
7. Su tinción debe ser igual o más intensa que la de los núcleos principales.

- **Puentes nucleoplásmicos (PN)**

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

5.6 Análisis estadístico.

Para la comparación entre la población testigo y las expuestas directa e indirectamente a plaguicidas acerca del daño genético observado, es decir, las frecuencias de MN, PN y bN, así como la respuesta del ciclo celular a través del IDN e IPBC, se realizaron análisis de varianza (ANOVA), $p < 0.05$, y posteriormente se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls, $p < 0.05$. Para evaluar la relación entre el tiempo de exposición y edad de los individuos expuestos con el daño ocasionado se hicieron correlaciones evaluadas a través del coeficiente de Pearson (r).

VI. RESULTADOS

6.0 Datos acerca de las poblaciones expuestas a plaguicidas.

Se analizaron los resultados de tres poblaciones diferentes, una sin exposición (testigo) formada por habitantes del municipio de Sahuayo y dos expuestas a plaguicidas tanto directa como indirectamente las cuales son formadas por residentes del municipio de Cojumatlán de Régules. Los individuos con exposición directa son aquellos que trabajan en los campos, como jornaleros, recolectores y asperjando los pesticidas o aquellos que los aplican en cultivos caseros. Por otro lado, los expuestos indirectos fueron considerados los que conviven diariamente con personas que aplican directamente los plaguicidas y tienen una relación de parentesco, es decir, padres, hijos o cónyuges.

Cada una de las muestras analizadas pertenecieron a individuos sin adicciones tales como alcoholismo, tabaquismo o drogas, sin exposición a rayos X por lo menos 6 meses antes de la toma de sangre, ni consumo de medicamentos que pudieran afectar los resultados, la edad promedio de la población testigo formada por 21 mujeres y 9 hombres es de 43.63 ± 12.51 años, la población con exposición directa (ED) a plaguicidas tiene un promedio de edad de 38.82 ± 13.56 años contando con 18 mujeres y 12 hombres y la población con exposición indirecta (EI) consta de 7 mujeres y un hombre con un promedio de edad de 43.00 ± 9.24 años. Cada uno de los individuos de las tres poblaciones viven en situación socioeconómica similar.

Los plaguicidas utilizados por las personas expuestas pertenecen principalmente a 14 grupos químicos destacando entre ellos piretroides, organofosforados, organoclorados y carbamatos, la lista se muestra en la Tabla 5, en la cual además se menciona la toxicidad de los compuestos de acuerdo con diferentes organizaciones internacionales.

Tabla 5. Plaguicidas que son utilizados en la región estudiada de Cojumatlán de Régules.

Organoclorados	Organofosforados	Carbamatos	Piretroides	Otros
Insecticidas				
Endosulfán (II)	Malatión (III)	Carbofurán	Alfa-	Fipronil (U) ^c
Aldrín (1a) ^a	Metamidofos (Ib)	(1b)	cipermetrina	Fosfuro de
Dieldrín (1a) ^a	Metil paratión (1a)	Metomilo	(U)	aluminio (U)
Mirex (1a) ^a		(1b)	Cipermetrina	Diflobenzuron
		Oxamilo	(III) ^b	(U)
		(1b)	Lamda-	Tiacloprid (B1)
			cialotrina (U)	
			Beta ciflutrina	
			(1b)	
			Permetrina (II) ^c	
Herbicidas				
				Paraquat (II) ^c
				Terbutrina (U)
				Glifosato (U) ^c
Fungicidas				
				Clorotalonil
				(B1)
				Hidróxido
				cúprico (U)

Clasificación WHO (2010): 1a = extremadamente peligroso, 1b = altamente peligroso, II = moderadamente peligroso, III = ligeramente peligroso, U = no presenta riesgo en uso normal.

^aIARC (2015) = probable carcinógeno para seres humanos (2a)

^bIARC (2015) = posible carcinógeno para seres humanos (2b)

^cEPA (2009): probable carcinógeno en seres humanos (B1)

Las botellas y bolsas vacías de los plaguicidas no son depositadas en lugares especializados para su deshecho, incluso los pobladores reportan que los residuos son quemados en el mismo campo de cultivo o son reutilizados para preparar mezclas de los plaguicidas, las botellas son transformadas en bolls las cuales se colocan en las redes de pesca que son manipuladas en el lago de Chapala.

6.1. Exposición directa.

Los integrantes de este grupo muestran como tiempo medio de exposición a plaguicidas 12.03 ± 13.22 años, donde el tiempo de exposición media para mujeres es de 6.83 ± 2.28 años y de 20.54 ± 19.23 años para los hombres (Tabla 6). El 100% de los hombres trabajan en campo y se dedican a asperjar los plaguicidas en los cultivos mientras que las mujeres principalmente aplican los pesticidas en cultivos caseros, solo 7 de ellas, 33%, se dedican a trabajar en campo como recolectoras.

El 33% de las mujeres expuestas han tenido al menos un aborto antes de los 3 meses de gestación.

6.2 Exposición indirecta.

El tiempo de exposición media es de 30.55 ± 14.43 años, siendo para las mujeres de 33.37 ± 13.63 años mientras que para el único hombre del grupo el tiempo de exposición es de 8 años. Las mujeres del grupo están expuestas a plaguicidas debido a que: seis de ellas conviven con su padre, una mujer con su esposo y otra con su hijo. Padre, esposo e hijo se dedican a asperjar plaguicidas en el campo. El 100% de estas mujeres han tenido al menos un aborto antes de los 3 meses de gestación.

El tiempo de exposición media es mayor para la población que tiene familiares que trabajan en campo, las mujeres con exposición indirecta reportan un tiempo de exposición mucho mayor en comparación con las de ED.

Tabla 6. Tiempos medios de exposición para las poblaciones expuestas a pesticidas.

Tipo de exposición	Grupo	Tiempo de exposición (años) Media \pm D. E.
Directa	Mujeres	6.83 ± 2.28
	Hombres	20.54 ± 19.23
	Total	12.03 ± 13.22
Indirecta	Mujeres	33.37 ± 13.63
	Hombres	8
	Total	30.55 ± 14.43

6.3 Observación y registro celular.

Para cada uno de los individuos se realizó el conteo de células mononucleadas (MONO), binucleadas (BN), trinucleadas (TRI) y tetranucleadas (TETRA) y únicamente para la células BN se realizó el registro de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares. Sin embargo también se pudieron observar células MONO con 1, 2 y 3 MN, TRI con 1 y 2 MN y TETRA con 1, 2 y 6 MN, respectivamente (Fig. 1). En las células BN se observaron células con 2 PN y 2 bN, las células que se contabilizaron solo fueron aquellas que se encontraban en interfase (Fig. 2).

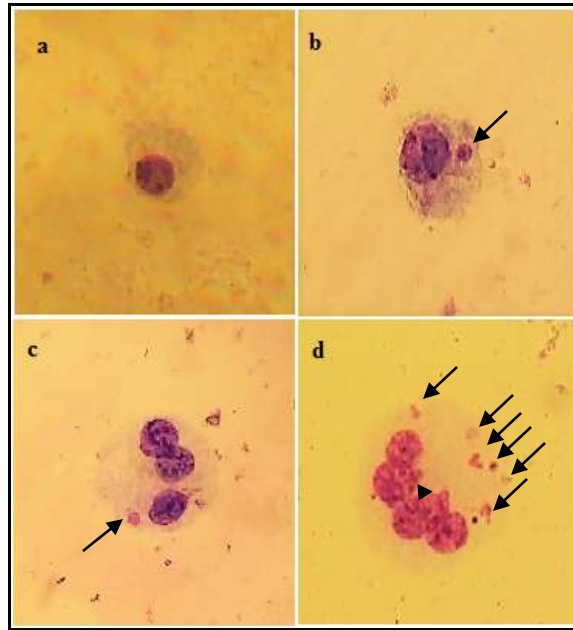


Fig. 1. Células observadas en las laminillas, (a) célula mononucleada sin MN (b) célula mononucleada con 1 MN (c) célula TRI con 1 MN y (d) célula TETRA con 6 MN y 2 bN. Los MN son indicados con flechas negras y los bN con cabeza de flecha.

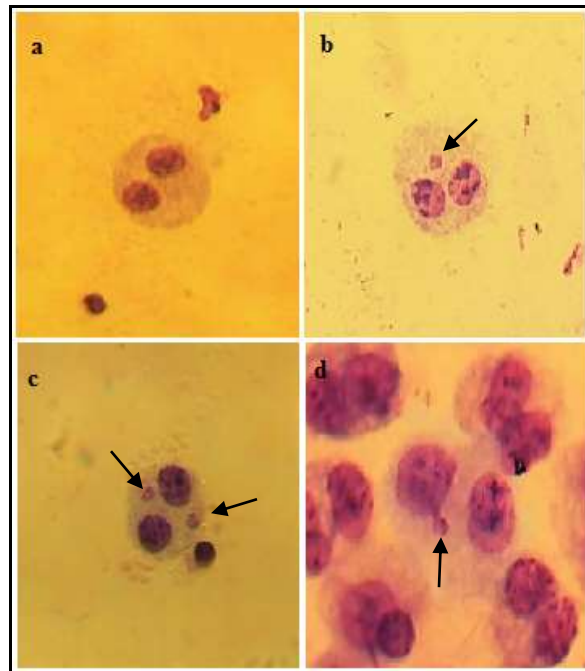


Fig. 2. (a) Células binucleadas sin micronúcleos (b) con 1 MN (c) con 2 MN y (d) célula BN con 1 brote nuclear, el daño genético correspondiente se encuentra señalado con flechas.

También se observaron células en la etapa de profase y anafase en las cuales se pueden ver fragmentos o cromosomas completos (Fig. 4), estas alteraciones no fueron analizadas en el trabajo.

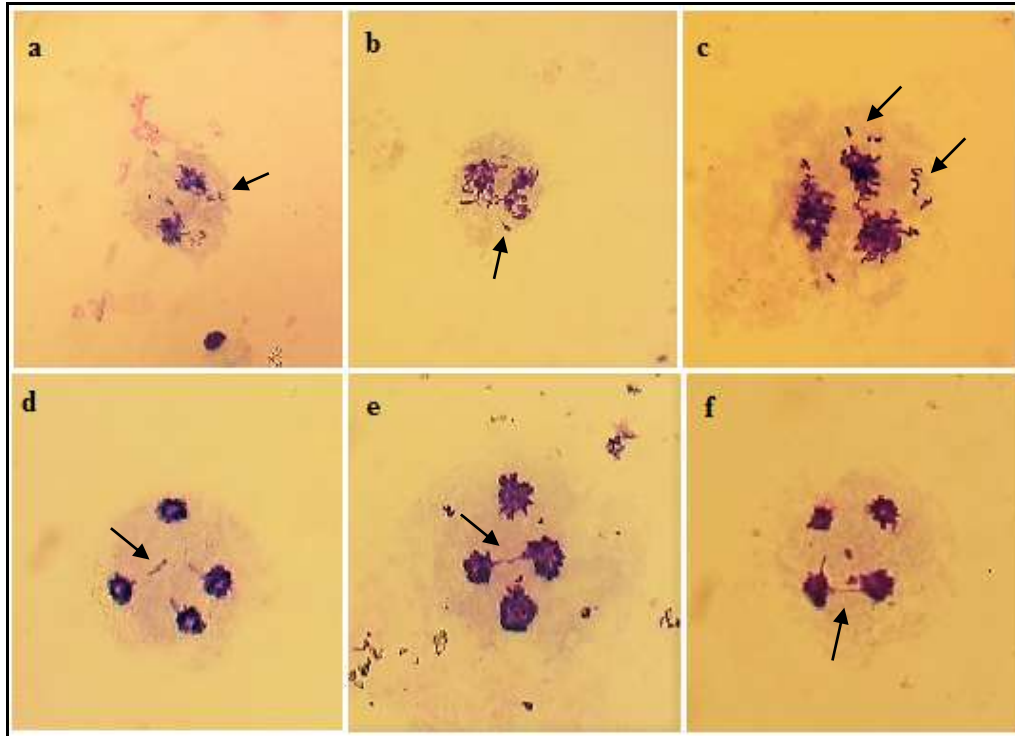


Fig. 4. Células polinucleadas en profase, en donde se pueden apreciar cromosomas o fragmentos de cromosomas (a-f). También se observan puentes en anafase en los incisos e y f.

6.4 IDN e IPBC.

Se obtuvo la frecuencia de células MONO, BN, TRI y TETRA nucleadas por cada uno de los individuos muestreados tanto de la población testigo como de las poblaciones expuestas directa e indirectamente, se observó que el número de células polinucleadas es muy similar para los tres grupos estudiados (Fig. 5). El IDN e IPBC no varía notablemente entre hombres y mujeres de cada población.

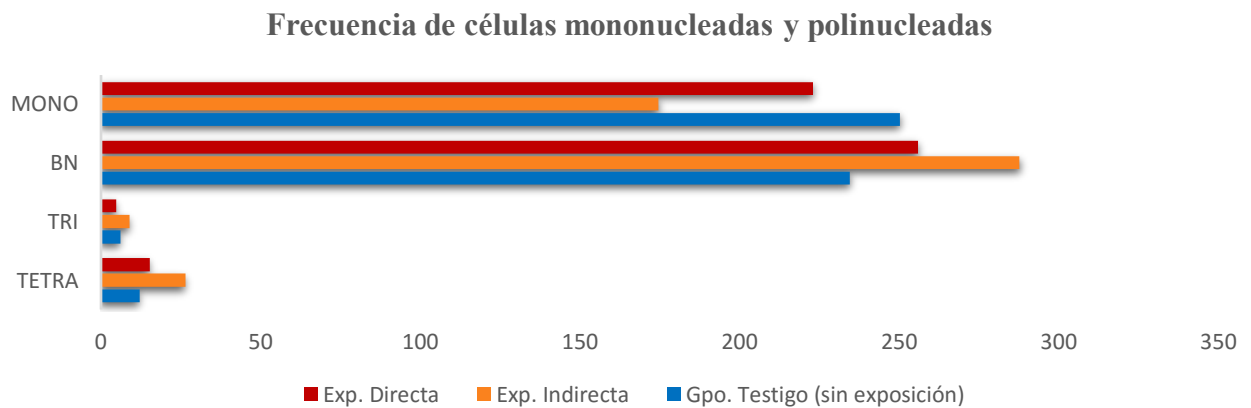


Fig. 5. Frecuencias absolutas de células mononucleadas y polinucleadas en cada una de las poblaciones estudiadas.

A partir de las frecuencias observadas se calculó el IDN y el IPBC. Posteriormente, se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para identificar diferencias entre el grupo testigo y los grupos con exposición a plaguicidas, se observó que no existen diferencias significativas entre los grupos con exposición y sin exposición, $p=0.61$.

Tabla 7. Valores del IDN e IPBC de acuerdo al tipo de exposición.

Tipo de exposición	N	IDN Media \pm D. E	IPBC Media \pm D.E
Testigo	30	1.56 \pm 0.20	1.53 \pm 0.19
Exposición Directa	30	1.64 \pm 0.16	1.61 \pm 0.14
Exposición Indirecta	8	1.77 \pm 0.16	1.72 \pm 0.15

6.5 Frecuencias de MN, PN y bN.

Se obtuvo la frecuencia de MN, PN y bN por cada 1000 células binucleadas, en los grupos expuestos los valores son mayores que en el grupo testigo, cabe destacar que los valores promedio de micronúcleos, puentes y brotes, de las mujeres son mayores que la de los hombres para ambas poblaciones expuestas.

A partir de las frecuencias encontradas se realizó un ANOVA entre los tres tipos de poblaciones estudiadas, sin exposición y con exposición directa e indirecta. Se obtuvo un valor de $p=0.047$ lo que indica que tienen frecuencias diferentes para cada uno de los tipos

de daño mencionado con anterioridad, posteriormente la prueba post hoc Newman-Keuls indicó que las diferencias encontradas son específicas entre la población testigo y las poblaciones con exposición a plaguicidas. También se realizó un ANOVA entre el tipo de exposición y cada uno de los indicadores de daño a ADN (MN, PN y bN), resultando significativo únicamente los MN contra el tipo de exposición obteniendo una $p=0.003$, la prueba de Newman-Keuls revela que la diferencia de las frecuencias es entre la población testigo y las poblaciones expuestas, $p=0.03$ para la ED y $p=0.01$ para EI. Las frecuencias obtenidas para PN y bN no arrojaron valores significativos (Tabla 8).

Tabla 8. Frecuencia de MN, PN y bN.

GRUPO	N	MN*	PN*	bN*
		Media \pm D. E.	Media \pm D. E.	Media \pm D. E.
Directa	30	15.50 \pm 7.36**	0.83 \pm 0.98	3.33 \pm 4.37
Indirecta	8	16.88 \pm 8.07**	1.33 \pm 1.94	2.11 \pm 2.28
Testigo	30	10.06 \pm 6.98	0.56 \pm 0.88	1.23 \pm 1.56

* Frecuencias obtenidas por cada 1000 células BN

** $p<0.05$

6.6 Correlaciones.

La prueba de correlación de Pearson, fue realizada para determinar la correspondencia entre los valores de MN, PN y bN y los factores de sesgo como la edad y el tiempo de exposición, la prueba solo fue realizada entre las variables independientes y las poblaciones con exposición a plaguicidas, con un nivel de significancia $p<0.05$.

Se estableció que el daño genético evaluado (MN, PN y bN) y el ritmo del ciclo celular (IDN e IPBC) no tienen relación con el tiempo de exposición a plaguicidas ni la edad, los coeficientes de Pearson no muestran diferencias significativas en ninguno de los casos evaluados (Tabla 9).

Tabla 9. Valores del coeficiente de Pearson para la edad y tiempo de exposición contra MN, PN y bN.

Tipo de daño genotóxico	Coeficiente de Pearson (<i>r</i>)	
	Tiempo de exposición	Edad
MN	0.612	0.433
PN	-0.169	0.166
bN	-0.252	-0.183

VII. DISCUSIÓN.

El estado de Michoacán posee una superficie aproximada de 1,250,000 hectáreas destinadas a la agricultura, esta superficie representa el 21% del área total de la entidad (COFEPRIS). De acuerdo con Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal en el municipio de Cojumatlán de Régules la principal actividad económica es la agricultura, ocupación a la que se dedica la mayoría de la población. En los campos agrícolas del municipio los habitantes se encuentran expuestos a plaguicidas ya sea por asperjarlos (exposición directa, ED), recolectar los productos en tiempo de cosecha (ED) o incluso por convivir diariamente con personas que trabajan en los cultivos (exposición indirecta, EI). En este municipio tener jardines de traspatio (ED) es muy común y más aún emplear los plaguicidas que se utilizan en los campos de cultivo. La exposición a los agroquímicos en Cojumatlán de Régules es constante debido a que éstos son aplicados en los campos y jardines durante todo el año.

Sin embargo, aunque se sabe que algunos de los ingredientes activos de los plaguicidas utilizados tienen actividad genotóxica demostrada, el beneficio hacia la población es mayor, permite impulsar la economía de la región y proteger a los habitantes de enfermedades transmitidas por vectores como el dengue.

Todos los individuos que trabajan como jornaleros comen en los campos de cultivo promoviendo así que el contacto con los plaguicidas sea aún más estrecho, las personas que se dedican a asperjar pesticidas no protegen su cuerpo permitiendo que el contacto dérmico con los agroquímicos sea directo, facilitando la absorción de las sustancias y por tanto no se reduce de ninguna forma el riesgo al que se exponen. Algunos de ellos a veces utilizan paliacate y zapatos cerrados cuando están trabajando; sin embargo esto no es suficiente para protegerse, las personas que aplican plaguicidas en sus jardines lo hacen sin cuidado de su persona. Los recolectores al igual que los que fumigan no protegen su piel del contacto directo con los productos de cosecha.

Por otro lado, cada uno de los individuos que trabajan en los campos de cultivo llevan restos de los plaguicidas en la ropa y aunque tienen la precaución de quitársela una vez que llegan a casa, esa ropa es lavada en conjunto con la de la familia ocasionando que el manejo

de estas prendas impregnadas por las mujeres provoque contacto indirecto con los agroquímicos puesto que se ha descrito que la ropa que se utiliza durante la jornada laboral debe ser lavada con agua y jabón y guardarla separada de la del resto de la familia (Gómez-Arroyo *et al.*, 2013).

En este trabajo las personas con exposición indirecta han tenido contacto con los agroquímicos debido a que conviven o tienen una relación de parentesco con personas que aplican pesticidas. El contacto con estas sustancias es menor pues a ellos únicamente les llegan residuos de los pesticidas asperjados en campo; sin embargo, esta exposición se da durante un tiempo prolongado. En la población de estudio el tiempo de exposición indirecta es de más de 30 años en el caso de las mujeres y 8 años en el único hombre.

En el municipio estudiado las personas con exposición se encuentran en contacto al menos a 24 plaguicidas diferentes, de los cuales únicamente el fipronil, paraquat y el glifosato son reconocidos por la EPA como probable carcinógenos en seres humanos (grupo B1), los demás pesticidas no tienen evidencia de carcinogenicidad (grupo E, EPA). Aunque en esta clasificación no sean reconocidos como carcinógenos existe demostración de que el metil paratión, endosulfán, paraquat y malatión tienen acción clastogénica, citotóxica y genotóxica en seres humanos, posiblemente debido a que la exposición a estas sustancias puede resultar en uniones covalentes a las moléculas del ADN ocasionando un evento inicial en el proceso de la mutagénesis química (Miller, 1978). También se sabe que el paraquat y endosulfán inducen estrés oxidante en hepatocitos e incluso en el sistema nervioso central (Bebe y Panemangalore, 2003), el carbofurán así como algunos organofosforados producen anomalías en esperma lo que pone en riesgo futuras generaciones de los hombres que se encuentran expuestos a plaguicidas (Contreras *et al.*, 1999).

Aunado a lo anterior, los grupos de individuos estudiados están expuestos simultáneamente a diferentes sustancias activas debido a que generalmente los pesticidas son aplicados en mezclas, constituidas en su mayoría de organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides, por lo que no es posible determinar el daño causado por cada agroquímico,

Martínez-Valenzuela *et al.* (2009), mencionan que las mezclas de pesticidas son aún más tóxicas que la exposición a solo un plaguicida.

Por cada una de las situaciones y características que se mencionan anteriormente y debido al uso indiscriminado de los pesticidas por los habitantes de Cojumatlán es posible atribuir que existan alteraciones en los individuos expuestos. A través del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis que se realizó en las muestras recolectadas se determinó que los grupos expuestos tienen daño genotóxico significativamente más frecuente que los testigos ($p=0.047$), el daño genotóxico no es diferente entre las personas con exposición directa e indirecta.

El incremento en la frecuencia de MN está relacionado con la pérdida y/o rompimiento cromosómico (Heddle *et al.*, 1991), esto ocurre simultáneamente con el incremento de cromosomas dicéntricos los cuales forman los PN (Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2001), por tanto es adecuado que en las poblaciones expuestas de la localidad estudiada se encuentren frecuencias mayores de puentes nucleoplásmicos en comparación con los valores del grupo testigo. El incremento de las frecuencias de MN y PN puede estar relacionado con el deterioro en la capacidad de reparación del ADN o con el incremento de radicales libres en las células (Costa *et al.*, 2006), lo que implica que las personas expuestas pueden estar en riesgo de desarrollar estrés oxidante que causa genotoxicidad (Tope *et al.*, 2006).

En una revisión realizada por Iarmarcovai *et al.* (2008) se reunieron los resultados de diferentes investigaciones llevadas a cabo a través del ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis en pacientes con cáncer de tiroides, pulmón, mama y cuello, el análisis demostró que la frecuencia basal promedio es de 13 MN por cada 1000 células BN y que una vez que se encuentran bajo algún tratamiento ésta aumenta en promedio a 25 micronúcleos. Los individuos de Cojumatlán de Régules tienen una media de 16 ± 7 MN, valor que es más alto incluso, que la frecuencia basal de los pacientes con cáncer analizados en la revisión. Al comparar los datos que se obtuvieron en el presente estudio con los del artículo antes mencionado, es posible inferir que la población expuesta a plaguicidas de Cojumatlán se encuentra en riesgo elevado de padecer algún tipo de enfermedad crónica.

Bonassi *et al.* (2007, 2011) sugieren que los valores altos de MN ya son una característica puntual del proceso temprano de carcinogénesis, pues la asociación entre la frecuencia de micronúcleos y el riesgo a padecer cáncer puede estar relacionado con eventos iniciales de daño genético en otros tejidos así como con factores ambientales y de dieta específicos.

La correlación entre la inducción de MN y el desarrollo del cáncer está sustentado por las siguientes observaciones: 1) la alta frecuencia de este biomarcador en pacientes sin tratamiento para cáncer o en individuos propensos a cáncer congénito; 2) la presencia de frecuencias elevadas de MN en la mucosa oral, utilizado como biomarcador en ensayos clínicos de quimio prevención; 3) la correlación que existe entre agentes genotóxicos que inducen micronúcleos y carcinogénesis y 4) la correlación inversa entre la frecuencia de MN y la concentración en sangre o ingesta de ciertos micronutrientes asociados con la reducción del riesgo a padecer cáncer como lo son el ácido fólico, calcio, vitamina E y vitamina B3. Es por lo anterior,, que para reducir el daño cromosómico y por ende la frecuencia de micronúcleos, es indispensable un cambio en la dieta y la ocupación laboral de los individuos que se encuentran expuestos a agentes genotóxicos.

Existen diversas variables que pueden afectar las frecuencias de MN, PN y bN, se ha descrito que la edad es el principal factor, posteriormente el género y en menor grado el hábito de fumar (Suarrallés y Natarajan, 1997; Gentile *et al.*, 2012). Para esta investigación no se tomaron en cuenta individuos fumadores por lo que no hay efecto del tabaco sobre los resultados obtenidos; sin embargo las variables consideradas fueron la edad y tiempo de exposición a pesticidas, para ambos factores se determinó que los valores de MN y PN no son influenciados por ninguna de las dos variables.

También interfiere en las frecuencias de MN la dieta, las personas que viven en Cojumatlán de Régules no comen adecuadamente pues el 51% de la población no cuentan con los ingresos suficientes para adquirir ni los bienes ni servicios suficientes para llevar una vida digna (Aguilar-Ortega, 2014). Fenech *et al.* (2005) dio a conocer que la ingesta más alta de vitamina E, retinol, ácido fólico, vitamina B3 y calcio está asociado con una reducción significativa en las frecuencias de micronúcleos de hasta un 49%; sin embargo, el consumo alto de riboflavina, ácido pantoténico y biotina promueven la formación de micronúcleos

elevando su frecuencia hasta en un 65%, es por esto que es recomendable que las personas expuestas a pesticidas se alimenten adecuada y balanceadamente.

Otro punto a evaluar del presente trabajo fue el índice de división nuclear, el cual indica el promedio de núcleos por célula y el índice de proliferación con bloqueo de la citocinesis, que es una medida indirecta del promedio de divisiones por célula (Suarrallés y Natarajan, 1997). Una reducción en el número de núcleos es interpretado generalmente como un indicador de retraso del ciclo celular y viceversa, en este trabajo el IDN y el IPBC no son significativamente diferentes para ninguna de las poblaciones estudiadas, demostrando así que no existe un efecto sobre el ritmo de la división celular en los individuos expuestos a plaguicidas, estos resultados coinciden con trabajos realizados por Lucero *et al.* (2000) y Pastor *et al.* (2001b).

A través de los cuestionarios aplicados a los individuos estudiados de Cojumatlán de Régules se determinó que es común que las mujeres expuestas a plaguicidas tengan abortos espontáneos. El 33% de las mujeres con ED, es decir 6 de las 18 analizadas, han sufrido la interrupción involuntaria de un embarazo antes de los 3 meses y en el caso de aquellas que se encuentran indirectamente expuestas, 7 de 7 (100%) han tenido abortos en el primer trimestre del embarazo, esto resultados son parecidos a los descritos por Carbajal-López *et al.* (2015), ellos encontraron que en Arcelia, Ajuchitlán y Tlapehuala, 3 poblaciones del estado de Guerrero, México, las esposas de jornaleros presentaron abortos espontáneos en porcentajes de 40.3%, 76.92% y 8.33%, respectivamente. Lo anterior puede ser explicado como resultado del efecto que tienen los plaguicidas sobre funciones reproductivas, desarrollando infertilidad (Koifman *et al.*, 2002) o que la exposición paterna a plaguicidas incrementa el número de casos de abortos espontáneos en las esposas, es decir, en mujeres con EI (Petrelli *et al.*, 2000).

El daño ocasionado por pesticidas no es únicamente en las poblaciones humanas sino que al existir un incorrecto manejo y deshecho de los recipientes vacíos de los agroquímicos ya que como se mencionó anteriormente estos se tiran en los mismos campos pues no existen contenedores especiales para su deshecho. En Cojumatlán los envases son reutilizados para contener agua y para hacer bollas que son colocadas en las redes de pesca que son

empleadas en el lago de Chapala. Por estas razones es que el perjuicio ocasionado por los pesticidas es aumentado por circunstancias antropogénicas contaminando agua, suelo, aire y a cada uno de los seres vivos que habitan estos estratos, colocando en riesgo el equilibrio de los ecosistemas. Por lo que es necesario que los campesinos reciban adiestramiento y capacitación, puesto que la forma en que las personas de Cojumatlán de Régules actúan frente a la exposición a pesticidas demuestra que no tienen la información ni conocimiento suficiente acerca de cuáles son las medidas de protección y prevención que deben seguirse al manejar estas sustancias, lo que incrementa la necesidad de mantener instruidos a cada uno de los habitantes del municipio con información sobre prevención de riesgo para la salud de ellos mismos, de su familia y la protección del ambiente.

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a través del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en individuos expuestos a plaguicidas del municipio Cojumatlán de Régules, demuestran que:

- La exposición directa e indirecta a las mezclas de pesticidas causan diferencias significativas en las frecuencias de MN. Los valores de PN y bN son mayores en las poblaciones con exposición demostrando de esta manera la existencia de rearrreglos cromosómicos y amplificación génica.
- El IDN e IPBC no presentan diferencias significativas por lo que no se demuestra efecto en el ciclo celular de los habitantes de Cojumatlán.
- El tiempo de exposición y edad no se correlacionan con los MN, lo que sugiere que estas variables no afectan las frecuencias de micronúcleos.
- El daño producido por plaguicidas en poblaciones expuestas puede ser evaluado a través del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en linfocitos de sangre periférica pues es una técnica confiable, sencilla y rápida.

Las observaciones llevadas a cabo en las poblaciones expuestas del municipio estudiado sugieren que:

- Se deben llevar a cabo estrategias de protección y prevención acerca del uso de los plaguicidas en la región para así poder proteger a los individuos con exposición directa e indirecta.
- Dar a conocer estrategias de alimentación adecuada para promover la reparación del ADN y poder así disminuir el daño genotóxico ocasionado por los plaguicidas.

- Es necesario apoyar a las personas que utilizan pesticidas con información acerca del deshecho de los empaques pues hacerlo de manera incorrecta ocasiona daño en otros sistemas.
- El biomonitoreo en poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas permite promover el desarrollo de prácticas de protección de la salud así como de la prevención del riesgo.

IX. REFERENCIAS

- Albert, L. (2005). Panorama de los plaguicidas en México. *Revista Toxicológica en línea (retel)*. No. 8. Recuperado el 7 de marzo de 2015, de <http://www.sertox.com.ar/retel/no8/01.pdf>.
- Aiassa, D., Mañas, F., Bosch, B., Gentile, N., Bernardi, N. y Gorla N. (2012). Biomarcadores de daño genético en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas. *Acta Biologica Colombiana* 17: 485-510.
- Aguilar-Ortega, T. (2014). Desarrollo económico y emigración en la Región Lerma-Chapala de Michoacán. *Ra Ximhai* 2: 63-87.
- Aktar-Wasim, M., Segupta, D. y Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2: 1-12.
- Análisis de extensionismo agrícola en México. (2011). Mejores políticas para una vida mejor. OCDE, París. Recuperado el 10 de junio de 2015, de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/DesCap/Documents/AnalisisExtensionismoAgricolaMexico.pdf>.
- Bebe, F. N. y Panemangalore, M. (2003). Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats. *Journal of Environmental Sciences and Health* B38: 349-363.
- Bolognesi, C., Parrini, M., Bonassi, S., Ianello, G. y Solanitto, A. (1993). Cytogenetic analysis of a human population occupationally exposed to pesticides. *Mutation Research* 285: 239-249.
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research* 543: 251-272.
- Bolognesi, C., Landini, E., Perrone, E. y Roggieri, P. (2004). Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. *Mutation Research* 557: 109-117.

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

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M. y Lando, C. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28: 625-631.

Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C. y Fenech, M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: Evidence from human studies. *Mutagenesis* 26: 93-100.

Calderón-Ezquerro, C., Guerrero-Guerra, C., Sansores-Martínez, R., Calderón-Segura, M. E., Villalobos-Pietrini, R., Amador-Muñoz, O. y Gómez-Arroyo, S. (2010). Genotoxicity in lymphocytes of smokers living in Mexico City. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 26: 47-63.

Carbajal-López, Y., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Calderón-Segura, M. E. y Martínez-Arroyo, A. (2016). Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 2513-2520.

Catalán, J., Falck, G.C., Jarventaus, H., Kallos-Tarpila, T., Pitkamani, L. y Norppa, H. (2006). *In vivo* micronuclei in uncultured T-lymphocytes of railroad transit workers and referents. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47: 137-148.

Catálogo de Plaguicidas. CICOPPLAFEST/COFEPRIS. México. Recuperado el 8 de noviembre de 2015 de <http://coepris.michoacan.gob.mx/uso-de-plaguicidas>

Contreras, H. R., Badilla, J., Bustos-Obregón, E. (1999). Morphofunctional disturbances of human sperm after incubation with organophosphate pesticides. *Biocell* 2: 135-141.

Coskum, M., Coskum, M., Cayir, A. y Ozdemir, O. (2011). Frequencies of micronuclei (MNi), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) in farmers exposed to pesticides in Canakkale, Turkey. *Environmental International* 37: 93-96.

- Davies, H.W., Kennedy, S.M., Tesschke, K. y Quintana, E.J.P. (1998). Cytogenetic analysis of South Asian berry pickers in British Columbia using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes. *Mutation Research* 416: 101-113.
- Fenech, M. y Morley, A.A. (1986). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* 144: 29-36.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research* 455: 81-95.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. y Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. *Mutation Research* 534: 65-75.
- Fenech, M., Baghurst, P., Luderer, W., Turner, J., Record. S., Ceppi, M. y Bonassi, S. (2005). Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, β -carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability-results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis* 5: 991-999.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research* 600: 58-66.
- Fenech, M. y Bonassi, S. (2011). The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26: 43-49.
- Garaj-Vrhovac, V. y Zeljezic, D. (2001). Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology* 165: 153-162.
- Gentile, N., Mañas, F., Bosch, B., Peralta, N. y Aiassa, D. (2012). Micronucleus assay as a biomarker of genotoxicity in the occupational exposure to agrochemicals in rural workers. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* 88: 816-822.

Gómez-Arroyo, S., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Martínez-Arroyo, A., Calderón-Segura, M.E., Villalobos-Pietrini, R. y Waliszewski, S.M. (2013). Riesgo genotóxico por la exposición ocupacional a plaguicidas en América Latina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29: 159-180.

Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P. y MacGregor J.T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 18: 277-291.

IARC. International Agency for Research on Cancer. (2015). Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 5 de diciembre de 2015 de http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php.

Iarmarocovai, G., Ceppi, M., Botta, A., Orsiere, T. y Bonassi, S. (2008). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cáncer patients: A meta-analysis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 659: 247-283.

Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). México. Recuperado el 8 de noviembre de 2015 de <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM16michoacan/municipios/16074a.html>

Kirsch-Volders, M. y Fenech, M. (2001). Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 16: 51-58.

Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M. y Decordier, I. (2002). Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research* 504: 137-148.

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Surrallés, J., Vaanhauwaert, A. y Wakata, A. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research* 540: 153-163.

Koifman, S., Koifman, R. J. y Meyer, A. (2002). Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 18: 435-445.

Lucero, L., Pator, S., Suárez, S., Durban, R., Gómez, C., Parrón, T., Creus, A. y Marcos, R. (2000). Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research* 464: 255-262.

Manual de Plaguicidas de Centroamérica. Universidad Nacional de Costa Rica. Recuperado el 8 de noviembre de 2015 de <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/>

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

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

Miller, E. C. (1978). Some current perspectives on chemical carcinogenesis in human and experimental animals. *Cancer Research* 38: 1479-1496.

New pesticides active ingredients. (1993). *American Chemical Society*. Recuperado el 10 de junio de 2015, de <http://www.acs.org/content/acs/en.html>.

PAN. International List of Highly Hazardous Pesticides. (2014). Pesticide Action Network International. Recuperado el 24 de octubre de 2015 de http://www.rap-al.org/articulos_files/ListaPAN_HHP.pdf

Pastor, S., Gutiérrez, S., Creus, A., Cebulska-Wasilewska, A. y Marcos, R. (2001a). Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutation Research* 495: 147-156.

Pastor, S., Gutierrez, S., Creus, A., Xamena, N., Piperakis, S. y Marcos, R. (2001b). Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral blood lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 16: 539-545.

Petrelli, G., Figá-Talamanca, I., Tropeano, R., Tangucci, M., Cini, C., Aquilani, S., Gasperini, L. y Meli, P. (2000). Reproductive male-mediated risk: spontaneous abortion among wives of pesticide applicators. *European Journal of Epidemiology* 16: 391-393.

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

RUP. Restricted use product summary report (2015). Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). Recuperado el 5 de diciembre de 2015 de <http://www.epa.gov/pesticide-worker-safety/restricted-use-products-rup-report>.

Sadoval- Moreno, A. y Ochoa-Ocaña, M. A. (2010). Grupos locales, acceso al agua y su problemática de contaminación en la Ciénega de Chapala, Michoacán. *Economía, Sociedad y Territorio* 34: 683-719.

Convenio de Estocolmo. SEMARNAT. (2012). Recuperado el 17 de noviembre de 2015 de <http://www.semarnat.gob.mx/temas/agenda-internacional/convenio-de-estocolmo>.

Suarrallés, J. y Natarajan, A.T. (1997). Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutation Research* 392: 165-174.

The WHO recommended classification of pesticides by hazards and guidelines to classification. (2010). WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 81 p.

Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Osorio, A. M. y Smith, M. T. (1997). Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of malathion-exposed workers. *Mutation Research* 388: 85-95.

Tope, A., Bebe, F. N. y Panemangalore, M. (2006). Micronuclei frequency in lymphocytes and antioxidants in the blood of traditional limited-resource farm workers exposed to pesticides. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 41: 843-853.

Venegas, W., Zapata, I., Carbonell, E. y Marcos, R. (1998). Micronuclei analysis in lymphocytes of pesticides sprayers from Concepcion, Chile. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 18: 123-129.

Vlastos, D., Demisa, G. y Matthopoulos, D. (2005). Potente genotoxic effects of metalaxyl and imidacloprid in human lymphocytes using the micronucleus assay *in vitro*, 3rd European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment, pp. 417-420.

WHO. World Health Organization (1990). Public health impact of pesticides used in agriculture. Ginebra.

Zalcain, M., Sierrasesúмага, L. y Patiño, A. (2005). El ensayo de micronucleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 28: 227-236.