



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Ciencias

**EVALUACIÓN DE GENOTOXICIDAD EN
TRABAJADORES AGRÍCOLAS DEL
ESTADO DE CHIAPAS EXPUESTOS A
PLAGUICIDAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

**FERNANDO URIEL GONZÁLEZ
DOMÍNGUEZ**

DIRECTORA DE TESIS
**DRA. REGINA DORINDA MONTERO
MONTROYA**

Ciudad Universitaria Cd. Mx., 2022





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.

Hoja de datos

- **Datos del alumno.**

González
Domínguez
Fernando
Uriel
55 18 52 20 46
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
312054115

- **Datos del tutor.**

Doctora
Regina
Dorinda
Montero
Montoya

- **Datos del sinodal 1.**

Doctora
Karen
Suárez
Larios

- **Datos del sinodal 2.**

Doctor
Rodolfo
Omar
Arellano
Aguilar

- **Datos del sinodal 3.**

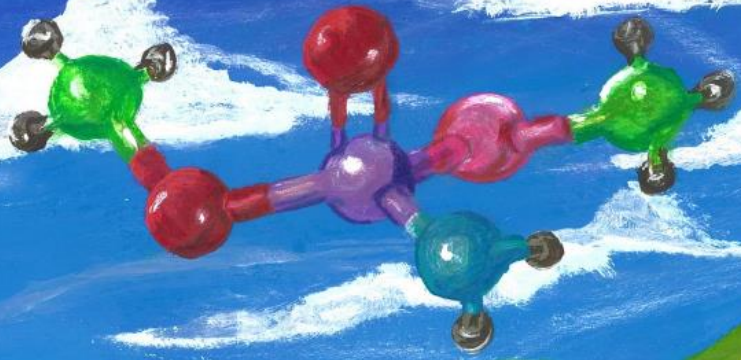
Doctora
Patricia
Ramos
Morales

- **Datos del sinodal 4.**

Doctora
Leticia
Guadalupe
Yáñez
Estrada

- **Datos del trabajo escrito**

Evaluación de genotoxicidad en trabajadores agrícolas del estado de Chiapas
expuestos a plaguicidas
57 p
2022



METAMIDOFOS

Agradecimientos

Primeramente a mi familia, quienes han sido el soporte más importante y quienes sin ellos no podría haber concluido este proceso, el cual ya nos debíamos. Realmente no hay palabras suficientes y tendría que escribir una tesis extra para explicar lo importante y lo agradecido que estoy con ustedes

A mi sobrino quien, es sus ojos puedo ver la esperanza, la felicidad y el amor, pero sobre todo, el claro motivo de lucha, para preservar la naturaleza tan hermosa que se ve amenazada, y así él tenga la oportunidad de conocerla, atesorarla y cuidarla posteriormente.

A mi padre y a su cariño, por su “tierra” aprendí a observar la naturaleza, estar en contacto con ella y sobre todo a admirarla desde pequeño, lo cual impacto en mi elección de profesión, gracias por siempre mostrarme cariño y estar a mi lado.

A mi hermana mayor Cintli quien me regalo lo mejor del mundo, no sé cómo sería mi vida sin ti, tu impulso y tu forma de ser.

A mi hermana Ixchel quien sin duda le estaré eternamente agradecido por mantenerme a flote y estar cuando siempre lo necesito.

A mi madre, quien me dio la vida dos veces y a su espíritu prácticamente inquebrantable, me mantuvo fuerte hasta en los instantes más inhóspitos de mi existencia, no existe nada en este universo que podría darte a cambio del cariño, amor, comprensión, cuidado que me has brindado siempre. Eres mi mayor fuente de inspiración y afecto.

A los demás miembros de mi familia, sobre todo de parte materna, mis tíos y tías quienes en más de una ocasión han operado como padres extra, les debo el estar aquí y en este instante gracias por mantenerse a mi lado cuando más los necesitaba, y ayudarme tanto en estos últimos años. Los amo a todos Arturo, Salvador, Yolanda, Laura...etc.

A mi linda y querida mascota que donde sea que estes, eras a quien me despedía al salir hacia la universidad y me recibía con cariño cuando llegaba.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que desde la preparatoria me dio las herramientas y sentido de pertenecía para desarrollarme profesionalmente, que orgullo ser PUMA.

A la Escuela Nacional Preparatoria 5, José Vasconcelos, por iniciar mi proceso en la máxima casa de estudios.

A la Facultad de Ciencias, UNAM. Por formarme y ser el sitio donde logré concretar mi sueño de ser científico, además de acercarme a profesionistas e investigadores los cuales siempre admiraré.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Por permitirme realizar mi proyecto en sus instalaciones, esperando formar parte de estos laboratorios en el futuro.

A los miembros de mi comité por sus correcciones y hacerme saber que aún me falta mucho camino por recorrer pero que siempre se puede mejorar. Dra. Karen Suarez, por ayudarme en todo el proceso, Dr. Omar Arellano, por su excelente clase y práctica, Dra. Patricia Ramos, por aceptarme en el taller, que me acercó a este proyecto y Dra. Leticia Yáñez, por su experticia en el área de agroquímicos que me permitió mejorar significativamente mi escrito.

A la SADEC AC. Por brindar las muestras y datos necesarios para este proyecto.

A los alumnos de las materias Bioquímica Ambiental y Toxicología ambiental por confiarme ser su adjunto, aprendí más de ustedes que ustedes de mí.

A los compañeros de laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental:

MVZ. Luis Serrano por apoyarme en todo el proceso experimental y su paciencia para mostrarme como se debían de hacer las cosas. Y sobre todo, por evaluar las últimas muestras cuando yo no pude.

A la Dra. Rocío López por su amistad y la confianza que tuvo al permitirme ser su ayudante, además de ser una mentora.

A la Biól. Betsy y a la M. en C. Rosa por su amabilidad y compañía en el laboratorio, además de siempre contestar mis dudas.

A la Dra. Karen Suárez, mentora, gracias por ser parte de mi formación desde el taller y también por acceder ser su ayudante, explicarme y corregirme con una excelente actitud en todo momento.

Finalmente a la Dra. Regina Montero Montoya, por ser una gran mentora desde que entré al taller, por su vasto conocimiento y la confianza para conmigo además del gran hecho que significó para mí, el esperarme hasta que pude retomar mi camino académico/profesional.

Existen muchas más personas y amigos quienes merecen una mención ya que me han confortado y ayudado especialmente en los últimos años. Una mención especial al personal de la unidad 405 del HGM. Dra. Arreguín, Dra. Ramírez, Dr. Santos, Dr. Sánchez Dra. Hernández, Dr. Norlando etc., quienes fueron ángeles en mi camino.

Dedicatoria

Para los participantes de este estudio, gracias a su valiosa muestra, logré concluir mi carrera profesional, espero retribuir de alguna forma su participación.

Para todo mi soporte médico, gracias a sus esfuerzos estoy aquí.

Para quienes queremos un mundo donde exista justicia social y justicia ambiental.

Para mi familia

Y finalmente para mí, por demostrarme que nada es imposible con el suficiente tiempo.

“El ser humano es parte de la naturaleza y su guerra contra ella es, inevitablemente, una guerra contra sí mismo.”

Rachel L. Carson

“No se puede sanar al mundo sin sanarse primero a sí mismo.”

Elisabeth Kübler-Ross

“No hay nada en el mundo que capacite tanto a una persona para sobreponerse a las dificultades externas y a las limitaciones internas, como la consciencia de tener una tarea en la vida.”

Viktor Frankl

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Abreviaturas y Acrónimos | 9 |
| RESUMEN | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| <i>Plaguicidas en Chiapas</i> | 13 |
| <i>Plaguicidas y su papel en la salud pública</i> | 14 |
| <i>Plaguicidas altamente peligrosos</i> | 15 |
| <i>Daño genotóxico y su relación con enfermedades</i> | 16 |
| <i>Determinación de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica por bloqueo de la citocinesis con citocalasina B</i> | 18 |
| <i>Formación del daño genotóxico: puentes nucleoplasmáticos y gemaciones</i> | 19 |
| JUSTIFICACIÓN | 19 |
| <i>Vinculación</i> | 20 |
| HIPÓTESIS | 21 |
| OBJETIVO GENERAL | 21 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 21 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 21 |
| <i>Sitios del estudio</i> | 21 |
| <i>Municipio de Ocosingo</i> | 21 |
| <i>El Corozo- El Bajo Grande</i> | 22 |
| <i>Palenque</i> | 22 |
| <i>Población de estudio</i> | 22 |
| <i>Colecta de muestra sanguínea</i> | 23 |
| <i>Ensayo de micronúcleos</i> | 24 |
| <i>Evaluación del daño genotóxico</i> | 26 |
| <i>Peligrosidad en salud y ambiente</i> | 27 |
| <i>Análisis estadístico</i> | 28 |
| <i>Genotoxicidad</i> | 29 |
| <i>Peligrosidad</i> | 31 |
| <i>Contribución de los plaguicidas a la genotoxicidad</i> | 34 |
| DISCUSIÓN | 36 |
| LIMITANTES | 43 |
| PERSPECTIVAS | 43 |
| ANEXOS | 44 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Anexo 1</i> | 44 |
| <i>Anexo 2</i> | 45 |
| <i>Anexo 3</i> | 52 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 53 |

Abreviaturas y Acrónimos

| | |
|-----------|---|
| AC | Asociación Civil |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| BANRURAL | Banco Nacional de Crédito Rural |
| CENAPRECE | Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades |
| COMB | Daño combinado |
| DT | Daño total |
| EPA | Agencia de Protección Ambiental* |
| FA | Figura apoptótica |
| FAO* | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| Fung | Funguicida |
| GN | Gemaciones nucleares |
| Herb | Herbicida |
| IARC | Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer* |
| IMC | Índice de masa corporal |
| Ins | Insecticida |
| MLG | Modelo lineal generalizado |
| MN | Micronúcleo |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PAN | Red de Acción de Plaguicidas* |
| PAP | Plaguicidas altamente peligrosos |
| PN | Puente nucleoplasmático |
| SADEC | Salud y Desarrollo Comunitario |
| SAG | Sistema Globalmente Armonizado |
| SARH | Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos |
| SEMARNAT | Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales |
| SRH | Secretaría de Recursos Hidráulicos |

*por sus siglas en ingles

RESUMEN

Introducción: En las últimas décadas, la integridad genética de la población humana se ha visto comprometida por la actividad industrial, esto a su vez ha incrementado la exposición a agentes genotóxicos que pueden alterar la estabilidad cromosómica, así como el deterioro ambiental que conlleva su uso, siendo un ejemplo los plaguicidas. Por tanto, es necesario contar con biomarcadores que puedan evaluar el daño genotóxico, como lo es el ensayo de micronúcleos (MN) para determinar riesgo en poblaciones expuestas a estos compuestos. **Objetivo:** determinar la frecuencia de daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica de pobladores de las cuatro localidades agrícolas atendidas por SALUD Y DESARROLLO COMUNITARIO, A.C. (SADEC) **Materiales y método:** A través del ensayo de MN por bloqueo de citocinesis se registró el daño genotóxico que estas muestras presentaron: MN, gemaciones nucleares (GN), puentes nucleoplasmático (PN), daño total (DT) y figuras apoptóticas (FA). De las cuatro localidades problema: Las Tazas, El Corozo, Francisco León y Palenque pertenecientes al estado de Chiapas. Los datos de genotoxicidad obtenidos, se analizaron con un Modelo Lineal Generalizados (MLG) para considerar posibles asociaciones entre el daño citogenético con las variables registradas en las encuestas enviadas por la SADEC, tales como edad, sexo, localidad, hábito de fumar, tiempo de uso y tipos de plaguicidas utilizados. Con esta información, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los efectos nocivos, que los plaguicidas empleados por los participantes generan, para realizar un estimado de peligrosidad. **Resultados:** las medias de los sitios de estudio de DT fueron las siguientes: Las Tazas 11.11 ± 3.78 ; El Corozo 9.35 ± 5.33 ; Francisco León 7.02 ± 2.9 y Palenque 8.4 ± 4.32 . Así mismo se obtuvieron dos calificadores (salud y ambiental) que muestran la peligrosidad de los tipos de plaguicidas registrados, la edad mostró una asociación significativa con PN mientras que el DT se relacionó con los sitios de estudio en donde se encontró un amplio uso de plaguicidas. **Discusión:** de la relación entre el daño total y los sitios de estudio, se infiere que hay un impacto en la estabilidad genética en los cuatro sitios mencionado, y la asociación con edad podría indicar también, tiempo de exposición. Además, el calificador en salud humana para cada compuesto que los integrantes manifestaron usar, y la asociación significativa con cada evento genotóxico, se infiere que los plaguicidas utilizados contribuyen a la inestabilidad genética observada. **Conclusión:** El uso de plaguicidas en estas regiones agrícolas y silvícolas se puede considerar como un importante factor de riesgo de genotoxicidad para sus habitantes.

Palabras clave. Daño genotóxico, biomarcadores, micronúcleo, plaguicida, modelo lineal generalizado.

INTRODUCCIÓN

El satisfacer la demanda mundial de alimentos y otros productos agrícolas (como granos, forraje, derivados pecuarios) se posicionó como un reto difícil de cumplir para los países en décadas pasadas. La innovación a través del uso de agroquímicos garantizó una mayor producción, reduciendo así la pérdida de sus productos por especies que afectaban a estos; por tanto, se ha colocado rápidamente como una herramienta indispensable para la actividad económica.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) define a los plaguicidas como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, **incluyendo** los vectores de enfermedades humanas o de animales, especies vegetales y animales no deseadas que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción agrícola, como elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, productos maderables y alimentos para animales.” Así mismo el término incluye “las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro antes del consumo” (FAO, 2020).

Siendo un concepto tan amplio, muchas sustancias hoy en día pueden considerarse plaguicidas. Su éxito se debe al eficaz control que tienen sobre organismos no deseados o plagas que puedan afectar la vida cotidiana, salud pública o la agricultura. En esta última ayuda a alcanza un máximo de producción agropecuaria, necesaria para satisfacer la demanda de zonas urbanas por productos agrícolas ya que se requiere una mayor producción, almacenamiento y protección de los productos. En consecuencia se ha incrementado el uso de estos compuesto como parte del sostenimiento de la demanda en agricultura y el desarrollo agroindustrial.

La relación plaguicidas-industria se dio principalmente en el último siglo; sin embargo, se pueden considerar tres grandes períodos en la historia de los plaguicidas, ya que estos han acompañado al hombre desde épocas antiguas (Bernardino y col., 2014).

La primera época se considera antes de la era de Cristo hasta mediados del siglo XIX; en estos siglos fueron utilizados “precursores” de plaguicidas tales como el azufre, arsenitos y flores. Algunas de las técnicas empleadas consistían en sumergir semillas en este tipo de mezclas azufradas y arsenicales, para evitar algún daño al cultivo; así como también el uso de cobre y piretrinas (derivadas de crisantemos, *Chrysanthemum cinerariifolium*), al igual que el empleo de jabones, fueron adoptándose en siglos posteriores. (Restrepo & Franco, 1988).

La segunda era se considera de finales del siglo XIX hasta 1920, ésta se caracterizó por el uso de productos simples, baratos y de toxicidad inespecífica, como el caldo bordelés o mezcla de Burdeos (una mezcla de sulfato de cobre con cal), el verde de París (acetoarsenito de cobre), los ácidos carbónico y fénico, el bromuro de metilo y el disulfuro de carbono, entre otros.

El principal evento que impulsó esta era fue la Revolución Industrial con la implementación de la técnica de asperjado con azufre, pólvora, humo de tabaco, vinagre hervido, ácido muriático, clorhídrico y nitroso (Moll, 1934). Además del uso de aceites de petróleo como el kerosene en cultivos de viñedos (Herrera-Arangüena, 1961).

Durante la última era, de 1920 hasta la actualidad, los productos sintéticos han aparecido y evolucionado gracias a diversos acontecimientos:

- La síntesis de productos químicos se incrementó primeramente, para tener un control de enfermedades por vector, como el paludismo, que en la actualidad continúa siendo un problema de salud pública en todo el mundo, principalmente en países en vías de desarrollo (Suh y col., 2004).
- En segundo lugar, gracias a su potencial tóxico contra los organismos dañinos o perjudiciales, el empleo de plaguicidas ha mostrado tener efectos en la salud del ser humano además ayudar al desequilibrio ecológico (Matheus & Bolaños, 2014), características que se han aprovechado como armas químicas.
- Y finalmente, a la adaptación que las especies a controlar, han adquirido contra estos mismos agentes. Debido a que las cantidades estándar se vuelven menos efectivas o incluso totalmente ineficaces, por lo cual existe una constante síntesis de nuevas sustancias que sean más efectivas, las cuales pueden tener consecuencias negativas tanto en la salud humana como en la ambiental, un ejemplo son algunos de los “plaguicidas altamente peligrosos” (PAP).

Plaguicidas en México

México fue el primer país en vías de desarrollo en implementar ideologías y tecnologías de la “Revolución Verde”, para un “progreso agrícola”, lo cual introdujo el uso de agroquímicos, para los cultivos de Trigo (*Triticum vulgare L.*) en 1955, algodón y ajonjolí (*Gossypium spp.*, *Sesamun indicum L.*) en 1960 principalmente, colocando a los plaguicidas rápidamente en la cotidianidad agrícola, tanto así, que para 1978 se utilizaron 9,798 toneladas de distintos plaguicidas y para la década de los 90, México fue el principal importador de agroquímicos de América Latina, siendo utilizados más de 450,000 toneladas, principalmente de insecticidas y herbicidas (Rivero y cols., 2001).

El uso a gran escala de estos agrotóxicos se puede observar en las afectaciones agudas reportadas cada año. Según datos de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), de 2012 al 2019 se registraron en el país un total

de 29,672 casos de intoxicaciones accidentales por uso de plaguicidas, de los cuales 20,394 fueron del sexo masculino y 9,278, del femenino las cuales incluyeron: “intoxicaciones por, entre otras sustancias, conservadores de la madera, insecticidas organofosforados y carbamatos, insecticidas halogenados (no clorinados), rodenticidas, herbicidas y fungicidas” (SEMARNAT, 2021).

Sin embargo, este número de casos podría ser distinto, ya que solo se establece “uso agrícola” como factor de intoxicación, sin especificar si estas correspondan a exposición laboral en el campo exclusivamente, o también a contacto indirecto, como asperjado para control de enfermedades transmitidas por vector o bien por contacto accidental.

Plaguicidas en Chiapas

En un contexto histórico, en la década de los 60 el estado implementó el empleo de plaguicidas gracias a la campaña intensiva de uso de plaguicidas para el campo, impulsada por la extinta Secretaría de Recursos Hidráulicos (SRH), posteriormente Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), a través de la entrega de créditos bancarios y asistencia técnica por medio del Banco Nacional de Crédito Rural (BANRURAL). Esto colocó al estado como el segundo consumidor nacional de estas sustancias químicas en los inicios del 2000, solo después de Sinaloa (Bernardino y col., 2014). En consecuencia una gran cantidad de personas tienen el potencial de estar expuestas a plaguicidas y presentar efectos adversos.

En el reporte de intoxicaciones accidentales anteriormente mencionado en 2019, el estado de Chiapas, contabilizó un total de 1,804 casos de los cuales 1,234 fueron hombres y 570 mujeres (SEMARNAT, 2021).

Lo anterior cobra relevancia ya que más del 16% de la superficie estatal está destinada al uso agrícola. Según el Sistema de Información Agrícola y Pecuaria se cultivan 53 productos cíclicos y perennes. Siendo el maíz (*Zea mays L.*), frijol (*Phaseolus vulgaris L.*), plátano (*Musa paradisiaca*), cacao (*Theobroma cacao L.*), trigo (*Triticum spp*) y café (*Coffea arabica L.*) los principales y tradicionales cultivos; sin embargo, otros autores mencionan que hasta un 20% de la superficie estatal, se le considera de uso agrícola lo que implica 1.4 millones de hectáreas (Flores, 2019).

La agricultura en Chiapas, representa una de las principales fuentes de ingreso económico al estado. Su desempeño tradicional era la del autoconsumo, como en muchas regiones, la cual es una forma de soberanía alimentaria de escala local-regional, consistente en la siembra de cultivos básicos a partir de variedades locales, donde no se requería el uso de agroquímicos.

Sin embargo, en el estado del 2006 al 2012 se impulsó el cultivo de la palma africana (*Elaeis guineensis*), el piñón mexicano (*Jatropha sp*), el limón (*Citrus limon*) y el aguacate (*Persea americana*), entre otros, así como café y mango para producirlos a mayor escala. Como resultado a esta política, se condujo a los cultivos de granos básicos como maíz, frijol y trigo a una disminución considerable a partir de los

programas de reconversión productiva hacia cultivos comerciales de producción continua.

A su vez este cambio ha repercutido tanto en los sistemas de agricultura familiar, como al medio ambiente. Con la desestructuración de las unidades campesinas (Gómez, 2017), y a la sobre explotación de suelo agrícola respectivamente. Esta producción intensiva genera una disbiosis en el suelo y lleva a su degradación temprana, por lo que se recurre a la deforestación para obtener nuevos sitios de cultivo, así como al uso de fertilizantes y plaguicidas.

Plaguicidas y su papel en la salud pública

Además del uso agrícola en el estado, los insecticidas son ampliamente empleados para el control de los vectores: *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopunctipennis*, transmisores de enfermedades como el dengue, zika y chikungunya, padecimientos endémicos en la población chiapaneca (Secretaría de Salud Chiapas, 2021).

Este control consiste en la aplicación de la sustancia química a los vectores en sus estados larvario y adulto, a través de rociado residual y/o nebulización y se utiliza como medida de prevención en sitios donde estos animales puedan desarrollarse y estar en contacto con personas.

En el 2015 se aplicaron organofosforados, piretroides y carbamatos de la lista (Tabla 1) emitida por el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE, 2016).

Tabla 1. Lista de productos recomendados por el CENAPRECE, 2015.

| Insecticida | Técnica |
|--|-------------------------|
| d-fenotrina* + butóxido de piperonilo | Tratamientos espaciales |
| d-fenotrina* + praletrina** + butóxido de piperonilo | Tratamientos espaciales |
| Fenotrina* | Tratamientos espaciales |
| Pirimifos-metil** | Tratamientos espaciales |
| Bifentrina** | Tratamientos espaciales |
| Clorpirifós-etil | Tratamientos espaciales |
| Malatión 2ª ** | Tratamientos espaciales |
| Deltametrina 3 ** | Rociado en viviendas |
| Lambdacialotrina** | Rociado en viviendas |
| Bendiocarb* ** | Rociado en viviendas |
| Ciflutrina** | Rociado en viviendas |
| Propoxur** | Rociado en viviendas |
| Alfacipermetrina* ** | Rociado en viviendas |

*Tóxico para abejas

** Enlistado PAP

Plaguicidas altamente peligrosos

De acuerdo a la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS), los plaguicidas altamente peligrosos (PAP) son aquellos que cumplan ciertos criterios: “toxicidad aguda alta, toxicidad crónica, los incluidos en convenios ambientales internacionales vinculantes y los ingredientes activos o formulaciones de plaguicidas que muestran una alta incidencia de efectos adversos irreversibles o severos en la salud o el ambiente”. Cada criterio se resume en la tabla 2.

En sí, la lista se compone de aquellos que presenten formulaciones con efectos graves y/o irreversibles tanto en humanos como en el medio (Bejarano-González, 2017), por lo que su uso debe ser restringido. Sin embargo este principio sólo es cumplido en aquellos países con Normas y regulaciones bien establecidas. Aunque queda a disposición y a las necesidades de cada país, la toma de decisión de políticas públicas sobre la prohibición total de estas sustancias de forma gradual y el dar a conocer los efectos adversos que ocasionan estas sustancias ya que la lista de PAP funciona como guía internacional (PAN, 2021).

| Criterio | Descripción |
|---------------------------|---|
| Toxicidad aguda alta | Síntomas graves de intoxicación, y/o muerte en pocas horas de exposición <ul style="list-style-type: none">• Enlistados como Clase 1ª (Extremadamente y Altamente Peligrosos) según clasificación de Plaguicidas por su Peligrosidad, OMS.• Fatal si se inhala (H330) según el Sistema Globalmente Armonizado de la Unión Europea (SAG). |
| Toxicidad crónica | Efectos por exposición repetida a bajas dosis, por un tiempo prolongado, se incluye cáncer, mutagenicidad y tóxico en la reproducción. <ul style="list-style-type: none">• Carcinógeno para seres humanos según IARC, EPA.• Conocidos o supuestos carcinógenos para seres humanos, Categoría I, SGA.• Probable/posible carcinógeno para seres humanos según IARC, EPA.• Sustancias que induzcan mutaciones hereditarias en las células germinales de seres humanos. Categoría I, SGA.• Sustancias de las que se sabe o se sospecha que son tóxicas para la reproducción humana. Categoría I, SGA.• Perturbador Endocrino: “Sospecha de ser tóxico para la reproducción humana”, Categoría II, SGA. |
| Convenios internacionales | <ol style="list-style-type: none">1. Estocolmo: sobre contaminantes orgánicos persistentes, los cuales son tóxicos, bioacumulables, altamente persistentes, capaces de transportarse a largas distancias y representan una amenaza global para los seres vivos. Todos los plaguicidas adoptados en los anexos A y B del convenio se encuentran en la lista PAP.2. Róterdam: sobre el consentimiento fundamentado previo aplicable a ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional. Aplicable a ciertas sustancias químicas y plaguicidas peligrosos o bien formulaciones que figuren en el Anexo tres del Convenio de Rotterdam como formulaciones de Plaguicidas Severamente Peligrosas. |

| | |
|----------------------|--|
| | 3. Protocolo de Montreal: para la eliminación gradual de sustancias consideradas responsables del agotamiento del ozono. Actualmente hay un plaguicida incluido como producto químico agotador del ozono. |
| Relevancia ambiental | <ul style="list-style-type: none"> • De vida media “muy persistente” > 60 días en aguas marinas o dulces o vida media > 180 días en el suelo (vida media “típica”), sedimentos marinos o de agua dulce. • “Muy tóxico para los organismos acuáticos” (LC/EC 50 [48h] para la <i>Daphnia spp.</i> < 0,1 mg/l). • “Altamente tóxico para las abejas” según la EPA (DL50, µg/abeja < 2). |

Daño genotóxico y su relación con enfermedades

Con base en los estudios reportados en la literatura, el uso de agroquímicos, especialmente plaguicidas, provoca daños a la salud humana y ambiental, tanto a corto como a largo plazo (Nicolopoulou-Stamati y col., 2016). En poblaciones humanas, los trabajadores agrícolas presentan un mayor riesgo de padecer los efectos nocivos de estos tóxicos, ya que en este sector se utiliza el 85% de tales productos (Escobar-Castillejos y col., 2011).

En la actualidad se conoce una gran variedad de efectos negativos por la exposición al principio activo y/o formulaciones de diversos plaguicidas estudiados de forma individual. Sin embargo, frecuentemente se utilizan como mezclas complejas, tanto por la aplicación de diferentes agentes químicos en simultáneo, como por la presencia de aditivos en formulaciones comerciales, que en conjunto pueden ocasionar daños inmunológicos, alteraciones en la reproducción y desarrollo, efectos carcinogénicos y neurotoxicidad (Ortega-Elorza, 2011).

Las afectaciones a nivel molecular que ejercen las sustancias tóxicas sobre los organismos son variadas, como: modificaciones en la composición celular, variaciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos en el ADN, aumento en la síntesis o en la actividad de determinadas proteínas y alteraciones en el material hereditario (Hernández, 2000).

El daño al material genético se interpreta como un cambio en la secuencia del ADN, pérdida o ganancia del mismo a distintos niveles, desde mutaciones o eliminación del número de bases nitrogenadas, modificaciones en genes o grupos de genes, o bien, eliminación de cromosomas completos o grupos de cromosomas (Heddle y col., 2011). El daño genotóxico ocasionado por la exposición a xenobióticos, como plaguicidas, puede traducirse como modificaciones directamente en la estructura del ADN que suceden durante la división celular, o en proteínas como las asociadas con la segregación cromosómica que se traducen en pérdida o ganancia de cromátidas o cromosomas enteros, estas alteraciones pueden presentarse tanto de las células somáticas como de las células germinales (Heddle y col., 2011).

Ante estas eventualidades existen mecanismos de reparación del ADN o bien mecanismos de muerte celular -apoptosis-, para evitar que el daño se herede a otras células. Si estos mecanismos no se activan y el ADN no se repara o no hay muerte celular, la célula puede continuar dividiéndose hasta dar origen a una célula maligna, lo que desencadenaría en alteraciones metabólicas, fisiológicas, proliferación celular desregulada e inclusive en cáncer (Arellano y col., 2012).

El uso de biomarcadores es una buena herramienta para caracterizar el tipo y la magnitud de los daños provocados por la exposición a plaguicidas, tanto para agentes individuales, como para mezclas de estos, ya que son medidas a nivel molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Mccarthy & Shugart, 1990).

Básicamente, los biomarcadores son mediciones en el organismos con un objetivo epidemiológico y en sentido amplio es cualquier respuesta biológica a un compuesto químico ambiental que demuestra una desviación del estatus normal.

Dependiendo de su objetivo de evaluación, existen tres tipos de biomarcadores en epidemiología:

- De exposición
- De efecto
- De susceptibilidad

Cada uno puede ofrecer diferente información. Qué compuestos tóxicos hay en el cuerpo y su concentración (de exposición), el daño cualitativo y cuantitativo que está causando, si el tiempo de exposición ha generado un daño medible (de efecto) y si hay individuos y/o especies son más susceptibles o bien son propensos a padecer un efecto (de susceptibilidad), etcétera.

Así, el biomarcador de efecto, es indicativo de cambios en los organismos o en las células como resultado de la exposición a xenobióticos (sustancias extrañas para la vida) (Patterson, 2010). El biomarcador de efecto utilizado para el presente estudio es el daño genotóxico, que consiste en la cuantificación en alteraciones al material genético, observada gracias al ensayo de micronúcleos.

Una de las técnicas para medir el daño genotóxico, ocasionado por la exposición a diversos plaguicidas, otros contaminantes ambientales e incluso, numerosos medicamentos o procedimientos médicos como las radiografías, es el ensayo de micronúcleos.

Los micronúcleos (MN) son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear que corresponden a material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, estos se forman inicialmente por errores en la segregación de cromosomas o ADN dañado durante la división del material genético, produciéndose pérdida cromosómica, parcial o completa, ocasionando

que el reparto no sea equitativo, por lo que material genético que se desprende y que no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, permanece en el citoplasma en forma de un núcleo pequeño, cuyo tamaño dependerá de la cantidad de ADN que posea. Estos fragmentos de cromosomas son eventualmente encerrados por una membrana nuclear (Fenech y col., 2011). Los MN también pueden generarse espontáneamente (Arellano y col., 2012), debido a ciertos factores pueden contribuir a su formación, como el envejecimiento celular, el sexo y la edad, o la deficiencia de vitaminas como B9 y B12 (Zalacain, y col., 2005).

Gran cantidad de estudios encontrado evidencias de la genotoxicidad de los plaguicidas ya que estas sustancias ocasionan un desequilibrio de nucleótidos siendo situación crítica en la formación de MN (Sailaja, y col., 2006), por lo cual una mayor exposición a plaguicidas puede causar mayor frecuencia de MN en el organismo, así como otros eventos tales como gemaciones nucleares (GN) y puentes nucleoplasmáticos (PN).

Determinación de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica por bloqueo de la citocinesis con citocalasina B

Inicialmente los MN fueron descritos por William Howell y Justin Jolly, de ahí su nombre en hematología “cuerpos de Howell-Jolly”. Estos investigadores detectaron figuras extracelulares de ADN en células de médula ósea de ratones y hámsteres.

La prueba de MN fue propuesta en 1976 en cultivos de linfocitos humanos para identificar la presencia de un fragmento en el citoplasma mediante tinción con Giemsa.

Existen diversas técnicas para la evaluación de MN, como el de muestras de mucosa oral donde no se utiliza la citocalasina B y el ensayo de MN por bloqueo de citocinesis en linfocitos de sangre periférica. Este último es una herramienta ampliamente reconocida, validada y confiable que se emplea en estudios de biomonitoreo; que utiliza el agente derivado del hongo *Helminthosporium dematoidium* (citocalasina B), que inhibe la polimerización de los filamentos de actina, impidiendo la citocinesis, al imposibilitar la creación del anillo contráctil, necesario para la división celular después de la telofase. Para este ensayo se requieren tipos celulares con actividad mitótica para detectar el daño cuando los cromosomas se segregan.

En 1985, Fenech y Morley propusieron el uso de citocalasina B para detener a las células proliferantes en la citocinesis y de esta manera estandarizar las condiciones del cultivo para que el ensayo fuese reproducible, esto también permitió valorar con menos error además de los MN otras lesiones como: PN, GN, así como cuantificar un índice de proliferación (Fenech, 2007), haciendo así a éste, un ensayo robusto para la evaluación del daño genético (Fenech, 2016).

Formación del daño genotóxico: puentes nucleoplasmáticos y gemaciones

Los PN se originan durante la anafase cuando los centrómeros de los cromosomas dicéntricos se dirigen a los polos opuestos de cada célula hija en la mitosis; sin embargo, no existe una rotura del puente en la anafase, la membrana nuclear finalmente rodea a los núcleos hijos, con lo cual queda intacta esta unión (Fenech y col., 2011).

Los PN se favorecen por una reparación incorrecta de rupturas de cromosomas (cromosomas dicéntricos) o bien por fusiones de telómero a telómero en sus extremos, debido a un montaje inadecuado de las proteínas de unión a telómeros (telosoma), que encapsula y protege al telómero, además por un acortamiento excesivo de los telómeros, proceso normal reportado con el avance de la edad. Por lo tanto, a mayor edad mayor reducción en los telómeros (Marti y col., 2017).

Las GN se forman por la eliminación de ADN amplificado cercano a la periferia del núcleo, es decir a las muchas copias de uno o más genes por lo cual las células se deshacen de las copias adicional o desechar cromosomas en exceso, expulsándolos en forma de una gemación (Shimizu y col., 2000), también pueden formarse a partir de complejos de reparación aglomerados y rompimiento de un PN. Algunos investigadores proponen que este daño se presenta bajo condiciones más selectivas que los MN (Fenech y col., 2011).

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, la integridad genética de la población humana se ha visto comprometida, dado al incremento de las actividades industriales, la quema de combustibles, la agricultura extensiva con uso de agroquímicos, las actividades mineras, aunadas a la deforestación y a la contaminación de agua, aire y suelos. Estas acciones han creado un ambiente inadecuado para la vida y la salud de los seres vivos expuestos a productos químicos, entre ellos agentes genotóxicos que, aunados a estilos de vida, tratamientos médicos, nutrición y polimorfismos genéticos entre otros, pueden contribuir a la alteración de la integridad cromosómica.

Por lo tanto, es de suma importancia realizar estudios de genotoxicidad de manera rutinaria y monitorizar a aquellos individuos que, por su ocupación laboral, el lugar donde viven o por su estilo de vida, se encuentran más expuestos o con mayor riesgo de sufrir alteraciones, capaces de modificar su estabilidad genética, las cuales podrían desencadenar en patologías.

Tal es el caso del estado de Chiapas y el impacto que los agroquímicos ocasionan en su población, ya que ciertas regiones se han incrementado su producción agrícola en las últimas décadas y su uso de plaguicidas, uno de los casos más representativos es el de Los Altos de Chiapas, donde a partir de la década de los 90's, la superficie agrícola pasó del 29% al 50% de la superficie total ejidal, mientras que la superficie boscosa pasó del 44.5% al 21.7% (Bernardino-Hernández y col., 2014).

El sistema de producción agrícola del estado, pasó de largos periodos de barbecho (fase en el cual se deja “descansar” a la tierra, es decir no se siembra durante uno o más años, para permitir así que se restauren nutrientes, humedad y microbioma, para su posterior labranza) (RAE, s.f) a distintos sistemas intensivos, los cuales requieren de agroquímicos como:

- “Roza-tumba-quema”, el cual consiste en derribar secciones de bosque maduro, extraer la parte maderable y la leña, dejar secar y posteriormente quemar el resto encima del suelo de siembra de uno a tres ciclos anuales (Gamero-Gamero, 2020).
- “Roza-quema” donde se tala la cubierta vegetal y se quema en el sitio de cultivo para que así las cenizas emplearlas como fertilizante.
- “Año y vez” el cual consiste en dividir la tierra de cultivo en secciones semejantes, cultivando en una y barbechando en otra para rotar en el siguiente ciclo de cultivo (Buzo-Sánchez, s. f.).
- “Cultivo anual continuo”, donde la tierra todo el año se cultiva (Pool, 1997).

Vinculación

Salud y Desarrollo Comunitario (SADEC), es una Asociación Civil (AC), mexicana no lucrativa, dedicada a la formación de recursos humanos en salud, a la atención médica y dental, al impulso de estrategias sanitarias, a la organización de estructuras de salud, así como al involucramiento de especialistas externos en el trabajo con pueblos indígenas, en coordinación con las comunidades de las distintas regiones del estado de Chiapas (SADEC, s.f.).

Desde hace 10 años, SADEC coordina y opera la atención a la salud de las comunidades indígenas de escasos recursos que no son atendidas por el sistema de la seguridad social de Chiapas. Un ejemplo exitoso de su intervención, es la reducción de la mortalidad de las madres y la mortalidad por enfermedades infecciosas.

Por otra parte los habitantes de la región viven en su mayor parte de la producción agrícola y siembran sobre todo maíz, frijol, café y chile. Por lo cual la aplicación de agroquímicos es práctica común: lamentablemente sin previa capacitación, no disponen de vestimenta ni equipo de protección y desconocen los riesgos a su salud por la exposición a plaguicidas. De ahí la importancia de la intervención de SADEC; no obstante estos esfuerzos, se ha registrado un aumento de diversos tipos de cáncer y enfermedades dermatológicas, posiblemente por el incremento en el uso de agrotóxicos.

Dado que no se conoce con certeza si existe un efecto genotóxico por la exposición a plaguicidas en la región, SADEC, le solicitó a nuestro grupo de investigación realizar el presente estudio para valorar la situación en la que se encuentran los pobladores de esta región del país, dado al aumento en aplicación de plaguicidas.

HIPÓTESIS

Acorde con las evidencias de que los plaguicidas provocan daño genotóxico:

- Las muestras sanguíneas provenientes de agricultores que utilizan plaguicidas, presentarán frecuencias de MN, GN, PN y FA elevadas en comparación con las muestras provenientes de agricultores que mencionan no utilizar dichos agroquímicos.
- Así mismo, muestras de donadores expuestos a plaguicidas de mayor toxicidad presentarán daño genotóxico elevado en comparación a donadores que utilicen agroquímicos de menor peligrosidad.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar a través del ensayo de micronúcleos la frecuencia de daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica que presentan los habitantes de “Francisco León” y “Las Tazas” ambos en el Municipio de Ocosingo, “El Corozo” en el municipio Salto de Agua y “Palenque” donde se hace uso de plaguicidas con diferentes finalidades.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la frecuencia de MN, GN, PN y FA.
- Conocer el efecto genotóxico del uso de plaguicidas en las regiones estudiadas.
- Evaluar mediante análisis multivariados, los factores de riesgo de genotoxicidad en las comunidades estudiadas.
- Generar datos de peligrosidad en salud humana y ambiental sobre uso de plaguicidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sitios del estudio

Municipio de Ocosingo

Nuevo Francisco León (16°58'46" N; 91°18'39" O) y Las Tazas (16° 58' 46" N y 91° 18' 39" O),

Con una extensión territorial de 9,520.12 km², este municipio representa el 12.88% de la superficie total estatal (Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México, s. f.). Presenta un clima cálido húmedo, cálido subhúmedo, semicálido con lluvias en verano, cálido húmedo, semicálido subhúmedo y semicálido húmedo con lluvias todo el año (Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Ocosingo, Chiapas, s. f.).

En su superficie vegetal, el 66.61% corresponde a selva, el 16.24% a bosque, el 1.14% a pastizal inducido, 0.84% a tular, y el 0.03% a sabana (Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Ocosingo, Chiapas, s. f.).

En lo relativo al uso de suelo, el 12.78% corresponde a pastizal cultivado, el 1.63% a agricultura y el 0.16% a zona urbana.

El uso agrícola total del municipio se distribuye en: 30.92% se destina para la agricultura mecanizada continua, el 0.22% para la agricultura mecanizada estacional, el 7.37% para la agricultura de tracción animal continua, el 18.73% para la agricultura manual continua y el 42.76% es no apta para la agricultura (Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Ocosingo, Chiapas, s. f.).

El Corozo- El Bajo Grande

Con coordenadas geográficas 17° 34' 44" N, 92° 08' 58" O, en el municipio de Salto del Agua con una extensión territorial de 1,202.40 km², que representan el 1.64% de la superficie estatal, colindante en los límites a las Montañas del Norte y de la Llanura Costera del Golfo de Tehuantepec.

Del suelo municipal, un 47.11% es pastizal cultivado, selva un 47.03%, así mismo, un 4.758% se usa para agricultura y 0.28% corresponde a zona urbana (Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Salto de Agua, Chiapas, s. f.).

El suelo de uso agrícola total, un 37.05% se destina a la agricultura mecanizada continua, 12.74% para la agricultura de tracción animal continua, 23.23% para agricultura manual continua, siendo solo una extensión del 26.98% no apta para la agricultura.

Palenque

Ubicado en las coordenadas 17° 33' 53" N y 92° 00' 01" O con 2,945.62 km² de superficie, corresponde al 10% de la superficie de la región y al 4.02% de la superficie estatal (Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Palenque, Chiapas, s. f.), con clima predominantemente cálido húmedo con lluvias todo el año.

El 54.52% de uso de suelo, corresponde a pastizal cultivado, 39.48% a selva, 3.26% a sabana, 1% a tular, 0.58% a zona urbana, 0.28% a pastizal inducido, 0.22% a agricultura y el 0.02% a bosque.

En relación a su potencial uso para cultivo, el 59.28% está destinado a agricultura mecanizada continua, mientras que el 1.18% para la agricultura mecanizada estacional, el 3.54% para la agricultura de tracción animal continua, el 6.41% para la agricultura manual continua, mientras que el 29.59% no es apta para la agricultura (Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Palenque, Chiapas, s. f.).

Población de estudio

Los criterios de inclusión para la población de estudio fueron: responder el cuestionario de características socio-económicas y de exposición a plaguicidas, ser mayores de edad, ser residentes de más de 5 años en los cuatro sitios y que

manifestaran o no tuvieran alguna enfermedad crónica diagnosticada. Los criterios de exclusión fueron quienes no cumplieran con alguno de los anteriores.

Todo el proceso de vinculación, diseño de cuestionarios y toma de muestras fue realizado por la SADEC AC., quienes realizaron visitas a las comunidades seleccionadas para invitar a los habitantes a participar en el estudio, explicando la finalidad del mismo, el cual sería conocer el grado de daño genotóxico que pudieran presentar, a su vez, si había relación con el uso de plaguicidas.

Al ser una participación voluntaria, se les comentó que podían retirarse del estudio en cualquier momento, del mismo modo se les explicó que su participación consistiría en la donación de una muestra de sangre, para lo cual se emplearía material nuevo y estéril, además que este proceso no comprometía su salud al ser de poca invasión, asegurándoles que sus datos serían manejados en forma confidencial y sólo para fines de la presente investigación. Todos aquellos que aceptaron participar, dieron su autorización mediante la firma de la carta de consentimiento informado (Anexo 1). El presente protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (Anexo 3).

El cuestionario (Anexo 2) recabó información adicional sobre cofactores que pudieran afectar los resultados de genotoxicidad, por lo que se incluyeron preguntas relacionadas con su actividad laboral, condición de salud, condiciones de vida, y también se incluyeron preguntas relacionadas con exposición directa a plaguicidas y las medidas de seguridad empleadas para su uso y cuáles utilizaban. Datos que para el posterior análisis fueron de utilidad en la búsqueda bibliográfica de relevancia ambiental y de efectos en salud humana como mutagenicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad, disrupción endócrina, neurotoxicidad y daño respiratorio además de su peligrosidad, de cada uno de ellos.

Colecta de muestra sanguínea

Se obtuvieron 119 muestras, de las cuales 64 correspondían a individuos que no trabajaran directamente con plaguicidas y 55 con exposición directa.

Se extrajeron 3 ml de sangre por punción venosa por personal capacitado, colectados en tubos heparinizados (vacutainer) previamente etiquetados; posteriormente todas las muestras fueron empacadas de acuerdo con las regulaciones para el transporte aéreo de muestras biológicas (UN 3373), en contenedores apropiados, diseñados para conservarlas frescas, para su transporte vía aérea a Palenque y consecutivamente a la Ciudad de México al laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas para su procesamiento. Durante el traslado, las muestras fueron custodiadas por un profesional de la salud.

Ensayo de micronúcleos

Las muestras fueron recibidas de acuerdo con el calendario que se presenta en la tabla 3.

| Fecha | Procedencia | Cantidad |
|--------------------|----------------------|----------|
| 7 de mayo del 2017 | Las Tazas (Ocosingo) | 30 |
| 21 de mayo 2017 | El Corozo | 22 |
| 12 de agosto 2017 | Francisco León | 39 |
| 10 de abril 2018 | Palenque | 28 |

Inmediatamente de haber recibido las muestras, se realizaron los hemocultivos por donante para la evaluación del ensayo de MN con una duración de 72 horas por duplicado. Se recibieron 119 muestras, cinco presentaron hemólisis por lo que solo se procesaron 114, figura 1.

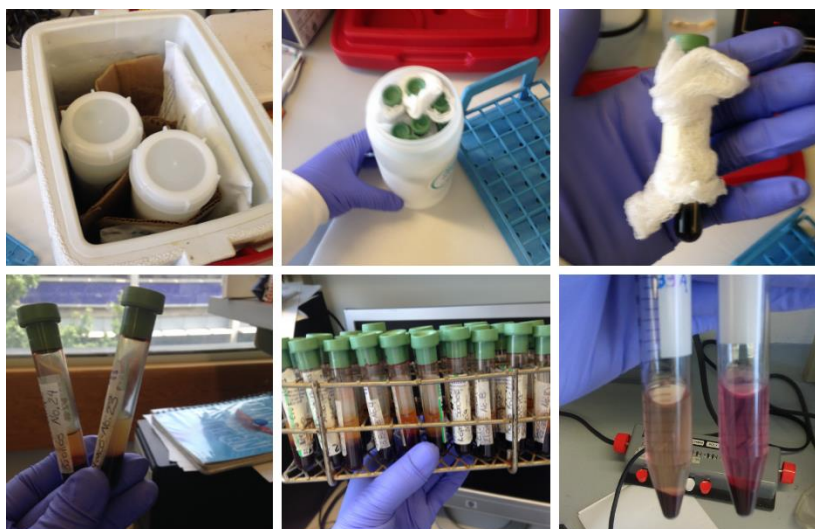


Fig.1 Recibimiento de muestras sanguíneas y cultivo hematológico

Para la evaluación del ensayo de micronúcleos se siguió la metodología de Fenech 2007 que se describe a continuación.

1. Cultivo de muestras: Se realizaron dos cultivos por donador utilizando 500 μ l sangre entera, a los cuales se les añadió medio RPMI más aminoácidos no esenciales y L-glutamina (50 μ l) ambos al 1X para un volumen de 4.3 ml, con 200 μ l de fitohemaglutinina, hasta un volumen final de 5 ml que se colocó en incubación a 37°C.
2. Bloqueo de la citocinesis: 44 horas después de realizar la siembra de linfocitos, se añadió 30 μ g de Citocalasina B de la marca Sigma a cada cultivo para regresar a la incubadora a 37°C.
3. Cosecha: 28 horas después de agregar la citocalasina B y a 72 horas de iniciada la siembra, mediante centrifugación a 1200 rpm por 10 minutos, se

retiró sobrenadante y se añadió la solución de fijación metanol-ácido acético glacial (3:1) hasta un volumen de 10 ml en vórtex, se resuspendieron las muestras y se volvieron a centrifugar para repetir el proceso 5 veces o hasta que el botón de células quedara lo más blanco y sin impurezas posible.

4. Elaboración de laminillas: al menos 24 horas después de fijar los cultivos (los cuales fueron almacenados en refrigeración con 5 ml de solución de fijación) mediante centrifugación de 1200 rpm por 5 minutos se retiró sobrenadante y se resuspendió el paquete celular para colocar 5 gotas de cada muestra sobre el portaobjetos, y realizar la observación al microscopio (después de secarse la laminilla) para confirmar presencia celular.
5. Tinción: de 24 horas a 28 horas después de la elaboración laminillas se realizó la tinción con Giemsa-Wright (marca Sigma) al 5% en una caja de coplin, durante 7 a 10 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar. Transcurrido el tiempo se observaron al microscopio para corroborar la tinción celular, donde se podía identificar citoplasma y núcleos para su posterior almacenaje.
6. Montaje de laminillas: Transcurridos 24 a 48 horas después de la tinción se colocaron en el portaobjetos 4 a 7 gotas de resina sintética (marca Entellan Merck) y después el cubreobjetos para dejar secar 48 horas a temperatura ambiente.
7. Observación: mediante microscopía de campo claro (American optical, one-ten) se obtuvo el índice de nucleación y el conteo de micronúcleos con aumento de 400x y 1000x donde se evaluaron 1000 células binucleadas por cada muestra de los participantes, buscando eventos genotóxicos con el criterio de identificación que a continuación se describe.

Criterio de identificación para eventos genotóxicos.

(Fenech, 2007)

Micronúcleos, MN (A, figura 2):

- El diámetro del MN debe tener una medida entre 1/16 hasta 1/3 del diámetro del núcleo principal. Si el tamaño es mayor se considera un núcleo adicional.
- La intensidad de tinción debe ser similar a la del núcleo principal.
- Podrían tocar el núcleo de la célula de origen, pero no superponerse con él.

Puentes nucleoplasmáticos (B, figura 2):

- Es una estructura continua que contiene ADN que une los núcleos en una célula binucleada.

- El ancho de un PN puede variar considerablemente, pero por lo general no supera 1/4 del diámetro de los núcleos principales.
- Tinción similar a los núcleos.

Gemaciones nucleares (C, figura 2):

- Las GN son similares a los MN, pero existe una unión física estrecha al núcleo.
- Las GN son de tinción similar a los núcleos principales.

Figuras apoptóticas (FA) (D, figura 2):

- Las FA se identifican por la presencia de condensación de cromatina dentro del núcleo.
- Hay una fragmentación nuclear en cuerpos nucleares más pequeños.
- La intensidad de tinción del núcleo, fragmentos suele ser de mayor intensidad que la de las células viables.

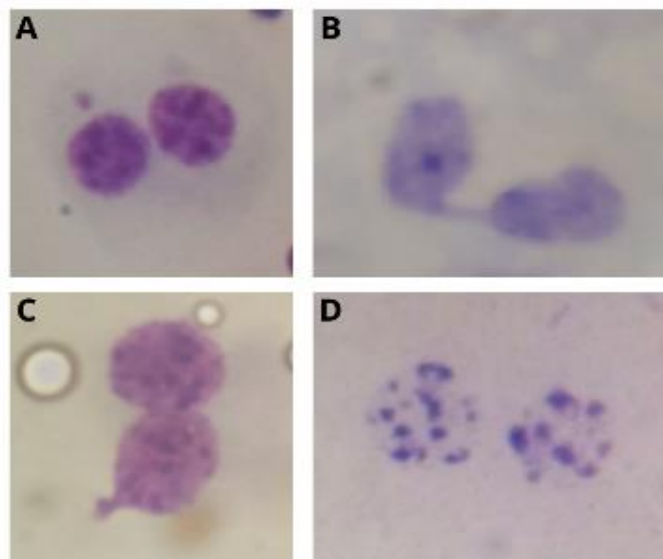


Fig. 2 Diferentes tipos de daño.

Evaluación del daño genotóxico

Para el índice de nucleación se contaron 500 células, diferenciando entre células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y tetranucleadas o polinucleadas. Los resultados se sustituyeron en la siguiente fórmula.

$$IN = \frac{(M1 + (2)(M2) + (3)(M3) + (4)(M4))}{N}$$

Donde, M1 corresponde a número de células mononucleadas, M2 al número de células binucleadas, M3 al número de células trinucleadas, M4 al número de células tetra o multinucleadas y N al número total de células contadas.

Los eventos genotóxicos (MN, GN, PN) fueron evaluados en células binucleadas; así mismo se registró el número de células con más de un evento, es decir, dos MN o MN más GN o PN, y se denominaron daño combinado (COMB). Además de evaluar el número de FA, que constituyen un biomarcador de la toxicidad celular. Se evaluaron 2 laminillas por donante y se contabilizaron 1000 células binucleadas; en el caso de no haberse detectado MN se evaluaron 1000 células más, quedando reportado como frecuencias.

Las frecuencias para cada biomarcador se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$F = \frac{x}{CB} (1000)$$

Donde: X corresponde a número de eventos MN, GN, PN o FA. CB = número de células binucleadas evaluadas.

Peligrosidad en salud y ambiente

Para conocer los efectos en la salud humana, con especial énfasis en mutagenicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad, perturbación endocrina, neurotoxicidad y daño respiratorio, de los plaguicidas reportados por los sujetos de estudio, éstos fueron buscados en las bases de datos de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés), así como del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés).

Además, se investigó si había reporte de daño a las abejas y si los plaguicidas mencionados en la encuesta se encontraban en algún convenio internacional (Estocolmo, Rotterdam, Basilea), que restringieran su uso como calificador de salud ambiental.

Para generar el calificador en salud humana, se tomó en cuenta los efectos adversos que los plaguicidas pueden generar y se le asignó un valor de 1 por cada efecto se haya reportado y 0 si no se conoce ese efecto en el plaguicida, siendo los criterios de puntaje mostrados en la siguiente tabla 4, al final se sumó el puntaje por cada plaguicida que los participantes del estudio manifestaron utilizar.

| Tabla 4. Valores asignados por cada criterio de efecto a la salud humana | | |
|---|---------------------|---|
| Efecto | Calificación | Explicación |
| Mutagenicidad | 0 ó 1 | 0 si no es mutagénico, 1 si lo es |
| Genotoxicidad | 0 ó 1 | 0 si no es genotóxico, 1 si lo es |
| Carcinogenicidad | 0 a 3 | Tabla siguiente |
| Disrupción endócrina | 0 ó 1 | 0 si no es disruptor, 1 si lo es |
| Neurotoxicidad | 0 ó 1 | 0 si no es neurotóxico, 1 si lo es |
| Daño respiratorio | 0 ó 1 | 0 si no causa daño respiratorio, 1 si causa |

Para carcinogenicidad se tomaron en cuenta las clasificaciones de sustancias de la EPA o de la IARC (Tabla 5). Esto debido a las diferentes categorías de carcinogenicidad, que tanto la EPA y la IARC establecen.

| EPA | IARC | Valor asignado |
|------------|-------------|-----------------------|
| A | 1 | 3 |
| B1 | 2A | 2 |
| B2 | 2A | 2 |
| C | 2B | 1 |
| D | 3 | 0 |
| | 4 | 0 |

De manera similar se asignó un valor para realizar un calificador ambiental (Tabla 6). Valor de 1, si se ha reportado como dañino para abejas, sumando por cada convenio internacional que este enlistado, siendo estos los de Estocolmo, Rotterdam, Basilea. Y un valor de 0 si no es dañino para abejas o no se encuentre en algún tratado internacional.

| Efecto | Valor asignado |
|--------------------------------------|---|
| Daña las abejas | 0 si no causa daño, 1 si causa daño |
| Enlistado en convenio internacional* | 0 si no está en algún convenio, 1 por cada convenio en el que estén |

*Estocolmo, Rotterdam, Basilea

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron los softwares GraphPad Prism 6 y Stata12. Las pruebas Shapiro-Wilk y Skewness-Kurtosis fueron empleadas para verificar normalidad en los datos. Al no tener una distribución normal se utilizó estadística no paramétrica.

A partir de los datos obtenidos se buscó el grado de asociación con el daño registrado y variables categóricas que la prueba K-Wallis mencionara fueran significativas. Se utilizaron edad, sitio de estudio, sexo y hábito de fumar, así como el tiempo de uso de plaguicidas según datos de las encuestas, con las frecuencias de MN, GN, PN y DT con el Modelo Lineal Generalizado (MLG) y distribución de error de Poisson y una función logarítmica.

RESULTADOS

Las siguientes imágenes (Figura 3), son ejemplos de MN, GN, PN y FA al microscopio de campo claro 1000x, que se obtuvieron en este trabajo.

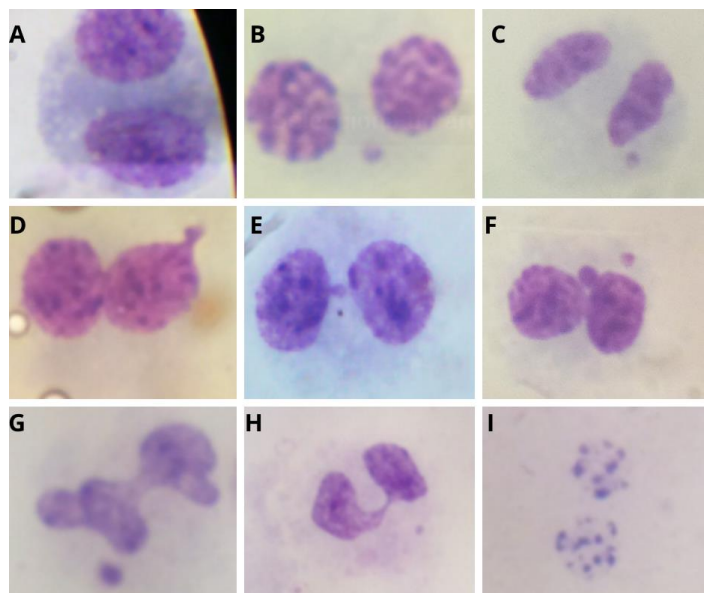


Fig. 3 Observaciones al microscopio

A= Linfocito binucleado sin daño genotóxico

B, C= Linfocito binucleado con Micronúcleo

D, E= Linfocito binucleado con Gemación

F= Linfocito binucleado con dos Micronúcleos

G=Linfocito binucleado con Puente Nucleoplasmático y Micronúcleo

H=Linfocito binucleado con Puente Nucleoplasmático

I=Figura Apoptótica

Genotoxicidad

El análisis estadístico reveló que la proliferación de células o IN, en cultivo fue homogénea entre los sitios de estudio. Por el contrario, la frecuencia de MN es significativamente mayor en la población de Las Tazas y El Corozo que en la de los otros dos sitios de estudio (Kruskal-Wallis, $p=0.0001$). Cuando se suman todos los parámetros de genotoxicidad, los sujetos de Las Tazas presentan un daño es significativamente mayor al de los participantes de Francisco León y Palenque (K-Wallis, $p=0.0001$). En la tabla 7 se muestran los diferentes tipos de daño genotóxico detectados por comunidad de estudio, reportados como media y desviación estándar y gráficamente por evento genotóxico de la figura 4 a la 7.

Tabla 7. Índice de nucleación, frecuencias de eventos genotóxicos registrados, y frecuencia de figuras apoptóticas

| Sitio | N | IN | MN | GN | PN | COMB | Total | FA |
|------------------|-----|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|
| Las Tazas | 28 | 1.47±0.14 | 7.4±2.88 | 2.71±2.07 | 0.52±0.83 | 0.48±0.57 | 11.11±3.78 | 0.54±1.09 |
| El Corozo | 21 | 1.48±0.11 | 6.62±3.77 | 2.12±1.97 | 0.38±0.74 | 0.23±0.54 | 9.35±5.33 | 1.33±1.01 |
| Fco. León | 38 | 1.46±0.07 | 3.61±1.44 | 1.45±1.13 | 1.5±1.79 | 0.42±0.80 | 7.02±2.9 | 0.94±0.89 |
| Palenque | 27 | 1.50±0.08 | 3.96±2.76 | 1.44±1.09 | 1.0±0.96 | 0.37±0.88 | 8.4±4.32 | 0.43±0.63 |
| Total | 114 | 1.47±0.10 | 5.18±3.12 | 1.88±1.64 | 0.93±1.32 | 0.41±0.72 | 8.4±4.32 | 0.79±0.96 |

N= número de muestras. IN= Índice de nucleación. MN= Micronúcleo. GN= Gemación Nuclear. PN=Puente Nucleoplasmático. COMB= Daño combinado. FA= Figura Apoptótica.

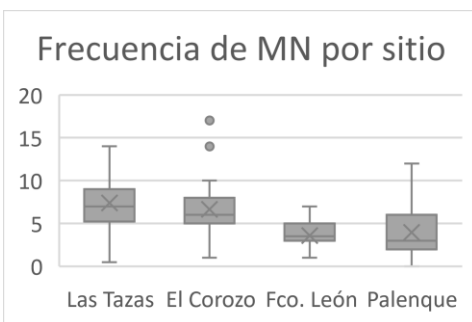


Fig. 4 Frecuencia de Micronúcleos por sitio

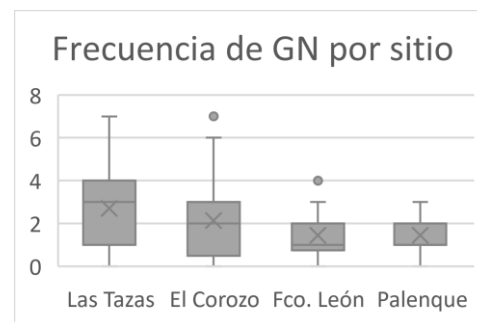


Fig. 5 Frecuencia de Gemaciones nucleares por sitio

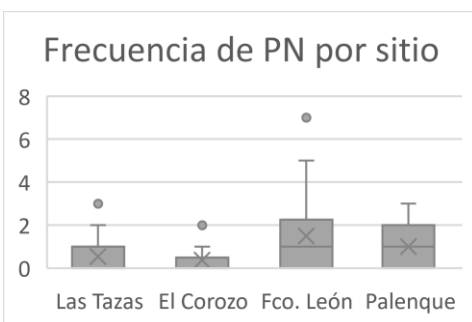


Fig. 6 Frecuencia de Puentes nucleoplasmáticos por sitio

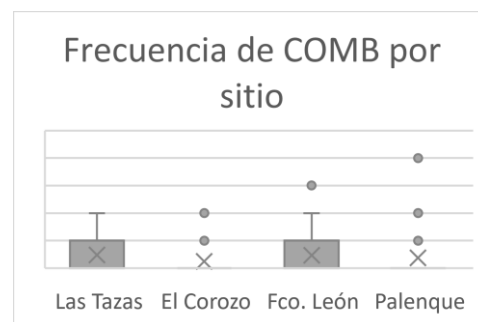


Fig. 7 Frecuencia de Daño Combinado por sitio

En Francisco León se encontró una mayor frecuencia de puentes nucleoplasmáticos (K-Wallis, $p=0.007$) con respecto a los demás sitios. Las muestras de los sujetos de estudio de El Corozo y Francisco León mostraron una frecuencia significativamente mayor de figuras apoptóticas (K-Wallis, $p<0.002$).

Con respecto a los factores que posiblemente contribuyen al daño genotóxico observado, y de acuerdo al análisis estadístico, los puentes nucleoplasmáticos se correlacionan significativamente con la edad, Tabla 8. ($R^2= 0.11$, $p =0.012$), agrupando a todos los sujetos de estudio y a las localidades en una sola población.

| Sitio | Edad (media) |
|----------------|--------------|
| Las Tazas | 37.5±11.7 |
| El Corozo | 44.2±12.7 |
| Francisco León | 52.3±11.7 |
| Palenque | 41.4±11.5 |

También se realizó encontró una correlación entre los micronúcleos y las gemaciones registradas y se encontró significancia entre ellos con un valor de P de < 0.0001 .

Peligrosidad

Los datos de exposición a plaguicidas se obtuvieron de los resultados de los cuestionarios que se aplicaron a los sujetos de estudio. A continuación, se presenta una tabla con la frecuencia de uso de agroquímicos y como consecuencia de exposición.

| Sitio | No usan | Usan | Usaron | Total de participantes |
|----------------|---------|------|--------|------------------------|
| Las Tazas | 53% | 47% | 0% | 30 |
| El Corozo | 41% | 59% | 0% | 22 |
| Francisco León | 24% | 68% | 8% | 38 |
| Palenque | 54% | 21% | 25% | 28 |

Con esta misma encuesta, se catalogó la variedad de plaguicidas que usan o alguna vez usaron los participantes del estudio, solo principio activo. Se contabilizó el número de participantes que han usado o usan las sustancias de la tabla 10, siendo los insecticidas en mayor proporción, después herbicidas y finalmente fungicidas en cuanto a uso.

| Uso | Plaguicida | Las Tazas | El Corozo | Fco. León | Palenque |
|------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| herb | Paraquat | 2 | 12 | 28 | 4 |
| herb | 2,4-D | 0 | 10 | 26 | 0 |
| herb | Glifosato | 1 | 5 | 18 | 8 |
| ins | Coumaphos | 15 | 1 | 1 | 1 |
| ins | Deltamethrin | 15 | 4 | 0 | 3 |
| ins | Amitraz | 12 | 0 | 3 | 0 |
| ins | Parathion-methyl | 0 | 0 | 1 | 0 |
| ins | Cypermethrin | 2 | 5 | 20 | 1 |
| ins | Propoxur | 0 | 0 | 1 | 0 |
| ins | Chlorpyrifos ethyl/permethrin | 8 | 8 | 10 | 6 |
| ins | Methamidophos | 0 | 0 | 6 | 0 |
| ins | Endosulfan | 0 | 0 | 7 | 0 |
| ins | Lindane | 0 | 0 | 3 | 0 |
| ins | Lambda-cyhalothrin | 0 | 0 | 2 | 0 |
| ins | Malathion | 0 | 0 | 1 | 0 |
| ins | Carbofuran | 0 | 0 | 3 | 0 |

| | | | | | |
|------|---------------------|---|---|---|---|
| fung | CuSO4 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| fung | Thiram/Tebuconazole | 0 | 2 | 2 | 0 |

herb= herbicida. ins = insecticida. fung = fungicida.

Con los criterios establecidos en *Peligrosidad en salud y ambiente*. Se obtuvo el puntaje desglosado para cada efecto severo que el plaguicida por individual genera al ser humano siendo el calificador en salud humana el puntaje total de estos efectos. Tabla 11 y figura 8. Para el caso de calificador ambiental se tomó en cuenta el puntaje final por los efectos mencionado en la tabla 10 y desglosado en la Tabla 12 y figura 9.

| Uso | Plaguicida | Mutagénico | Genotóxico | Carcinogénico | Disruptor Endócrino | Neurotóxico | Daño respiratorio | Calificador |
|------|-----------------------------|------------|------------|---------------|---------------------|-------------|-------------------|-------------|
| ins | Lindano | 0 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 5 |
| ins | Malatión | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 5 |
| ins | Metil-paratión | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 5 |
| ins | Endosulfán | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 4 |
| ins | Permetrina | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 4 |
| herb | Paraquat | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| herb | 2,4-D | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| herb | Glifosato | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| ins | Deltametrina | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 |
| ins | Metamidofos | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 |
| ins | Amitraz | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| ins | Carbofurano | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 |
| ins | Clorpirifos etil/permetrina | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| ins | Cipermetrina | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| ins | Lambda-cihalotrina | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 |
| fung | Tiram/Tebuconazol | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| ins | Propoxur | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| ins | Cumafos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| fung | CuSO4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

herb= herbicida. ins = insecticida. fung = fungicida

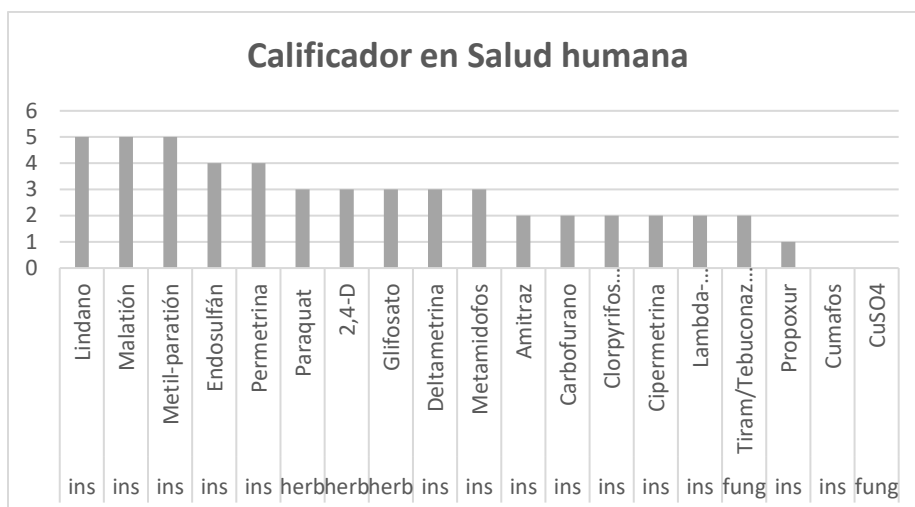


Fig. 8 Gráfica comparativa de la calificación de salud

En la figura 8 se grafica el puntaje en Salud humana por cada principio activo que los participantes manifestaron utilizar, entre mayor sea el número, el plaguicida tendrá un mayor peligro para la salud humana siendo *lindano*, *malatión* y *metil-paratión* los más peligrosos y de manera opuesta, el *CuSO4* y *cumafos* los menos.

Tabla 12. Puntaje desglosado y final, calificador ambiental

| Uso | Plaguicida | Daño Abejas | Convenios | Calificador Ambiental |
|------|-----------------------------|-------------|-----------|-----------------------|
| ins | Lindano | 1 | 2 | 3 |
| ins | Carbofurano | 1 | 1 | 2 |
| ins | Metamidofos | 1 | 1 | 2 |
| ins | Clorpirifos etil/permetrina | 1 | 0 | 1 |
| ins | Cipermetrina | 1 | 0 | 1 |
| ins | Deltametrina | 1 | 0 | 1 |
| ins | Lambda-cihalotrina | 1 | 0 | 1 |
| ins | Malatión | 1 | 0 | 1 |
| ins | Metil-paratión | 0 | 1 | 1 |
| ins | Permetrina | 1 | 0 | 1 |
| ins | Propoxur | 1 | 0 | 1 |
| fung | Tiram/Tebuconazol | 0 | 1 | 1 |
| herb | Paraquat | 0 | 0 | 0 |
| herb | 2,4-D | 0 | 0 | 0 |
| herb | Glifosato | 0 | 0 | 0 |
| ins | Amitraz | 0 | 0 | 0 |
| ins | Cumafos | 0 | 0 | 0 |
| ins | Endosulfán | 0 | 0 | 0 |
| fung | CuSO4 | 0 | 0 | 0 |

herb= herbicida. ins = insecticida. fung = fungicida

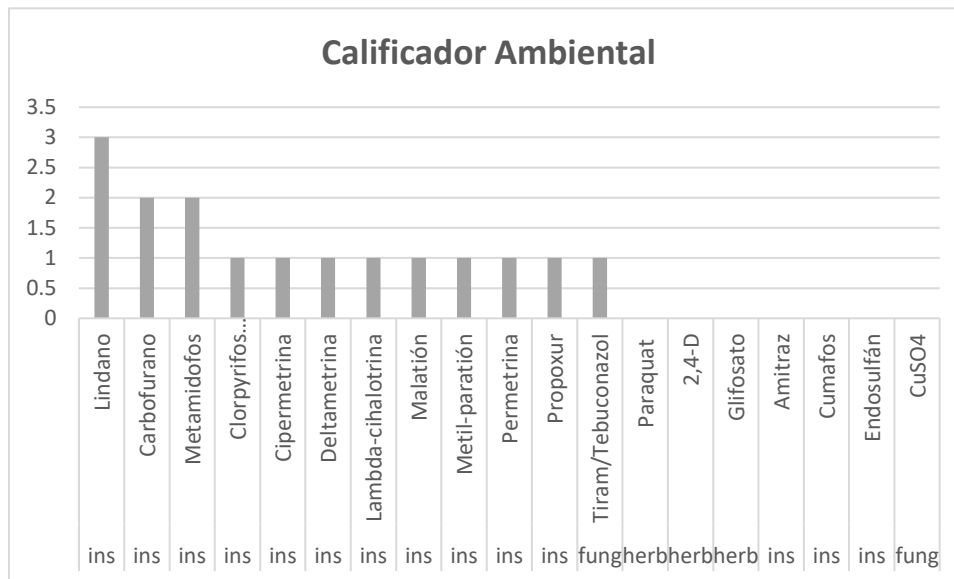


Fig. 9 Gráfica comparativa de la calificación ambiental

En la figura 9 se grafica el Calificador ambiental, utilizando el mismo principio que el calificador en salud humana. El plaguicida de mayor peligro ambiental, que los sujetos de estudio usan fue, *lindano* posteriormente *carbofunaro* y *metamidofos*. Mientras lo de menor peligro ambiental fueron *paraquat*, *2-4D*, *glifosato*, *Amitraz*, *cumafos*, *endosulfán* y *CuSO4*.

Contribución de los plaguicidas a la genotoxicidad

Con el fin de analizar la contribución de los plaguicidas al daño genotóxico observado, y sin tener datos sobre los niveles de exposición a ellos se registraron los tipos y marcas de agroquímicos que cada integrante del estudio expresó que emplean mediante la aplicación de una encuesta *ex profeso* para ello. A cada plaguicida se le asignó una puntuación del calificador de salud, como se menciona en la metodología. Se realizó una sumatoria del calificador de salud de cada principio activo, independientemente de la marca comercial, de los plaguicidas utilizados por cada participante en cada sitio (Tabla 13).

Tabla 13. Sumatoria calificador en salud humana por individuo

| Las Tazas | El Corozo | Fco. León | Palenque |
|-----------|-----------|-----------|----------|
| 2 | 8 | 11 | 0 |
| 0 | 9 | 0 | 3 |
| 8 | 0 | 8 | 0 |
| 3 | ND | 17 | 9 |
| 3 | 0 | 18 | 9 |
| 9 | 3 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 6 |
| ND | 14 | 20 | 0 |
| 2 | 6 | 9 | 0 |
| 5 | 15 | 15 | 0 |
| 8 | 5 | 8 | 15 |
| 13 | 8 | 13 | 15 |
| 9 | 8 | 13 | 0 |
| 3 | 17 | ND | 15 |
| 3 | 10 | 16 | ND |
| 9 | 10 | 0 | 0 |
| 3 | 10 | 11 | 0 |
| 0 | 12 | 0 | 0 |
| 3 | 5 | 8 | 3 |
| 8 | 9 | 33 | 2 |
| 5 | 0 | 13 | 0 |
| 0 | | 11 | 0 |
| 3 | | 14 | 0 |
| 6 | | 12 | 0 |
| 11 | | 14 | 0 |
| 2 | | ND | ND |
| 2 | | 9 | 3 |
| 8 | | 15 | 5 |
| 2 | | 10 | |
| 2 | | 10 | |
| | | 8 | |
| | | 13 | |
| | | 10 | |
| | | 24 | |
| | | 11 | |
| | | 0 | |
| | | 10 | |
| | | 18 | |
| | | 11 | |

ND= sin datos

En la siguiente tabla, se colocó el total de agentes activos utilizados y la sumatoria del calificador de salud que se obtuvo en cada sitio. Esto debido a que cada participante que manifestó emplear plaguicidas contribuye al impacto de estos en cada sitio.

| Sitio | Total de agentes activos utilizados en cada sitio | Σ Calificador de Salud por sitio | Promedio ajustado de uso de Plaguicidas por persona en cada sitio |
|-----------|---|---|---|
| Fco. León | 176 | 530 | 4.5 |
| El Corozo | 66 | 194 | 3 |
| Las Tazas | 62 | 141 | 2 |
| Palenque | 27 | 94 | 1 |

Con el puntaje del Calificador en Salud humana para cada participante (tabla 13) y utilizando el MLG se analizó la correlación con el daño genotóxico encontrado. Se obtuvo así los siguientes valores de asociación p que se muestran en la Tabla 15.

| Tipo de daño genotóxico | Valor de p |
|---------------------------|--------------|
| Micronúcleos | 0.01 |
| Gemaciones nucleares | 0.046 |
| Puentes nucleoplasmáticos | 0.033 |
| Daño total | 0.017 |

Estos niveles de significancia muestran la relación con cada evento genotóxico y los plaguicidas utilizados por los participantes del estudio.

DISCUSIÓN

Con respecto a lo evaluado en el sistema de MN.

La correlación entre MN y GN, fue de importancia ya que la relación entre estos parámetros ha sido reportada en estudios previos del laboratorio, con lo cual se concuerda que ambos eventos genotóxicos pueden ser causados por los mismos agentes que dañen el material genético en este caso plaguicidas (Serrano-García & Montero-Montoya, 2001).

Las Tazas, presentó los registros más elevados de eventos genotóxicos en el sistema de MN, los cuales fueron MN, GN y COMB, mientras que El Corozo las FA y el segundo sitio con mayor índice de MN y GN, sin embargo también presentó los valores más bajos en PN y COMB.

En el caso de Francisco León, los participantes presentaron los valores más elevados en PN, el segundo en COMB y FA, mientras que la frecuencia de MN resultó la más baja, y finalmente, Palenque, no obtuvo algún registro con la mayor frecuencia de evento genotóxico pero solamente en los casos de GN y FA presentó

los datos más bajos de los cuatro sitios. Estas variaciones nos indican que efectivamente existe daño genotóxico y que los plaguicidas son una fuente de esta afectación al material genético.

En el caso del IN, no hubo diferencias significativas en cuanto a resultados para los cuatro sitios siendo homogéneo lo obtenido. Este parámetro evalúa la actividad mitótica de las células, que al estar en un medio rico de nutrientes, como la fitohemaglutinina, se estimula al cultivo para que entre en división celular. Gracias a la ecuación se pueden obtener valores de 1 hasta >2 , reflejando el tipo de células resultantes de los cultivos ya que, valores cercanos a 1 presentan mayor cantidad de células mononucleadas, mientras que valores cercanos a 2, indicarán células que completaron la mitosis por lo tanto son binucleadas (Fenech, 2007). En este caso la actividad mitótica también puede reflejar un daño genético ya que por factores genotóxicos, la división celular se vería comprometida.

La proliferación celular es necesaria para la formación de MN por lo cual si existiera un IN bajo sería difícil observar los eventos como MN (Belmont-Díaz, 2014).

En los sitios de estudio (MN en Tabla 7), con un IN promedio de 1.47 ± 0.10 se observa una división celular media, y fue posible identificar todos los tipos de daño que se evalúan en este sistema, aunque los MN fueron el daño más frecuente en Las Tazas, El Corozo, Palenque y Francisco León en ese orden

Gracias al daño amplio y variado de genotoxicidad en las muestras y al tamaño de estas, se tomó en cuenta a los datos generados por el ensayo de MN como una sola muestra para el MLG y este arrojó que las variables, edad y sitios de estudio existe asociación significativa con el daño genotóxico encontrado.

Con un nivel de significancia <0.05 , el DT, se relacionó con los sitios de estudio, lo que implica que hay un impacto directo en la estabilidad genética dependiendo de la ubicación geográfica de la comunidad y del tiempo de exposición a agrotóxicos. Esto puede corroborarse con las encuestas, donde se registró que hay un amplio uso de plaguicidas en todas las comunidades, siendo Francisco León el de mayor variedad de principios activos con 17 plaguicidas, después El Corozo con 8 variedades, Las Tazas con 7 y finalmente Palenque con 6 plaguicidas, por lo cual se infiere que la mayoría de las personas pueden estar expuestas a una gran variedad de plaguicidas, esto sin conocer las cantidades que son utilizadas, el tiempo de empleo y si la técnica de desecho de material agroquímico es el correcto, por ende a la dosis que pueden estar expuestos.

La contribución de los plaguicidas al daño encontrado se puede observar con los valores hallados de p significativos de la Tabla 15, ya que se muestra correlación con cada frecuencia de eventos genotóxicos (MN, GN, PN, DT) con el Calificador en Salud, que estima el peligro de cada agroquímico para el humano, lo cual podrían inferir que el uso de los plaguicidas constituye uno de los factores que contribuyen a la inestabilidad genética observada.

Aunque numerosos participantes mencionaron que NO utilizan plaguicidas, muchos de ellos mostraron daños similares a los que declararon que sí los emplean. Con la información de los plaguicidas que usan y ajustando el promedio de estos, prácticamente cada persona en Francisco León es impactada por al menos 4 agroquímicos, en El Corozo 3, en Las Tazas 2 y Palenque al menos un agrotóxico por persona, esto sin estimar las marcas comerciales, las cuales pueden tener mismos agentes activos (Tabla 14). Además estas mezclas tóxicas no solo estarían afectando la integridad genética de los participantes, sino también el ambiente por la liberación y movilización de estos.

La exposición en todos los sitios probablemente es indirecta, ya que se encontraron efectos genotóxicos por plaguicidas en los participantes que no utilizan dichas sustancias. De acuerdo a Lozano-Kasten y colaboradores, en un estudio realizado en una comunidad agrícola cercana al lago de Chapala en Jalisco, se reportó la presencia de *glifosato* en muestras de orina tanto de personas que trabajaban en los campos, como en niños que no lo hacían (Lozano-Kasten y col., 2021), esto debido a que restos de estos agroquímicos pueden ser transportados a través de la ropa de trabajo o en la misma piel de los agricultores hacia otras personas con las cuales viven, con lo cual los plaguicidas no se mantienen solamente en el lugar de aplicación, situación que podría verse replicada en los sitios de estudio de este proyecto, además gracias a la volatilización de los plaguicidas, pueden ser distribuidos por el viento hasta los hogares, lo que ocasiona una exposición no ocupacional de los miembros de la familia o de la comunidad, tanto por actividades agrícolas como sanitarias, por lo que también están en riesgo de presentar daños a su salud tal como los reportados en los jornaleros agrícolas, Para corroborar lo anterior se propone realizar un estudio posterior donde se cuantifique plaguicidas en diferentes muestras.

Los efectos en la inestabilidad genética asociada a micronúcleos por agentes como los plaguicidas, no solamente se puede observar en patologías malignas como lo es el cáncer. Se han encontrado evidencias de correlación entre cuerpos de agua contaminada con plaguicidas y presencia de diabetes e hipertensión (Lozano-Kasten y col., 2021), que aunque no son enfermedades catastróficas sí presentan una relevancia y necesidad de atención médica ya que pueden agravarse, además de que los costos que involucra tratar enfermedades, no solo para la familia sino para el estado, pueden ser muy elevados, generándose una problemática socioambiental.

Otro caso es la asociación entre el uso de glifosato, con déficit de atención e hiperactividad en niños de padres usuarios del herbicida, además de disrupción endócrina debido a niveles elevados de estrés oxidante los cuales también se han asociado a problemas inmunológicos, por lo que estas poblaciones estarían más propensas a padecer enfermedades no transmisibles, gracias a la exposición de plaguicidas. No quiere decir, sin embargo, que el daño genotóxico encontrado se

debe exclusivamente al uso de agroquímicos, pero sí aparecen como un importante factor de riesgo.

En cuanto la correlación entre la edad y los PN ($p= 0.002$). Una posible explicación a este resultado, es que la longitud de los telómeros se considera un marcador de envejecimiento, pues estos se van acortando conforme las células acumulan divisiones y avanza la edad del individuo, aunado a lo anterior, los telómeros más cortos están relacionados con una esperanza de vida menor y un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, cirrosis hepática, hipertensión, aterosclerosis, diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, (Marti y col., 2017) las cuales pueden aparecer de manera acelerada por factores ambientales, que tengan un impacto negativo en las poblaciones, como lo es la exposición a plaguicidas.

Dado a que los PN pueden ser favorecidos por el acortamiento de los telómeros y que estos se incrementan con la edad, se puede esperar un mayor número de eventos PN con edades más avanzadas en los participantes de este estudio, siendo Francisco León con el promedio de edad más avanzado (52.3 ± 11.7 años) quien efectivamente tuvo el mayor índice de PN, gracias a esta correlación edad-daño genotóxico, presumiblemente se consideraría como un referente para estimar el tiempo de exposición.

De acuerdo a cada sitio, el puntaje en el Calificador en Salud humana, Francisco León acumula el mayor peligro con 44 puntos, le sigue El corozo con 18, Las Tazas con 15 puntos, sitio donde MN, GN y COMB presentaron las frecuencias más altas de los demás lugares y finalmente Palenque con 10 puntos.

Con lo anterior se hubiera esperado un mayor registro en las frecuencias de genotoxicidad en Francisco León, sin embargo Las Tazas fue el sitio con las frecuencias más elevadas.

A pesar del peligro estimado en cuanto a Salud humana, no se obtuvieron resultados de mayor peligro con mayor daño en cada evento genotóxico, con lo cual una hipótesis del trabajo no se cumplió. Esto puede deberse a dos posibles razones: la primera, que la dosis administradas es variada, por lo que algunos plaguicidas pudieran hacer mayor efecto que otros. La segunda, es que los niveles "permisibles" de cada plaguicidas pueden estar en rangos aceptables de uso, pero en mezcla los efectos son variados y hasta acumulativos, sin embargo se observó que este biomarcador funciona para estimar daño a pesar de que los participantes utilicen mezclas de plaguicidas o no estén en contacto directo con ellos. Cabe mencionar que los participantes usan mezclas variadas de estos plaguicidas, además que las marcas comerciales a pesar de ser diferentes, tienen el mismo principio activo. Así, existe la posibilidad de que algunos agricultores puedan usar solo un agente activo pero en mayores cantidades debido al empleo de diferentes marcas.

Salud ambiental

Gracias a los datos obtenidos por las encuestas, se pudo hacer un estimado ambiental, siendo el calificador de salud ambiental, donde Francisco León presentó el mayor peligro ambiental por uso diverso de plaguicidas, con un puntaje de 14 posteriormente, Palenque con 5, a pesar de presentar los valores de genotoxicidad más bajos, siguiendo con El corozo con 4 y Las Tazas 3 puntos ambientales.

Al igual que en el ensayo de MN estas sustancia pueden tener efectos adversos indirectos en el ambiente ya que cuando los plaguicidas son aplicados, por ejemplo en los campos de cultivo éstos tienen el potencial de migrar, puede ser a distancias cortas o largas, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas como su coeficiente de partición octanol: agua (entre más lipofílicos, mayores serán las distancias de movilidad) (Suratman y col., 2015) y mediante procesos físicos que incluyen adsorción, lixiviación, volatilización, deriva de la pulverización y escorrentía, además de que por acción de la microbiota del suelo o por efecto de la luz UV, pueden degradarse y/o producir metabolitos, que inclusive podrían ser más tóxicos, ocasionando por ende una afectación adicional a los ecosistemas, al impactar en prácticamente todas las matrices ambientales (Tudi y col., 2021). Además la formulación en mezcla de los plaguicidas puede aumentar y/o diversificar los efectos ambientales que tienen estos agrotóxicos.

De los plaguicidas que los participantes emplean, 12 de estos, obtuvieron algún puntaje en el calificador ambiental, un ejemplo de esto es el *clorpirifos* de puntuación 1, cuyo metabolito el *3,5,6-tricloro-2-piridinol*, es más tóxico que el compuesto padre y se le ha detectado en suelo, sedimento y aguas subterráneas, poniendo en riesgo a los organismos que habitan estos ecosistemas (Tudi y col., 2021). Esto cobra relevancia ya que a pesar de no llegar a la calificación de peligrosidad más alta, su metabolito posee efectos considerables como lo es perturbador endócrino, con posible riesgo hacia los humanos.

La relevancia de utilizar daño a las abejas como un factor del calificador ambiental, es que estos organismos son de los mayores polinizadores de muchas plantas silvestres y monocultivos, siendo claves para la producción agrícola y el ciclo vital de tales especies (Martin-Culma, 2018) así mismo, porque poseen una dosis letal media de 2 microgramos por abeja. Con lo cual se infiere que con pequeñas cantidades dispersas se puede generar mortalidad en decenas o miles de abejas.

La situación de estos himenópteros en las últimas seis décadas se ha agravado considerablemente, un ejemplo es Estados Unidos, el número de colonias se ha reducido en un 45%, de tal modo que se estimó un descenso de 42 millones a 24 millones (Johnson y col., 2010). La disminución poblacional por efectos tóxicos de los plaguicidas representa un efecto notable sobre la producción de alimentos y la biodiversidad en general, ya que al no ayudar al ciclo vital de los organismos primarios las redes tróficas tendrán un desequilibrio, provocando la muerte masiva y sucesiva de otras especies; este daño colateral ha podido observarse en los

residuos de plaguicidas en las diversas mieles que producen y que pueden ser consumidas por humanos (Martin-Culma, 2018).

Las principales afectaciones para estos artrópodos, son:

- Alteraciones fisiológicas: como malformación embrionaria, la aparición de mutaciones, dificultad para eclosionar de los huevos, pérdida de peso, mala navegación, baja respuesta inmune.
- Alteraciones conductuales: cambios en su comportamiento, dificultades en la localización del alimento, comunicación, orientación y regreso al lugar que habitan.

Siendo estas afectaciones unos de los motivos en la disminución poblacional de estas especies. Por lo cual el uso de plaguicidas no solo es perjudicial a nivel genético, sino también ecosistémico.

Los insecticidas, reportados en las encuestas, más perjudiciales para estos organismos son *Cipermetrina Lindano, Carbofurano Deltametrina, Metil-paratión, Permetrina y Metamidofos*, gracias a su uso agrícola principalmente. Sin embargo los de mayor preocupación en la región serían *Clorpirifos etil-permetrina* ampliamente utilizado en los cuatro sitios igual que *Lambda-cihalotrina, Malatión y Propoxur*, estos últimos utilizados principalmente en Francisco León, ya que están aceptados por el CENAPRECE para su uso sanitario contra insectos vectores que aunado a su uso agrario pueden generar un impacto negativo en la zona.

CONCLUSIONES

En los cuatro sitios de estudio se encontró una elevada frecuencia de daño genotóxico, asociado con los tipos de plaguicidas utilizados. Siendo Las Tazas sitio con los valores más altos de genotoxicidad en MN, GN y COMB.

El tipo de daño encontrado (PN, GN o MN) fue diferente entre los cuatro sitios.

El extenso uso que se hace de los plaguicidas, causa una presencia ubicua, ya que participantes que declararon no usar plaguicidas aun así presentan daño genotóxico importante.

Debido a la amplia variedad de sustancias reportadas, resulta difícil asociar un solo compuesto al daño hallado, ya que la variedad de marcas utiliza coadyuvantes distintos, se desconoce la dosis a la que están expuestos, y hay variaciones en las medidas de seguridad que puedan tener o no los agricultores.

Los agroquímicos utilizados en todos los sitios de estudio fueron *paraquat*, *glifosato*, *cumafos*, *cipermetrina*, *clorpirifos*.

A excepción de *CuSO₄*, todos los plaguicidas registrados en las encuestas se mencionan en la lista PAN, con lo cual el daño encontrado cobra mayor relevancia.

El insecticida *lindano* presentó el mayor peligro tanto en salud humana como ambiental obteniendo el mayor puntaje en ambos calificadores: esto es de naturaleza preocupante, no solo por la toxicidad alta del compuesto, sino porque este agente ha sido prohibido desde hace más de 10 años.

Por su parte y después de *lindano*, los insecticidas *carbofurano* y *metamidofos* presentaron los siguientes puntajes elevados en afectación ambiental, mientras que *malatión*, *paratión*, *endosulfán* y *permetrina*, en cuanto a afectación humana.

Aunque hubo más variedad en principio activo entre los insecticidas, las marcas comerciales de herbicidas fueron más variadas.

En Las Tazas el mayor porcentaje de uso en la localidad de plaguicidas fue de tipo insecticidas al igual que en Palenque, mientras en El corozo y Francisco León, usan más los herbicidas.

Los plaguicidas *cumafos* y *CuSO₄* fueron los de menor peligro para ambos calificadores.

Los calificadores manejan el peligro potencial de los plaguicidas en forma individual, y aunque no reflejen directamente el daño encontrado si es una guía de prevención contra el uso de plaguicidas que puede alertar sobre sus efectos además que en mezclas y aún con poca diversidad de plaguicidas se pueden obtener daños genotóxicos importantes.

LIMITANTES

1. Al igual que la variable edad, un IMC elevado puede estar relacionado con reducción telomérica debido al estado inflamatorio crónico por sobre peso (Navarro-Ibarra y col. 2019), lo cual podría verse expresado en un incremento de PN. Esta variable no fue cuantificada en el estudio, por lo que se sugiere registrar el peso y calidad nutricional en futuros estudios.
2. Nivel de consanguinidad entre los participantes, otra variable que debería considerarse, ya que ésta aumenta el riesgo de expresión de condiciones autosómicas recesivas las cuales pueden causar MN (Shubber y col., 2010). Esta hipótesis surge ya que gracias a las encuestas se obtuvieron los nombres completos de los participantes, y varios presentan el mismo apellido.
3. Buscar y registrar otros agentes genotóxicos que puedan influir en la estabilidad genética de los sitios y reportar el impacto que pueda llegar a tener el asperjado en la zona (marca, agente activo, dosis y tiempo de exposición).

PERSPECTIVAS

1. El presente estudio genera un precedente de daño temprano, por lo que sería de suma importancia, implementar un programa de seguimiento que permita identificar y por ende intervenir en el caso de que alguno de los participantes del estudio desarrollase patologías relacionadas con inestabilidad genética.
2. Continuar con investigaciones mayormente enfocadas en el uso de agroquímicos.
3. Que se genere una vigilancia ambiental y de salud humana en las zonas de estudio, además de alertar sobre los plaguicidas y sus efectos sobre todo aquellos que están prohibidos su distribución.

ANEXOS

Anexo 1



Núm. Encuesta_____

TITULO DEL PROYECTO:

ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE EFECTO EN TRABAJADORES AGRÍCOLAS DE FRANCISCO J. GRAJALES

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

FECHA: día____mes____año_____

El que suscribe, he sido informado(a) de que El Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, está realizando un estudio de investigación en esta zona, el cual me ha sido explicado. Se me ha asegurado que la información que yo proporcione será confidencial, por lo que autorizo que se me entreviste y de la misma manera acepto donar una muestra de 3 ml de sangre venosa, la cual será tomada con material nuevo, estéril y por un profesional especializado, para el estudio.

Me han informado también que compartirán los resultados del estudio con todos los donadores, una vez que los hayan analizado.

He leído cuidadosamente este documento por lo que consiento en participar. Si en el futuro tuviéramos alguna duda, el personal de la investigación está en la mejor disposición para aclararla.

Nombre y Firma del trabajador

Nombre y firma del investigador responsable

Anexo 2

Cuestionario sobre uso de pesticidas / Personas afectadas

DATOS PERSONALES

NOMBRE

COMPLETO: _____

DIRECCIÓN

(comunidad) _____

FECHA DE NACIMIENTO: _____

SABE LEER SI _____ NO _____

HABLA ALGUNA LENGUA _____ CUAL _____

HOMBRE: _____ MUJER: _____

PREGUNTAS DE LA ENCUESTA

A) Actividad de trabajo

1. ¿A qué se dedica? _____

2. ¿En qué consiste su trabajo? _____

—

3. ¿Qué cultivos trabaja? _____

4. ¿De qué tamaño es la superficie de cultivo? _____

5. ¿Utiliza algún producto agroquímico? _____
6. ¿Cuál(es)? _____

B) Condición de salud

7. ¿Cree tener o tiene alguna enfermedad o lesión? _____
8. Explica qué lesiones/heridas/enfermedades _____

9. ¿Desde cuándo? _____

10. ¿Tiene algún síntoma o malestar actualmente? _____
11. ¿Desde cuándo? _____

12. ¿Ha sufrido alguna intoxicación? _____

13. ¿Cuál fue la causa? _____

14. ¿Ha tenido algún problema para embarazarse o tener hijos? _____
15. ¿Han tenido ud o su pareja algún problema de salud durante un embarazo?
Especificar, cuando ocurrió, recibió tratamiento?, cuando y cuál fue?

16. ¿Ha tenido un hijo con algún problema de salud al nacer? Especificar.

17. ¿Tienes hijos con problemas para aprender alguna tarea, hablar o caminar?

Especificar. _____

18. ¿Le han diagnosticado algún tipo de cáncer a usted o a algún familiar?

Especificar _____

19. ¿Ha solicitado y recibido atención médica?

a) ¿Fue comprendida la enfermedad?

b) ¿Tiene receta, certificado o nota médica de lo sucedido?

C) Condiciones de vida

20. ¿Cómo es su vivienda?

Describir _____

21. ¿Qué usa para cocinar? (Leña, gas, carbón) _____

22. ¿Fuma? (cantidad y frecuencia) _____

23. ¿Toma? (bebidas embriagantes, cantidad y frecuencia) _____

24. ¿Consume alguna droga? _____

D) Exposición Directa

25. ¿Ha usado

agroquímicos? _____

26. ¿Desde

cuándo? _____

27. ¿Qué agroquímicos ha utilizado?

28. ¿Dónde lo consigue (compra/Programa social)? *nombre del AGQ - fabricante*. Buscar envases o envolturas, notas o recibos de compra.

29. ¿En qué momento del proceso de cultivo los
usa? _____

30. ¿En qué meses?

**a) ¿Cuándo fue la última
vez?** _____

31. ¿Cómo lo
prepara? _____

32. ¿Cómo lo
aplica? _____

E) Medidas de seguridad

33. ¿Qué medidas de seguridad tiene cuando usa agroquímicos?

- a) Usa mascarilla _____
- b) Usa Lentes de protección _____
- c) Usa sombrero o gorra _____
- d) Usa guantes _____
- e) Usa ropa protectora _____
- f) Lava ropa y equipo? _____
- g) Cada cuándo? _____
- h) Quién Lo hace? _____
- i) Dónde _____
- j) Se Baña después de usar AGQ _____
- k) Dónde _____

34.Cuál es la forma en que lo usa?

- a) A qué hora del día? _____
- b) Por cuánto tiempo? _____
- c) Cantidad? _____
- d) Cuidados durante aplicación? (viento a favor, no fumar, no comer)

F) Etiquetas/Advertencias/Capacitaciones

35. Hay advertencia u hoja con información en los envases o bolsas de los agroquímicos que maneja? *Traer envase o tomar foto*

36. ¿Puede leerlas? (en caso de ser negativa respuesta especificar por qué) _____

37. ¿Ha recibido sobre el uso de Agroquímicos y sobre el cuidado personal?

a) capacitación y/o entrenamiento ¿quién lo hizo? ¿cuándo?

b) documento, Instructivo o folleto (solicitar copia)

38. ¿La capacitación le sirvió en algo?

Describir _____

G) Contactos de la compañía

39. ¿Ha venido a su comunidad personal de la compañía fabricante de AGQ?

a) ¿Quién? _____

b) ¿Cuándo? _____

c) ¿Para qué? (capacitación, chequeo médico, inspeccionar el lugar)

H) Exposición Indirecta

40. ¿Se fumiga con agroquímicos cerca de su casa, lugar de trabajo o donde
obtiene el agua que
consume? _____

41. ¿Sabe cuáles son esos agroquímicos?

Nombre
entrevistador(a) _____

Fecha. _____

Anexo 3



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Comité de Ética en Investigación con Seres Humanos

A QUIEN CORRESPONDA:

Después de haber revisado el proyecto de investigación "**Prevención de daños a la salud causados por pesticidas en indígenas**" que presenta la **Dra. Regina Montero Montoya** investigadora de este Instituto, nos permitimos emitir un dictamen aprobatorio. Lo anterior se basa en que la Investigación propuesta no entraña riesgo para la integridad física y psicológica de los participantes, ya que solo se tomarán muestras de sangre periférica para determinar linfocitos. Por otra parte se adjunta una carta de consentimiento informado y se consideran medidas apropiadas para salvaguardar la identidad de los participantes.

Atentamente.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. a 31 de agosto del 2017.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Raúl Mancilla Jiménez'.

Dr. Raúl Mancilla Jiménez
Coordinador de la Comisión de Bioética

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arellano, M., Camarena, O., Von-Glascoe, C., Ruiz, B., Zuñiga, E., & Monraño, T. (2012) Daño genotóxico en mujeres y hombres expuestos en cuatro localidades de Baja California. En: Instituto Nacional de Ecología. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naryrales (SEMARNAT). Género, Ambiente y Contaminación por Sustancias Químicas. México; p. 95-113.
2. Bejarano-González, F. (2017). Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México. (RAPAM, Ed.) (1st ed.). México. <https://doi.org/10.1097/NNA.0b013e31828958cd>
3. Belmont-Díaz, J., López-Gordillo, A., Molina Garduño, E., Serrano-García, L., Coballase-Urrutia, E., Cárdenas-Rodríguez, N., Arellano-Aguilar, O., & Montero-Montoya, R. (2014). Micronuclei in bone marrow and liver in relation to hepatic metabolism and antioxidant response due to coexposure to chloroform, dichloromethane, and toluene in the rat model. *BioMed research international*, 2014, 425070. <https://doi.org/10.1155/2014/425070>
4. Bernardino-Hernández, H., Mariaca-Méndez, R., Nazar, A., Álvarez-Solís, J., Torres-Dosal, A., & Herrera-Portugal, C. (2014). Los plaguicidas en los Altos de Chiapas: soluciones que matan (Ed.), El colegio de la frontera sur.
5. Buzo-Sánchez, I. (s. f.). La rotación de los cultivos. La rotación de los cultivos. Recuperado 18 de agosto de 2021, de http://contenidos.educarex.es/sama/2010/csociales_geografia_historia/segundoeso/tema4/rotacion.html
6. CENAPRECE (2016). Monitoreo de resistencia a insecticidas (adulcidades) utilizados en el programa de enfermedades transmitidas por vectores en México. Recuperado 19 de agosto de 2020, de <https://www.gob.mx/salud/cenaprece/acciones-y-programas/direccion-del-programa-de-enfermedades-transmitidas-por-vectores>
7. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. (s. f.) Chiapas-Ocosingo. Recuperado 1 de septiembre de 2021, de <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM07chiapas/municipios/07059a.html>
8. Escobar-Castillejos, D., Caballero-Roque, A., & Rendón-Von Osten, J. (2011). Prácticas de utilización para plaguicidas en la localidad Nueva Libertad, La Concordia, Chiapas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(spe1), 19-30.
9. Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 2(5), 1084–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
10. Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A., Surralles, J., Crott, J., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D., Tucker, J., & Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132
11. Fenech, M., Nersesyan, A., & Knasmueller, S. (2016). A systematic review of the association between occupational exposure to formaldehyde and effects

- on chromosomal DNA damage measured using the cytokinesis-block micronucleus assay in lymphocytes. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 770(Pt A), 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.04.005>
12. Flores, M. (2019). Los alcances en la producción agrícola chiapaneca. Una reflexión sobre la soberanía alimentaria en la región. *Región Y Sociedad*, 31, e1177. <https://doi.org/10.22198/rys2019/31/1177>
 13. Food and drug administration of the United Nations, FAO. (2020) Eliminación de Grandes Cantidades de Plaguicidas en Desuso en los Países en Desarrollo - Colección FAO: Eliminación de Plaguicidas -4. <http://www.fao.org/3/W1604S/w1604s00.htm#Contents>
 14. Gamero-Gamero, A., Delgadillo-Martínez, J., Cortés-Flores, J., Velasco-Velasco, J., & Velasco-Cruz, C. (2020). Propiedades del suelo afectadas por el tiempo de descanso en un sistema de roza-tumba-quema. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 7(1), e2098. <https://doi.org/10.19136/era.a7nl.2098>
 15. Gómez, N. (2017). La contribución socio-productiva de la organización social a la soberanía alimentaria en la Trinidad, Chiapas. C. Vázquez y k. Nicola. (eds.), *México rural ante los retos del siglo XXI. Seguridad alimentaria*, t. III (pp. 11-28). México: Asociación Mexicana de Estudios Rurales A. C
 16. Heddle, J., Fenech, M., Hayashi, M., & MacGregor, J. (2011). Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis*, 26(1), 3–10. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq085>
 17. Hernández, F. (2000). El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. *Revista de Toxicología*, 17(1), 19-26.
 18. Herrera-Arangüena, J. (1961). Los Aceites de Petróleo como Insecticidas y su Empleo en los Cultivos de Cítricos. *Revista Peruana de Entomología Agrícola*. Vol. 4 Núm 1.
 19. Johnson, R., Ellis, M., Mullin, C., & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity - USA. *Apidologie*, 41(3), 312-331. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>
 20. Lozano-Kasten, F., Sierra-Díaz, E., Chavez, H., Peregrina Lucano, A., Cremades, R., & Pinto, E. (2021). Seasonal Urinary Levels of Glyphosate in Children from Agricultural Communities. Dose-response: a publication of International Hormesis Society, 19(4), 15593258211053184. <https://doi.org/10.1177/15593258211053184>
 21. Marti, A., Echeverría, R., Morell-Azanza, L., & Ojeda-Rodríguez, A. (2017). Telómeros y calidad de la dieta. *Nutrición Hospitalaria*, 34(5), 1226-1245. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.1181>
 22. Martín-Culma, N., & Arenas-Suárez, N. (2018). Daño colateral en abejas por la exposición a plaguicidas de uso agrícola. *Entramado*, 14(1), 232–240. <https://doi.org/10.18041/entramado.2018v14n1.27113>
 23. Matheus, L., & Bolaños A. (2014) Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. Universidad de Carabobo.

24. McCarthy, J., & Shugart, L. (1990) Biological Markers of Environmental Contamination. In: McCarthy, J.F. and Shugart, L.R., Eds., Biomarkers of Environmental Contamination, Lewis Publishers, Boca Raton, 3-14.
25. Moll, A. (1934). Los orígenes de la desinfección en particular en los buques. Pan American Journal of Public Health, 14(4). Recuperado 1 de junio de 2022, de <https://iris.paho.org/handle/10665.2/18357>
26. Navarro-Ibarra, M., Hernández, J., & Caire-Juvera, G. (2019). Diet, physical activity and telomere length in adults. Nutrición Hospitalaria, 36(6), 1403-1417. Epub 24 de febrero de 2020. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.02673>
27. Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. Frontiers in public health, 4, 148. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
28. Ortega-Elorza, L. (2011). Contaminación ambiental en México por plaguicidas persistentes y su relación con problemas de salud durante el desarrollo prenatal y la infancia (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
29. PAN. (2021). Lista de plaguicidas altamente peligrosos de PAN Internacional. Pesticide Action Network International c/o PAN Germany, Hamburgo, Alemania Recuperad 4 de febrero 2021, de https://pan-international.org/wp-content/uploads/PAN_HHP_List.pdf
30. Pool N. (1997). Intensificación en la agricultura tradicional y cambios en el uso del suelo. pp. 1-22. In: Parra V. M. y B. Díaz H. (eds.). Los Altos de Chiapas: Agricultura y crisis rural. Tomo 1. Los recursos naturales. El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de la Casas, Chiapas, México.
31. Patterson, A., Gonzalez, F., & Idle, J. (2010). Xenobiotic metabolism: a view through the metabolometer. Chemical research in toxicology, 23(5), 851–860. <https://doi.org/10.1021/tx100020p>
32. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Ocosingo, Chiapas. (s. f.). Library. Recuperado 2 de septiembre de 2021, de <https://1library.co/document/qvp12vgq-prontuario-informacion-geografica-municipal-mexicanos-ocosingo-chiapas-geoestadistica.html>
33. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Salto de Agua, Chiapas. (s. f.). INEGI. Recuperado 6 de septiembre de 2021, de http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/07/07077.pdf
34. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Palenque, Chiapas. (s. f.). INEGI. Recuperado 5 de septiembre de 2021, de http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/07/07065.pdf

35. Real Academia Española. (s.f.). Barbecho. En Diccionario de la lengua española. Recuperado en 20 de mayo de 2021, de <https://dle.rae.es/barbecho>
36. Restrepo, I., & Franco S. (1988) Naturaleza muerta. Los plaguicidas en México (Ed.) Andromeda, 236p.
37. Rivero, O., Rizo, P., Ponciano, G., & Oláiz, G. (2001) Daños a la salud por plaguicidas. México. Consejo de Salubridad General, Facultad de Medicina. UNAM. El Manual Moderno
38. SADEC. (2014). Salud y desarrollo comunitario, A.C. ¿Quiénes somos? Recuperado 5 de mayo de 2019, de <http://www.sadec.org.mx/index.htm>
39. Sailaja, N., Chandrasekhar, M., Rekhadevi, P. V., Mahboob, M., Rahman, M. F., Vuyyuri, S. B., Danadevi, K., Hussain, S. A., & Grover, P. (2006). Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutation research*, 609(1), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.06.022>
40. Secretaria de Salud Chiapas. (2021). Mantienen acciones preventivas y de control del dengue en Chiapas. Recuperado 16 de junio de 2021, de <https://saludchiapas.gob.mx/noticias/post/mantienen-acciones-preventivas-y-de-control-del-dengue-en-chiapas>
41. SEMARNAT. (2021). Casos nuevos reportados de Intoxicación por Plaguicidas. Recuperado 15 de julio de 2021, de http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D1_SAMBIENTAL04_01&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce&NOMBREENTIDAD=* &NOMBREANIO=*
42. Serrano-García, L., & Montero-Montoya, R. (2001). Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and molecular mutagenesis*, 38(1), 38–45. <https://doi.org/10.1002/em.1048>
43. Shimizu, N., Shimura, T., & Tana, T. (2000). Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Rev. Mutat. Res. Vol. 448*: 81-90
44. Shubber, E., AL-Julandi, J., & AL-Rawah, S. (2010). Micronucleus Frequencies in Buccal Cells from Patients with Sickle Cell Anaemia. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics*, 3(1). <https://www.iasj.net/iasj/download/c76103ce67a65087>
45. Suh, K., Kain, K., & Keystone, J. (2004). Malaria. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 170(11), 1693–1702. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1030418>
46. Suratman, S., Edwards, J. W., & Babina, K. (2015). Organophosphate pesticides exposure among farmworkers: pathways and risk of adverse health effects. *Reviews on environmental health*, 30(1), 65–79. <https://doi.org/10.1515/reveh-2014-0072>
47. Tudi, M., Daniel-Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture Development, Pesticide Application and Its

Impact on the Environment. International journal of environmental research and public health, 18(3), 1112. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>

48. Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L., & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 227-236. Recuperado en 28 de junio de 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300007&lng=es&tlng=es.