



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE DAÑO PROVOCADOS
POR LOS NANO-PLAGUICIDAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CYNTHIA ALEJANDRA PAZ TREJO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA Y CAMBIO CLIMÁTICO, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, ENERO 2023



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE DAÑO PROVOCADOS
POR LOS NANO-PLAGUICIDAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CYNTHIA ALEJANDRA PAZ TREJO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA Y CAMBIO CLIMÁTICO, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, ENERO 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD INSTITUTO DE GEOLOGÍA

OFICIO CPCB/1083/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que, en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **03 de octubre de 2022**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **PAZ TREJO CYNTHIA ALEJANDRA** con número de cuenta **308536607** con la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE DAÑO PROVOCADOS POR LOS NANO-PLAGUICIDAS”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO
Vocal: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO
Vocal: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO
Secretario: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 23 de noviembre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad de seguir preparándome académica y profesionalmente.

Al apoyo económico recibido por el CONACyT, número de becario **775677**

Al apoyo económico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA) de la UNAM con el proyecto IN114220

A los miembros de mi Comité Tutor que me han acompañado en toda mi trayectoria profesional desde la licenciatura hasta el doctorado.

A mi tutora, la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo por permitirme desarrollar este proyecto y crecer en su grupo desde la licenciatura, por impulsarme a mantener una mente crítica y por motivarme en la búsqueda de nuevos retos en la investigación, por apoyarme en cada paso y permitirme crecer y desarrollarme en cada ámbito profesional. Su experiencia en la investigación fue fundamental y enriquecedora para el desarrollo de esta tesis y a manera personal, fue crítica en mi desarrollo como investigadora.

Al Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero que con amplio conocimiento en el tema y diseño experimental, fomentó mi criterio para discutir y ahondar en los resultados obtenidos. Gracias a su experiencia y generosidad, se logró avanzar y concluir con la parte experimental de este proyecto, y su guía fue invaluable para concluir exitosamente.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García que con su experiencia en microscopía de transmisión y su apoyo se lograron descubrimientos importantes. Por sus sugerencias y su apoyo durante el desarrollo de mi trabajo teórico y experimental, y por su constante disposición a apoyar.

Agradecimientos a título personal

A todos los profesores y técnicos que me apoyaron durante el proceso y realización de los experimentos. Su invaluable ayuda en los pasos diarios del proyecto y la experimentación, su ingenio, creatividad y buena voluntad permitieron que pudiese avanzar incluso durante la pandemia: Adriana Tayde López Santaella, José Alfredo Ramírez Álvarez, Monserrat Zaragoza Ojeda y Ana Rosa Márquez Flores

A Victoria Carrillo, más que una técnico del laboratorio, es una amiga y una personal vital para que funcionen las cosas. A ella le debo los pasos del día a día, su siempre abierta disposición, bondad y optimismo me acompañaron desde el primer día que llegue al laboratorio. Su apoyo fue necesario para la realización de esta tesis y a manera personal, ese apoyo me permitió avanzar incluso en los momento difíciles.

A mis compañeros de laboratorio, por compartir experiencias, conocimiento y apoyo. Denisse Badillo, Zeltzin Muñoz, Javier Ancona, Norberto Alarcón y Elisa Roldán.

A mi madre, su ejemplo, fuerza, generosidad y visión son y serán siempre mi estandarte en cada paso que de. Ella es y será siempre el ejemplo más grande de éxito como ser humano y profesionista en mi vida. Las palabras jamás serán suficientes para expresarle mi gratitud y amor incondicionales, pero quizá esta tesis sea una pequeña evidencia de la gran influencia que ejerce en mi.

A mi hermana, mi amiga, confidente y protectora, porque en cada paso estoy segura de que siempre me escucharás sin juzgarme, dándome la libertad de expresarme incluso en los momentos más oscuros.

Finalmente, quiero agradecer al amor de mi vida. Fabián Vergara, una persona que no sólo brilla por su inteligencia sino por la luz que emana. Por ser no sólo mi compañero de vida en todo momento sino por enseñarme a ser más humana, tener más paciencia y disfrutar la ciencia incluso en los malos momentos.

Dedicatoria

Le dedico esta tesis a mis grandes protectoras que siempre me apoyaron incluso cuando estaba mal. Mi abuelita Rosalina Caballero y mi Tía Rosario Trejo Caballero.

Esta tesis quedo marcada por eventos históricos, la pandemia se llevó a dos de las personas que más amaba y que siempre estuvieron ahí para mí. Esta tesis se la dedico, porque sin su amor y enseñanzas en mi vida, no sería quien soy ahora, su ejemplo me guió durante todo el proceso y me guiará toda la vida.

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
I.Introducción	3
1.1 Nanotecnología y regulación	3
1.2 Nanoplaguicidas	5
1.3 Genotoxicología de nanoplaguicidas	8
1.4 Prueba de Micronúcleos	9
1.5 Estrés de retículo	11
1.6 Lambda-cihalotrina (λ - cihalotrina)	13
II. Antecedentes	14
III. Hipótesis	17
IV. Objetivos	17

V. Metodología	18
5.1 Aislamiento y caracterización de plaguicidas	18
5.2 Cultivo de línea celular NL-20	18
5.3 Caracterización física	19
5.3.1 RAMAN	19
5.3.2 Potencial Z	19
5.4 Determinación de anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) y actividad de SOD1	19
5.5 Microscopía de transmisión para determinar ultraestructura	21
5.6 Análisis de la morfología	21
5.7 Análisis de la expresión de genes relacionados con el estrés a retículo endoplásmico	22
5.7.1 Extracción de ARN	22
5.7.2 Reacciones RT-qPCR	23
5.8 Inmunofluorescencia de BIP y SOD1	24
5.9 Estandarización de la prueba de Micronúcleos	24

5.10 Análisis estadístico	25
VI. Resultados	26
6.1 Caracterización física	26
6.2 La fracción nano del plaguicida induce estrés oxidante	28
6.3 Análisis Ultraestructural por MET	30
6.4 Morfología	32
6.5 RT-qPCR de genes que participan en la RERE	33
6.6 Análisis genotóxico	36
VII. Discusión	40
VIII. Conclusión	49
IX. Perspectivas	50
X. Referencias	51

Lista de Abreviaturas

EPA Agencia de Protección Ambiental

FIFRA Acta Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas, y Facilidades Federales

WHO Organización Mundial de la Salud

FAO Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

IUPAC Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

EU Unión Europea

ROS Especies Reactivas de Oxígeno

MN Micronúcleos

PN Puentes Nucleoplásimicos

BN Brotes Nucleares

IDN Índice de División Nuclear

IPBC Índice de Proliferación por Bloqueo de Citocinesis

RE Retículo Endoplásmico

ER Estrés de Retículo

RERE Respuesta a Estrés del Retículo Endoplásmico

IRE1 α Inositol Requiring 1 α

PERK PKR-like ER kinase

ATF6A Activación del Factor-6a

SOD1 Superóxido Dismutasa 1

NRF2 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

HMOX-1 Hemoxigenasa 1

IL-6 Interleucina 6

CHOP DNA damage-inducible transcript 3

MET Microscopía Electrónica de Transmisión

NAC N-Acetil Cisteína

Resumen

En los últimos años la implementación de la nanotecnología en diferentes sectores ha generado expectativas como nueva fuente de aprovechamiento debido a las características novedosas que traerá consigo. Particularmente, su uso en plaguicidas promete generar productos más sustentables y menos dañinos con el ecosistema y la salud humana; sin embargo, la mayoría de los estudios continúan con un enfoque dirigido a su eficacia en campo, dejando de lado el efecto en modelos animales y en los seres vivos.

El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto genotóxico de la fracción nanométrica del plaguicida encapsulado, en cultivo de células de epitelio bronquial de la línea NL-20, y dilucidar el mecanismo molecular por el cual inducen daño.

Para ello se caracterizó y separó la fracción nano del plaguicida Karate Zeon® 5 CS, se evaluó la vía de entrada a la célula y los cambios inducidos en la ultraestructura celular. Se estimaron los principales marcadores de estrés oxidante, estrés de retículo y se evaluó la genotoxicidad por medio de la prueba de micronúcleos.

Se obtuvo la fracción de 700 nm con el potencial Z de -40 mV, cuyo principal componente es poliurea formaldehído, esto les permite a las cápsulas ingresar a la célula por medio de macropinocitosis y endocitosis mediada por clatras. En el interior de la célula, inducen estrés oxidante que activa la respuesta de estrés de retículo por medio de la proteína BIP y el sensor IRE-1, desencadenando la activación de IL-6.

Asimismo, el estrés reduce la proliferación celular y aumenta el daño genotóxico por medio del incremento de micronúcleos, sin embargo, este daño es inducido principalmente por contacto directo de las cápsulas con el núcleo.

Este estudio pionero se realiza empleando un plaguicida comercial encapsulado nanométrico, en el que se evalúa el mecanismo molecular de daño inducido, lo cual lo sitúa como el primer paso en el análisis de si estas sustancias representarán un contaminante tóxico o una solución emergente.

Abstract

In recent years, the implementation of nanotechnology in different sectors has generated expectations as a new source of use due to the novel characteristics that it will bring. Particularly its use in pesticides promises to generate more sustainable products that are less harmful to the ecosystem and human health, however, most studies continue to focus on their efficacy in the field, leaving aside the effect on animal models and in humans.

The aim of this project was to evaluate the genotoxic effect of a nano-encapsulated pesticide on bronchial epithelial cells (NL-20) in vitro and to elucidate the molecular mechanism by which they induce damage.

To accomplish this, the nano fraction of the pesticide Karate Zeon® 5 CS was characterized and separated, and the up take into the cell and the changes induced in the cellular ultrastructure were evaluated. The main markers of oxidative stress, reticulum stress, and genotoxicity were evaluated using the micronucleus test.

A 700 nm fraction with a Z potential of -40 mV was obtained, whose main component is polyurea formaldehyde, this allows the capsules to enter the cell through macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. Once inside, they induce oxidative stress that activates a reticulum stress response via the BIP protein and the IRE-1 sensor, triggering an inflammatory response.

Likewise, stress reduces cell proliferation and increases genotoxic damage by increasing micronuclei; however, this damage is mainly induced by direct contact of the capsules with the nucleus.

This is a pioneering study carried out using a nanometric encapsulated commercial pesticide in which the molecular mechanism of induced damage is evaluated, which makes it the first step in the analysis of whether these substances represent a contaminant or an emerging solution.

I. Introducción

1.1 Nanotecnología y regulación

Alrededor de los años 90, el desarrollo científico dirigido a la nanotecnología comenzó a generar expectativas como nueva fuente de aprovechamiento en diferentes sectores debido a sus características novedosas (APVMA, 2014). Desde entonces y en la última década, ha habido un crecimiento acelerado de su aplicación en diferentes sectores industriales como la alimentaria, la farmacéutica, la industrial y recientemente, la agrícola. A raíz de ese crecimiento la FAO convocó reuniones en las que se discutieron principalmente 3 temas: el uso de nanotecnología en la comida, el riesgo potencial de su uso en el ser humano y los aspectos sociales de diálogo entre la comunidad (FAO, 2013).

Estas reuniones comenzaron a revelar problemas de regulación en temas tan elementales como la carencia de una definición universal de nanotecnología, pues existen diferentes definiciones dependiendo del tipo de material al que se esté aplicando esta tecnología como nanomaterial, nanoescala, nanopartícula, nanoobjeto, entre otros (Cuadro 1). Actualmente la definición más aceptada es la de nanoescala definida por la “UK Royal Society and Royal Academy of Engineering” en su reporte del 2004, la cual define a cualquier producto “nano” como aquel que mantenga una escala de 0.2--100 nm (EC, 2009; 2015; WHO, 2010; JRC-IPTS, 2014). Sin embargo, múltiples estudios relacionan productos que tienen una dimensión “ultrafina” (nanométrica que no coincide con la definición de nanoescala) a daños novedosos, distintos a los inducidos por sus contrapartes micrométricas, como los aerosoles atmosféricos, el material particulado o contaminantes industriales, los cuales llegan a comportarse diferente a sus contrapartes micrométricas (SCENIHR, 2006).

Este problema ha conllevado a una discrepancia en la manera en que se evalúa el riesgo de nanomateriales y nuevos productos comerciales, debido a que muchos de ellos son de escalas nanométricas no menores a 100 nm que presentan propiedades fisico-químicas diferentes a sus contrapartes comerciales actuales, llevando a que escapen fácilmente de una regulación nacional o internacional puesto que no entran en la definición estándar de nanoescala.

Cuadro 1. Diversas definiciones de nanotecnología aplicada

Nanotecnología en productos	Definición
Nanoescala	Tener una o más dimensiones de entre 0.2-100 nm
Nanociencia	El estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, donde las propiedades difieren significativamente de las de una escala mayor.
Nanotecnología	Diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control y manipulación de la forma y tamaño a nanoescala.
Nanomaterial	Material con una o más dimensiones externas, o una estructura interna que podría exhibir características novedosas en comparación con el mismo material sin características a nanoescala.
Nanotubo	Estructuras tubulares del orden de nanómetro.
Nano-objetos	Los nano pueden tener múltiples presentaciones que son utilizados para desarrollar nuevos materiales llamados nanomateriales, y les confieren propiedades mejoradas o específicas de la dimensión nanométrica.

Información obtenida de SCENIHR, 2006.

A nivel internacional todavía existen diferencias en cuanto a la regulación con respecto a la definición, etiquetado, especificaciones nano específicas y evaluaciones de riesgo y toxicidad (Kihara, 2021). Hasta 2013 Australia, Nueva Zelanda y Canadá no contaban con regulación

o registro de su uso pero sí de su manufactura, y China tampoco tenía legislación relacionada con nanomateriales hasta el 2013, que se rechazó su uso en alimentos. Solamente Japón y E.U.A. le han dado prioridad al desarrollo tecnológico e investigación en nanotecnología con regulación en alimentos y desarrollo de industria emergente. Las principales organizaciones en lograr la regulación básica son: la Agencia de Protección Ambiental (EPA), Acta Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas, y Facilidades Federales (FIFRA), Organización Mundial de la Salud (WHO), Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) y la Unión Europea (EU) (WHO, 2009; Kah y Hofmann, 2014), sin embargo en México aún no existen asociaciones gubernamentales específicas que regulen su producción, distribución y manejo.

1.2 Nanoplaguicidas

La aplicación de la nanotecnología en los productos agroquímicos comenzó a crecer a principios del siglo XXI, con el objetivo de optimizar los procesos de producción de agroquímicos y hacerlos más sustentables (Shang et al., 2019).

A pesar de los múltiples estudios hechos en campo sobre la eficacia de estos productos, la mayoría de los nanoplaguicidas actuales no están incluidos en la definición de nano escala (1-100 nm) sin embargo, se utiliza dicho término ya que incluye entidades del rango nano menor a 1000 nm, son designados con el prefijo o tienen propiedades novedosas asociadas al tamaño, cualidad relevante para definir productos nanométricos (Kumar y Dhawan, 2013). Además de que a nivel toxicológico existe evidencia de que puedan inducir daño diferente o mayor a sus contrapartes micrométricas (Benelli, 2018).

Esta falta de conceso internacional ha dado la oportunidad de crecimiento e innovación científica alrededor de la implementación de la nanotecnología en múltiples productos como los plaguicidas. Siendo Asia la líder en investigación y producción de artículos científicos y

Estado Unidos y Alemania en patentes de nanomateriales destinados a la agricultura (Gogos et al., 2012; Kah et al., 2013).

La investigación en agroquímicos ha crecido en la última década ya que se prevee pueda mejorar el proceso de adquisición de alimentos de manera sustentable y más rápida a partir de ciertas ventajas que no permiten sus presentaciones actuales, como: el incremento de solubilidad en el agua, una mayor asimilación biológica y absorción, se podrá dirigir su liberación en el campo, evitarán la separación de fases en su almacenamiento y aplicación, serán más económicos ya que puede disminuir la cantidad de aplicaciones en campo, por tener una mayor área de contacto (Kah et al., 2013; Kah y Hofmann, 2014; Shang et al., 2019). Como ejemplo de ello, en emulsiones hechas con B-cypermtrina se comprobó que en comparación con las microemulsiones, las nanoemulsiones son mucho más estables y se difunden mejor en campo (Wang et al., 2007).

En estudios de eficacia en campo se comprobó que la permetrina en nanoemulsión no produce daño a organismos no blancos, sobre todo bacterias de suelo, mientras que la microemulsión genera daño en las plantas de *Allium cepa* donde se aplicó (Kumar et al., 2013). Asimismo, se probó que glifosato tiene igual o mayor eficacia en campo en una forma nanométrica que su presentación regular (Lim et al., 2011, 2012) y validomicina en nano presentación prolonga su actividad en los campos de cultivo (Qian et al., 2011).

Es posible que las nuevas presentaciones nanométricas constituyan un nuevo riesgo de sustancias químicas inocuas, o que antes no tenían ningún efecto dañino asociado a algún sistema. Un ejemplo de ello son los múltiples estudios genotoxicológicos realizados con nanopartículas metálicas, utilizadas en materiales de construcción o de diversa índole, como la sílica, el aluminio o el óxido de titanio, con los cuales se comprobó que debido a sus novedosas características facilitaban la difusión, resistencia, dimensionalidad y entrada a los sistemas biológicos (Kumar y Dhawan, 2013). También se encontró interrupción de genes involucrados en ciclo celular en células pulmonares epiteliales al exponerse a nanopartículas de cobre (Hanagata et al., 2011).

A pesar del crecimiento de esta tecnología en la industria, aún sigue habiendo carencia en la investigación de su efecto en la salud humana principalmente a nivel genotóxico, lo cual

impide predecir su posible toxicocinética y toxicología, ya que debido a sus características novedosas, tendrá un comportamiento diferente al de su contraparte micrométrica (APVMA, 2014). En una revisión hecha por Öberdorster et al. (2005) se comenzaron a debatir los riesgos potenciales de la reducción de tamaño de la partícula y su uso en productos comerciales, considerando que el pequeño tamaño permite el fácil acceso a las células a través de epitelios y endotelios, además de que lo hace “ideal” para mimetizarse con moléculas asociadas a reacciones de catálisis, su superficie atómica o molecular juega un papel crucial, ya que incrementa su actividad en sistemas biológicos y posiblemente a nivel genético. Tan sólo en experimentos de producción de nanopartículas se demuestra que la adsorción y absorción aumenta en partículas nanométricas y que dependiendo de su ingreso en el sistema, pueden ser persistentes en sangre llegando a tener una distribución sistémica; la eliminación de nanopartículas no biodegradables es lenta e ineficiente y causan inflamación provocada principalmente por estrés oxidante (APVMA, 2014; Magdolenova et al., 2014), incluso se ha llegado a reportar peroxidación de lípidos en cerebro y eritrocitos (Öberdörster, 2014; Hamadi et al., 2015). De toda esta evidencia, es posible deducir que incluso pueden llegar a inducir daño al ADN de manera directa e indirecta.

Por ello, es importante generar una evaluación completa de riesgo de nanoplaguicidas, a nivel genotóxico y citotóxico, como se muestra en este estudio.

1.3 Genotoxicología de nanoplaguicidas

El estudio de la genotoxicidad permite conocer el efecto a corto y largo plazo ya que se enfoca en las propiedades mutagénicas, clastogénicas o carcinogénicas de los contaminantes (López-Montoya, 2011). Es posible considerar que una sustancia genotóxica tiene la capacidad de unirse al ADN directamente o actuar de manera indirecta mediante su metabolismo o por afectación de moléculas relacionadas con el ADN causando alteraciones (Menzie et al., 1992). Este tipo de alteración por lo general, es amortiguado por los sistemas de reparación y no suele ser evidente de manera inmediata, si no que requiere la acumulación de daño para manifestarse o debe producirse en secuencias de alta transcripción que usualmente están más protegidas, ésta es una de las razones por las cuales es difícil vincular a los agentes genotóxicos como causa inmediata del daño crónico. El problema se puede presentar cuando escapan a las maquinarias de reparación o se reparan erróneamente, dando paso a efectos adversos en el ciclo celular, la expresión génica, la comunicación citoplasma-mitocondria y servir como sustrato para desencadenar procesos carcinogénicos (Wiseman et al., 1996). A pesar de que las consecuencias suelen ser graves, también pueden ser reversibles si se detectan a tiempo. Estas razones hacen a la evaluación genotóxica una de las más importantes en los estudios de estimación de riesgo de productos de *novo*.

En la actualidad, los estudios de los efectos genotóxicos empiezan a tomar fuerza con relación a los nanoplaguicidas, principalmente en aquellos con naturaleza metálica. Al respecto, empleando el ensayo cometa, la exposición a nanopartículas de ZnO (12.5—50 mg/mL por 24 h) en la línea celular de riñón NRK-52E incrementó la intensidad de la cauda (Uzar, 2015). Investigaciones recientes, en la línea celular de pulmón no tumorogénica (WI-38) y tumorogénica (A549), demuestran que plaguicidas a base de nanopartículas de cobre incrementan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y producen daño al ADN estimado por la longitud de la cauda y el porcentaje de ADN en la cauda, además de que estos efectos pueden estar relacionados con la entrada de las partículas a la célula; donde concentraciones bajas ingresan más rápido (Fahmy et al., 2020).

Imidacloprid, un neonicotinoide, indujo aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea a bajas concentraciones (<100 mg g/mL/Kg), aberraciones numéricas (metafases con <42 cromosomas), estructurales (extremos pegajosos, anillos y fragmentos) e incremento de micronúcleos (MN) en eritrocitos de ratas Wistar (Karabay y Oguz, 2005).

1.4 Prueba de Micronúcleos

Para este trabajo se utilizó la prueba de micronúcleos con bloqueo de citocinesis, con la cual es posible identificar MN que pueden formarse por procesos clastógenos o aneudógenos, puentes nucleoplásmicos (PN), yemas o brotes nucleares (BN), células apoptóticas y necróticas, entre otros múltiples procesos moleculares (Cuadro 2) (Fenech et al., 2011; Goldoni et al., 2014).

Cuadro 2	Eventos moleculares asociados al biomarcador
MN	Retraso de fragmentos acéntricos cromosómicos o cromatídicos en anafase Reparación incompleta de rupturas de ADN Falta de reparación en rupturas de ADN Retraso de cromosomas completos en anafase Hipometilación de secuencias repetidas en ADN centromérico y pericentromérico Defectos en el ensamble del cinetocoro o sus proteínas Huso acromático disfuncional Fallo en genes "check point" de anafase Problemas con los intermediarios de estrés para la replicación
NPB	Cromosomas dicéntricos o multicéntricos con centrómeros jalados a polos opuestos de la célula en anafase Falla en la reparación de rupturas de ADN Fusión de las terminaciones teloméricas debido al acortamientos de éstos, disfunción de telómeros o falta de ellos. Defecto en la separación de cromátidas hermanas por falla en la separación de hebras.
BN	Proceso activo de eliminación de material nuclear. Eliminación de ADN amplificado provocado por el ciclo de ruptura-fusión-puente. Supresión de complejos proteicos de reparación de ADN Descarte de exceso de cromosomas (posible en células poliploides) Contracción de la ruptura de un puente nucleoplásmico entre dos células, dando paso a un brote temporal.
Información obtenida de Fenech <i>et al.</i> (2011)	

Las alteraciones más importantes son los MN que se forman principalmente a partir de la no incorporación en la anafase de fragmentos acéntricos cromosómicos o cromatídicos causados por reparación incompleta de las rupturas de cadenas de ADN o fallas en la reparación a causa del daño genotóxico, por ende no se incluyen en el núcleo principal (Fenech et al., 1997, 2003; Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007). Una vez sucedida la falla, en telofase se forma una membrana nuclear alrededor de ellos adquiriendo gradualmente la morfología de un núcleo pero más pequeño (no más grande que un tercio del tamaño del núcleo original) (Fenech, 2000; Fenech et al., 2003).

En cultivos de linfocitos humanos con bloqueo de la citocinesis por citocalasina, de acuerdo con Fenech y Morley (1985), la formación y frecuencia de MN observados en un número determinado de linfocitos depende de:

- La proporción de células que respondieron al mitógeno
- La cantidad de células que se dividieron
- El destino de MN en células que se han dividido más de una vez

Otro resultado importante son los PN que son cromosomas dicéntricos que se originan posiblemente por diferentes mecanismos: mala reparación de ruptura de ADN, fusión final de telómeros o falla en la separación de cromátidas hermanas durante anafase, es decir, los centrómeros son jalados a lados opuestos durante anafase, pero no se rompe la conexión permitiendo que se reorganice la membrana nuclear a su alrededor (Randa et al., 2008).

Yemas o brotes nucleares (BN): se originan por eliminación de ADN amplificado (en fase S) que se ubica en la periferia del núcleo, complejos de reparación aglomerados, evento posterior a un puente nucleosómico y posible exceso de cromosomas por células aneuploides (Randa et al., 2008; Fenech et al., 2011).

Con esta técnica, también es posible obtener el índice de división nuclear (IDN) mediante la fórmula:

$$\text{IDN} = (\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})) / \text{N}$$

Y el índice de proliferación por bloqueo de citocinesis (IPBC) a través de la fórmula:

$$\text{IPBC} = (\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3} + \text{M4})) / \text{N}$$

Donde M1-M4 representan las células con 1 a 4 núcleos y N es el número total de células viables contadas.

El primer índice provee el promedio de núcleos por célula, mientras que el segundo proporciona el promedio de divisiones mitóticas por célula. Ambos parámetros son útiles para conocer el posible efecto citostático sobre la respuesta mitógena de los linfocitos, además de tener un control sobre la población binucleada del cultivo y el correcto funcionamiento de la citocalasina (Fenech, 2000; Fenech et al., 2003).

Esta prueba permite de manera simple determinar el mecanismo de acción del componente por la presencia o ausencia de centrómero en los micronúcleos, por lo que se puede usar como alternativa a la prueba de aberraciones cromosómicas y abre la posibilidad de ir adelante en el conocimiento del riesgo genotóxico asociado a exposición por plaguicidas (Bolognesi et al., 2011). Requiere relativamente poca muestra celular, no es invasivo, permite comparar tejidos, es económico y sobre todo se puede determinar un amplio espectro de daño genético.

1.5 Estrés de retículo

El daño citotóxico es un tipo de alteración importante, ya que denota principalmente efecto agudo, que es el primer paso en la evaluación de riesgo de cualquier compuesto.

La respuesta a estrés del retículo endoplásmico (RERE) se desencadena cuando se detectan defectos en el plegamiento de proteínas en el retículo edoplásmico (RE) y activando un

programa de expresión génica que facilita la recuperación de la homeostasis o, cuando hay demasiado estrés crónico, conduce a la muerte celular (Foufelle, 2016), de manera que permite la restitución del funcionamiento del RE.

Este proceso se caracteriza por la aparición de vesículas intracelulares, muchas de las cuales corresponden a dilataciones del RE y de la mitocondria (Cao y Kaufman, 2014; Lee et al., 2016). Asimismo, es percibida por tres sensores transmembranales: “inositol requiring 1a” (IRE1a), “PKR-like ER kinase” (PERK), y la activación del factor-6a (ATF6a) (Cawley et al., 2011; Dara et al., 2011; Malhi y Kaufman 2011; Foufelle, 2016).

En ausencia de estrés, los 3 sensores se encuentran en asociación con la chaperona GRP78 (BIP). Sin embargo al acumularse las proteínas mal plegadas, BIP se disocia activando la vía de RERE que a su vez dirige la transcripción de genes de reparación, inflamación, biogénesis, muerte celular, entre otros (Szegezdi et al., 2006; Yap et al., 2020 (Fig.1).

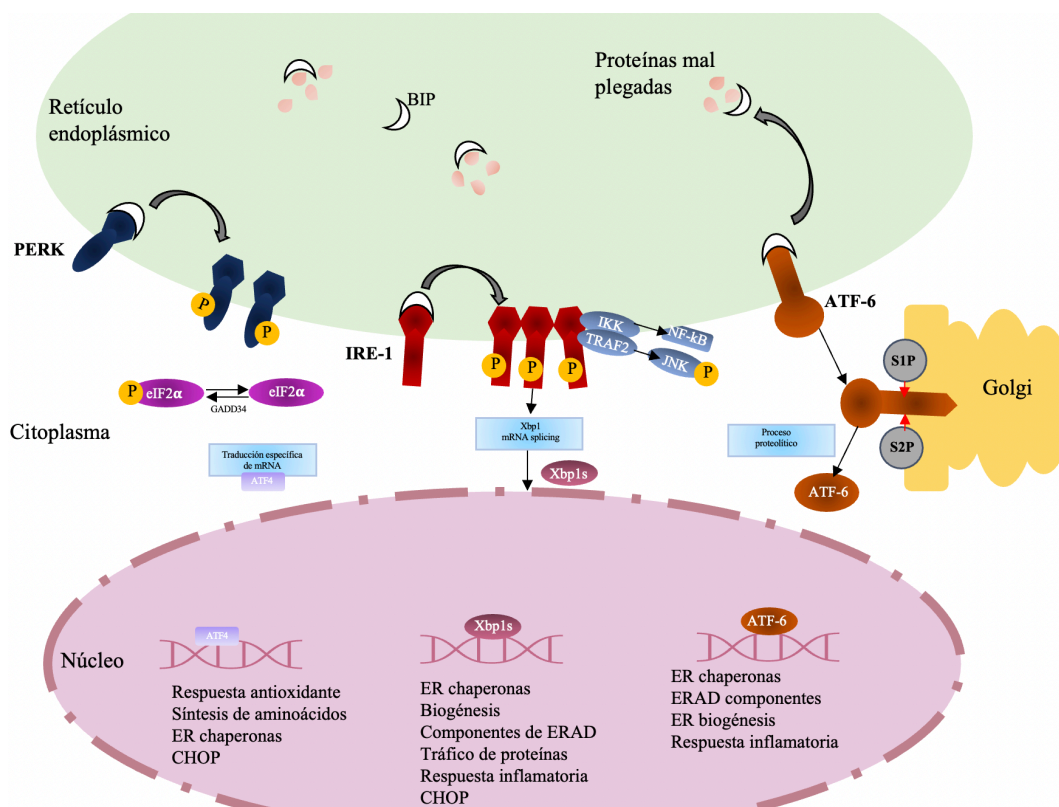


Figura 1. Esquema de la RERE, modificada de Cao et al., 2014. El esquema representa a los principales sensores, su activación y los principales genes que se activan ante la detección de proteínas mal plegadas.

1.6 Lambda-cihalotrina (λ - cihalotrina)

Independientemente de la técnica, varios autores denotan la importancia de la caracterización de las nanopartículas o nanomoléculas que se vaya a evaluar, y adaptar las técnicas que se decida utilizar, de acuerdo a estas características; ya que se ha probado que nuevas propiedades asociadas a la nanotecnología, obstaculizan la metodología y por lo tanto con los resultados obtenidos (Guadagnani et al., 2015). Un ejemplo de ello es la interferencia en la fluorescencia al evaluar daño genotóxico por medio de ensayo cometa, en donde las nanopartículas metálicas interfieren con la lectura de las laminillas generando falsos positivos o falsos negativos (Magdolenova et al., 2012). Éste fenómeno se ha repetido en diferentes estudios genotóxicos, reforzando la importancia de la caracterización de la molécula a evaluar y la pertinente modificación de la técnica a usar (en caso de requerirse). En este estudio se evaluó la fracción nanométrica de Kárate, que es un plaguicida encapsulado con tecnología Zeon de la marca Syngenta, el cual tiene las siguientes características:

- Ingrediente activo: λ - cihalotrina (permetrina) al 5%
- Insecticida: actúa sobre el sistema nervioso alterando, el flujo de iones a través de la membrana nerviosa, lo cual provoca inactivación y persistencia de la despolarización de la membrana nerviosa (El-Demerdash, 2007).

Consideraciones toxicológicas importantes:

- El ingrediente activo puro se fotodegrada rápidamente y es insoluble en agua. Se considera poco persistente (12 días).
- La tecnología Zeon se refiere a que se mantiene una alta liposolubilidad, es sumamente persistente y se adhiere al follaje para evitar su lavado por lluvias y degradación solar.
- Se recomienda no ingresar al cultivo antes de 12 h de haber aplicado el producto.
- Muy tóxico para organismos acuáticos y abejas (Syngenta, 2015)

II. Antecedentes

El laboratorio de la Dra. Stacy Harper es de los pocos lugares que se dedica a investigar el efecto tóxico de los plaguicidas nanoencapsulados y sus efectos en el desarrollo del pez zebra, *Danio rerio*, encontrando daño teratogénico (Meredith et al., 2015).

La mayoría de los estudios genotóxicos y citotóxicos se han hecho con nanomateriales o ingredientes activos puros de medidas nanométricas.

Maddolenova et al. (2014) hicieron una revisión donde se analiza el daño genético a través de técnicas como ensayo cometa, aberraciones cromosómicas, ensayo de AMES, mutaciones de HPRT, intercambio de cromátidas hermanas, entre otras, por efecto de las nanopartículas más comunes en el mercado (óxido de titanio, hierro, plata, furanos, sílica, carbón negro, zinc y oro) y encontraron que debido a su tamaño y características particulares pueden inducir daño genético indirecto, a través de la generación de ROS, o daño directo por interacción con los poros nucleares y su llegada al ADN. Y aunque en términos generales es posible que a menor tamaño se induce mayor toxicidad, esto también depende de su composición química.

Otros estudios hechos específicamente con nanopartículas de metal corroboraron su potencial para generar ROS en pulmón de rata, sin embargo, el grado de citotoxicidad y genotoxicidad dependen principalmente de la vía de ingreso y su composición química (Karlsson et al., 2009; Karlsson, 2010). Por otro lado, en líneas celulares HepG2 se comprobó que las nanopartículas de sílica generan más daño que las micropartículas, pero que no todo es provocado por la inducción de ROS (Li et al., 2011). Otra de las líneas celulares más usadas para el estudio de toxicología de plaguicidas, son aquellas relacionadas con el sistema respiratorio, ya que es una de las vías de entrada a este tipo de contaminantes.

La nueva tecnología de los nanoplaguicidas utiliza el principio de encapsular el plaguicida que tiene las ventajas de mantener la exposición sostenida y lograr su penetración al organismo blanco. Algunos nanoplaguicidas utilizan a lambda-cyhalotrin y clorantraniliprole como un ingrediente activo. La EPA (2015) no ha reportado genotoxicidad de clorantraniliprole en ratas o en conejos expuestos al ingrediente activo, no obstante se desconoce el efecto de la presentación nanoencapsulada.

Lambda-cihalotrina (λ - cihalotrina) en su presentación comercial genera menor daño clastogénico en espermatozoides de ratones que la mitomicina C (Fahmy y Abdalla, 2001). Pero estudios previos han demostrado que λ - cihalotrina puede inducir daño por estrés oxidante, investigaciones en eritrocitos de conejo describen incremento en biomarcadores de estrés oxidante y aumento de antioxidantes (El-Demerdash, 2007). Además, en eritrocitos de rata Wistar induce la alteración de la integridad y fluidez en la membrana celular, y la producción de MN y citotoxicidad (Hamadi et al., 2015). También se ha reportado inducción de MN en células de médula ósea y eritrocitos de rata (Celik et al., 2005), ese efecto genotóxico se repite en linfocitos de sangre periférica humana *in vitro* (Naravaneni y Jamil, 2005).

Antecedentes realizados en el laboratorio, durante la maestría (Paz-Trejo et al., 2022), utilizando linfocitos de sangre periférica humana y bloqueo de citocinesis, muestran que los tratamientos de 24 h con nanocápsulas del plaguicida Karate aumentan la frecuencia de MN y brotes nucleares a la concentración de 25 μM , puentes nucleoplásmicos a 50 μM y reducen la proliferación celular a partir de 50 μM (por reducción del índice de proliferación (IPBC) y de división nuclear (IDN)). Mientras que, para el plaguicida Ampligo se observó incremento de los puentes nucleoplásmicos en la concentración de 50 μM y los brotes nucleares en 75 μM ; sin embargo, este plaguicida detiene la división de las células en concentraciones de 25 y 30 μM , donde sus IDN e IPBC son uno.

Se elige inicialmente explorar la proliferación celular, porque es una de las características de los procesos carcinogénicos e indirectamente pudiera representar un primer evento en este sentido.

En cuanto a la genotoxicidad, es importante también considerarla ya que al existir una proliferación asociada a daño de ADN no reparado, pueden quedar fijadas las mutaciones, que también son características de un proceso carcinogénico.

Otras instituciones se han dedicado a la evaluación del daño que causan productos manufacturados microencapsulados en organismos no blanco, en el sistema respiratorio, a nivel citotóxico y genotóxico (Stejskal et al., 2009; Mehrazar et al., 2015). Por lo que se puede deducir que un producto nanoencapsulado tiene el potencial de generar más daño, ya

que cambia su distribución biológica y persistencia del ingrediente activo en comparación con su contraparte micrométrica (Meredith et al., 2015).

Este punto es relevante porque la nanotecnología cambia la forma en que los productos interactúan con el ambiente y la biota (NNI, 2022), por lo que conocer cómo se relaciona con las células humanas es de vital importancia.

III. Hipótesis

El plaguicida Karate Zeon presentará partículas nanométricas (fracción nano) adicionales a las micrométricas, que al ser probadas en la línea celular NL-20 generarán daño genotóxico expresado en forma de Micronúcleos, así como detención del ciclo celular. Por un lado se espera que cause daño mediante la inducción de especies reactivas de oxígeno, y por otro lado que las nanocápsulas ingresarán a la célula.

IV. Objetivos

General

1. Evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos inducidos por la fracción nano del plaguicida en la línea celular bronquial NL-20.

Particulares

1. Realizar el análisis ultraestructural de los cambios inducidos en la línea por exposición a las nanocápsulas.
2. Evaluar si la fracción nano del plaguicida induce estrés oxidante.
3. Determinar si la fracción nano del plaguicida induce estrés de retículo.
4. Evaluar si la fracción nano del plaguicida induce daño genotóxico

V. Metodología

5.1 Aislamiento y caracterización de plaguicida

Se seleccionó el plaguicida Karate, el cual presenta tecnología Karate Zeon® y está disponible para el público general.

El insecticida Karate Zeon® 5 CS contiene como ingrediente activo a λ - cihalotrina en un 5% (registro: RSCO-MEZC-1101L-301-300-014), en suspensión concentrada.

Dicha suspensión fue centrifugada a 3050 rpm por 10 min. Posteriormente se separó el sobrenadante que contenía la fracción nanométrica.

Dicha fracción se liofilizó y a través Z-sizer se determinó la concentración mediante una curva de concentración y peso molecular. Asimismo, se obtuvieron los parámetros de diámetro hidrodinámico, potencial Z, índice de polidispersión y coeficiente virial.

La preparación de la fracción nano para los tratamientos se hizo en agua destilada y doble filtrada (Milli-Q y MILLEX GV, Durapore) y almacenada a 21°C para posteriores análisis.

5.2 Cultivo de línea celular NL-20

La línea celular NL-20 corresponde a epitelio bronquial no tumorigénico e inmortalizado. Estas células fueron cultivadas en medio Ham-F12 suplementado con 4% de suero fetal bovino, 2.0 mM de L-glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 5 mg/mL de insulina, 10 μ g/mL de factor de crecimiento epitelial, 500 ng/mL de hidrocortisona, 100 μ g/mL de sulfato de estreptomina y 100 μ g/mL de penicilina-G, a 37 °C y 5 % de CO₂.

El separado de la monocapa de las células se realizó con una solución de 0.05% de tripsina y 0.01 % de verseno por 4 min a 37 °C.

A partir de ensayos preliminares encaminados a evaluar viabilidad con azul de tripano se establecieron distintas concentraciones para los diferentes experimentos, en el caso de

genotoxicidad se utilizaron 5, 10, 15 y 20 μM ; mientras que para citotoxicidad fueron 25 y 30 μM ; ambos a 24 h.

5.3 Caracterización física

5.3.1 RAMAN

El análisis RAMAN de la cápsula se realizó con equipo DRX Raman Thermo Scientific a las longitudes de onda de 532 nm y 780 nm, con una apertura “pinhole” 25.6 de potencia, y tiempo de captura de 20 s. Las imágenes fueron analizadas con el programa OMNIC, y se examinaron 32 muestras en pellet en total de la fracción nano del plaguicida.

5.3.2 Potencial Z

Se realizó el análisis del potencial Z en un equipo Zetasizer de Malvern Instruments a 25 °C, con agua como diluyente a un índice de refracción de 1.33. Se analizaron 3 muestras del plaguicida y se hizo por triplicado.

5.4 Deteriminación de anión superoxido ($\bullet\text{O}_2^-$) y actividad de SOD1

La presencia de $\bullet\text{O}_2^-$ se evaluó mediante la prueba de nitroazul de tetrazolio (NBT) que produce una reacción colorimétrica estable en una muestra biológica que puede contener $\bullet\text{O}_2^-$. Se siguió el protocolo descrito por Secombes (1990) y Lieke et al. (2021) con modificaciones menores. Se añadieron 1×10^6 células en tres repeticiones a una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 h a 37 °C, seguido de una exposición de todas las concentraciones (5, 10, 15, 20, 25 y 30 μM) con y sin N-acetilcisteína (NAC) que se agregó 30 min previamente a 10 mM, un pretratamiento durante 30 min antes de la exposición.

Después de 24 h, las células no adherentes se eliminaron lavando con 100 μL de medio de cultivo y se incubaron en medio de cultivo con 1 mg/mL de NBT durante 90 min a 37 °C. El

formazán resultante se disolvió en 100 µl de KOH 2 M y 100 µl de DMSO y se cuantificó la cantidad de color en un espectrofotómetro a 595 nm.

Para cuantificar la actividad de superóxido dismutasa (SOD1), que cataliza la dismutación del anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Se utilizó el SOD1 Kit Sigma (CS0009). Se lisaron 1×10^6 células en Trizma-HCl 0.1 M enfriado con hielo, pH 7.4, que contenía Triton X-100 al 0.5%, mercaptoetanol 5 mM e inhibidores de proteasa. Luego se centrifugó a 4 °C ($14\ 000 \times g$ durante 5 min) y fue transferido el sobrenadante a un tubo nuevo.

Se agregaron 20 µL de la muestra por pozo en tres repeticiones y se siguieron las instrucciones del “kit” para la preparación de la placa, la cual se incubó a 20-25 °C durante 30 min y luego se cuantificó la absorbancia a 450 nm.

La actividad de SOD (unidades/mL) se analizó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{SOD (unidades/mL)} = \frac{(\text{MuestraLSR} - \text{intercepto}) \times 10 \times \text{DF}}{\text{pendiente}}$$

Donde:

MuestraLSR = Tasa de SOD linearizada de la muestra

DF = Factor de dilución.

5.5 Microscopía de transmisión para determinar ultraestructura

Con la finalidad de corroborar la interacción de las cápsulas con las células, se realizaron tratamientos a 25 y 30 μM por 1, 3, 6, 9 y 24 h, analizado por microscopía electrónica de transmisión (MET).

Para ello se realizó una primera fijación a temperatura ambiente en una mezcla de paraformaldehído 4% y glutaraldehído 2.5 % durante 2 h y amortiguador de fosfatos pH 7 (PBS). Post fijación en tetraóxido de osmio al 1% durante 90 min, se lavaron tres veces durante 10 minutos cada uno, para posteriormente deshidratar gradualmente en etanol (30, 50, 70, 90, 96 y 100%; 10 min en cada concentración). Las células se lavaron tres veces con óxido de propileno por 10 min y se colocó en una mezcla 1:1 de óxido de propileno/resina epóxica (Epon) durante 24 h. Las muestras se dejaron destapadas a temperatura ambiente para la evaporación del óxido de propileno y se incluyeron en resina Epon de dureza media y se colocaron en una estufa a 60 °C para su polimerización (48 h). Después, fueron obtenidos cortes semifinos (300-500 nm) que se tiñeron con azul de toluidina para realizar una exploración preeliminar.

Posteriormente, se tiñeron 10 min con acetato de uranilo y 10 min con citrato de plomo para la observación al microscopio de transmisión JEOL 1010 (JEOL, Peabody, MA, USA).

5.6 Análisis de la morfología

Para el análisis morfológico de ER, se cultivaron 60 mil células en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina:agua destilada (1:10) a un volumen de 900 μL por 24 h a 37°C con humedad a temperatura ambiente.

Posteriormente, se hicieron los siguientes tratamientos: como testigo negativo se usó medio de cultivo, testigo positivo tunicamicina a 4 μM por 24 h, cicloheximida 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (≥ 98 % de pureza, Sigma) como inhibidor de la síntesis de proteínas, aplicado 2 h antes de la exposición a cualquier otro protocolo experimental (Kim et al., 2014) y N-acetilcisteína, NAC, en 10 mM, un pretratamiento de 30 min previo a la exposición a la fracción nano del plaguicida (Castro-Gálvez et al. 2019).

La concentración de 25 μ M del plaguicida fue probada con y sin cicloheximida y NAC. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes, y las imágenes digitales fueron analizadas por medio de microscopio Leica con el programa LASX.

5.7 Análisis de la expresión de genes relacionados con el estrés a retículo endoplásmico

5.7.1 Extracción de ARN

Para corroborar cuáles de los “sensores” de la RERE, interleucinas inflamatorias y genes de respuesta a estrés oxidante están asociados a la exposición al plaguicida, se analizó la expresión de 8 genes en las células bronquiales NL-20 a 25 y 30 μ M con y sin NAC. Estos fueron: PERK, ATF6, IRE1, BiP, CHOP, NRF2, HMOX-1 e IL-6, utilizando como gen constitutivo a GAPDH.

Las secuencias e los iniciadores se presentan en la cuadro 3.

Cuadro 3. Secuencias de iniciadores de genes evaluados (5'-3')

Genes	“Forward”	“Reverse”
GADPH	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTC-3'	5'ATGAAGGGGTCATTGATGGCA-3'
PERK	5'TACATATGGACTCAGTGCATAT-3'	5'-CGTCACTATCCCATTGGCG-3'
ATF6	5'-CAGACATTTGGGACATCAAC-3'	5'-TGACCGAGGAGACGAGACT-3'
IRE1	5'-GCAGGTCCCAACACATGTG-3'	5'TCTTGCTTCCAAGCGTATACA-3'
BIP	5'-GAACGTCTGATTGGCGATGC-3'	5'ACCACCTTGAACGGCAAGAA-3'
CHOP	5'-CCTATGTTTCACCTCCTGGA-3'	5'-CAGCCAAGCCAGAGAAGCA-3'
HMOXI	5'-CAAAGTGCAAGATTCTGCCC-3'	5'-TGTAAGGACCCATCGGAGA-3'
NRF2	5'-CAGGTTGCCACATTCCCAA-3'	5'AACGTAGCCGAAGAAACCTC-3'
IL-6	5'-ATCTCAGCCCTGAGAAAGGA-3'	5'-CCATCTTTGGAAGGTTTCAGG-3'

Posteriormente a la exposición de 90,000 células a la fracción del plaguicida en placas de 24 pozos (3 pozos por tratamiento), se añadieron 300 μ L de Trizol a cada uno. Cada medio de

lisis fue resuspendido y colocado en microtubos de 1.5 mL, se añadieron 500 μ L de cloroformo a cada tubo y, a continuación se dejó reposar por 5 min.

Posteriormente, se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min a 4 °C, la fase acuosa se separó y colocó en un nuevo microtubo. A manera de favorecer la precipitación del RNA se añadió 1 μ L de gluógeno y 200 μ L de isopropanol, y se dejó reposar por toda una noche a 4 °C.

Subsiguientemente se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en etano al 70%, se volvió a centrifugar a 7500 rpm por 10 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se dejó secar hasta su totalidad.

El “botón” de RNA se resuspendió en agua estéril libre de ARNasas, se cuantificó en un equipo Genova Nano (Jenway).

5.7.2 Reacciones RT-qPCR

Posteriormente a la cuantificación de RNA, se realizó la síntesis de cDNA usando los siguientes reactivos: 5X amortiguador de reacción, inhibidor RNasa “RiboLock” 20 U/ μ L, dNTP 10mM, transcriptasa reversa 200 U/ μ L, Oligo dT y agua estéril, para llegar a un volumen final de 20 μ L. Las condiciones experimentales que se usaron con el termociclador fueron 42 °C por 60 min y una temperatura final de 70 °C por 5 min.

El PCR en tiempo real se realizó a un volumen final de 20 μ L usando Sybr Green. Se colocaron 2 μ L de los oligos “reverse” y “forward” a 5 μ M , ROX 1:20, 2 μ L de cDNA y agua libre de ARNasas.

Como testigo de contaminación, presencia de dímeros o estructuras secundarias del iniciador, se realizó a la par un control NTC, el cual no tiene cDNA.

El termociclador operó con un programa de 10 min a 95 °C por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 58 °C, y un ciclo final de 30 s a 95 °C, 30 s a 65 °C y finalmente 30 s a 95 °C.

Finalmente los resultados fueron analizados con la función $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para evaluar los cambios de expresión de los genes (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

5.8 Inmunofluorescencia de BiP y SOD1

Para corroborar la expresión de las proteínas BiP y SOD1 en células NL-20 con y sin NAC, se realizaron inmunotinciones. Se cultivaron 60,000 células en una placa de 6 pozos expuesta a 25 y 30 μM del plaguicida, en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina. Después de 24 h de tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 20 min, seguido de tres lavados con PBS. Se llevó a cabo una permeabilización con Triton X-100 al 0.2% por 30 min. Posteriormente, se efectuaron tres lavados con PBS, otros tres lavados con Glicina 50 mM para remover el fijador y tres lavados más con BSA al 0.1% en PBS suplementado con suero de cabra al 10 % por 1 h.

Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y se añadieron 25 μL de los anticuerpos primarios [1:100]: anticuerpos Anti-GRP78/BIP y Anti-SOD1, seguido de una noche de incubación a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, las células se lavaron tres veces en PBS-Tween X-100 0.05% y finalmente, 25 μL del anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Flour 594, diluido [1:200] en PBS durante 1 h. El exceso de anticuerpo se eliminó con tres lavados de Tween X-100 al 0.05 % en PBS durante 5 min cada uno. Como testigo positivo para Bip se utilizó butirato de sodio a 8 mM. Las células se montaron con Vectashield y se analizaron con un microscopio de fluorescencia Leica DMi8.

5.9 Estandarización de la prueba de Micronúcleos

Se cultivaron 60 mil células en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina:agua destilada (1:10) a un volumen de 900 μL por 24 h a 37 °C con humedad en el ambiente. Posteriormente, se expusieron a las concentraciones establecidas del plaguicida (5, 10, 15 y 20 μM) con medio de cultivo como vehículo por 24 h.

A las 48 h se adicionó la citocalasina B (Cyt-b) a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Chandra y Navak, 1996; Cervena et al., 2016; Roszak et al., 2016) por 28 h.

A las 72 h se trató el cubreobjetos con metanol puro frío por 5 min, se descartó y una vez secas se sumergieron en colorante Giemsa previamente filtrado en amortiguador (1:30) entre

1-2 min para el análisis de los índices. Para el análisis de micronúcleos y genotoxicidad en general se utilizó DAPI mediante el medio de montaje Vectashield.

Finalmente, se observaron al microscopio óptico con el aumento de 400X para determinar los índices y con microscopía de fluorescencia para el análisis de genotoxicidad.

5.9 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, con 95% de confianza, seguida de la prueba post hoc Newman-Keuls para confirmar las diferencias entre grupos. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas a un valor de $p \leq 0,05$.

Todas las pruebas se realizaron utilizando el software Statistica 10.0. Los gráficos y cuadros se reprodujeron utilizando Microsoft Excel 2011 e Illustrator CC (22.x), respectivamente.

VI. Resultados

6.1 Caracterización física

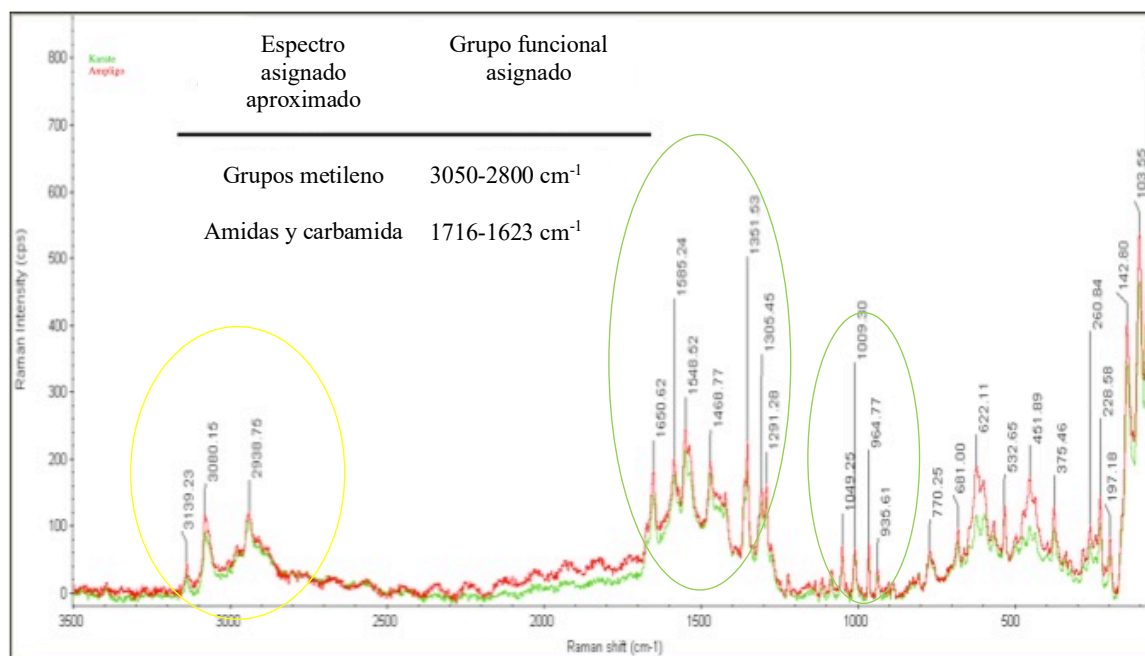


Figura 2. Espectro RAMAN a 780 nm de la nanocápsula del plaguicida Karate. En círculo amarillo se muestran los espectros identificados con los grupos funcionales carbonil y amida. En verde grupos funcionales no identificados pero asociados con metileno.

La caracterización física de los nanomateriales es esencial para determinar su comportamiento al interactuar con sistemas biológicos, relacionar “anomalías” en los resultados encontrados con diferentes técnicas de laboratorio, y poder diferenciar, predecir y complementar el entendimiento del proceso por el cual pueden estar induciendo algún daño genético.

El espectro RAMAN permite identificar la composición química de una molécula, a partir de la excitación fotónica de los estados vibracionales de un elemento. Dicha vibración es única de los grupos funcionales o enlaces que registra el espectro, similar a una huella dactilar. En este proyecto se identificaron dos grupos funcionales cercanos en la cápsula del

plaguicida, el carbonil con espectros entre 1615 cm^{-1} y el amida que juntos coinciden con un espectro de enlace tipo urea (Fig. 2) (Hill et al., 1984; Coscos et al., 2007).

Este espectro se mantiene constantemente alto, indicando que se tiene una composición de poliurea.

Por otro lado, también se encontraron dos picos alrededor de 2735 y 399 cm^{-1} (Fig. 2) que se mantenían constantes al modificar las condiciones generales, lo cual muestra grupos no identificados presentes en la composición de las cápsulas.

Cuadro 4. Propiedades físicas de las nanocápsulas del plaguicida Kárate

		HDD (nm)	PZ (mV)	IPD	A ₂
Karate	NEF	753 ± 34	-44 ± 11	0.091	0

El tamaño promedio de las nanocápsulas en Karate 753 nm . El PDI representa la amplitud de la distribución de tamaños en la muestra. Por lo tanto, un $PDI \geq 1$ no es adecuado para la medición, ya que indica variedad de tamaño en la muestra. Un $PDI \leq 0,7$ se considera ideal. Como se evidencia, las nanofracciones tienen la mayor homogeneidad, por lo que se supone que la separación de fases se realizó de manera óptima. El segundo coeficiente virial (A₂) calcula la interacción soluto-disolvente: $A_2 < 0$ representa un mal disolvente, $A_2 > 0$ buen disolvente y $A_2 = 0$ un disolvente ideal. Para el plaguicida se obtuvo un A₂ ideal, permitiendo deducir que las nanocápsulas con agua producen una suspensión estable.

El potencial Z permite conocer las propiedades electrocinéticas de las cápsulas y su estabilidad en el disolvente, de esta manera se sabe si las partículas tenderán a agregarse o no.

Se considera que las partículas son estables cuando superan los valores de $+40\text{mV}$ y -40mV ; se obtuvo un valor negativo (Cuadro1) que representa la carga neta de las cápsulas, y valores mayores a -44 cm^{-1} . Ambos parámetros establecen que las cápsulas tienen carga negativa y son estables, por lo que no tienden a agregarse formando cúmulos.

6.2 La fracción nano del plaguicida induce estrés oxidante

La exposición a la fracción nanométrica aumentó la actividad de SOD1 y los niveles de súper óxido en cada concentración de forma dependiente. SOD1 aumentó considerablemente la actividad a 20 mM, pero a 30 mM no hubo detección ya que el límite más bajo de detección del “kit” es de 0.3 unidades SOD/mL, la densidad óptica obtenida para 30 mM fue menor, lo que indica que hubo una gran cantidad de SOD1 presente cuando se exponen a las nanocápsulas. Sin embargo, cuando se agregó NAC, los niveles disminuyeron significativamente y se mantuvieron estables en todas las concentraciones (Fig. 3).

Un comportamiento similar se observó con los niveles de súper óxido, el aumento de las especies reactivas se eleva con la concentración, pero se reduce significativamente cuando se agrega NAC.

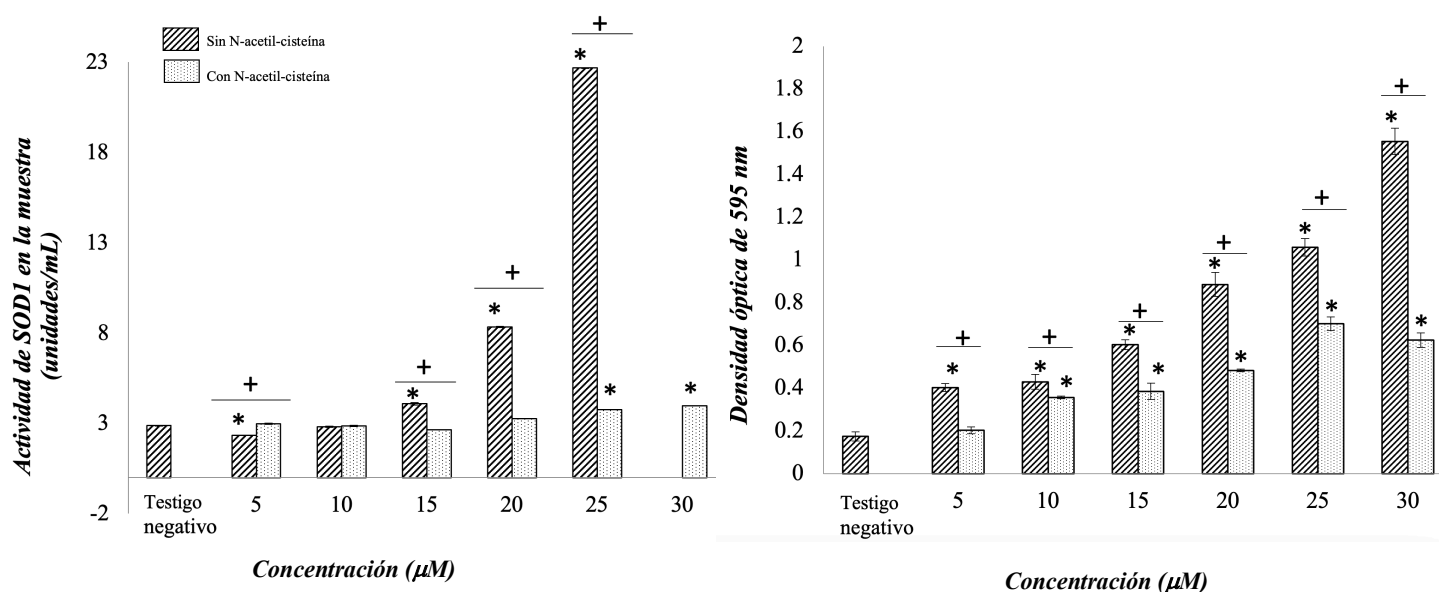


Figura 3. Producción de especies reactivas de oxígeno y actividad de SOD1. El panel izquierdo muestra la actividad de SOD1. El panel derecho indica la producción de súper óxido medida por el ensayo NBT (“nitro blue tetrazolium”). La densidad óptica (DO) se cuantificó a 595 nm. Cada barra representa la media de la expresión de cambio \pm EE de una serie por triplicado de 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ denota diferencias significativas con respecto al testigo, y + diferencias significativas entre grupos con y sin NAC, que se evaluaron mediante un ANOVA unidireccional y una prueba post-hoc de Newman-Keuls para confirmar las diferencias entre los grupos.

Asimismo, se ve incrementada la expresión de los genes involucrados en la respuesta al estrés oxidante NRF2 y HMOX1 (Fig. 4), cuando se agregan las nanocápsulas, sin embargo, cuando se adiciona NAC hay una disminución en su expresión. La expresión y localización de la SOD1, cambia a medida que aumenta la concentración: se localiza en el núcleo (Fig 4, B-C), pero en presencia de NAC permanece en el citoplasma.

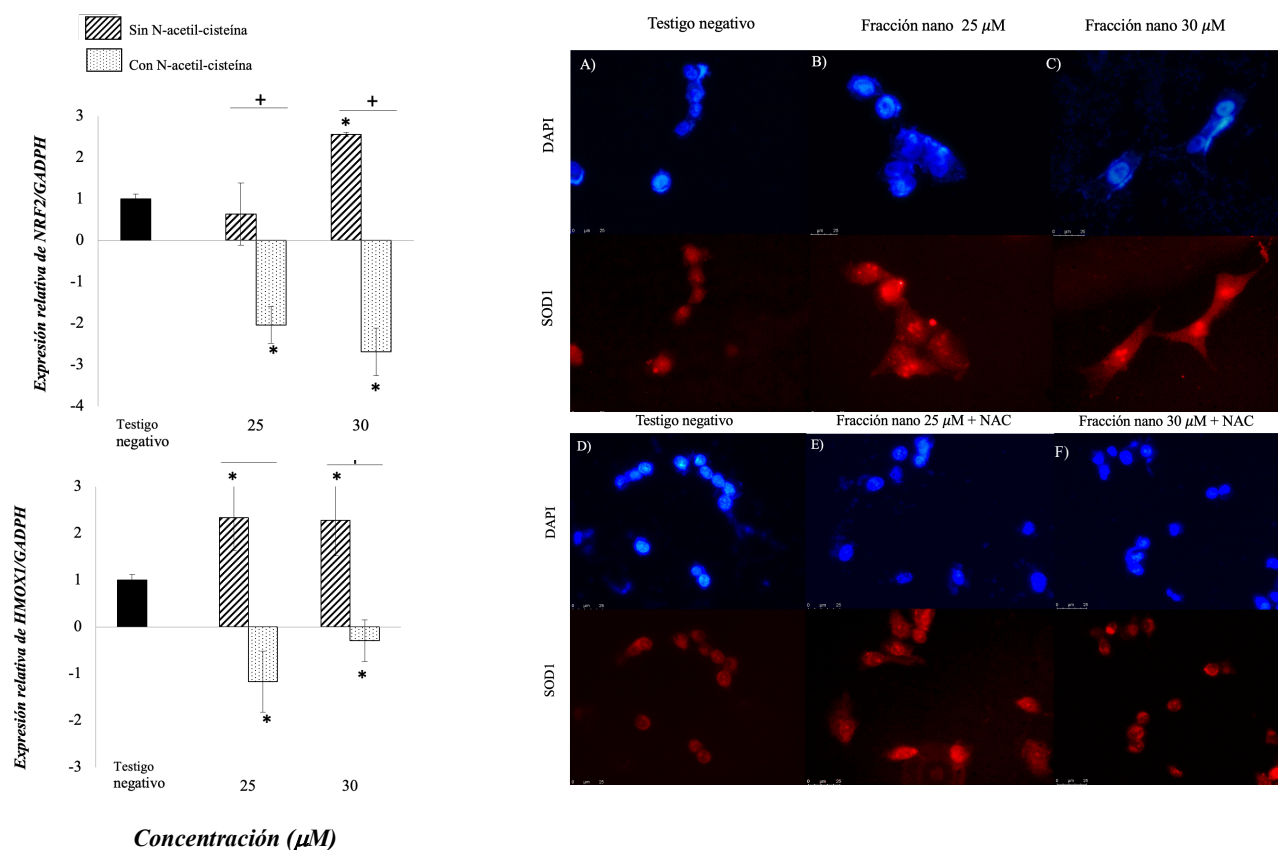


Figura 4. Estrés oxidante producido por la fracción nano. Lado izquierdo a, b) Aumenta la expresión de NRF2 y HMOX1 cuando se expone al plaguicida, sin embargo, hay disminución significativa cuando se agrega la N-acetil-cisteína (NAC). Cada barra representa la media de la expresión de cambio \pm EE. de una serie por triplicado de 3 experimentos independientes. * $P \leq 0.05$ denota diferencias significativas con respecto al testigo, y + diferencias significativas entre los grupos que se evaluaron mediante un ANOVA unidireccional y la prueba post-hoc de Newman-Keuls para confirmar dónde ocurrieron las diferencias entre los grupos. Lado derecho, micrografías representativas de grupos experimentales: núcleos teñidos con DAPI; canal azul x40 e inmunofluorescencia positiva anti-SOD1; canal rojo x40 A) Testigo, B) Nanofracción 25 μM C) Nanofracción 30 μM , sin NAC. D) testigo, E) Nano fracción 25 μM y F) Nanofracción 30 μM con NAC. La barra de escala es de 25 μm es común para todas las micrografías.

6.3 Análisis Ultraestructural por MET

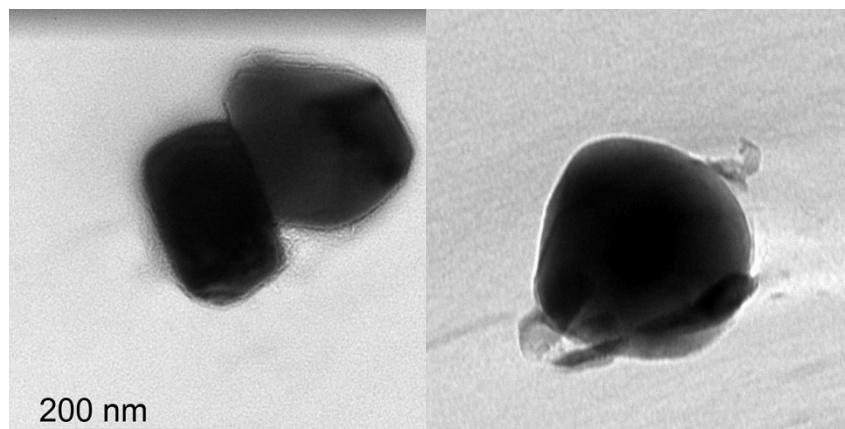


Figura 5. Nanocápsulas de plaguicida observadas con contraste de osmio observadas por MET.

Para poder determinar la vía de entrada en la célula, se probó la concentración de 25 μM a diferentes periodos de tiempo, siendo a las 2 h cuando se logró detectar macropinocitosis, observándose una clara extensión de la membrana alrededor de las cápsulas (Fig. 6, c-d) y endocitosis mediada por clatrina (Fig. 6, e-f), donde se logra apreciar una típica formación de clatrina alrededor del “bolsillo” endocítico.

Esta evidencia prueba que las cápsulas no sólo entran en contacto con la célula, sino que también ingresan a ella, pudiendo inducir su daño desde las 2 h de exposición.

A la misma concentración por 6 h se logró observar un cambio en la morfología de la célula, pudiéndose encontrar vesículas, y dilatación tanto del retículo endoplásmico como de la mitocondria, característica importante del estrés de retículo (Fig. 6, g-h).

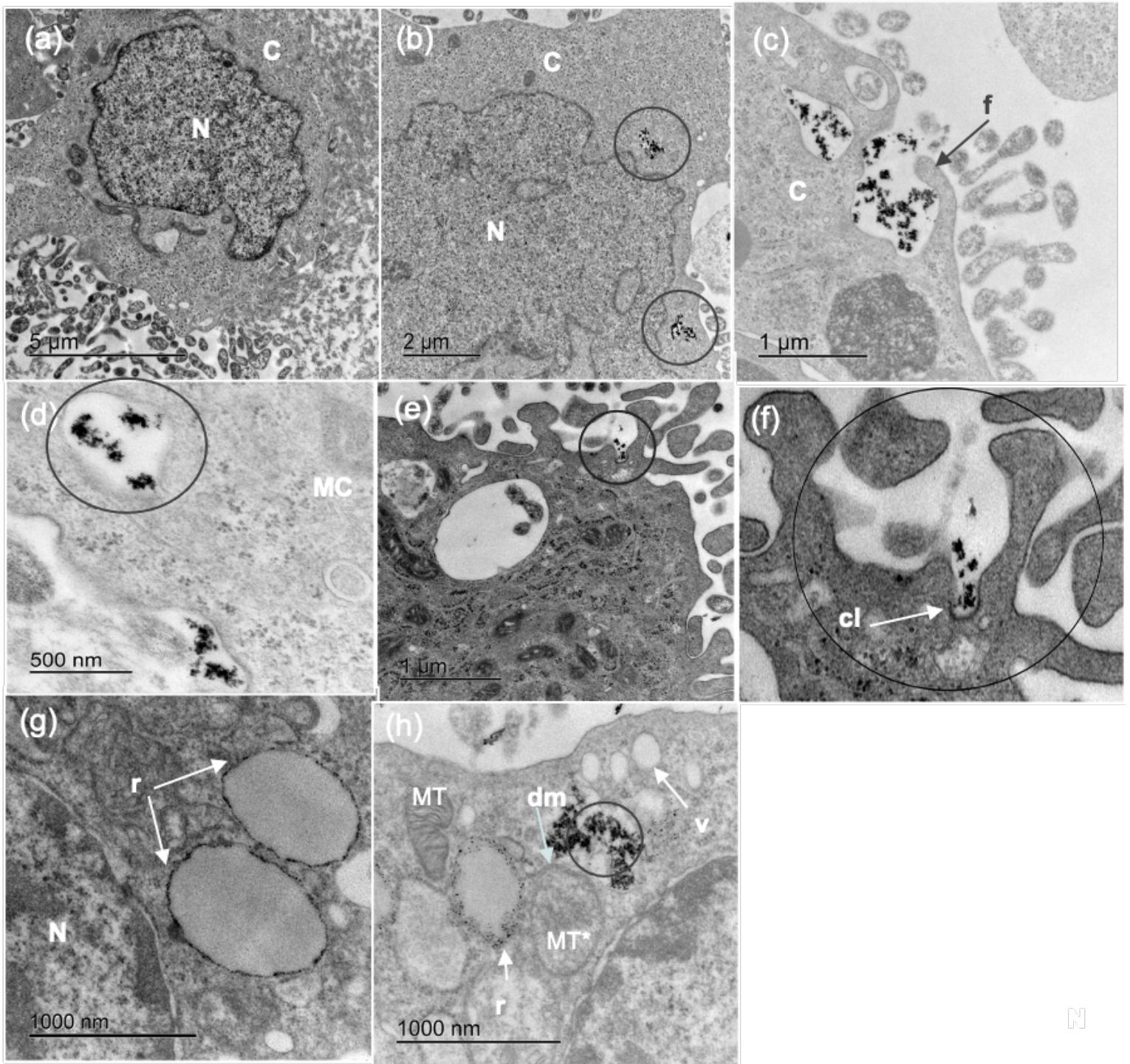


Figura 6.

Análisis ultraestructural por MET. (a) Estructura de célula tratada únicamente con medio Ham F-12, en la que se observa el núcleo (N), la membrana citoplasmática y el citoplasma (C) íntegros. En (b) muestra la célula tratada con fracción nano a 25 μ M por 1 h, se observa a las cápsulas dentro del citoplasma. En (c), (d) se notan fagosomas que evidencian un ingreso de las cápsulas por fagocitosis, cada vesícula tiene su propia membrana y la flecha indica la extensión del citoplasma para ingresar a las cápsulas. En (e), (f) se observa el ingreso de las cápsulas por pinocitosis por medio de clatras (cl), la flecha indica la condensación típica de éstas en la zona donde está sucediendo el ingreso a la célula. En (g), (h) se presenta morfología de la célula tratada con fracción nano a 25 μ M por 6 h, en la que se advierte el retículo endoplásmico (r) dilatado con los ribosomas en la periferia, las mitocondrias (MT)

igualmente dilatadas reconocidas por su doble membrana (dm) con las crestas en degeneración (MT*), Asimismo, se comienzan a distinguir la formación de vesículas (v), en los círculos percibiéndose la presencia de las cápsulas.

6.4 Morfología

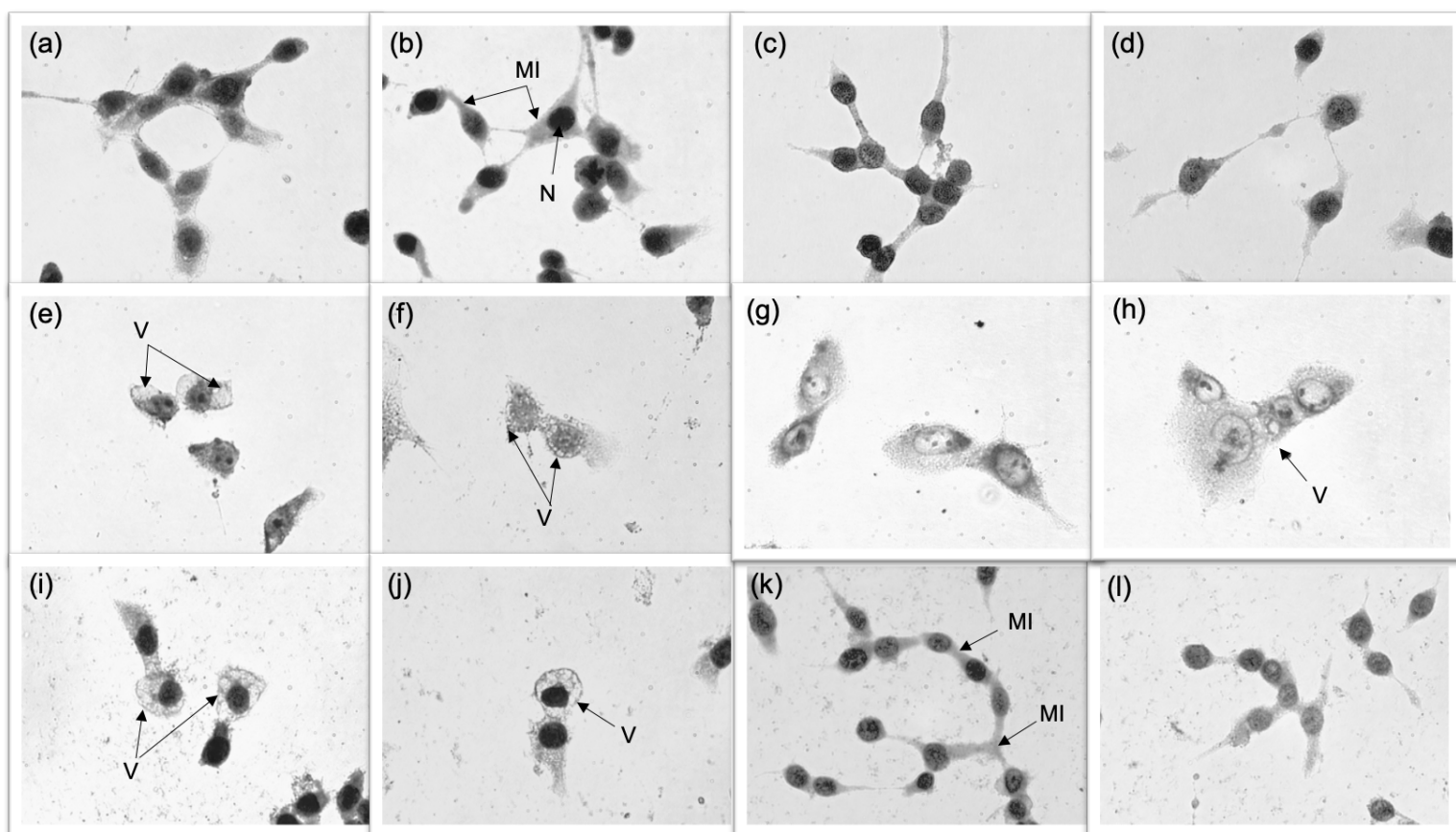


Figura 7. Análisis morfológico mediante microscopía de campo claro. (a)-(b) Corresponden a los testigos negativos, células NL-20 cultivadas con medio Ham F-12 en las cuales se observa la membrana celular íntegra (MI) y el núcleo (N). (c)-(d) Células tratadas con N-acetil cisteína a 10 mM. (e)-(f) Tratamiento con la fracción nano a 25 μ M por 24 h en la que se observa la presencia de numerosas vesículas (V). (g)-(h) Testigo positivo con tunicamicina a 4 μ M en la que se evidencia la membrana con vesículas. (i)-(j) Células tratadas con 2 h de cicloheximida a 20 μ M previas al tratamiento con la fracción nano en un total de 24 h. (k)-(l) Tratamiento con N-acetil cisteína a 10 mM 30 min antes del tratamiento con fracción nano por 24 h en total.

Todas las fotos fueron tomadas a 60X.

Para el análisis morfológico se comparó el fenotipo de las células expuestas a 25 μ M del plaguicida por 24 h con y sin cicloheximida y NAC, con el fin de determinar si existía una inhibición del fenotipo de ER y de manera indirecta deducir qué estímulo estaba induciendo la RERE. Como testigo positivo se utilizó tunicamicina. Los resultados mostraron que la RERE no se debe al descontrol en la síntesis de proteínas que corresponde a la respuesta típicamente descrita, ya que la cicloheximida no fue capaz de recuperar el fenotipo en presencia de las nanocápsulas del plaguicida (Figs 7, i-j), pero el fenotipo celular se recuperó en presencia de NAC, aún en presencia de las nanocápsulas del plaguicida (Figs 7, k-l), lo que corrobora que la RERE se debe a la inducción de estrés oxidante.

6.5 RT-qPCR de genes que participan en la RERE

Los cambios morfológicos observados en el RE de las células expuestas a las cápsulas sugieren que un mecanismo ERSR podría estar en curso en estas células. Para confirmar esta posibilidad, se evaluó la expresión de genes que participan en la RERE mediante RT-qPCR a 25 y 30 μ M del plaguicida durante 24 h. Se observaron niveles de expresión aumentados de los genes BIP, PERK, ATF6, CHOP, IRE1 e IL-6 en las células, que fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en comparación con los niveles observados en las células de testigo (Fig. 7, a-f) en ambas concentraciones, siendo IRE1 α el sensor que se activa desde la concentración de 25 μ M.

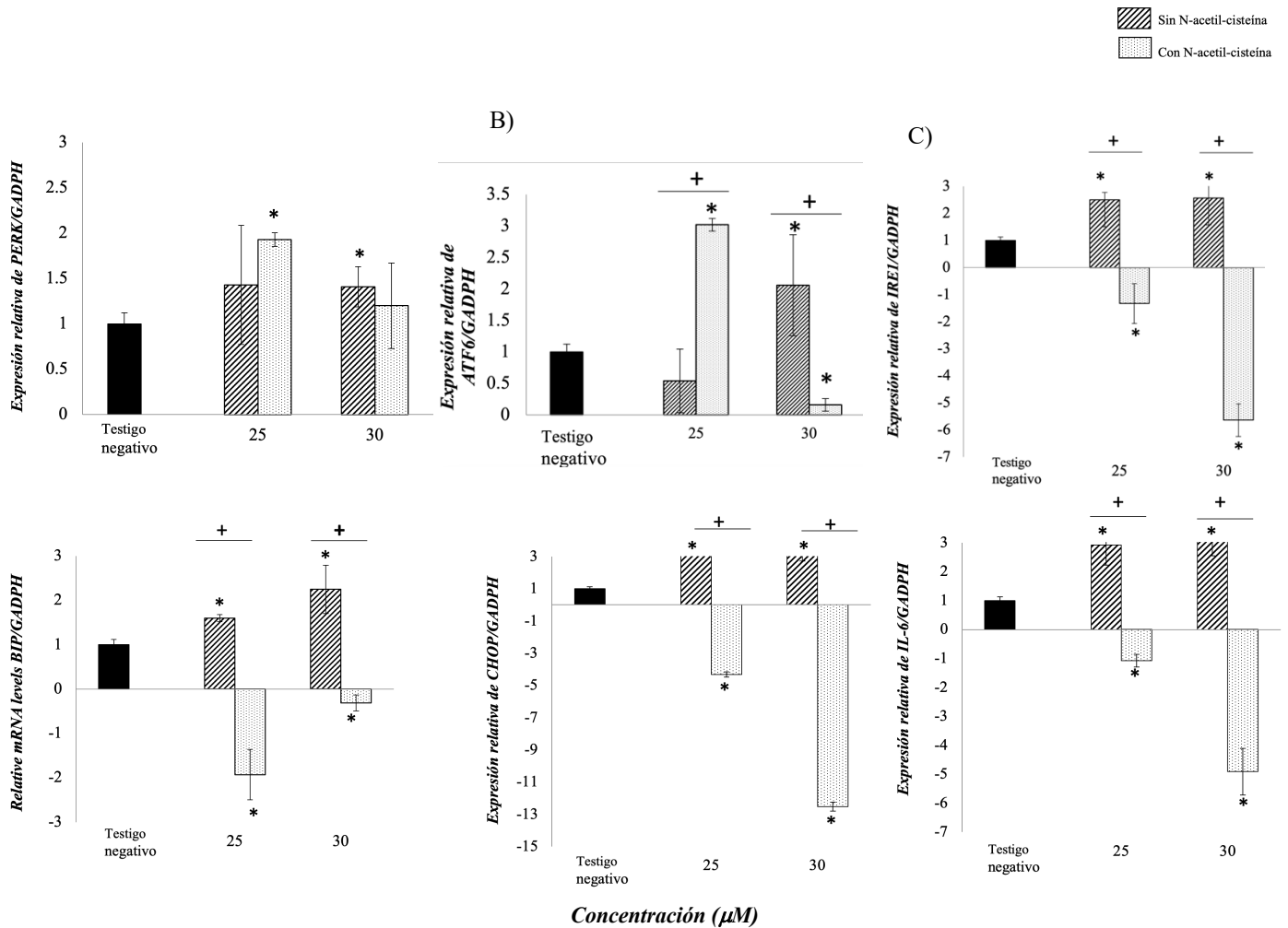


Figura 8. Niveles de expresión relativos de genes relacionados con la ERSR por RT-qPCR con y sin NAC. A) PERK, B) ATF6, C) IRE1, D) BIP, E) CHOP, F) IL-6. Cada barra representa la media de la expresión de cambio de pliegue \pm err. de una serie por triplicado de 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ denota diferencias significativas con respecto al testigo, y + diferencias significativas entre los grupos que se evaluaron mediante un ANOVA unidireccional y una prueba post-hoc de Newman-Keuls para confirmar dónde ocurrieron las diferencias entre los grupos. Los cinco genes asociados a la RERE se encontraron con un aumento en sus niveles de expresión después de la exposición al plaguicida.

Para corroborar la expresión de la proteína BiP, se realizó una inmunofluorescencia (Fig.9) a 25 y 30 μM del plaguicida durante 24 h con y sin NAC. Se observa un incremento en la distribución heterogénea de la proteína en la exposición al plaguicida sin NAC, mientras que en su presencia, la tinción decrece y presenta un patrón más homogéneo (Fig 9) ésta se vuelve más homogénea y disminuye.

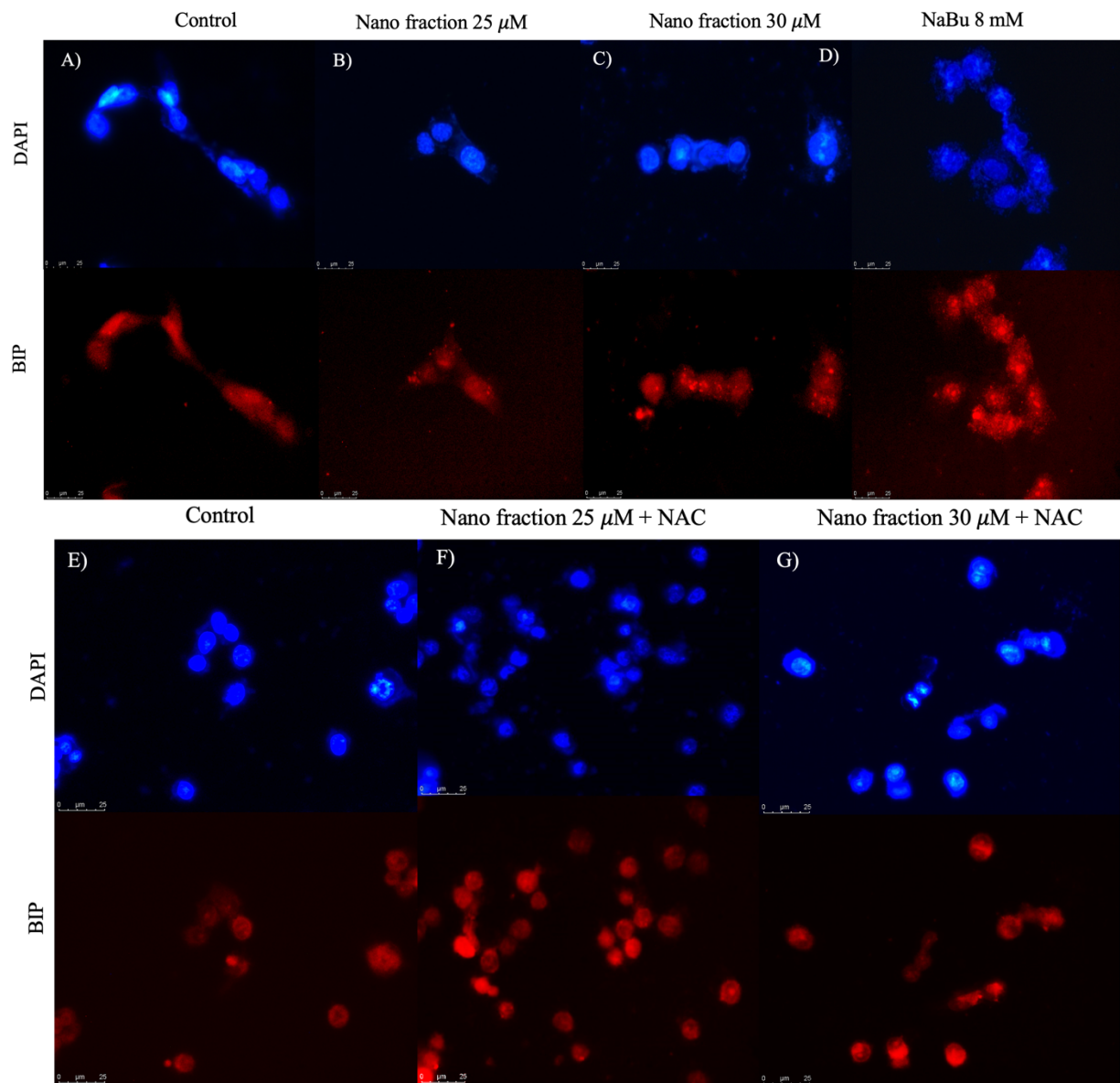


Figura 9. Micrografías representativas de grupos experimentales: núcleos teñidos con DAPI; canal azul x40 e inmunofluorescencia positiva anti-BIP; canal rojo x40 A) Testigo, B) Nano fracción 25 μM C) Nanofracción 30 μM , sin NAC. D) testigo positivo, butirato de sodio 8 mM sin NAC. E) Control, F) Nanofracción 25 μM y g) Nanofracción 30 μM con NAC. La barra de escala es de 25 μm es común para todas las micrografías.

6.6 Análisis genotóxico

Para la evaluación de la genotoxicidad se utilizó la prueba de MN con su variante de bloqueo de citocinesis. El cuadro 5 muestra la frecuencia promedio de MN, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares cuantificados en 3000 células binucleadas expuestas a las nanocápsulas del plaguicida. El plaguicida aumentó la frecuencia de MN y los brotes nucleares a 15 y 20 μM en comparación con el testigo negativo, los brotes nucleares a 15 y 20 μM también se incrementaron, pero no hubo presencia de puentes nucleoplásmicos en ninguna concentración.

Con el fin de dilucidar si el daño en el ADN se produjo por el estrés oxidante inducido por el plaguicida, se realizó la prueba con la adición de NAC. En la Cuadro 6 se muestran los resultados donde se presenta la reducción del número de brotes nucleares, pero no de MN. Esto puede indicar que la fragmentación del ADN puede ser inducida por otra fuente. Para abordar esto, se analizó la ultraestructura de las células a 25 μM durante 3 h para encontrar si las nanocápsulas estaban en el núcleo. La figura 10 muestra las nanocápsulas dentro del núcleo, lo que puede indicar que también existe una interacción directa de la cápsula con el ADN, lo que posiblemente significa que el daño que se visualiza en el cuadro de MN se produce directamente.

En el caso de los índices, las nanocápsulas redujeron el ritmo de división (Cuadro 7) a 10,15 y 20 μM . Sin embargo, al agregar NAC (Cuadro 8) el ritmo se restableció a la normalidad, es decir que las nanocápsulas podrían estar modificando el ciclo celular de las células.

Cuadro 5. Frecuencias de micronúcleos, puentes nucleoplasmáticos y brotes nucleares en células binucleadas de linfocitos tratados con las diferentes concentraciones de las nanocápsulas de Karate.

* Indica diferencias significativas en comparación con el testigo negativo (P<0,05). FN

		MN Media ± DE	Puentes Nucleoplasmáticos Media ± SD	Brotos Nucleares Media ± DE
Pesticide	Concentracion (µM)	NF	NF	NF
Karate	Testigo negativo	3.3 ± 0.5	0 ± 0	0.6 ± 0.57
	Testigo positivo	32 ± 4.5*	1 ± 1	4.3 ± 0.57*
	5	9.3 ± 3.2*	0 ± 0	4.0 ± 2.64
	10	10 ± 2.6*	0 ± 0	3.3 ± 2.8
	15	23 ± 4*	1 ± 1	9.3 ± 2.5*
	20	24 ± 4.7*	0.6 ± 1.1	10.6 ± 5.0*

indica fracción Nano, Micronúcleo (MN).

Cuadro 6. Frecuencias de micronúcleos, puentes nucleoplasmáticos y brotes nucleares en células binucleadas de linfocitos tratados con las diferentes concentraciones de las nanocápsulas de Karate expuestas a NAC.

		MN Mean ± SD	Puentes Nucleoplasmáticos Media ± SD	Brotos Nucleares Media ± DE
Plaguicida	Concentracion (µM)	NF	NF	NF
Karate + NAC	Testigo negativo	5.3 ± 0.5	0 ± 0	0.6 ± 0.57
	Testigo positivo	37 ± 3.6 *	1 ± 1	5.2 ± 0.57*
	5	9.7 ± 2.6	0 ± 0	2.0 ± 2.64
	10	12 ± 2.6*	0 ± 0	5.3 ± 2.8*
	15	27 ± 3.5*	0 ± 0	3.6 ± 2.5
	20	33 ± 2.1*	0 ± 0	3.2 ± 1.3

* Indica diferencias significativas en comparación con el testigo negativo (P<0,05). FN indica fracción Nano, Micronúcleo (MN) y N-acetilcisteína (NAC).

Cuadro 7. Índice de división nuclear (IDN) e índice de proliferación comparativo por bloqueo de citocinesis (IPBC) de la fracción nano en células NL-20 del plaguicida Karate.

		IDN	IPBC
		Media ± DE	Media ± DE
Pesticide	Concentracion (µM)	NF	NF
Karate	Testigo negativo	1.98 ± 0.01	1.97 ± 0.01
	Testigo positivo	2.09 ± 0.01	2.06 ± 0.00
	5	1.96 ± 0.0	1.94 ± 0.00
	10	1.95 ± 0.01*	1.93 ± 0.00*
	15	1.86 ± 0.01*	1.83 ± 0.00*
	20	1.78 ± 0.01*	1.78 ± 0.00*

* Indica diferencias significativas frente al testigo negativo, con una $P < 0,05$. Nanofracción (NF). En este caso, en ambos, los testigos positivo y negativo tienen valores similares ya que la Bleomicina no modifica el ciclo celular.

Cuadros 8. Índice de división nuclear (IDN) e índice de proliferación comparativo por bloqueo de citocinesis (IPBC) de la fracción nano en células NL-20 de Karate expuestas a NAC.

		IDN	IPBC	*
		Mean ± DE	Mean ± DE	
Pesticide	Concentration (µM)	NF	NF	
Karate + NAC	Testigo negativo	1.96 ± 0.01	1.99 ± 0.01	
	Testigo positivo	1.99 ± 0.01	2.00 ± 0.00	
	5	1.99 ± 0.0	2.01 ± 0.00	
	10	1.94 ± 0.01	1.96 ± 0.00	
	15	1.91 ± 0.01	1.94 ± 0.00	
	20	1.95 ± 0.01	1.99 ± 0.00	

Indica diferencias significativas frente al testigo negativo, con una $P < 0,05$. Nano fracción (NF). En este caso, en ambos, el testigo positivo y negativo tienen valores similares ya que la Bleomicina no modifica el ciclo celular.

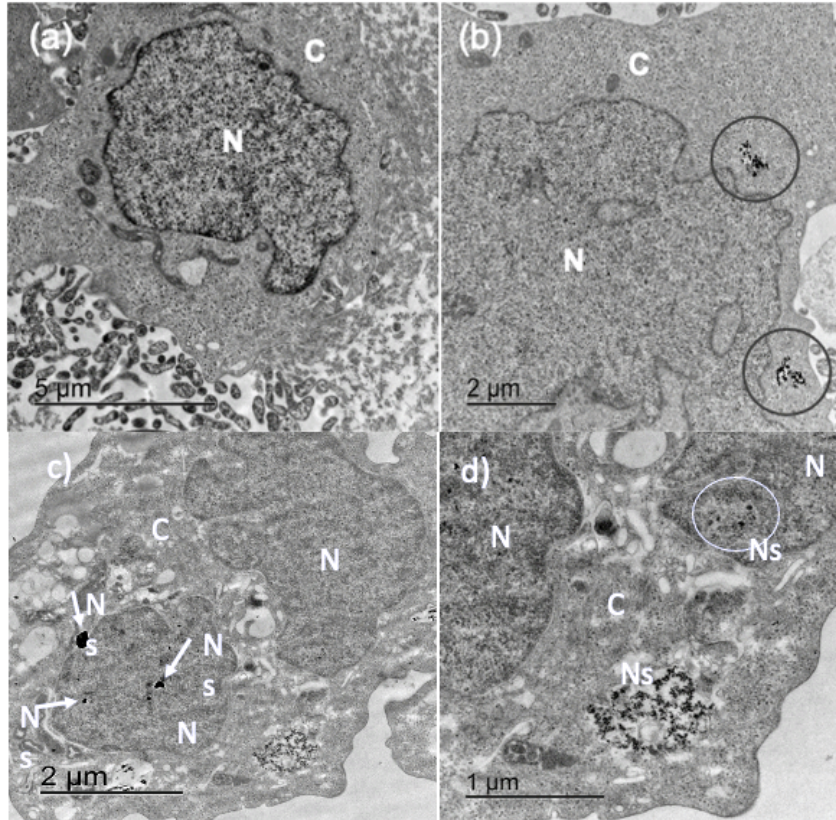


Figura 10. Micrografías representativas del análisis TEM. En (a) las células tratadas con medio, el núcleo (N) y el citoplasma (C) están intactos. En (b) se observan las cápsulas dentro del citoplasma en las células tratadas con nanoplaguicida a 25 μ M por 2 h. En (c-d) se presentan las células tratadas con nanocápsulas a 25 μ M a las 3 h, dentro del núcleo.

VII. Discusión

La aplicación de la nanotecnología en plaguicidas busca mejorar su eficacia en el campo, hacerlos más sustentables y disminuir los efectos negativos en organismos no blanco, solucionando problemas que traen consigo sus presentaciones actuales o micrométricas, y buscando ser el futuro en los productos agroquímicos. Sin embargo, aún queda mucha investigación que hacer en torno a la evaluación de riesgo de nanoplaguicidas antes de determinar si representarían una solución emergente antes que un contaminante emergente. Este trabajo buscó ser pionero en dar el paso inicial en la evaluación del mecanismo molecular por el cual los nanoplaguicidas inducen daño celular y genético en las células de epitelio bronquial.

Como primera actividad, se realizó una caracterización física que demostró que las cápsulas están formadas por polímeros de poliurea formaldehído con carga negativa, lo cual concuerda con la naturaleza química de los enlaces tipo urea. Éstos impiden la agregación, lo cual es consistente con productos que requieren formar soluciones estables para su dispersión evitando que se sedimenten más rápido.

Aunado a ello, la poliurea es un polímero sintetizado a partir de isocianato y poliamina que generan enlaces tipo urea hidrofóbicos (Primeaux, 2004), es persistente a la luz UV, resiste temperaturas hasta los 130°C y es estable en agua, ya que forma redes tridimensionales gracias a sus enlaces tipo urea impermeables (PLY, 2011), lo cual la hace ideal para resistir más tiempo a condiciones extremas al ser asperjado como plaguicida.

Estos resultados concuerdan con la patente EP2822388A1 realizada por la empresa Sapec Agro S.A. quienes desarrollaron una fórmula para mejorar la obtención de un insecticida, usando el sistema de encapsulado similar a la de Zéneca (ahora Syngenta) que contiene poliurea (Neves et al., 2013) y otras empresas que usan estos productos.

A pesar de encontrarse poliurea en la composición de las moléculas, también se hallaron dos componentes extra que no pudieron ser identificados. Éstos podrían explicar la facilidad con

que las cápsulas forman coloides con el agua. En antecedentes realizados en el laboratorio durante el trabajo experimental de la maestría (Paz-Trejo et al. 2022) se encontró que el agua era un buen sistema de dilución de los plaguicidas (a pesar de no ser el ideal), pero tanto el agua como el metanol de naturaleza polar disolvieron mejor a los plaguicidas. Sin embargo, estos resultados muestran que los enlaces tipo urea no permiten generar ningún tipo de asociación con el agua (Malvern, 2004). Aunque el potencial Z y los enlaces de formaldehído sí crean enlaces parciales con los H^+ del agua. Los compuestos no identificados pueden ser clave para comprender la asociación entre las cápsulas y su diluyente.

De manera general, se puede decir que las nanocápsulas, no el ingrediente activo, tienen una carga negativa y una región hidrofílica que permite hacer asociaciones parciales con el agua, sin romper su red tridimensional gracias a sus enlaces tipo urea y que evita la agregación. Esto puede significar que las cápsulas entran en contacto con las células de manera independiente y no como agregados, además su hidrofobicidad parcial le permite entrar en contacto con la membrana e ingresar a la célula, aunque el tamaño (700 nm aprox, para Karate) infiere que únicamente se mantienen “pegadas” a la membrana, permitiendo el ingreso del ingrediente activo directamente sobre la célula.

Esto posiblemente explica la causa por la cual se incrementa el efecto del plaguicida (en comparación con su contraparte micro), ya que la nanocápsula le permite llegar hasta la membrana celular y facilitar su ingreso, aunque de acuerdo a los resultados obtenidos, a pesar de que la teoría dice que no podrían ingresar a la célula (Benelli, 2018), en este trabajo se demostró que son capaces de ingresar hasta el citoplasma.

El ingrediente activo λ -cyhalothrin es un piretroide tiene efecto sobre el sistema nervioso central (NPIC, 2001) e induce estrés oxidante (Naravaneni 2005; Fetoui et al. 2015), razón por la cual el primer análisis ha sido evaluar si la fracción nano induce estrés oxidante.

En los resultados (Fig. 3) se observa la inducción tanto de especies reactivas ($\bullet O_2^-$) como el incremento en la actividad de SOD1, a partir de la concentración de 20 μM de manera significativa. Sin embargo, al agregar N-acetilcisteína (NAC), se reduce considerablemente y se mantiene constante conforme aumenta la concentración. En el caso de la actividad de

SOD1, se obtienen densidades óptimas menores a 0.3 unidades/mL a 30 μ M, las cuáles son tan pequeñas para ser detectadas por el “kit”, pues la disminución de la señal del color es proporcional a la actividad inhibidora de SOD1 (Sigma-Aldrich information, 2021). Con base en lo anterior, es posible asumir que a 30 μ M se está produciendo una actividad elevada que no es posible detectar con el “kit”, la cual disminuye considerablemente al añadir NAC, y regresa a tener una densidad óptica detectable. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con Nitroblue, lo cual significa que se está induciendo un estrés oxidante al exponerse a las nanocápsulas, que se reduce al agregar NAC. El cual es un fármaco que funciona como antioxidante por sí mismo, y que además se une a las cisteínas de glutathione permitiendo su inducción y función, para de esa manera ayudar a equilibrar el estrés redox que se está induciendo en las células (DrugBank, 2022). La disminución de los marcadores SOD1 y superóxido al agregar el NAC, permite corroborar el uso de este agente como reductor del estrés redox en el microambiente celular, y que al ser usado en las pruebas subsecuentes puede revertir el daño genotóxico o celular observado, siempre y cuando éste fuese inducido por estrés oxidante. La reducción de marcadores de estrés oxidante y especies reactivas al adicionar NAC, ya ha sido observada en estudios con pacientes con Alzheimer y fibrosis pulmonar, a los cuales se les administraron tratamientos con NAC induciendo un ambiente protector que redujo la expresión de marcadores de estrés oxidante y apoptosis (Moreria et al., 2007), y recientemente en células mononucleares de sangre periférica humana al adicionar NAC, se redujo considerablemente la respuesta inflamatoria y el estrés oxidante inducido por polisacáridos asociados a diversos patógenos (Bastin et al., 2022).

Aunado a ello, se analizaron dos genes que participan en la respuesta metabólica a estrés oxidante, NRF2 y HMOX-1. El primero, un factor de transcripción involucrado en regular la expresión inducible de varios genes de enzimas desintoxicantes y antioxidantes (Fainstein, 2007), entre ellos el gen de la enzima hemoxigenasa 1 (HMOX-1). Este último encargado de catabolizar los grupos hemo a nivel celular a biliverdina, monóxido de carbono e hierro libre, también se regula fuertemente durante el estrés. Ambos considerados indicadores sensibles y confiables del estrés oxidante celular (Poss y Tonegawa, 1997).

Los resultados muestran que la expresión de ambos genes incrementa diferencialmente a 25 y 30 μ M y disminuyó al agregar NAC. Esto puede estar indicando la activación de una respuesta metabólica al estrés que se está induciendo por las nanocápsulas. Sin embargo la

activación de HMOX-1 posiblemente se está dando gracias a la expresión basal de NRF2 en el citoplasma, sin necesidad de que exista un incremento de su expresión en el núcleo, ya que como se observa en la figura 4, su expresión se eleva a 25 μ M, mientras que NRF2 sólo se eleva hasta 30 μ M. El aumento del mensajero de HMOX-1 puede darse sin el incremento en la NRF2 en el núcleo, puesto que la vía canónica es por co-activación del modulador “thioredoxin-1” (TXNRDI), el cual termina por activar HMOX-1 directamente. Sin embargo, existe otro modulador, BACH1, que al inactivarse permite que los niveles basales de NRF2 en el núcleo sean suficientes para unirse al promotor de HMOX1 y expresarla (Reichard et al. 2007).

A su vez, esto concuerda con la expresión y ubicación de la enzima SOD1 en el citoplasma (Figura 4 A-F), ya que al activarse no sólo incrementa su actividad, sino que se redistribuye heterogéneamente hacia compartimientos específicos cerca de la mitocondria que le permiten ejercer su función, concordando con los resultados y es posible observarlo en la figura 4 en la concentración de 25 μ M. No obstante, a 30 μ M se puede observar un cambio de localización de la enzima, en donde se redistribuye hacia el núcleo (Fig. 4, C). Esta localización al núcleo se ha reportado poco común, ya que únicamente se activa a niveles muy altos de estrés oxidante, en donde la enzima se transporta a núcleo y actúa como factor de transcripción directamente en promotores de genes de resistencia al estrés y mecanismos de reparación de ADN (Tsang et al. 2014). Esta es la primera vez que se observa reporta el cambio de localización, del citoplasma al núcleo por la SOD1, durante este comportamiento en la exposición a nanoplaguicidas, por lo que puede abrir la puerta a futuras investigaciones en torno a ello.

Simultáneamente, al agregar NAC, esta enzima la SOD1 vuelve a distribuirse por el citoplasma de manera agregada, que es la forma en que se encuentra normalmente cuando ejerce su actividad antioxidante (Fig. 4, B, E y F). Este comportamiento cambio de localización celular es importante, ya que abre la oportunidad a futura investigación para determinar si las nanocápsulas pueden inducir la actividad de esta enzima como del factor de transmisión transcripción de SOD1, que, de acuerdo a la revisión bibliográfica exhaustiva realizada en esta investigación, aún no ha sido reportada registrada.

De manera general, estos primeros resultados permiten corroborar la inducción de especies reactivas de oxígeno al exponer al plaguicida conforme aumenta la concentración,

induciendo posteriormente la activación de una respuesta antioxidante incrementada exacerbada, que finalmente deriva en estrés oxidante en las células. Al agregar NAC, el precursor de glutathion, estos niveles disminuyen significativamente, contribuyendo a la hipótesis de que λ -cyhalothrin en células animales induce estrés oxidante.

Para probar esto, se hizo un análisis por medio de MET a 25 y 30 μ M durante 1, 3, 6, 9 y 24 h, con la finalidad de detectar el momento preciso en que las cápsulas entran en contacto directo con la célula. Se observó que a 3 horas las cápsulas ya se encuentran dentro de la célula y se comienza a ver un cambio en la ultraestructura, por lo que se decidió reducir el tiempo a 1 h, en el cual se logró identificar dos formas de ingreso a la célula a 25 μ M (Fig. 6, c-f).

En la primera forma se aprecia claramente una macropinocitosis, la cual es un tipo de endocitosis en la que algunas células rodean con su membrana citoplasmática partículas sólidas y las introducen a la célula. Esto se produce gracias a la emisión de pseudópodos alrededor de la partícula o microorganismos (la cuál se puede observar claramente en la figura 6), hasta englobarla completamente y formar alrededor de él una vesícula (Fig. 6), la cual fusionan posteriormente con lisosomas para degradar el antígeno endocitado, y que se reviste de una membrana propia.

En la segunda forma se aprecia una típica región de la membrana celular llamada depresión revestida de clatrina por pinocitosis, la cual se da con partículas de menor tamaño.

A diferencia de la macropinocitosis, la pinocitosis implica el consumo de pequeñas partículas disueltas y fluido, además es típicamente menor que la primera. Además de ser pequeñas, las vesículas pinocíticas suelen ser de un tamaño uniforme, a diferencia de las vesículas macro que son de forma irregular y grandes que dependen de la partícula que estén ingresando (Behzadi et al., 2017).

Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que la composición de las cápsulas al tener una región hidrofóbica y una hidrofílica, le permite entrar en contacto directo con la célula, y en este caso ingresar hasta el citoplasma. Actualmente se ha generalizado a la macropinocitosis, como la forma más común mediante la cual nanopartículas pueden ingresar a la célula, y su estudio está creciendo ya que puede llegar a tener ventajas terapéuticas

(Means et al., 2021). En este trabajo se corroboró que incluso en plaguicidas, el tamaño nanométrico induce macropinocitosis, contrario a la pinocitosis mediada por clatras, la cual es aún más rara de observar ya que depende principalmente de receptores transmembranales y transportadores específicos (Mettlen et al., 2018), y no tanto por el tamaño como en el caso de la macropinocitosis.

Al encontrar ambas formas de ingreso, se corroboró que no sólo el tamaño de las nanopartículas es importante sino también la composición.

Por otro lado, también se observa cambio en la ultraestructura a partir de las 3 h, pero fue a las 6 h cuando se observó incremento considerable en el tamaño de las mitocondrias, proceso conocido como “biogénesis mitocondrial”, en el cual, la mitocondria al entrar bajo un estímulo específico puede sintetizar parte de sus componentes para generar más de ellas mismas, pero también puede sintetizar proteínas que activen vías antioxidantes que reduzcan el estrés dentro del microambiente mitocondrial modulando la tasa de oxidación de radicales libres, produciendo dilatación de las crestas mitocondriales (Campos, 2013; Jin et al., 2014). En la figura 6 (g-h) se aprecia la dilatación de las mitocondrias y en donde además las crestas se ven destruidas.

Aunado a ello en las mismas imágenes se logra apreciar la dilatación del retículo endoplásmico rodeado de ribosomas, esta morfología es clásica de la respuesta a ER (Siyan Cao y Kaufman, 2014).

El ER se caracteriza morfológicamente por la dilatación del retículo endoplásmico, en ocasiones dilatación de las crestas mitocondriales, citoplasma íntegro con gran número de vesículas y núcleo íntegro sin daño (Sperandio et al., 2000; Lee et al., 2016). En las figuras se logra apreciar dicho fenotipo al tratar las células con los plaguicidas, por lo que se puede asociar, que la entrada de las cápsulas y la liberación del ingrediente activo dentro del citoplasma, induce un fenotipo típico de ER que desencadena una respuesta a RERE, lo cual se verifica por la expresión de los genes “sensores” de la respuesta y que ésta podría estar inducida por estrés oxidante.

La activación de RERE tradicionalmente comienza por proteínas mal plegadas que son detectadas por la proteína chaperona BIP, la cual se encuentra unida a los sensores y al

detectar daño por proteínas se desprende activando la respuesta. Sin embargo, es posible que el daño en las proteínas pueda ser activado por estrés oxidante. De acuerdo con Chong et al. (2017) el exceso en la producción y acumulación de ROS comprometen la respuesta antioxidante de defensa, induciendo un mal plegamiento de proteínas y activando una respuesta, de manera que si se bloquea la síntesis proteica y la respuesta es iniciada únicamente por ello, el fenotipo se recupera. Para corroborar si el estrés oxidante es la causa principal del mal plegamiento de las proteínas u otro estímulo, se utilizó cicloheximida como inhibidor de la síntesis de proteínas para evitar el fenotipo. Los resultados presentados en la figura 7 demuestran que la causa que está iniciando la señalización por mal plegamiento proteico es el estrés oxidante, puesto que al agregar NAC, el fenotipo se inhibe completamente (Fig.7, k-f), mientras que al añadir únicamente cicloheximida no hay una reversión ni inhibición de la morfología (Fig.7, i-j).

Una vez iniciada la respuesta, se pueden activar 3 sensores, PERK, ATF-6 e IRE-1, cada uno desencadenando cascada abajo una respuesta particular. En este trabajo se analizaron 6 genes relacionados con las vías de activación de RERE, iniciando con BIP, los 3 sensores principales y dos genes de respuesta tardía que son CHOP e IL-6.

Como se muestra en la figura 8, la proteína BIP presenta un incremento en su expresión a 25 y 30 μ M, el cual disminuye en presencia de NAC. Esto nos permite corroborar que el inicio de la respuesta es inducido por estrés oxidante al adicionar las nanocápsulas.

Una respuesta similar se observó con con IRE-1 α , CHOP e IL-6 (Fig.8, c,e,f), lo cual significa que la vía que está respondiendo al estrés es por medio de este sensor. A pesar de que a CHOP se le asocia generalmente con PERK, de acuerdo con Hu et al. (2019) la vía de activación de CHOP no es exclusiva de éste, sino que puede ser activada por IRE-1 α y posiblemente desencadena una respuesta inflamatoria dependiente de estrés oxidante, ya que incrementa la expresión de ERO1 α (ER reductasa), la cual cataliza la oxidación de la proteína disulfuro isomerada (PDI), resultando en la producción de H₂O₂ en el RE, activando la respuesta inflamatoria, y concordando con el incremento de la citocina pro-inflamatoria IL-6 que se reportó en este trabajo (Fig. 8, f).

La expresión de PERK y ATF-6 al contrario, muestran una activación diferente ya que los sensores son expresados por el plaguicida y disminuida su expresión al agregar NAC (Fig.8, a,b). Puede significar que los genes incrementan su expresión en coordinación con IRE-1 α por la separación de BIP, pero no debido al estrés oxidante sino por un estímulo diferente, o en co-activación por la separación de BIP (Gardner B et al., 2013).

Se realizó un análisis para conocer la distribución de BIP en la célula, ya que al igual que SOD1, los niveles de BIP se encuentran normalmente en un estado basal, pero durante un estrés puede sufrir su redistribución heterogéneamente en el citoplasma, cerca de las vesículas y en el interior del retículo para unirse a la región hidrofóbica de las proteínas mal plegadas (Alfaro-Valdés et al., 2018). Para corroborar la localización correcta de BIP se llevó a cabo una inmunofluorescencia con y sin NAC a 25 y 30 μ M (Fig. 9), la cual muestra que efectivamente BIP al estar en contacto con las nanocápsulas se redistribuye en cúmulos en el citoplasma y al agregar NAC esa distribución disminuye volviendo a ser homogénea, por lo que con ello se corrobora la participación y relocalización de BIP debido al efecto del plaguicida, y que la razón del acumulamiento de las proteínas mal plegadas podría ser por estrés oxidante.

Finalmente, se realizó la prueba de micronúcleos para evaluar el daño genotóxico inducido por el plaguicida, en la que se consideran los parámetros de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y brotes nucleares, así como los índices de división nuclear (IDN) y de proliferación por bloqueo de citocinesis (IPBC).

En los cuadros 5 y 6 se observan los resultados obtenidos con y sin NAC respectivamente, del daño genotóxico, en los cuales se puede evidenciar un incremento en la cantidad de micronúcleos conforme aumenta la concentración al igual que de brotes nucleares, un resultado esperado y que concuerda con los resultados obtenidos previamente en linfocitos de sangre periférica humana (Paz-Trejo et al., 2022). Sin embargo y de manera interesante, no se presenta reducción en la cantidad de daño al adicionar NAC, lo cual difiere de los resultados encontrados en el caso del efecto citotóxico, por lo que esto sugiere que posiblemente el daño genotóxico no está siendo inducido por estrés oxidante.

Para poder responder esto se analizaron las imágenes de ultraestructura a 3 h a 25 μ M, en las que se logra visualizar a las cápsulas dentro del núcleo de las células (Fig. 10, c-d), lo cual significaría que éstas pueden entrar en contacto con el ADN e inducir el daño directamente por contacto y así explicar que no existe una reducción en la cantidad de micronúcleos al adicionar NAC. En estudios previos se ha demostrado que λ - cihalotrina puede causar alteración en la integridad y fluidez en la membrana celular por estrés oxidante en eritrocitos de rata, así como micronúcleos y citotoxicidad (Fetoui et al., 2015). También se evaluó *in vitro* en linfocitos de sangre periférica humana, encontrando daño genotóxico a través de aberraciones cromosómicas y aumento de la longitud de la cola mediante el ensayo cometa (Naravaneni 2005), e *in vivo* en eritrocitos de médula ósea de rata y epitelio de colon, se describe un aumento de micronúcleos y la dosis, siendo el epitelio del colon más sensible al efecto (Celik et al., 2005). Sin embargo, en este trabajo a pesar de haber encontrado daño genotóxico que concuerda con dichos estudios, no se puede correlacionar con un efecto por estrés oxidante, ya que existe una variable adicional que es la entrada directa de las cápsulas al núcleo y el contacto directo con el ADN, una cualidad que le es permitida por su tamaño nanométrico.

Asimismo, se analizaron los índices de proliferación y se obtuvieron encuentran resultados similares a los obtenidos en estudios previos en linfocitos (Paz-Trejo et al., 2022), donde las células reducen su división al entrar en contacto con las nanocápsulas hasta detenerla. En el presente estudio, al adicionar NAC esta proliferación se restablece, significando que puede ser el estrés oxidante responsable de detener la proliferación, lo cual concuerda con múltiples estudios en diferentes líneas celulares y modelos animales en los que se observa que los piretroides pueden modificar la proliferación celular (Hadnagy et al. 1999), no afectando directamente las moléculas que participan en “check-points”, sino de manera indirecta induciendo algún daño celular o genético que produce un arresto en las células (Carbonell et al., 1989; Barrueco et al., 1992; Hadnagy et al., 1997).

Todos estos resultados nos permiten tener una primera visión general del efecto que pueden estar induciendo los plaguicidas nanométricos. Actualmente se conoce, que los plaguicidas son capaces de conllevar consecuencias negativas a la salud humana, pues han sido asociados con la incidencia de cáncer, enfermedades cardiovasculares, problemas teratogénicos,

complicaciones neurológicas, entre otras alteraciones, en poblaciones humanas expuestas, relacionadas principalmente con la inducción de estrés oxidante (Sule et al., 2022); modificar su forma de dispersión podría representar un riesgo mayor en el medio ambiente y en la salud humana, debido que su forma de acción puede ser mayor o más rápida que lo visto con los productos comerciales convencionales.

VIII. Conclusión

Este estudio es el primero en analizar los mecanismos de daño inducidos por los nanoplaguicidas, en el cual se determinó que el componente principal de las nanocápsulas del plaguicida Karate es poliurea formaldehído el cual (aunado a su tamaño), les permite ingresar a la célula por medio de pinocitosis mediada por clatrin y macropinocitosis.

Una vez dentro de la célula, inducen estrés oxidante que desencadena estrés de retículo y su respuesta al mismo, la cual es mediada principalmente por IRE-1 α que desencadena la activación de CHOP y la citocina pro-inflamatoria IL-6.

A su vez, las cápsulas pueden inducir daño genotóxico tanto de manera indirecta (por estrés) como directa por el contacto de las cápsulas con el ADN, y reducen la proliferación celular dependiente de estrés oxidante.

IX. Perspectivas

El análisis de riesgo de productos nanométricos aplicados a agroquímicos, representa el primer paso en el camino por resolver la duda de si estos productos representarán un daño mayor o menor que sus contrapartes comerciales.

Por ello sería importante profundizar en la investigación en diversas líneas celulares y modelos in vivo, así como profundizar en el efecto que podría tener el estrés oxidante en la mitocondria, y profundizar en la hipótesis de la función de SOD1 como factor de transcripción.

X. Referencias

Alfaro-Valdés, H. M., Burgos-Bravo, F., Casanova-Morales, N., Quiroga-Roger, D. y Wilson, C. A. (2018). Mechanical Properties of Chaperone BiP, the Master Regulator of the Endoplasmic Reticulum. En (Ed.), Endoplasmic Reticulum. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82080>

APVMA. Regulatory considerations for nanopesticides and veterinary nanomedicines. [en línea] 2014 [fecha de consulta:10/02/2022] Disponible en: <http://apvma.gov.au/sites/default/files/docs/report-draft-regulatory-considerations-nanopesticides-veterinary-nanomedicines.pdf>

Barrueco, C., Herrera, A., Caballo, C., De la Peña, E. (1992). Cytogenetic effects of permethrin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 7(6),433–437. <https://doi.org/10.1093/mutage/7.6.433>

Bastin, A. R., Nazari-Robati, M., Sadeghi, H., Doustimotlagh, A. H., y Sadeghi, A. (2022). Trehalose and N-Acetyl Cysteine Alleviate Inflammatory Cytokine Production and Oxidative Stress in LPS-Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Immunological Investigations*, 51(4), 963-979. <https://doi.org/10.1080/08820139.2021.1891095>

Benelli G. (2018) Model of action of nanoparticles against insects. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 12329-12341. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1850-4>

Behzadi, S., Serpooshan, V., Tau, W., Hamaly, M., Aikawareek, M. y Dreaden, E. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chemistry Society Review* 46(14), 4218-4244. <https://doi.org/10.1039/C6CS00636A>

Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P. y Marcos, R. (2011). Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 26(1), 19-26. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq070>. PMID: 21164178.

Campos Y.G. 2013. Enfermedades mitocondriales y biogénesis mitocondrial. Universidad Autónoma de Madrid, España.

Carbonell, E., Puig, M., Xamena, N., Creus, A. y Marcos, R. (1989). Mitotic arrest induced by fenvalerate in human lymphocyte cultures. *Toxicology Letters* 48(1), 45-48. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(89\)90184-7](https://doi.org/10.1016/0378-4274(89)90184-7).

Castro-Gálvez, Z., Garrido-Armas, M., Palacios-Arreola, M.I., Torres-Flores, U., Rivera-Torruco, G., Valle-Ríos, R., Amador -Muñoz, O., Hernández-Hernández, A. and Arenas-Huertero, F. (2019). Cytotoxic and genotoxic effects of Benzo[ghi]perylene on the human

bronchial cell line NL-20. *Toxicology in Vitro* 61; 104645. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104645>.

Cao, S.S., Kaufman, R.J. (2014). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid. Redox Signal* 21 (3), 396–413. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2014.5851>.

Cawley K, Deegan S, Samali A, Gupta S (2011). Assays for detecting the unfolded protein response. *Methods Enzymol* 490: 31–51.

Celik, A., Mazmanci, B., Askin, A. y Cömelekoglu ,U. (2005). Induction of micronuclei by lambda-cyhalotrin in wistar rats bone marrow and gut epithelial cells. *Mutagenesis* 20(2), 125-129.

Cervena, T., Rossnerova, A., Sikorova, J., Beranek, V., Vojtisek-Lom, M., Ciganek, M., Topinka, J. y Rossner, Jr. (2016). DNA Damage potential of engine emissions measured *in vitro* by micronucleus test in human bronchial epithelial cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 121(S3), 102-108.

Chandra, G. y Nayak, V. (1996). Micronuclei-induction and its correlation to cell survival in HeLa cells treated with different doses of adriamycin. *Cancer Letters* 110(1-2), 123-128.

Chong, W. C., Shastri, M. D., y Eri, R. (2017). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious nexus implicated in bowel disease pathophysiology. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 771.

Coscos, S., Ambrogi, V., Musto, P. y Carfagna, C. (2007). Properties of polyurea (urea-formaldehyde) microcapsules containing an epoxy resin. *Journal of Applied Polymer Science* 105(3), 1400-1411.

Dara L, Ji C, Kaplowitz N (2011). The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. *Hepatology* 53: 1752–1763.

DrugBank. Acetylcysteine. [en línea] 2022 [fecha de consulta: 21/09/2022] Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06151>

European Comission. Nanomaterials. [en línea] 2016 [fecha de consulta:28/01/16] Disponible en: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/index_en.htm

El-Demerdash F. (2007). Lambda-cyhalotrin-induced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidants. *Toxicology In Vitro* 21(3), 392-397.

EPA. Cholantraniliprole pesticide fact sheet. [en línea] 2015 [fecha de consulta: 27/09/2021] Disponible en: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-090100_01-Apr-08.pdf

Fahmy, M. y Abdalla, E. (2001). Cytogenetic effects induced by the natural pyrethrins and the synthetic lambda cyhalothrin in mice in vivo. *Cytologia* 66, 139-149.

Fahmy, H. M., Ebrahim, N. M. y Gaber, M. H. (2020). In-vitro evaluation of copper/copper oxide nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity in normal and cancer lung cell lines. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 60, 126481.

Fainstein MK. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB* 26(1):18-25

FAO/WHO, “Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. State of the art on the initiatives and activities relevant to risk assessment and risk management of nanotechnologies in the food and agriculture sectors,” en FAO/WHO Technical Paper [en línea] 2013 [Fecha de consulta: 23/07/2021] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/018/i3281e/i3281e.pdf>

Fenech M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research* 455(1-2), 81-95.

Fenech, M. y Morley, A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* 147, 29-36.

Fenech, M., Perepetskaya, G. y Mikhalevich, L. (1997). A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations-experiences from Chernobyl catastrophe. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30, 112-118.

Fenech, M., Chang, W., Kirsch-Volders, Holland, N., Bonassi, S. y Zieger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. *Mutation Research* 534(1), 67-75.

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

Fetoui H., Amedi F., Ghada B et al. (2015) Exposure to lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid, increases reactive oxygen species production and induces genotoxicity in rat

peripheral blood. *Toxicology and Industrial Health* 31(5): 433-441.
<https://doi.org/10.1177/0748233713475516>

Foufelle F, Fromenty B. (2016). Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res Perspect.* 4;4(1):e00211

Gardner, B., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C., y Walter P. (2013) Endoplasmic Reticulum Stress Sensing in the Unfolded Protein Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(3), a013169.

Gogos, A., Knauer, K. y Bucheli, T. (2012). Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 60, 9781–9792

Goldoni, A., Klauck, S., Da silva, M., Da Silva, P., Ardenghi, L. y Da Silva, L. (2014). DNA damage in Wistar rats exposed to dithiocarbamate pesticide mancozeb. *Folia Biologica* 60, 202-204.

Guadagnini, R., Halamoda, B., Walker, L., Pojana, G., Magdolenova, Z., et al. (2015). Toxicity screening of nanomaterials: Challenges due to interference with assay processes and components of classic *in vitro* tests. *Nanotoxicology* 9(1), 13-24.

Hadnagy, W., Sust, H., y Seemayer, N. H. (1997). Induction of cell division disturbances in chinese hamster lung cell line V79 by a complex mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons and aza-heterocyclic compounds. *Toxicology in vitro*, 11(5), 703-709.
[https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(97\)00041-6](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(97)00041-6)

Hadnagy, W., Seemayer, N. H., Kühn, K. H., Leng, G., y Idel, H. (1999). Induction of mitotic cell division disturbances and mitotic arrest by pyrethroids in V79 cell cultures. *Toxicology letters*, 107(1-3), 81-87.

Hamadi, F., Amedi, F., Ghada, B. y Hassen, K. (2015). Exposure to lambda-cyhalotrin, a synthetic pyrethroid, increases reactive oxygen species production and induces genotoxicity in rat peripheral blood. *Toxicology and Industrial Health* 31(5), 433-441.

Hanagata, N., Zhuang, F., Connollys, S., Li, J., Ogawa, N., Xu, M. (2011). *ACS. nano* 5(12), 9326-9338.

Hill, C., Hedren, A., Myers, G. y Koutsky, J. (1984). RAMAN spectroscopy of ures-formaldehyde resins and model compounds. *Journal of Applied Polymer Science* 29, 2749-2762.

Hu, H., Tian, M., Ding, C., y Yu, S. (2019). The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Frontiers in immunology*, 9, 3083.

Jin, O., Bong, S. y Shey-Shing, S. (2014). En: *Cardiac Electrophysiology: de Cell to Bedside*, Edición: 6th, Chapter: Structural and Molecular Bases of Mitochondrial Ion Channel Function, Publisher: Elsevier Inc., Editores: Douglas P. Zipes, Jose Jalife, pp.71-84

JRC-IPTS. Nanotechnology for the agricultural sector: from research to the field,” en *Proceedings of a workshop organized by Joint Research Centre – Institute for Prospective Technological*, [en línea] 2014 [acceso el 23 de Julio de 2021] Disponible en: [https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/ipts_jrc_89736_\(online\)_final.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/ipts_jrc_89736_(online)_final.pdf) [Accessed July 23, 2015].

Kah, M. y Hofmann, T. (2014). Nanopesticides research: current trends and future priorities. *Environmental Interests* 63, 224–235

Kah, M., Beulke, S, Tiede, K. y Hofmann, T. (2013). Nanopesticides: state of knowledge, environmental fate and exposure modelling. *Critical Reviews in Environmental Science Technology* 43, 1823–1867

Karabay, N. U., y Oguz, M. G. (2005). Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genetics and Molecular Research*, 4(4), 653-662.

Karlsson, H. (2010). The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398(2), 651-666.

Karlsson, H., Gustafson, J., Cronholm, P. y Muller, L. (2009). Size dependent toxicity of metal oxide particles. A comparison between nano-and micrometer size. *Toxicology Letters*, 188(2), 112-118.

Kihara, S. Nanotechnology regulation in Aotearoa New Zealand: Current developments and comparison with overseas regulations. [en línea] 2021 [fecha de consulta:10/02/2022] Disponible en: <https://cpb-ap-se2.wpmucdn.com/blogs.auckland.ac.nz/dist/f/688/files/2021/06/Intern-Report-Shinji-Kihara-Nanotechnology-regulation-in-Aotearoa-New-Zealand-May-2021-proof-updated-140621.pdf> Accessed 18 December 2021.

Kim, S. H., Kang, J. G., Kim, C. S., Ihm, S. H., Choi, M. G., Yoo, H. J., y Lee, S. J. (2014). The hsp70 inhibitor VER155008 induces paraptosis requiring de novo protein synthesis in anaplastic thyroid carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 454(1), 36-41.

Kumar, A. y Dhawan, A. (2013). Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: an update. *Archives of Toxicology* 87, 1883-1900.

Kumar, R., Shiny, P., Anjali, C., Jerobin, J., Goshen, K., Magdassi, S., Mukherjee, A. y Chandrasekaran, N. (2013). Distinctive effects of nano-sized permethrin in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 20(4), 2593-2602.

Lee, D., Kim I., Young, S., Sharmistha y Choi S. (2016). Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. *Pharmacology and Therapeutics* 162, 120-133.

Li, Y., Sun, L., Jin, M., Du, Z., Liu, X., Guo, C., Li, Y., Huang, P. y Sun Z. (2011). Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicology In Vitro* 25(7), 1343-1352.

Lieke, T., Steinberg, C. E., Pan, B., Perminova, I. V., Meinelt, T., Knopf, K., y Kloas, W. (2021). Phenol-rich fulvic acid as a water additive enhances growth, reduces stress, and stimulates the immune system of fish in aquaculture. *Scientific reports*, 11(1), 1-12.

Lim, Y., Sun, L., Jin, M., Du, Z., Liu, X., Guo, C., et al. (2011). Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicology In Vitro* 25(7), 1343-1352.

Lim, C., Bashri, M., Modh, D., Rahman, D., Salleh, A. y Rahman, R. (2012). Physicochemical characterization and formation of glyphosate-laden nano-emulsion for herbicide formulation. *Industry Crops Production* 36(1), 607-613.

Livak KJ, T.D. Schmittgen. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25: 402-408

Lopez Montoya C. 2011 Aplicación del ensayo cometa en la asignación del daño genómico por benzo [a]pireno en *Dunaliella tertiolecta*. Tesis de. Maestría en Ciencias en Ecología Molecular y Biotecnología de: *Universidad Autónoma de Baja California*, México.

Magdonelova Z, Lorenzo Y, Collins A, et al. (2012) Can standard genotoxicity test be applied to nanoparticles? *Journal of Toxicology and Environmental Health* 75(13): 800–806. DOI: 10.1080/15287394.2012.690326.

Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V. y Dunsinska, M. (2014). Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* 8, 233-278.

Malhi H, Kaufman RJ (2011). Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 54: 795–809.

Malvern. Zetasizer nano series user manual. [en línea] 2004 [fecha de consulta 3/11/2021] Disponible en: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf

Martínez-Valenzuela, C. y Gómez-Arroyo, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23(4), 185-200.

Means, N., Elechalawar, C. K., Chen, W. R., Bhattacharya, R., y Mukherjee, P. (2021). Revealing macropinocytosis using nanoparticles. *Molecular Aspects of Medicine*, 100993.

Mehrazar, E., Mahdi, R. y Rahaie, S. (2015). Application of nanoparticles for pesticides, herbicides, fertilizers and animals feed management. *International Journal of Nanoparticles* 8(1), 1-19.

Menzie, C., Potocki, B., Santodonato, J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science and Technology* 26, 1278– 1284.

Meredith, A., Harper, B. y Harper, S. (2015). The influence of size on the toxicity of an encapsulate pesticide: a comparison of micron- and nano-sized capsules. *Environmental International* 86, 68-74.

Mettlen, M., Chen, P. H., Srinivasan, S., Danuser, G., y Schmid, S. L. (2018). Regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 87, 871.

Moreira, P. I., Harris, P. L., Zhu, X., Santos, M. S., Oliveira, C. R., Smith, M. A., y Perry, G. (2007). Lipoic acid and N-acetyl cysteine decrease mitochondrial-related oxidative stress in Alzheimer disease patient fibroblasts. *Journal of Alzheimer's Disease*, 12(2), 195-206.

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

Neves, J., Carvalhal, C. y Vasconcelos, A. (2013). Insecticide formulation, method for manufacturing the same and use thereof. *World Intellectual Property Organization* 21(3), 1-47.

NNI. Applications of nanotechnology. [en línea] 2022 [accesado el 18 de julio del 2022] Disponible en: <https://www.nano.gov/about-nanotechnology/applications-nanotechnology>

NPIC. Lambda-cyhalothrin [en línea] 2001 [fecha de consulta: 21 de septiembre de 2022] Disponible en: http://npic.orst.edu/factsheets/archive/l_cyhalotech.pdf

Öberdorster, E., Öberdorster, E. y Öberdorster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 113(7), 823– 839.

Oberdörster, E. (2014). Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental Health Perspectives* 112, 1058–1062.

Paz-Trejo, C., Jiménez-García, L.F., Arenas-Huertero, F., Gómez-Arroyo, S. (2022) Comparison of the genotoxicity of two commercial pesticides by their micro and nano size capsules. *Toxicology and Industrial Health*, 07482337221122482.

Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2003-2007

PLY. Polyurea technology [en línea] 2011 [fecha de consulta: 10/10/2021] Disponible en: http://www.polyurea-word.com/artikel-article.articleid-232-t-polyurea-technologie-sel_lang-english.htm

Primeaux, D. (2004). Polyurea elastomer technology: history, chemistry and basic formulating techniques. Primeaux Associates LLC.

Poss K and Tonegawa S. 1997. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(20); 10925-10930. <http://doi10.1073/pnas.94.20.10925>

Qian, K., Shi, T., Tang, T., Zhang, S., Liu, X., et al. (2011). Preparation and characterization of nanosized calcium carbonate as controlled release pesticide carrier for validamycin against *Rhizoctoniasolani*. *Microchimistry Acta* 173(1), 51-57.

Randa, A., Fenech, M., López, M., Spitz, M. y Etzel, C. (2008). Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases among smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 17(5), 1111-1119.

Roszak, J., Catalán, J., Järventaus, H., Lindberg, H., Suhonen, S., Vippola, M., Stępnik, M. y Norppa, H. (2016). Effect of a particle size and dispersion status on cytotoxicity and genotoxicity of zinc oxide in human bronchial epithelial cells. *Mutation Research* 805, 7-18.

Shang, Y., Hasan, M. K., Ahammed, G. J., Li, M., Yin, H., y Zhou, J. (2019). Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: a review. *Molecules*, 24(14), 2558.

Sigma-Aldrich information. Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit. 2021. [en línea, consultada el 13 de febrero de 2022] Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/cs0009>

Cao, S. S., y Kaufman, R. J. (2014). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants & redox signaling*, 21(3), 396-413.

Secombes, C. J. (1990). Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In Stolen, J. S., T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson & W. B. Van Muiswinkel (eds), *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, New Jersey, U.S.A.: 137–152.

Sperandio, S., De Belle, I. y Bredesen E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(26), 14376-14381.

SCENIHR. Nanotechnologies [en línea] 2006 [fecha de consulta: 5/09/2021] Disponible en: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/en/nanotechnologies/l-3/1-introduction.htm.

Syngenta. Karate Zeon. [en línea] 2015 [fecha de consulta:10/10/2021] Disponible en:<http://www3.syngenta.com/country/cl/cl/soluciones/proteccioncultivos/Paginas/KarateZeon.aspx>

Sule, R. O., Condon, L., y Gomes, A. V. (2022). A common feature of pesticides: oxidative stress—the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.

Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., y Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*, 7(9), 880-885.

Reichard, J.F., Motz, G. y Puga, A. (2007). Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Heme Nucleic Acids Research* 35(21), 7074-7086.

Tsang, C. K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., y Zheng, X. S. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature communications*, 5(1), 1-11.

Uzar, N.K., Abudayyak, M., Akcay, N., Algun, G., Özha, G. (2015) Zinc oxide nanoparticles induced cyto- and genotoxicity in kidney epithelial cells. *Toxicol Mechan Methods* 25: 334-339. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1045654>

Wang, W., Cai, D., Shan, Z., Chen, W., Poletika, N. y Gao, X. (2007). Comparison of the acute toxicity for gamma-cyhalothrin and lambda-cyhalothrin to zebra fish and shrimp. *Regulation of Toxicology Pharmacology* 47, 184-188.

Wiseman, H. y Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemistry Journal* 313(1), 17-29.

WHO. The WHO recommended classification of pesticides by hazard, and guidelines for classification [en línea] 2009 [fecha de consulta: 19/05/2021]. Disponible en: http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf

WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors. Potential food safety implications [en línea] 2010 [fecha de consulta: 19/05/2021] Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241563932_eng.pdf [Accessed July 23, 2015].

Yap, J., Chen, X., Delmotte, P., y Sieck, G. C. (2020). TNF α selectively activates the IRE1 α /XBP1 endoplasmic reticulum stress pathway in human airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 318(3), L483-L493.