



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

**“Citotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a la
mezcla de dos fungicidas y un herbicida utilizados en el
Estado de México”**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:

Sebastian Saidir Trejo Cervantes

Comité de Tutores

Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Director

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Codirector

Dra. Erika Patricia Azorín Vega

Asesora

Toluca, Estado de México

2022

Yo **Sebastian Saidir Trejo Cervantes** autor (a) responsable de la presente Tesis, la cual lleva como título **“Citotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a la mezcla de dos fungicidas y un herbicida utilizados en el Estado de México”** y en representación de las (los) coautores (as):

Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Dra. Erika Patricia Azorín Vega

Declaro que la información presentada en este documento es resultado de un protocolo de investigación del cual soy representante y por tanto me responsabilizo legalmente por el contenido en caso de plagio, deslindando de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma del Estado de México.

INDICE

	No. página
Resumen y Summary	4
I Antecedentes	6
1.1 <i>Clasificación de pesticidas</i>	6
1.1.1 <i>Fungicidas</i>	7
1.1.2 <i>Modo de acción de fungicidas</i>	8
1.1.3 <i>Herbicidas</i>	9
1.2 <i>Utilización de mezcla de pesticidas</i>	9
1.3 <i>Estadística de los plaguicidas a nivel mundial</i>	10
1.3.1 <i>Uso de pesticidas en México</i>	12
1.3.2 <i>Vía de exposición a plaguicidas</i>	12
1.3.3 <i>Intoxicaciones causadas por pesticidas</i>	12
1.3.4 <i>Intoxicaciones causadas por pesticidas en México</i>	13
1.4 <i>Estado de México</i>	13
1.5 <i>Líneas celulares</i>	14
1.6 <i>Linfocitos</i>	15
1.7 <i>Electroforesis alcalina de células individuales</i>	15
II Planteamiento del Problema	17
III Hipótesis	18
IV Objetivos	19
V Justificación	20
VI Material y Métodos	21
6.1 <i>Diseño de estudio</i>	21
6.2 <i>Criterios de inclusión, exclusión y eliminación</i>	21
6.3 <i>Procedimientos</i>	21
6.4 <i>Variables de Estudio</i>	22
6.5 <i>Recolección de Datos y análisis estadístico</i>	24
6.6 <i>Implicaciones Bioéticas</i>	26
VII Resultados	27
7.1 <i>carta de envío del articulo</i>	27
7.2 <i>resumen del artículo</i>	28
VIII Discusión	28
IX Conclusiones	30
X Referencias	31
XI Anexos	38

Resumen:

La creciente intensificación de la agricultura como consecuencia de una evolución socioeconómica ha promovido la utilización grandes cantidades de pesticidas (PC) a nivel mundial, tan solo en el año 2020 se estimó la utilización de más de 53 mil toneladas de i.g. Para la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, un PC es cualquier sustancia o la mezcla de sustancias que son destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga. Un fungicida es un producto químico utilizado para disminuir el crecimiento de hongos considerados como patógenos. Un herbicida es un producto químico, que controla y elimina malezas no deseadas en cultivos agrícolas de interés comercial. La mezcla de diversos PC como los fungicidas y herbicidas es una práctica común en campo utilizada para elevar la producción y el rendimiento. Sin embargo, se encuentra evidencia de que cada PC es tóxicos en la salud humana, sin embargo, es escasa la información toxicidad de la toxicidad de la mezcla de PC utilizados comúnmente en campo. **Objetivo:** Evaluar la toxicidad y citotoxicidad de la mezcla de dos fungicidas con un herbicida en Linfocitos humanos. **Métodos:** Se determinó la toxicidad (DL^{50}) que causaron los PC: **A)** fungicida Captan ultra[®] 50 WP (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida), **B)** fungicida Coraza[®] 720S (clorotalonil: 2,4,5,6-tetracloroisofталонitrilo) y **C)** herbicida Faena fuerte[®] (Sal de potasio N-fosfonometil- glicina), así como la mezcla de PC (**A+C** y **B+C**) en linfocitos humanos de sangre periférica. Las concentraciones evaluadas fueron de 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ m. Posteriormente se determinó la genotoxicidad mediante electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa), los resultados se clasificaron como; muy toxico, poco toxico o nada toxico, a través de la observación del daño al núcleo celular. **Resultados:** Captan ultra[®] 50 WP, Coraza[®] y Faena fuerte[®] no presentaron toxicidad en concentraciones de 2.5-100 μ M en los linfocitos en 1 hora de exposición de manera individual, sin embargo a 24 hrs de exposición, todos los pesticidas resultaron citotóxicos en individual y en sus respectivas combinaciones. Captan ultra[®] 50 WP, Coraza[®] y Faena fuerte[®] causaron genotoxicidad en linfocitos a 1 hora a 100 μ M. Hay diferencia entre los pesticidas individuales y la combinación. **Conclusiones:** Los pesticidas Captan ultra[®] 50 WP, Coraza[®] y Faena fuerte[®] presentan toxicidad en linfocitos humanos a las concentraciones recomendadas por el fabricante para su utilización en campo.

Summary:

The increasing intensification of agriculture as a consequence of a socioeconomic evolution has promoted the use of large amounts of pesticides (PC) worldwide, only in the year 2020 the use of more than 53 thousand tons of i.g. For the United States Environmental Protection Agency, a PC is any substance or mixture of substances that are intended to prevent, destroy, repel or mitigate any pest. A fungicide is a chemical product used to reduce the growth of fungi considered as pathogens. A herbicide is a chemical product that controls and eliminates unwanted weeds in agricultural crops of commercial interest. The mixture of various PCs such as fungicides and herbicides is a common field practice used to increase production and yield. However, there is evidence that each PC is toxic to human health; however, there is little information on the toxicity of the mixture of PCs commonly used in the field. Objective: To evaluate the toxicity and cytotoxicity of the mixture of two fungicides with one herbicide in human lymphocytes. Methods: The toxicity (LD50) caused by PC was determined: A) fungicide Captan ultra® 50 WP (N-trichloromethylthio-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide), B) fungicide Coraza® 720S (chlorothalonil: 2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile) and C) herbicide Faena fuerte® (N-phosphonomethylglycine potassium salt), as well as the PC mixture (A+C and B+C) in human peripheral blood lymphocytes. The concentrations evaluated were 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 µM. Subsequently, genotoxicity was determined by single cell alkaline electrophoresis (comet assay), the results were classified as; very toxic, little toxic or not at all toxic, through the observation of damage to the cell nucleus. Results: Captan ultra® 50 WP, Coraza® and Faena fuerte® did not show toxicity in concentrations of 2.5-100 µM in lymphocytes after 1 hour of exposure individually, however after 24 hours of exposure, all pesticides were cytotoxic in individually and in their respective combinations. Captan ultra® 50 WP, Coraza® and Faena fuerte® caused genotoxicity in lymphocytes at 1 hour at 100 µM. There is a difference between individual pesticides and the combination. Conclusions: The pesticides Captan ultra® 50 WP, Coraza® and Faena fuerte® present toxicity in human lymphocytes at the concentrations recommended by the manufacturer for use in the field.

1.-Antecedentes:

Un pesticida (PC), es un compuesto químico frecuentemente utilizado para controlar la aparición de plagas que puedan dañar plantas, animales, seres humanos y el medio ambiente, estos pueden tener un efecto negativo a la producción de alimentos y la salud pública¹. Para la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos 2019, (EPA, por sus siglas en inglés) un PC es cualquier sustancia o la mezcla de sustancias que son destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga, además de que también pueden ser usados como agentes reguladores ante la aparición de plantas, usado como defoliante o deshidratante de estas plantas².

Los PC juegan un papel fundamental en la protección de los cultivos³, debido a la creciente intensificación de la agricultura como consecuencia de la evolución socioeconómica, esta situación ha promovido el uso de grandes cantidades de PC en los campos de cultivos^{4, 5}. Esto es una estrategia utilizada, después de la Segunda Guerra Mundial, para hacer frente a las plagas que ponen en riesgo los cultivos y sus productos alimentarios derivados⁵.

1.1 Clasificación de pesticidas

Los PC se utilizan para el control de vegetación y acciones de salud pública (como control de roedores e insectos que pueden actuar como vectores), su modo de acción es mediante la repulsión, prevención, mitigación o destrucción vectores considerados plagas⁶, tales como plantas, hongos y bacterias, entre otros. Los PC se pueden clasificar en subclases, que a su vez son generalmente divididos en función de sus plagas objetivo, entre las clases principales se incluyen pesticidas dirigidos a insectos (insecticidas), hierbas (herbicidas), bacterias (bactericidas), roedores (roedoricidas) y hongos (fungicidas), todos los cuales pueden tener varias subclases propias basadas en su identidad química, estado físico y método de aplicación⁷.

1.1.1 Fungicidas

Los hongos patógenos constituyen una seria amenaza a nivel mundial para importantes cultivos básicos como el arroz, el maíz y la soya⁸, entre otros. Para combatir la presencia y aparición de hongos considerados como patógenos, el uso de fungicidas es necesario tanto para control como para la prevención de las enfermedades causadas por los hongos⁹.

Un fungicida es un producto que tiene como finalidad interferir en los procesos bioquímicos de los hongos, son PC que matan o inhiben su crecimiento ¹⁰. Los fungicidas se pueden utilizar en forma foliar, ya sea en polvo o líquido, produciendo una barrera defensiva en superficies cuticulares de las plantas o causando toxicidad sistémica en el desarrollo del hongo objetivo ¹¹.

1.1.2 Modo de acción de los fungicidas

El proceso metabólico específico que inhibe el desarrollo de los hongos, depende del fungicida utilizado en particular, dentro de cada modo de acción hay sitios de acción específicos, que son las enzimas específicas del proceso celular a las que se unen los fungicidas ¹², entre los modos de acción de los fungicidas se encuentran:

- Metabolismo de ácidos nucleicos, interfieren la síntesis de ácidos nucleicos ADN y ARN, reduciendo la producción de enzimas como la ADN topoisomerasa, adenosin - deaminasa y ARN polimerasa I.
- Proteínas motoras y del citoesqueleto, como la tubulina, molécula importante en la formación y segregación de cromosomas en la división celular, su alteración afecta la mitosis.
- Inhibición mitocondrial de la respiración celular
- Inhiben la biosíntesis de la metionina y la secreción de enzimas, involucradas en el traslado de la información contenida en el ARN.
- La transducción de señales que inhiben los mecanismos metabólicos que permiten a la célula adaptarse a su entorno.
- Alteran la integridad de las membranas y la síntesis de los lípidos.
- Inhibidores de enzimas y procesos enzimáticos en la biosíntesis del ergosterol
- Impiden la fijación de glucosamina a la quitina dentro de las paredes celulares
- Inducción de defensas en la planta huésped.
- Modo de acción no especificado
- Sin clasificación.
- Con actividad multi-sitio.

1.1.3 Herbicidas

Un herbicida es un producto químico, ocupado principalmente para el control y eliminación de malezas, hierbas y arbustos ¹³. En general, el uso de herbicidas ha permitido el control ante la aparición y erradicación de hierbas de competencia frente a los cultivos, logrando así el aumento notable en el rendimiento de los cultivos ³. Hoy en día, los herbicidas representan más del 60% de los plaguicidas utilizados en todo el mundo y la agricultura moderna, especialmente la mayor parte de la agricultura a gran escala y cultivos intensivos; consecuentemente los sistemas agrícolas dependen casi exclusivamente de los herbicidas para controlar plantas no deseadas ¹⁴.

Uno de los herbicidas más usados es el glifosato, cuyo ingrediente activo es la N-fosfonometilglicina, presente en una variedad de formulaciones de herbicidas de amplio espectro, denominadas herbicidas a base de glifosato ¹⁵. El glifosato, es un aminoácido derivado de la glicina, sintetizado por primera vez en 1950, es un herbicida organofosforado sistémico no selectivo, que interrumpe la vía metabólica del ácido shikímico, responsable en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos de las plantas y algunos microorganismos ^{16, 17}. Otro herbicida utilizado es el Diurón, que controla la vegetación alterando el crecimiento relacionado con la fotosíntesis de malas hierbas no deseadas¹⁸.

1.2 Utilización de mezcla de pesticidas

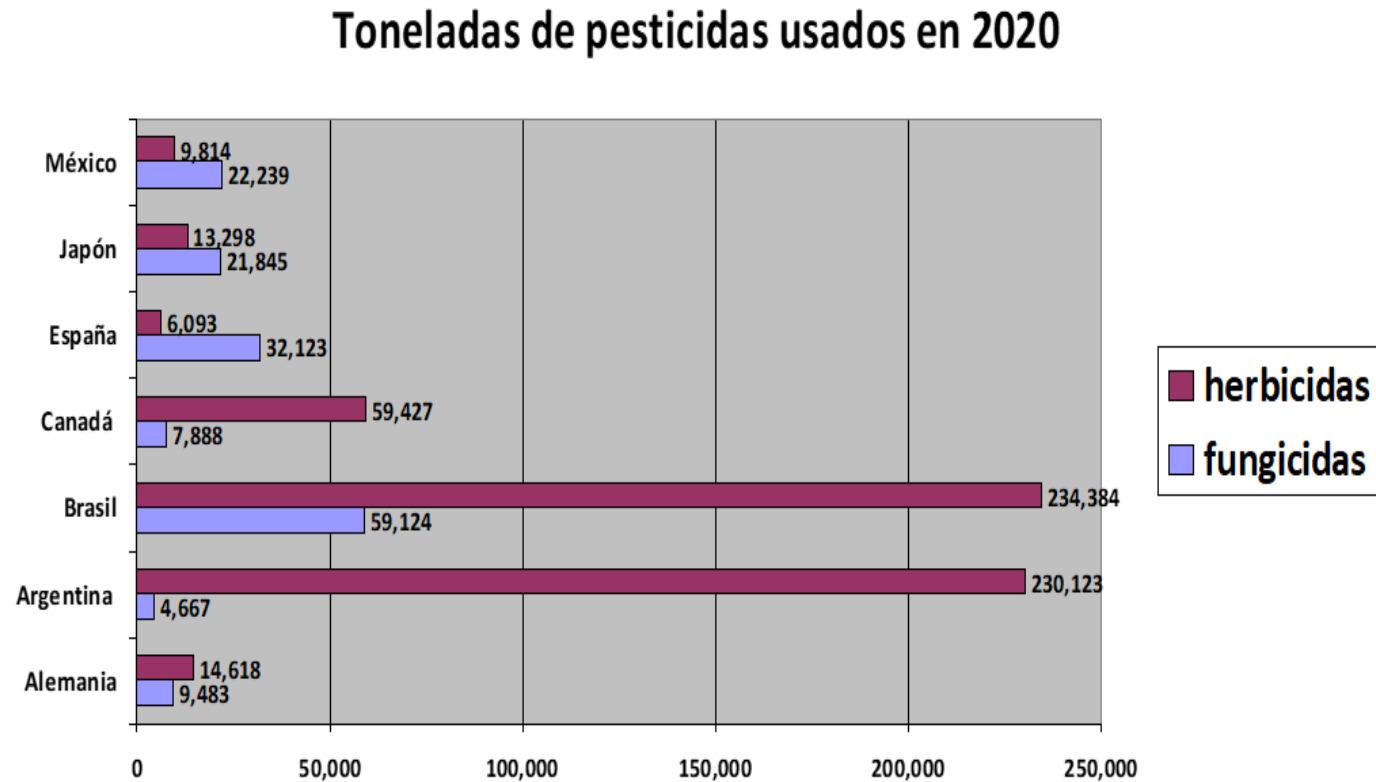
Una práctica común y recomendada en México y en el mundo es mezclar diversos PC, con la finalidad de hacer más eficiente el control de plagas en los cultivos agrícolas para la producción de alimentos; incluso el Comité de Acción de resistencia a Fungicidas (FRAC por las siglas en Ingles de Fungicide Resistance Action Committee) recomienda utilizar la mezcla de fungicidas para combatir a los hongos, debido a que todas las estrategias eficaces de manejo de resistencia a fungicidas tienen como objetivo minimizar la selección de resistencia a cualquier tipo de fungicida ¹². Los fungicidas son comúnmente utilizados con la adición de herbicidas, durante el ciclo de cultivo, el Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA) ¹⁹, menciona que, en México el uso de herbicidas es aceptado entre los productores del país; su aceptación se debe a que facilita el control y combate contra especies vegetales no deseadas en el cultivo, denominadas malezas o malas hierbas. Aún con la utilización a gran escala de los PC en México, de acuerdo con el código de

conducta de la Organización Mundial para la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la legislación sobre los PC debe cubrir todos compuestos utilizados en todos los sectores en los que son utilizados; sin embargo, en el área de la salud pública su legislación no está del todo atendida, situación claramente inadecuada ²⁰. Si bien este enfoque ha ayudado a identificar y caracterizar numerosos peligros químicos resultantes de la exposición a las respectivas sustancias, la exposición en la vida real implica una exposición a mezclas complejas de varios productos químicos ²¹.

1.3 Estadísticas de los plaguicidas a nivel mundial

Las formas de producción agrícola, desarrolladas al inicio del siglo XX ²², demandaron el uso extensivo de PC para el control plagas y enfermedades de las plantas; esto reemplazó los métodos tradicionales de la agricultura, con la finalidad de obtener una mayor rentabilidad de los cultivos y el lograr la máxima productividad de los suelos. El último dato disponible de la utilización de PC de algunos de los principales países consumidores, incluyendo a México indican un alto consumo (cuadro 1).

Cuadro 1: Uso de plaguicidas (toneladas de ingrediente activo por tipo de producto) y consumo mundial de los principales países del mundo.



Elaboración propia con datos recabados de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP> consultado el 03 de octubre de 2022²³

1.3.1 Uso de pesticidas en México

En el año 2020 en el campo mexicano, según cifras de la FAO, se emplearon 11,366 toneladas de herbicidas y 25,318 toneladas de fungicidas (FAO, estadísticas consultadas el 03 de octubre de 2022 en <https://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>). A pesar de la gran cantidad de PC utilizados, en México se encuentra una falta de regulación y escasa información, únicamente se cuenta con el catálogo oficial de plaguicidas, que no ha sido actualizado en más de una década y excluye información sobre los recientes descubrimientos de la peligrosidad de estos tóxicos; ejemplo de ello, es el glifosato, componente activo del herbicida más usado en el país ²⁴.

1.3.2 Vías de exposición a plaguicidas

La exposición a plaguicidas puede ocurrir por diferentes vías, de acuerdo a Mostafalaou and Abdollahi ²⁵, las ocupaciones que están relacionadas con la producción, transporte, entrega, aplicación y vivienda en los lugares de alto contenido de residuos, genera una mayor circulación y acumulación de PC en la cadena alimentaria ²⁶.

1.3.3 Intoxicaciones causadas por pesticidas

Una intoxicación hace referencia al conjunto de signos y síntomas que se producen en el organismo por consecuencia de la entrada de una sustancia externa, en cantidades suficientes que pueda ocasionar un daño. Cualquier sustancia puede ser potencialmente tóxica, pero esto va a depender de la dosis; algunas son prácticamente inocuas y requieren grandes cantidades para producir efectos tóxicos y otras son muy tóxicas por lo que a pequeñas dosis pueden causar intoxicaciones severas ²⁷.

Entre los daños que pueden ocasionar los PC se encuentran neurotoxicidad denominada neuropatía retardada, síndrome que aparece algunos días después de una exposición aguda y que puede persistir durante semanas o años, afectando principalmente los miembros inferiores causando atrofia muscular, calambres, sensación de quemadura, dolor en pantorrillas y parálisis, disminución en la fecundidad masculina, problemas cognitivo-conductuales, neurotoxicidad, cáncer, citotoxicidad mutagénica, daño renal, infertilidad, inmunosupresión, leucemia y asma ²⁸. Por supuesto, el riesgo de peligros para la salud debido a la exposición a pesticidas depende no solo de qué tan tóxicos sean los ingredientes activos, también influye en el nivel de exposición ²⁹.

1.3.4 Intoxicaciones causadas por pesticidas en México

En México de acuerdo con la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) ³⁰, en la última década, la tendencia de intoxicaciones ha sido a la baja, con un total 4,094 (2012), 4,310 (2013), 4,428 (2014), 4,025 (2015), 3,816 (2016), 3,044 (2017), 2,893 (2018), 3,062 (2019) y para el año 2020 de 2,049. El Estado de México es una de las regiones más importantes en producción agrícola, tanto de flor como de hortalizas, principalmente localizadas en la jurisdicción sanitaria de Tenancingo, que comprende los Municipios de Almoloya de Alquisiras, Coatepec Harinas, Ixtapan de la Sal, Malinalco, Ocuilán, Sultepec, Tenancingo, Texcaltitlán, Tonatico, Villa Guerrero, Zacualpan y Zumpahuacán. Consecuentemente también se han reportado casos de intoxicaciones (Tabla 1), con un rango de personas intoxicadas de 134 – 218 anualmente.

Tabla 1. de Casos nuevos reportados de Intoxicación por Plaguicidas en el Estado México.

Estado	Genero	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
México	Hombres	152	173	155	164	163	142	109	160	87
	Mujeres	45	45	45	42	39	54	32	54	47
	Total	197	218	200	206	202	196	141	217	134

Tabla de elaboración propia, información tomada de la SEMARNAT (2020).

1.4 El Estado de México

El Estado de México se localiza en el centro del país, cuenta con una superficie de 22,351 km², con un clima templado subhúmedo, temperatura media anual de 14.7 grados centígrados y una precipitación total anual de 900 mm¹. La población total es de 16,187,608 personas, de las cuales el 51.6% son mujeres y el 48.4% hombres, según la Encuesta Intercensal 2015 del Instituto Nacional de Estadística y Geografía ³⁰. Basado en los datos de la Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) ³¹, el Estado de México tiene una superficie sembrada de 404 mil hectáreas destinado a la siembra, de los cuales, se obtienen 1,500 toneladas de productos cosechados, tan solo el cultivo del Maíz alcanzó un rendimiento de 3,713 toneladas.



Imagen obtenida de: <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=15#collapse-Mapas>
consultado el 01/05/2022 (30)

1.5 Líneas celulares

Una línea celular es una población de células que pueden proliferar indefinidamente bajo condiciones de cultivo apropiadas, tienen una vida muy útil e infinita, como estas células son accesibles y fáciles de manipular, se convirtieron en una de las principales herramientas de investigación en los laboratorios a nivel mundial, contribuyendo significativamente al conocimiento de la biología celular y molecular básica, patología y para el desarrollo de terapias ³². Las células inducidas por humanos son utilizadas para establecer líneas celulares y órganos específicos de mamíferos, esto con la finalidad de generar modelos que repliquen y reflejen características patológicas de una enfermedad *in vitro*, también permite la generación de investigación de mecanismos subyacentes ³³. Algunas de las áreas que usualmente manejan líneas celulares son, patología y oncología, así como áreas preclínicas como la farmacología, que tienen el potencial de obtener resultados clínicamente aplicables ³⁴. Entre las líneas celulares utilizadas comúnmente para ensayos, se encuentran las células de carcinoma hepatocelular (CHC) que incluyen BEL-7402, BEL-7404, HuL-1, QGY-7701, QGY-7703 y SMMC-7721(35); de meduloblastoma, estas células corresponden a un tipo o tipos de cáncer que suceden en el sistema nervioso central y periférico, de las cuales son usadas como DAOY, SHH grupo; D341, grupo 3; D283 ³⁶; otro tipo de líneas celulares ocupadas dentro de la investigación para determinar citotoxicidad se encuentran las

células provenientes del hígado y riñón (Hep G2) y líneas celulares renales (HEK 293)

37.

1.6 Linfocitos.

De acuerdo con Leslie P. Gartner, los linfocitos son células redondas que circulan en el torrente sanguíneo, miden de 8 a 10 μm de diámetro, su núcleo es redondo y ocupa la mayor parte de la célula. Constituyen del 20 al 25% del total de la población de leucocitos circulantes. Los linfocitos presentan una escasa cantidad de citoplasma. Actualmente se informa que los linfocitos no presentan una función en el torrente sanguíneo, no obstante, en el tejido conjuntivo, son responsables de un funcionamiento adecuado del sistema inmunitario, migrando a compartimentos corporales específicos con el objeto de madurar y expresar marcadores y receptores específicos. De acuerdo su funcionalidad, los linfocitos se subdividen en tres tipos funcionales: linfocitos B, linfocitos T y células nulas. A pesar de que morfológicamente son indistinguibles entre los tres tipos, pueden ser diferenciados por su perfil inmuno-citoquímico, debido a las diferencias en sus marcadores de superficie. Del total de linfocitos circulantes, el 80% son linfocitos T, el 15% linfocitos B y el 5% restantes son células nulas.⁽³⁸⁾ El establecimiento y mantenimiento de la respuesta inmunitaria, la homeostasis y la memoria patogénica, depende de las células T, tiene la capacidad de expresar un receptor con el potencial de reconocer diversos antígenos de patógenos, tumores y el medio ambiente y también mantienen memoria inmunológica y auto tolerancia. Las células T también están implicadas como principales impulsoras de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes³⁹. La función de los linfocitos es participar principalmente en la inmunidad específica o adquirida, a excepción de los linfocitos T gamma-delta ($\gamma\delta$) y los asesinos naturales (Natural Killer_NK), estos son capaces de establecer contacto y eliminar directamente a un antígeno, durante la etapa de actividad de la inmunidad⁴⁰.

1.7 Ensayo de electroforesis Alcalina de células individuales

El Ensayo de electroforesis Alcalina de células individuales, también conocido como ensayo cometa, es una técnica usada para medir el daño en el ADN celular, es un ensayo simple, sensible, versátil y rápido, se puede realizar con sangre completa, linfocitos aislados y células germinales, entre otros⁴¹. Es empleado en ensayos de genotoxicidad,

estudios de bio-monitoreo en humanos, epidemiología molecular y ecotoxicología, así como para evaluar la reparación del ADN. Se basa en la visualización microscópica de imágenes de ADN (previamente teñidas con un cromóforo fluorescente), después de que las células fueron embebidas en agarosa, lisadas y sometidas a una electroforesis alcalina⁴². El Ensayo Cometa, es un indicador de daño temprano, lo que permite implementar estrategias de intervención oportunas⁴³.

II Planteamiento del Problema:

A nivel mundial el modelo de agricultura industrial a impulso en las últimas décadas el uso de PC sintéticos, de acuerdo con la FAO, tan solo en el año 2020 en el campo mexicano, se emplearon 11,366 toneladas de i.a de herbicidas y 25,318 toneladas de i.a de fungicidas. Uno de los problemas que amenazan la salud humana, es la exposición, por cualquier vía, a los PC. La ONU estima que anualmente se intoxican casi 2 millones de personas por contacto directo e indirecto con PC.

Entre los efectos secundarios causados por la exposición PC destacan las mutaciones genéticas, cáncer, esterilidad, alteración en líneas celulares y en casos más graves por intoxicación, la muerte.

De acuerdo con la SEMARNAT, la última década en México se han reportado mas de 31700 casos de intoxicaciones causadas por PC y en el Estado de México más de 1700 casos.

Aunque se ha reportado ampliamente el efecto toxico de la exposición de pesticidas en humanos, es escaso la información sobre la exposición a la mezcla de diversos PC en la salud humana.

En necesario conocer el efecto que tiene la mezcla de fungicidas y herbicidas en líneas celulares para comprender el posible impacto en la salud humana. La certeza de conocer el impacto negativo en líneas celulares humanas permitirá comprender la toxicidad que generan los pesticidas sintéticos utilizados en el Estado de México y su riesgo en la salud humana

Pregunta investigación:

¿Las mezclas de dos fungicidas y un herbicida sintético utilizados en el Estado de México producen citotoxicidad en linfocitos humanos?

III Hipótesis:

Hipótesis alterna:

La mezcla del fungicida Captan ultra® 50 WP y el herbicida Cayana® utilizados en el Estado de México producen citotoxicidad en linfocitos obtenidos de sangre periférica de humanos.

La mezcla del fungicida Cercobin®-M y el herbicida Cayana® utilizados en el Estado de México producen citotoxicidad en linfocitos obtenidos de sangre periférica de humanos.

Hipótesis nula:

La mezcla del fungicida Captan ultra® 50 WP y el herbicida Cayana® utilizados en el Estado de México no producen citotoxicidad en linfocitos obtenidos de sangre periférica de humanos.

La mezcla del fungicida Cercobin®-M y el herbicida Cayana® utilizados en el Estado de México no producen citotoxicidad en linfocitos obtenidos de sangre periférica de humanos.

IV Objetivos:

General:

Evaluar la toxicidad y citotoxicidad en linfocitos humanos expuestas a la mezcla de dos fungicidas y un herbicida sintético utilizados en el Estado de México

Específicos

- Determinar cuál es la dosis letal₅₀ en linfocitos del fungicida Captan ultra® 50 WP
- Determinar cuál es la dosis letal₅₀ en linfocitos del fungicida Cercobin®-M
- Determinar cuál es la dosis letal₅₀ en linfocitos del herbicida Cayana®
- Determinar cuál es la dosis letal₅₀ en linfocitos de la mezcla del fungicida Captan ultra® 50 WP más el herbicida Cayana®
- Determinar cuál es la dosis letal₅₀ en linfocitos de la mezcla del fungicida Cercobin®-M más el herbicida Cayana®
- Determinar la citotoxicidad en linfocitos del fungicida Captan ultra® 50 WP
- Determinar la citotoxicidad en linfocitos del fungicida Cercobin®-M
- Determinar la citotoxicidad en linfocitos del herbicida Cayana®
- Determinar la citotoxicidad en linfocitos de la mezcla del fungicida Captan ultra® 50 WP más el herbicida Cayana®
- Determinar la citotoxicidad en linfocitos de la mezcla del fungicida Cercobin®-M más el herbicida Cayana®

V Justificación

Los pesticidas son sustancias utilizadas para el control, prevención y eliminación de agentes patógenos que pueden poner en riesgo los cultivos de alimentos a nivel mundial. Las formas de producción agrícola, desarrolladas desde principios del siglo XX, demandaron el uso extensivo de PC para el control de insectos y enfermedades de las plantas; esto reemplazó los métodos tradicionales de la agricultura para la optimización de una mayor rentabilidad de los cultivos y el logro de la máxima productividad de los suelos. En todo el mundo la demanda de pesticidas químicos se ha incrementado, se estima que en el año 2020 el uso de plaguicidas alcanzo 53 millones de toneladas de i.a. El Estado de México es una de las regiones más importantes en producción agrícola en México, tanto de flor como de hortalizas. La exposición de las comunidades, así como de todo el sector de producción primaria a los PC se encuentra en aumento y se desconoce el impacto que tiene sobre la salud de la población.

La exposición de linfocitos humanos a las mezclas de dos fungicidas y un herbicida utilizado comúnmente en el Estado de México permitirá conocer su posible efecto toxico y citotóxico, el resultado de esta investigación permitirá implementar estrategias futuras para promover la disminución de PC en el campo mexicano.

VI.- Material y Métodos:

6.1 Diseño de Estudio

Tipo de estudio

Experimental transversal comparativo.

Universo

Linfocitos humanos de sangre periférica

Método de muestreo

Por conveniencia

Tamaño de muestra

1×10^5 células /mililitro por tratamiento.

6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios inclusión

Linfocitos aislados de sangre periférica

Criterios eliminación

Linfocitos no aislados o que presenten contaminación

6.3 Procedimientos

Se identificaron los pesticidas y herbicidas comúnmente utilizados por los productores en diferentes sitios ubicados en el Estado de México; se determinó la concentración a evaluar de los fungicidas y el herbicida basado en las recomendaciones de utilización del fabricante. Se aislaron linfocitos humanos de sangre periférica y se evaluó la toxicidad y el daño celular causado por la exposición de los PC mencionados

6.4 Variables de Estudio

Independientes:

- Citotoxicidad.

Dependientes:

- Herbicida
- Fungicida
- Mezcla de fungicidas y herbicida
- Porcentaje de viabilidad Celular

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Indicador	Análisis estadístico
Fungicida	Compuesto químico que inhibe el crecimiento de hongos.	Concentración del fungicida adicionado al cultivo celular (linfocitos)	Cuantitativa	Concentraciones de 0.01 -1000 μ M.	ANOVA
Herbicida	Compuesto químico que inhibe el crecimiento de malezas.	Concentración del herbicida adicionado al cultivo celular (linfocitos)	Cuantitativa	Concentraciones de 0.01 -1000 μ M.	ANOVA
Mezcla de pesticidas	Conjunto de productos químicos enfocados a combatir, controlar o eliminar agentes fitopatógenos	Concentración del herbicida + el fungicida adicionado al cultivo celular (linfocitos)	Categórica	Concentraciones de 0.01 - 1000 μ M	ANOVA
Viabilidad celular	Células viables en un cultivo celular	% de células viables expuesta a la mezcla de fungicidas + herbicidas	Cuantitativa	Porcentaje de células vivas.	ANOVA

6.5 Recolección de Datos y análisis estadístico

Pesticidas químicos para evaluar

Se evaluaron dos fungicidas y un herbicida comúnmente utilizados en el Estado de México:

Fungicidas:

1.-Captan ultra[®] 50 WP (Captan: N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida) en polvo humectable (con 500 g de i.a./kg), distribuido por Arysta LifeScience México, SA de CV Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.

2.-Coraza[®] 720S (clorotalonil: 2,4,5,6-tetracloroisofталонitrilo) (con 720 g de i.a./L en suspensión acuosa) de Promotora Técnica Industrial, S.A. de C.V., Morelos, México.

Herbicida:

1.- Faena fuerte[®] (Sal de potasio N-fosfonometil- glicina) suspensión acuosa (con 363 g. de i.a (ácido glisofato) / L. será adquirido a Monsanto comercial, S de R.L de C.V paseo del Cerenero No. 890, Nextipac Zapopan Jalisco.

Concentraciones de los fungicidas y herbicidas a evaluar

A fin de determinar la concentración citotóxica (CL₅₀) de los fungicidas a evaluar en linfocitos de sangre periférica, se realizaron ensayos previos con concentraciones entre 2.5 y 100 µM basados en su i.a.

Las concentraciones que se utilizaron en las pruebas de citotoxicidad para los fungicidas Captan ultra[®] 50 WP (Captan), Coraza[®]720 S (Clorotalonil) y el herbicida Faena fuerte[®] (Sal de potasio N-fosfonometil- glicina) fueron de 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µM. Todas las concentraciones fueron diluidas en buffer de fosfatos (PBS) estéril.

Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar de la media, de al menos tres experimentos independientes. La significación estadística se evaluó mediante ANOVA de 1 vía seguida de la prueba *post hoc* de Tukey (p <0,05) utilizando el software SPSS V.

Obtención de células

Se obtuvieron 5 ml. de sangre periférica de los donantes en un Tubo BD Vacutainer® con EDTA K2, posteriormente, en un tubo falcon 15 ml. se adicionaron los 5 ml de sangre más 5 ml de solución fisiológica (1:1) se homogenizó. En otro tubo Falcón se adicionaron 2 ml del histopaquete®- 1077(Sigma-Aldrich) al fondo del tubo, posteriormente se agrega cuidadosamente la mezcla anterior (10 ml), evitando que se mezclen las fases. Los tubos fueron centrifugado a 2000 rpm x 30 minutos. Posteriormente, con una pipeta Pasteur, se tomó el anillo de células aisladas⁴⁴.

Ensayo del cometa

Se tomaron 40 µl de la suspensión celular (linfocitos) de cada tubo, se le adicionaron 80 µl de agarosa de bajo punto de fusión (1%), se colocó la mezcla sobre un portaobjetos (previamente elaborado con una capa de agarosa de bajo punto de fusión al 1%). Se colocó en una charola con temperatura menor a 5 °C para gelificar la agarosa. Se tomaron 80 µl de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) y se colocó sobre el preparado anterior a manera de generar un “sándwich” con las células. Las láminas se expusieron durante 1 hora a una solución de lisis, elaborada previamente con NaCl (14.62g), Tris-base (0.1214g), hojuelas de NaOH (1.2g) y el EDTA Na₂ (3.7224g) con un pH de 10 y una temperatura de 4°C. Posteriormente las láminas se colocaron en la cámara de electroforesis horizontal y se dejaron en pre - electroforesis con la solución de electroforesis elaborada previamente con, EDTA (1.86 g / 25mL) NaOH (40 g / 100mL). El tiempo de pre- electroforesis fue de 15 minutos a 4°C. Se corrió la electroforesis a 300 mA y 25 V durante 20 minutos. Posteriormente, se lavó 3 veces con solución de tris base, esperando 5 minutos entre cada enjuague. Para la lectura, las láminas fueron teñidas con 60 µl de bromuro de etidio (2 µg/mL). Las láminas se analizaron usando el microscopio de fluorescencia Zeiss con un filtro de excitación BP 546/10 nm y un filtro de barrido de 590 nm ⁴⁵.

6.6 Implicaciones bioéticas

Basado en el convenio sobre la diversidad biológica de las Naciones Unidas, el cual fue firmado por 193 países, se estableció en 1992 y entró en vigor en diciembre de 1993, donde:

- El valor intrínseco de la diversidad biológica hacia la ecología, genética, social, económico, científico, educativo, cultural, recreativo y estético.
- El derecho al uso sostenible de los recursos biológicos en beneficio de las generaciones actuales.
- Generar conocimiento de entendimiento básico para desarrollar las capacidades científicas, técnicas e institucionales.

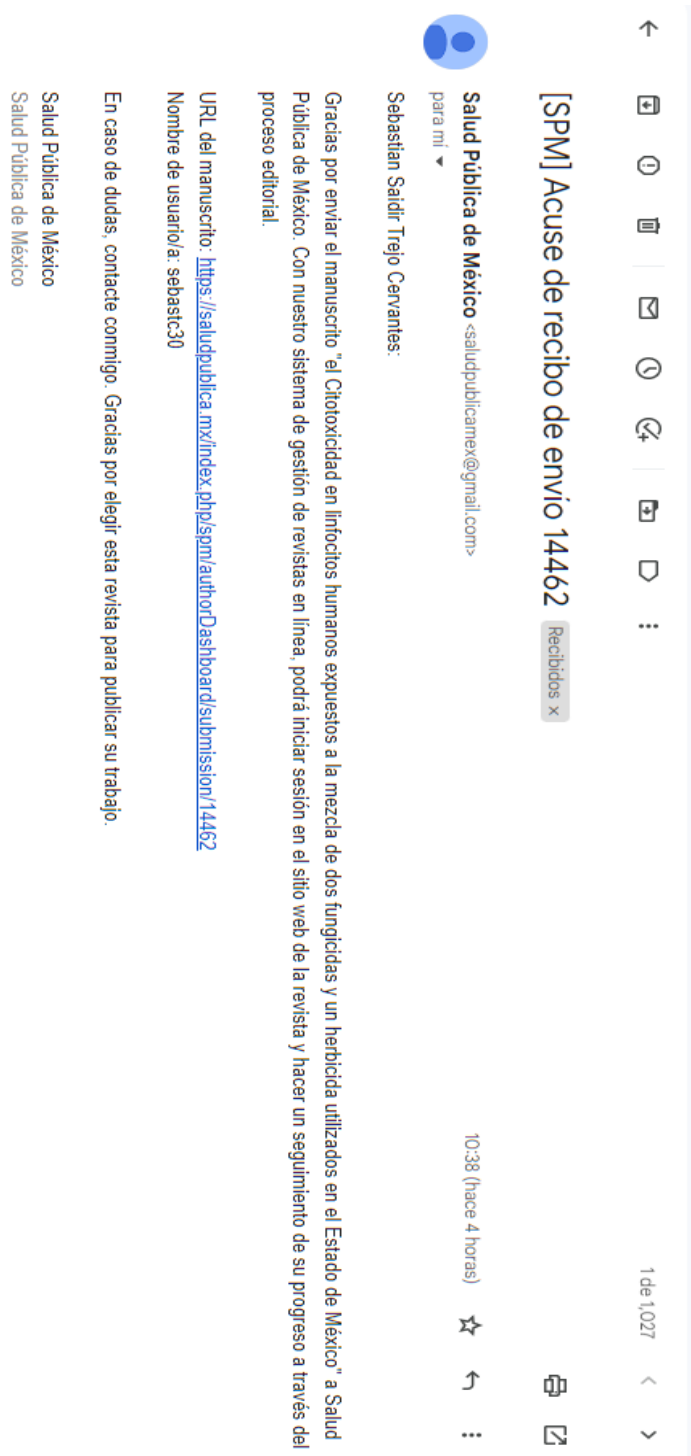
Ley General de Salud en Materia de Investigación Médica pronuncia lo siguiente en el artículo 3° del capítulo único: ⁴⁶

La investigación para la salud comprende el desarrollo de acciones que contribuyan:

- I. Al conocimiento de los procesos biológicos y psicológicos en los seres humanos;
- II. Al conocimiento de los vínculos entre las causas de enfermedad, la práctica médica y la estructura social;
- III. A la prevención y control de los problemas de salud;
- IV. Al conocimiento y evaluación de los efectos nocivos del ambiente en la salud;
- V. Al estudio de las técnicas y métodos que se recomienden o empleen para la prestación de servicios de salud, y
- VI. A la producción de insumos para la salud.

VII. Resultados

7.1 Carta de envío del artículo



7.2 Resumen del artículo

Los pesticidas juegan un papel fundamental en la protección de los cultivos contra las enfermedades, plagas y malezas, los fungicidas inhiben el crecimiento de los hongos, los herbicidas eliminan las malezas y hierbas no deseadas en cultivos. La mezcla de fungicidas y herbicidas es una práctica común para el control de plagas, con la finalidad de mejorar la calidad de los cultivos de alimentos. **Objetivo:** Evaluar citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a la mezcla de dos fungicidas y un herbicida, comúnmente utilizados. **Métodos:** Se aislaron linfocitos de sangre periférica, se expusieron a la mezcla de los fungicidas Captan ultra® 50 WP (Captan: N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida), Coraza® 720S (clorotalonil: 2,4,5,6-tetracloroisoftalonitrilo) y el herbicida Faena fuerte® (Sal de potasio N-fosfonometilglicina), a concentraciones de 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µM, se determinó la DL⁵⁰ de cada pesticida y la genotoxicidad mediante electroforesis alcalina de células individuales (ensayo cometa), se determinó el -Tail Length (TL), Tail Moment (TM) y el Tail Intensity del ADN fuera del núcleo conformando la cola del cometa. **Resultados:** Los fungicidas Captan® Ultra, Clorotalonil y Faena fuerte® presentan citotoxicidad y genotoxicidad a concentraciones 40 mM en linfocitos a 24 horas de exposición. **Conclusiones** Los tres PC causan daño al ADN de los linfocitos a 24 horas de exposición. La mezcla de pesticidas Captan® Ultra más Faena fuerte® y Clorotalonil más Faena fuerte® presentan diferencias respecto a la toxicidad y genotoxicidad de los PC de manera individual.

VIII. Discusión

Citotoxicidad

Respecto a la determinación de la citotoxicidad, todos los PC evaluados A, B, C y A+B, A+C fueron tóxicos en linfocitos en concentraciones de 100 µM, estas concentraciones coinciden con las reportadas por Kanemoto¹⁶, que evaluó al fungicida Ziram® (dimetilditiocarbamato de zinc) en tejido de la glándula del timo de modelos murinos Wistar a una concentración de 100 µM a 24 hrs, encontrando un significativo aumento de la letalidad celular; por su parte, Ae, 2018 evaluó el Bifenil (precursor en la elaboración de pesticidas, como fungicidas e insecticidas) en timocitos de rata Wistar, encontró que a 100 µM aumento significativamente la muerte celular después de la incubación de 3 hrs.

Para el caso del Captan® los valores encontrados en esta investigación (30 y 40 µM) respectivamente, son similares a los reportados por Inoue¹⁷, pero difieren respecto al tiempo de exposición; el autor evaluó la toxicidad en células de timo de ratas Wistar macho durante 1 h y luego se incubaron durante 3 horas más con IP y anexina a concentraciones de 1, 3, 10 y 30 µM, encontrando que a 30 µM aumentó considerablemente la población de células muertas. Respecto al fungicida Clorotalonil, los resultados encontrados respecto a la (DL₅₀) son similares a los reportados por Ikeda¹⁸, donde encontró que a una concentración de 30 µM a 24 hrs de exposición, aumento la muerte de células de modelos murinos Wistar. Para el Glifosato, los resultados de la toxicidad obtenidos no son similares a otros autores como Kilic¹⁹, con los herbicidas Pendimetalina® y Trifluralina (Dinitroanilina), que mostraron efectos citotóxicos a una concentración de 66 µM y 128 µM a las 18 horas de exposición en líneas celulares V79 (ATCC), iniciado en concentraciones de 2,5 hasta 500 µM); y

Barbasz²⁰ (2020) quien determinó la citotoxicidad de este PC en células de humano (U-937 y HL-60), expuestas a 24 horas a concentración de 3,600 µg/mL; encontrando una viabilidad del 20% de células.

En todas los PC evaluados se encontró una tendencia general de dosis-repuesta, que coincide con la investigación de Srivastava²¹ (2012) que determinó los efectos citotóxicos del fungicida Mancozeb® en linfocitos humanos, donde se evaluaron diferentes concentraciones 0.2–10 µg/ml, a 6, 12 y 24 hrs, de exposición; se encontró que los resultados revelaron una inhibición dependiente de la dosis sobre el crecimiento y proliferación celular;

Genotoxicidad

No se encontraron informes de genotoxicidad de los fungicida Captan y Clorotalonil en linfocitos humanos, solo se encontraron reportes de diferentes fungicidas, como los reportados por Ferri²², que coinciden con esta investigación, donde evaluó la genotoxicidad en leucocitos humanos a través de la exposición directa en agricultores de los fungicidas Mancozeb®, Fosetil®, Oxidicloruro de cobre® y Pencoanol®, obteniendo similitudes en la desviación estándar (SD) de los parámetros TL (6.04) y TM (2.52), a concentraciones de 2.5 µM a 30 µM y 100 µM.

Pero difieren de los reportados por Valencia²³ determino el daño al ADN de muestras periféricas de sangre en agricultores expuestos a pesticidas como el Mancozeb® y Paraquat®, encontrando diferencias en el TL, TI y el TM del grupo expuesto ($78,80 \pm 3,77\%$, $22,40 \pm 1,48\%$, $6,34 \pm 0,76\%$ y $16,29 \pm 1,49\%$) y el grupo control ($55,62 \pm 2,72\%$, $9,21 \pm 0,80\%$, $1,89 \pm 0,24\%$ y $5,69 \pm 0,64\%$), los parámetros de TL y TM determinan la magnitud del material genético que es desprendido del núcleo.

En la investigación realizada por Saquib²⁴, en donde se evaluó la actividad genotóxica del fungicida Tiofanato Metílico a concentraciones de (0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM) en linfocitos humanos a 3 horas de exposición, Los resultados para la genotoxicidad en la concentración más alta fue de 40.30 ± 2.64 en el TM, para el TL arrojó un 201.22 ± 1.09 µm de fragmentos y Daño del ADN fue de $44.39 \pm 2.03\%$. Estos resultados, contrastados con lo hallado en esta investigación tienen 8.19 ± 7.29 del momento de la cola para el Captan ultra (CP) y 4.67 ± 4.65 para el Clorotalonil (CL), en el TL 38.04 ± 14.63 µm y 31.74 ± 10.21 µm respectivamente, para el daño (%) se obtuvieron valores $39.17 \pm 24.08\%$ para el CP y $27.31 \pm 19.33\%$ para CL.

En un estudio, realizado por Nagy²⁵ en líneas celulares de muestra de línea blanca de sangre periférica de humano, donde se evaluó el fungicida Penycuron a concentraciones de (5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml), a una hora de exposición, donde Penycuron indujo un aumento de daño dependiente de la dosis del químico evaluado sobre el daño del ADN en las células. Se encontró una correlación positiva entre el daño en el ADN y la concentración (TI: $r = 0,968$, $p = 0,000$; TL de: $r = 0,965$, $p = 0,000$), se observó un aumento significativo del ADN de la cola y los valores de longitud de la cola como resultado de exposiciones de penycuron de 50 y 100 µg/ml. Respecto al herbicida a base de glifosato los resultados obtenidos son similares a los reportados por Mladinic²⁶ (2009) quien evaluó linfocitos de muestras simples de sangre expuestas a concentraciones crecientes del herbicida, mediante ensayo cometa, encontró daños genotóxicos (24 hrs), que aumentaron la necrosis y la apoptosis a concentraciones de 0.50 µM, con un TL de $0.5 \pm 0.18 \%$ y TI de 0.41 ± 0.32 µm.

Por su parte Mañas²⁷, evaluó la genotoxicidad del glisofato, mediante ensayo cometa, en linfocitos de sangre periférica de humanos, encontró un TM de $(5,42 \pm 1,83\%)$. en un rango de concentraciones de 3,00 a 7,50 μM respectivamente en un tiempo de exposición a 48 horas de exposición, los valores hallados en la exposición del herbicida en esta investigación superan los encontrados por Mañas, sin embargo, la concentración más alta, utilizada fue de 100 μM obteniendo un TM de $7.27 \pm 6.98\%$, esto puede deberse a la menor concentración utilizada por el autor.

Otro tipo de herbicidas examinados por Zeljezic²⁸, quien evaluó Atrazina® y Gesaprim® (s-[triazina](#)) a concentraciones de 0,047 $\mu\text{g/ml}$, 0,47 $\mu\text{g/ml}$ y 4,7 $\mu\text{g/ml}$, en linfocitos humanos a 0,5, 1, 3, 5 y 8 h de tratamiento los valores de TL y TI durante las 8 h de tratamiento expresaron $(14,3 \pm 14,9 \mu\text{m}$ y $0,2 \pm 0,6 \%$ de ADN, respectivamente). Después de 8 h de tratamiento con Gesaprim®, el valor medio del TL de las células aumentó en un 85,7%, 63,6% y 29,2% para las concentraciones de 4,7 $\mu\text{g/ml}$, 0,47 $\mu\text{g/ml}$ y 0,047 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Los valores medios del TI aumentaron 14,5, 9,75 y 3,2 puntos porcentuales, respectivamente. También utilizaron menores concentraciones.

La mezcla de PC sugiere una asociación con el aumento de los efectos tóxicos y genotóxicos en linfocitos humanos, el daño del ADN es un primer paso hacia la carcinogénesis y otras alteraciones en la salud humana.

IX conclusión

Los fungicidas Captan® Ultra, Clorotalonil y Faena fuerte® presentan citotoxicidad en linfocitos a 24 horas de exposición. Los tres PC causan daño al ADN de los linfocitos a 24 horas de exposición. La mezcla de pesticidas Captan® Ultra más Faena fuerte® y Clorotalonil más Faena fuerte® presentan diferencias respecto a la toxicidad y genotoxicidad de los PC de manera individual.

X Referencias

1. El-Nahhal Y, El-Nahhal I. Cardiotoxicity of some pesticides and their amelioration. *Environ Sci Pollut Res*. 2021;28(33):44726–54.
2. Unidos A de PA de E. No Title [Internet]. Basic Information about Pesticide Ingredients. 2019. p. 1. Available from: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>
3. Qu RY, He B, Yang JF, Lin HY, Yang WC, Wu QY, et al. Where are the new herbicides? *Pest Manag Sci*. 2021;77(6):2620–5.
4. Ramos JSA, Pedroso TMA, Godoy FR, Batista RE, de Almeida FB, Francelin C, et al. Multi-biomarker responses to pesticides in an agricultural population from Central Brazil. *Sci Total Environ* [Internet]. 2021;754:141893. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141893>
5. Yousefi M, Rahimi-Nasrabadi M, Mirsadeghi S, Pourmortazavi SM. Supercritical Fluid Extraction of Pesticides and Insecticides from Food Samples and Plant Materials. *Crit Rev Anal Chem*. 2021;51(5):482–501.
6. Marican A, Durán-Lara EF. A review on pesticide removal through different processes. *Environ Sci Pollut Res*. 2018;25(3):2051–64.
7. Richardson JR, Fitsanakis V, Westerink RHS, Kanthasamy AG. Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2019;138(3):343–62. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02033-9>
8. Rosa S, Pesaresi P, Mizzotti C, Bulone V, Mezzetti B, Baraldi E, et al. Game-changing alternatives to conventional fungicides: small RNAs and short peptides. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2022;40(3):320–37. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.07.003>
9. Junqueira VB, Müller C, Rodrigues AA, Amaral TS, Batista PF, Silva AA, et al. Do fungicides affect the physiology, reproductive development and productivity of healthy soybean plants? *Pestic Biochem Physiol*. 2021;172(June 2020).

10. Bohnert S, Neumann H, Thines E, Jacob S. Visualizing fungicide action: an in vivo tool for rapid validation of fungicides with target location HOG pathway. *Pest Manag Sci*. 2019;75(3):772–8.
11. Mojiri A, Zhou JL, Robinson B, Ohashi A, Ozaki N, Kindaichi T, et al. Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. *Chemosphere* [Internet]. 2020;253:126646. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126646>
12. FRAC. Modo de acción: clasificación de fungicidas y bactericidas según el modo de acción [Internet]. 2019;1:28. Available from: <http://www.dimune.com/assets/bionox.pdf>
13. Kaushal J, Khatri M, Arya SK. A treatise on Organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2021;207:111483. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111483>
14. Dayan. Herbicide Discovery. *Weed Manag Handb*. 2019;93–113.
15. Gastiazoro MP, Durando M, Milesi MM, Lorenz V, Vollmer G, Varayoud J, et al. Glyphosate induces epithelial mesenchymal transition-related changes in human endometrial Ishikawa cells via estrogen receptor pathway. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2020;510(February):110841. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110841>
16. Tóth G, Háhn J, Radó J, Szalai DA, Kriszt B, Szoboszlai S. Cytotoxicity and hormonal activity of glyphosate-based herbicides. *Environ Pollut* [Internet]. 2020;265:115027. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115027>
17. Masood MI, Naseem M, Warda SA, Tapia-Laliena MÁ, Rehman H ur, Nasim MJ, et al. Environment permissible concentrations of glyphosate in drinking water can influence the fate of neural stem cells from the subventricular zone of the postnatal mouse. *Environ Pollut*. 2021;270.
18. Mohammed AM, Huovinen M, Vähäkangas KH. Toxicity of diuron metabolites in human cells. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2020;78(May):103409.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103409>

19. CEDRSSA centro de estudios para el desarrollo rural sostenible y la soberania alimentaria. uso y regulación de herbicidas en Mexico. uso y Regul Herbic en México. 2020;66:37–9.
20. FAO. Global situation of pesticide management in agriculture and public health. 2018.
21. Lichtenstein D, Mentz A, Sprenger H, Schmidt FF, Albaum SP, Kalinowski J, et al. A targeted transcriptomics approach for the determination of mixture effects of pesticides. *Toxicology* [Internet]. 2021;460(August):152892. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152892>
22. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), Martinez A, Ruiz L, Gavilán A. Perspectivas de las Importaciones y Exportaciones de Plaguicidas en México. 2020;56. Available from: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/559746/PerspectivasImportacionesExportacionesPlaguicidas.pdf>
23. Statistics Division (ESS) ES team. pesticides indicators [Internet]. pesticides indicators. 2018. p. 1. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>
24. Arellano-Aguilar O, Rendón J. La huella de los plaguicidas en México. Greenpeace [Internet]. 2018;1:21. Available from: http://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/Graficos/2016/comida-sana/Plaguicidas_en_agua_ok_EM.pdf
25. Mostafalou S, Abdollahi M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol*. 2017;91(2):549–99.
26. Ferrer A. Intoxicación por plaguicidas. *An Sist Sanit Navar*. 2003;26(SUPPL. 1):155–71.
27. Morillo A. Intoxicaciones agudas en atención primaria. *Consult Umbrete* [Internet]. 2019;20(2173–5573):108. Available from: <https://www.samfyc.es/wp->

content/uploads/2020/01/v20n2.pdf

28. OLGA LILIANA ANGUIANO, ANA FERRARI C, INÉS LASCANO, WALTER COPESES JS, CRISTINA AMPDDY, MONTAGNA M. Conociendo los efectos adversos de los plaguicidas podremos cuidar nuestra salud y el ambiente. segunda. 2015. 71 p.
29. Kim KH, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ* [Internet]. 2017;575:525–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
30. INEGI [Internet]. 2022. Available from: <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=15#collapse-Mapas>
31. SIAP. avance de siembras y cosechas por estado [Internet]. avance de siembras y cosechas por estado. 2020. Available from: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do;jsessionid=F4D771FA33518898642890D959D5F41B
32. Poletto E, Baldo G. Creating cell lines for mimicking diseases [Internet]. 1st ed. Vol. 181, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc.; 2021. 59–87 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.01.014>
33. Huo Y, Wang J, He J, Kong D, Ma J. Establishment of human induced pluripotent stem cell line from dermal fibroblasts of a healthy individual. *Stem Cell Res* [Internet]. 2020;44(February):101762. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101762>
34. Skok K, Gradišnik L, Maver U, Kozar N, Sobočan M, Takač I, et al. Gynaecological cancers and their cell lines. *J Cell Mol Med*. 2021;25(8):3680–98.
35. Cheung ST, Chan SL, Lo KW. Contaminated and misidentified cell lines commonly use in cancer research. *Mol Carcinog*. 2020;59(6):573–4.
36. Casciati A, Tanori M, Manczak R, Saada S, Tanno B, Giardullo P, et al. Human medulloblastoma cell lines: Investigating on cancer stem cell-like phenotype.

- Cancers (Basel). 2020;12(1):1–14.
37. Timoumi R, Amara I, Ben Salem I, Abid-Essefi S. Triflumuron induces cytotoxic effects on hepatic and renal human cell lines. *J Biochem Mol Toxicol*. 2020;34(8):1–12.
 38. Gartner L. Texto de histología. Atlas a color. Elseviercastellano, editor. 2017. 672 p.
 39. Kumar B V., Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* [Internet]. 2018;48(2):202–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
 40. Vega Robledo GB. Linfocitos. *Rev la Fac Med UNAM* [Internet]. 2009;52(6):2. Available from: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-6/RFM052000609.pdf>
 41. Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment interactions. *Mutagenesis*. 2008;23(3):191–205.
 42. Rr T, E A, D A, B B, A H, H K, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology. *Arch Env Contam Toxicol*. 2000;35:112–22.
 43. Maluf SW, Erdtmann B. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;124(1):71–5.
 44. Kizhakeyil A, Ong ST, Fazil MHUT, Chalasani MLS, Prasannan P, Verma NK. Isolation of human peripheral blood T-lymphocytes. *Methods Mol Biol*. 2019;1930:11–7.
 45. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184–91.
 46. SSA. REGLAMENTO DE LA LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA DE INVESTIGACION PARA LA SALUD [Internet]. Available from: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>

47. Kanemoto-Kataoka Y, Oyama TM, Ishibashi H, Oyama Y. Zinc is a determinant of the cytotoxicity of Ziram, a dithiocarbamate fungicide, in rat thymic lymphocytes: Possible environmental risks. *Toxicol Res (Camb)*. 2017;6(4):499–504.
48. Inoue T, Kinoshita M, Oyama K, Kamemura N, Oyama Y. Captan-induced increase in the concentrations of intracellular Ca^{2+} and Zn^{2+} and its correlation with oxidative stress in rat thymic lymphocytes. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2018;63:78–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.017>
49. Ikeda M, Deguchi J, Fukushima S, Qingyu A, Katayama N, Miura H, et al. Some adverse actions of chlorothalonil at sublethal levels in rat thymic lymphocytes: Its relation to Zn^{2+} . *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018;59:61–5.
50. Sarıgöl Kılıç Z, Aydın S, Ündeğer Bucurgat Ü, Başaran N. In vitro genotoxicity assessment of dinitroaniline herbicides pendimethalin and trifluralin. *Food Chem Toxicol*. 2018;113(December 2016):90–8.
51. Barbasz A, Kreczmer B, Skórka M, Czyżowska A. Toxicity of pesticides toward human immune cells U-937 and HL-60. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes*. 2020;55(8):719–25.
52. Srivastava AK, Ali W, Singh R, Bhui K, Tyagi S, Al-Khedhairi AA, et al. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. *Life Sci* [Internet]. 2012;90(21–22):815–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.013>
53. Ferri GM, Cavone D, Dambrosio M, Intranuovo G, Schiavulli N, Birtolo F, et al. Lymphocytes DNA damages and exposure to chlorpyrifos, deltamethrin, penconazole, copper oxichloride. *Biomarkers* [Internet]. 2019;24(2):186–98. Available from: <https://doi.org/10.1080/1354750X.2018.1539766>
54. Valencia-Quintana R, López-Durán RM, Milić M, Bonassi S, Ochoa-Ocaña MA, Uriostegui-Acosta MO, et al. Assessment of cytogenetic damage and cholinesterases' activity in workers occupationally exposed to pesticides in zamora-jacona, michoacan, mexico. *Int J Environ Res Public Health*.

- 2021;18(12):1–17.
55. Saquib Q, Siddiqui MA, Ansari SM, Alwathnani HA, Musarrat J, Al-Khedhairi AA. Cytotoxicity and genotoxicity of methomyl, carbaryl, metalaxyl, and pendimethalin in human umbilical vein endothelial cells. *J Appl Toxicol* [Internet]. 2021;41(5):832–46. Available from: <https://doi.org/10.1002/jat.4139>
 56. Nagy K, Tessema RA, Budnik LT, Ádám B. Comparative cyto- and genotoxicity assessment of glyphosate and glyphosate-based herbicides in human peripheral white blood cells. *Environ Res* [Internet]. 2019;179:108851. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108851>
 57. Moura M De, Houten B Van. Review Article. *Environ Mol Mutagen* [Internet]. 2010;405(April):391–405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/em.20575>
 58. Mañas F, Peralta L, Raviolo J, Ovando HG, Weyers A, Ugnia L, et al. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009;28(1):37–41.
 59. Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V, Perkovic P. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicol Vitro*. 2006;20(6):923–35.

XI. Anexos:

Tesis MCS 2022

INFORME DE ORIGINALIDAD

20%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.redalyc.org Internet	160 palabras — 2%
2	belchim.es Internet	80 palabras — 1%
3	www.elsevier.com Internet	79 palabras — 1%
4	tesis.ipn.mx Internet	50 palabras — 1%
5	ouci.dntb.gov.ua Internet	49 palabras — 1%
6	maestroviejo.es Internet	47 palabras — 1%
7	hs-kl.de Internet	45 palabras — < 1%
8	www.certiseurope.es Internet	44 palabras — < 1%
9	www.monografias.com Internet	41 palabras — < 1%
10	revistas.udea.edu.co Internet	