



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

**“Determinación del Efecto Hepatotóxico en Ratones CD-1 a la Exposición
Conjunta de los Fungicidas Captan y Clorotalonil”**

PROTOCOLO DE TESIS

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

Presenta:

Lic. en Biotecnología
Bárbara Gallegos Inzunza

Comité de Tutores

Director de tesis:

Dr. En Ciencias Biológicas
Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Co-director:

Dra. en Ciencias
Ninfa Ramírez Durán

Asesor:

Dra. en Ciencias
Arely Bautista Gálvez

Toluca, Estado de México

Año 2025

INDICE

	No. página
1. Resumen	3
Abstract	4
2. Introducción	5
3. Marco teórico	5
1.1 Pesticidas	6
1.2 Clasificación de los pesticidas	7
1.3 Toxicidad de los pesticidas	7
1.4 Composición química de los pesticidas	8
1.5 Utilización de acuerdo con su objetivo	9
1.6 Uso de pesticidas a nivel mundial	10
1.7 Uso de pesticidas en México	11
1.8 Regulación de pesticidas en México	12
2 Estado de México	13
2.1 Daños ocasionados por los pesticidas	14
3 Fungicidas	15
3.1 Captan	15
3.2 Clorotalonil	16
3.3 Toxicidad de los fungicidas Captan y Clorotalonil	16
3.4 Mezcla de pesticidas	20
3.5 Hígado	25
3.6 Hepatotoxicidad	25
3.7 Citoqueratina CK18	25
3.8 inmunohistoquímica antiCK18	25
4 Modelos murinos	26
4. Planteamiento del problema y pregunta de investigación	29
5. Hipótesis <i>(nula y alterna)</i>	31
6. Objetivos <i>(general y particulares)</i>	32
7. Descripción metodológica	33
7.1 Diseño de estudio	33
7.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	33
7.3 Procedimientos	34

7.3.1	Manejo de animales de experimentación	34
7.3.2	Esquema de suplementación de fungicidas	34
7.3.2.1	Eutanasia	35
7.3.2.2	Obtención de muestras biológicas	35
7.3.2.3	Cortes y deshidratación	35
7.3.2.4	Inclusión y formación del bloque de parafina	35
7.3.2.5	Obtención de los cortes histológicos	36
7.3.2.6	Tinción de hematoxilina y eosina	36
7.3.2.7	Tinción de PAS-Shiff	36
7.3.2.8	Tinción tricromica de Masson	37
7.3.3	Análisis histopatológico del hígado	37
7.3.3.1	Inmunohistoquímica	38
7.4	Variables de Estudio	39
7.5.	Implicaciones Bioéticas	40
7.6.	Recolección de Datos	40
7.6.1	Visualización	40
7.6.2.	Análisis Estadístico	40
7.6.3	Límite de espacio y tiempo	40
8.	Resultados	41
8.1	Carta de envió	41
8.2	Resumen del artículo	42
8.3	Discusión	43
8.4	Conclusiones	44
8.4	Agradecimientos	45
9.	Referencias bibliográficas	46
10.	Anexos	55

RESUMEN

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) define los plaguicidas o pesticidas (PC) como “*cualquier sustancia o mezcla de estas intencionadas para prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier peste*”, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) reportó que durante el año 2022 el uso global de pesticidas rebasó las 3,000,000 toneladas y en México se usaron más de 19 mil toneladas durante el mismo período. Los fungicidas (FGC) son PC utilizados para prevenir, eliminar y erradicar las infecciones en cultivos provocadas por hongos. En el Estado de México la utilización de los FGC Captan (CAPT) y Clorotalonil (CLOR) es común. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto hepatotóxico causado por la exposición individual y conjunta de los fungicidas Captan 50 WP® y Coraza 720S® en ratones CD-1. **Métodos:** Se evaluaron los fungicidas: **A)** Captan Ultra 50 WP® (CAPT) (N-(triclorometilto) ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida) y **B)** Coraza 720S® (CLOR) (Chlorotalonil, 2,4,5,6-Tetracloro Ftalonitrilo) individualmente de (100 mg de fungicida/kg de peso) y **C)** combinados Capt- Clor (100 mg de Captan Ultra 50 WP® /kg + 100 mg de Coraza 720S® /kg). El Grupo Control (**C**) solo agua. Se realizaron cortes histológicos del hígado y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E), PAS-Shift y Tricrómica de Masson (TTM), finalmente se realizó un inmunoensayo anticitoqueratina. **Resultados:** No se encontraron diferencias en el área de capilares sinusoides (μm^2) en las tinciones de PAS-Shift y Tricrómica de Masson, pero significativas en la tinción H&E entre los grupos Ct y la mezcla Capt-Clor. También se encontraron diferencias en la expresión anti-CK18 entre los grupos Capt, Clor y mezcla Capt-Clor con respecto al el grupo Ct. **Conclusiones:** el hígado en ratones presenta alteraciones morfológicas debido a la exposición a los fungicidas utilizados.

ABSTRACT

The United States Environmental Protection Agency (USEPA) defines pesticides or pesticides (PC) as "any substance or mixture of these intended to prevent, destroy, repel or mitigate any pest", according to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) reported that during the year 2022 the global use of pesticides exceeded 3,000,000 tons and in Mexico more than 19 thousand tons were used during the same period. Reports suggest that damage caused by PC worldwide is more frequently reported in middle-income countries and rural areas where agricultural activities are practiced. Consequently, the population faces greater exposure to PC. Fungicides (FGCs) are PCs used to prevent, eliminate, and eradicate fungal crop infections. In the State of Mexico, the use of the FGCs Captan (CAPT) and Chlorotalonil (CLOR) is common, despite studies supporting their toxicity in various organisms. Mixing FGCs is a common and recommended practice worldwide to improve pest control; However, this practice can result in toxicokinetic and toxicodynamic changes when using only one FGC. Currently, there is very little information on the hepatotoxicity induced by the combination of fungicides in humans. The objective of this study was to determine the hepatotoxic effect caused by individual and combined exposure to the fungicides Captan 50 WP® and Coraza 720S® in CD-1 mice. Methods: The following fungicides were evaluated: A) Captan Ultra 50 WP® (CAPT) (N-(trichloromethylthio) cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide) and B) Coraza 720S® (CLOR) (Chlorothalonil, 2,4,5,6-Tetrachloro Phthalonitrile) individually (100 mg of fungicide/kg of weight) and C) combined Capt-Clor (100 mg of Captan Ultra 50 WP® /kg + 100 mg of Coraza 720S® /kg). The Control Group (C) only water. Results: No differences were found in the area of sinusoidal capillaries (μm^2) in PAS-Shiff and Masson's Trichrome stains, but significant differences were found in H&E staining between the Ct and Capt-Clor groups. Differences were also found in anti-CK18 expression between the Capt, Clor and Capt-Clor mixture groups compared to the Ct group. Conclusions: The liver in mice presents morphological alterations due to exposure to the fungicides used.

I. Introducción

Marco teórico

1.1 Pesticidas

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) define a los PC como *“cualquier sustancia o mezcla de estas intencionadas para prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier peste”* (USEPA,2025). Por su parte, para la Organización Mundial de la Salud (OMS) los PC son *“compuestos químicos utilizados para combatir pestes de toda clase como como los insectos, roedores, hongos, hierbas, etc., que pueden actuar como vectores de enfermedades”* (OMS, 2020).

Se estima que hace aproximadamente 10,000 años, las civilizaciones humanas comenzaron a practicar la agricultura, así como la aplicación de métodos para conservar por más tiempo y en buenas condiciones sus recursos alimentarios, como ejemplo de estos eventos, fue el cultivo de vegetación venenosa junto a cultivos agrícolas con la finalidad de eliminar insectos a causa de su efecto protector. (Abubakar et al., 2020). En paralelo, los Sumerios y chinos adoptaron compuestos del sulfuro para combatir insectos y ácaros de sus. Actualmente los PC han evolucionado de fórmulas naturales derivadas de plantas, animales y minerales a compuestos sintéticos o industriales, desde la Segunda Guerra Mundial aparecieron nuevas empresas dedicadas a la formulación de nuevos pesticidas en Europa, Estados Unidos y Japón (Umetsu y Shirai, 2020).

En 1874 un evento vital marcó la historia de los PC que fue la síntesis del primer pesticida moderno con propiedades insecticidas: el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), el cual desde ese entonces se utiliza para el control de estas plagas en cultivos agrícolas. Sin embargo, se suspendió su uso en la década de 1970 debido a sus informes sobre efectos tóxicos en seres humanos y animales. Este evento despertó una preocupación pública de tipo sanitario en función de las consecuencias del uso de pesticidas en la salud humana. A pesar de esta situación, actualmente el uso del DDT se limita para el control de la malaria y otras enfermedades transmitidas por insectos (Harada et al., 2016).

1.2 clasificación de los pesticidas

Los PC son clasificados de acuerdo a diversos criterios como su toxicidad, peste a la que está dirigido, función, composición química, mecanismo de acción, formulación y fuente de origen (Akashe et al., 2018). Generalmente, son el modo de entrada, composición química y peste blanco los criterios más utilizados, aunque la OMS y el Sistema Global Armonizado (GHS) priorizan en la salud pública por lo que se enfocan más hacia la toxicidad basada en sus efectos dañinos secundarios (Pathak et al., 2022).

1.3 Toxicidad de los pesticidas

La toxicidad de un pesticida es la capacidad de producir un daño agudo a la salud por medio de la exposición en un período determinado de tiempo, depende en gran medida de su composición química, es decir, del reactivo o mezcla de diferentes reactivos y de su concentración, pero los factores más importantes que la definen son las dosis utilizadas o cantidad de sustancia administrada durante un tiempo específico de exposición, estos dos últimos determinarán si la toxicidad es aguda o crónica (Pathak et al., 2022). La toxicidad se clasifica en dosis letal 50 (DL₅₀), que es la concentración de la sustancia (mg/kg), administrada por vía oral o dérmica, que resulta mortal para el 50% de un grupo de animales experimentales; y concentración letal media 50 (CL₅₀), concentración de una sustancia en forma de vapor, gas, niebla o polvo (mg/L), administrada por inhalación, que resulta mortal para el 50% de un grupo de animales experimentales. La toxicidad es subdividida por la OMS en cinco grados de riesgo: Ia sumamente peligroso, Ib muy peligroso, II moderadamente peligroso, III poco peligroso, IV productos que no ofrecen peligro según la OMS (2019) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de los plaguicidas según la toxicidad

Grado de toxicidad	Dosis letal 50 (DL ₅₀) (mg/kg) en ratas			
Clasificación de riesgo OMS	Vía oral		Vía dérmica	
	Sólido	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia sumamente peligroso	5 ó < 5	20 ó < 20	10 ó < 10	40 ó < 40
Ib muy peligroso	5 > hasta 50	20 > hasta 200	10 > hasta 100	40 > hasta 400
II moderadamente peligroso	50 > hasta 500	200 > hasta 2000	10 > hasta 1000	40 > hasta 4000

III poco peligroso	500 > hasta 2000	2000 > hasta 3000	100 > hasta 1000	400 > hasta 4000
IV productos que normalmente no ofrecen peligro	2000>	3000>		

Fuente: elaboración propia basada en datos de la OMS (2019).

1.4 Composición química de los pesticidas

El método más común para clasificar a los pesticidas es analizando su composición química y naturaleza de sus ingredientes activos, de este modo es más viable determinar su modo de aplicación, precauciones y dosis. En la actualidad existen dos grupos principales de pesticidas: naturales y sintéticos, los naturales se subdividen en derivados de las plantas y minerales, mientras que los sintéticos en inorgánicos y orgánicos. A su vez, éste último se subdivide en: organoclorados, organofosforados y carbamatos (Figura 1), es una clasificación más compleja ya que la mayoría de los pesticidas modernos son de tipo orgánico (Kaur et al., 2019).

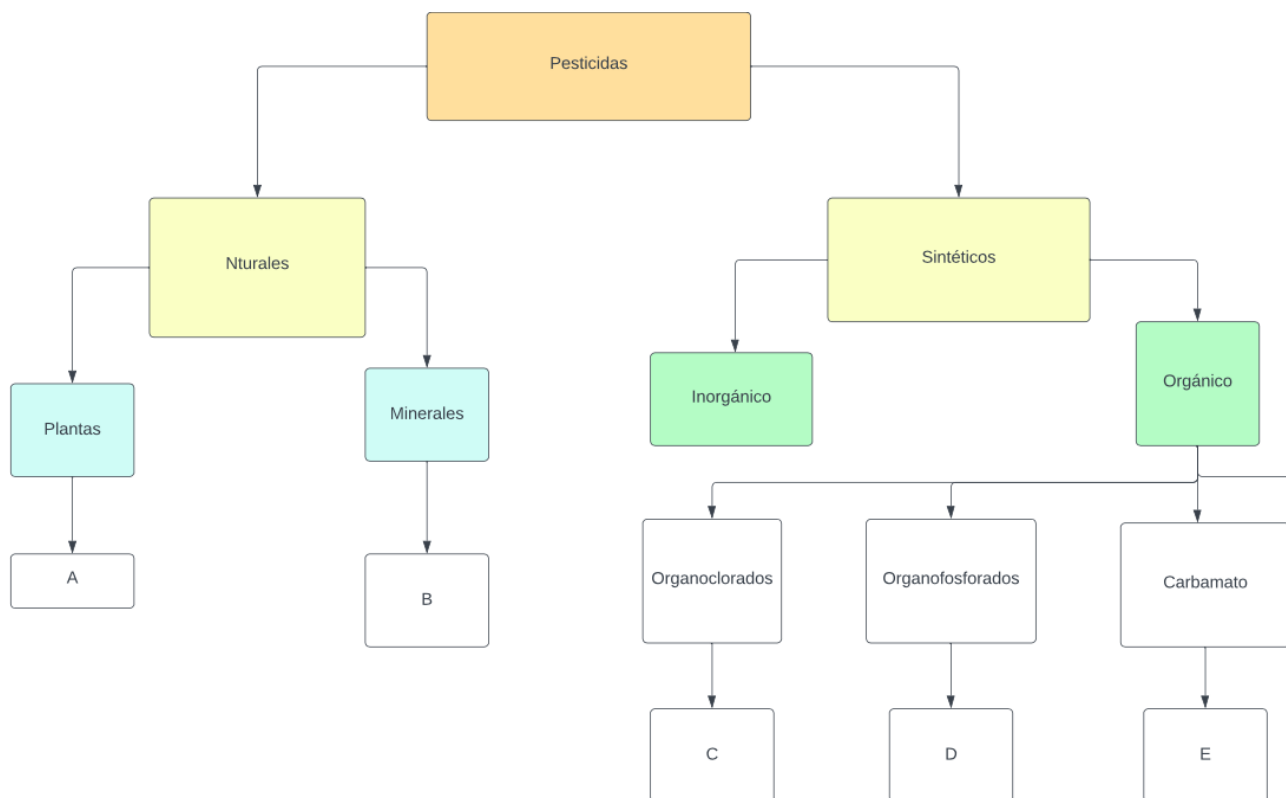


Figura 1. Clasificación de los pesticidas según su composición química. A): Fitoquímicos (fungicida) Cobre. (B): fungicida Hexaclorobenceno, (C): fungicida Fosetil Aluminio, (D) fungicida Metil-2-benzimidazol carbamato (E): fungicida. Fuente: elaboración propia. Información tomada de: Kaur et al., 2019.

1.5 Utilización de acuerdo con su objetivo

Como se mencionó previamente, los plaguicidas controlan las plagas o pestes, otro método de clasificación se basa en el tipo de organismo peste y a partir de ello recibe su nombre (Cuadro 2). Los nombres de los pesticidas son compuestos, al inicio incluyen el nombre del organismo y al final el sufijo en latín “cida” que significa “muerte o asesino” (Chandra y Linthoingami, 2017).

Cuadro 2. clasificación de los plaguicidas según la peste objetivo.

Tipo de pesticida	Peste objetivo	Ejemplo
Insecticidas	Insectos	Aldicarb
Fungicidas	Hongos	Azoxistrobina
Bactericidas	Bacterias	Complejos de cobre
Herbicidas	Hierbas	Atrazina
Acaricidas	Ácaros	Bifenazato
Rodenticidas	Roedores	Warfarina
Algicidas	Algas	Sulfato de cobre
Larvicidas	Larvas	Metopreno
Repelentes	Repele plagas por su aroma y sabor	Metiocarbo
Desicantes	Deshidrata los tejidos de las plantas	Ácido bórico
Ovicidas	Huevecillos de insectos	Benzoxacina
Virucidas	Virus	Escitovirina
Molusquicidas	Moluscos	Metaldehído
Nematicidas	Nemátodos	Aldicarb
Avicidas	Pájaros	Avitrol
Bolas de naftalina	Larvas de polillas	Diclorobenceno
Lampricidas	Lampreas	Triflurometil
Pisquicidas	Peces	Rotenona
Silvicidas	Vegetación que crece en la madera	Tebutiurón
Termiticidas	Termitas	Fipronil

Fuente: elaboración propia, información tomada de Fishel y Ferrell, (2013).

1.6 Uso de PC a nivel mundial

Los pesticidas son ampliamente utilizados en países de vías de desarrollo, al crecer la población de estos países, también la demanda alimenticia, por lo tanto, se prioriza la expansión de los sistemas agroalimentarios, su mantenimiento, control de plagas y crecimiento; para lograr dichos objetivos, los agricultores optan por la aplicación de pesticidas para eliminar pestes que puedan afectar sus cultivos (Sarkar et al., 2021). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAOSTAT) reportó que en el año 2022 el uso global de pesticidas fue de más de 3,690,000 toneladas (Figura 2 y 3). En el año 2019, se reportó que anualmente se pierde hasta el 45% de la producción alimentaria por infestación de pestes, la utilización de PC trae consigo beneficios para disminuir estas pérdidas, sin embargo, también presenta desventajas como contaminación ambiental, altas emisiones de CO₂ y compuestos tóxicos para los seres vivos. A pesar de que existen nuevas alternativas más amigables con el medioambiente como cultivos transgénicos para evitar el uso de estos químicos, no están al alcance de muchos países y otros simplemente prefieren continuar con la aplicación tradicional de PC (Sharma et al., 2019).

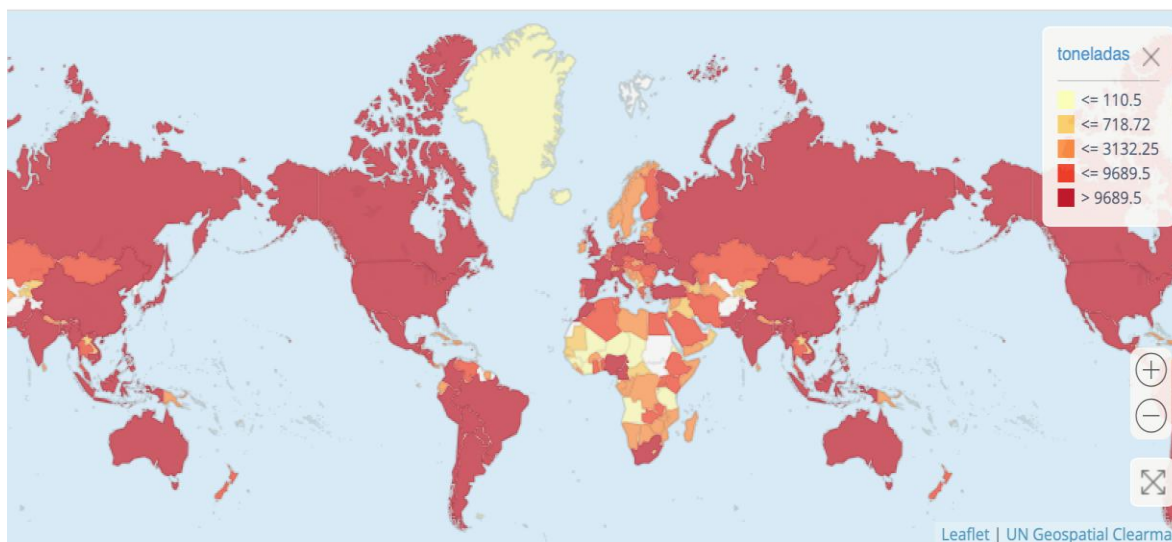


Figura 2. Mapa del uso agrícola global de pesticidas expresado en toneladas en el período 2022. Fuente: FAOSTAT. Disponible en <https://www.fao.org/faostat/es/#data/RP/visualize>

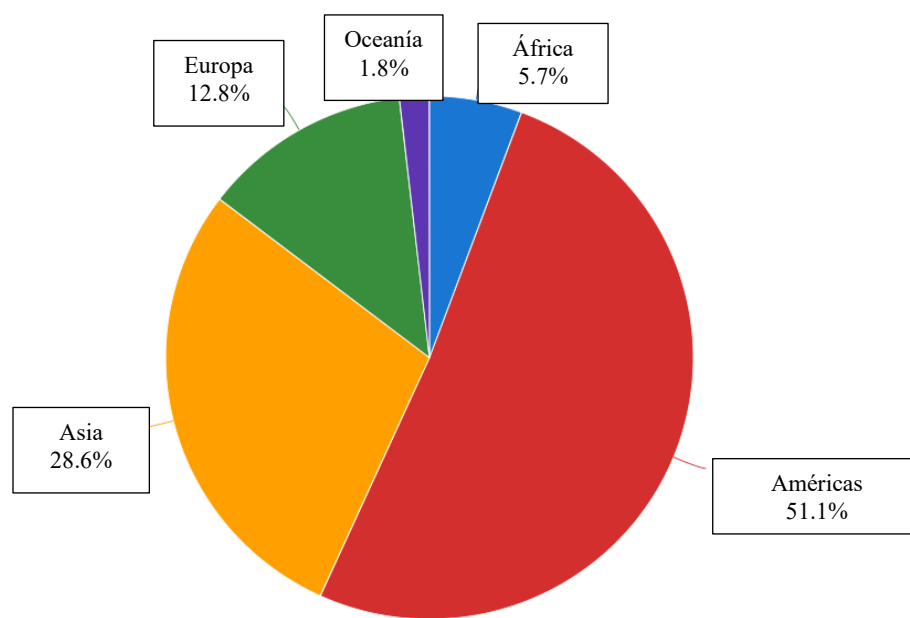


Figura 3. Uso de pesticidas en cultivos agrícolas a nivel global por continente expresado en porcentaje (año 2022). Fuente: FAOSTAT. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/RP/visualize>

1.7 Uso de Pesticidas en México

La agricultura en México contribuye al producto interno bruto (PIB) del país en un 3.7%, cerca de 30 millones de hectáreas son tierras de cultivo, la agricultura es intensiva en la mayor parte de México, la mayoría de las cosechas se encuentran en Sinaloa, Chihuahua, Tamaulipas, Zacatecas-Durango, Veracruz y Oaxaca y Chiapas, y por consecuencia también lo es el uso de pesticidas (Corona, 2016). Según los datos disponibles de la Gaceta del Senado de la República LXIII/2PPO-60/67821 las regiones con mayor uso de pesticidas son: Sinaloa, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Chiapas, Veracruz, Michoacán, Tabasco, el Estado de México, Puebla y Oaxaca. Se estima que en ellas se aplica 80% del total de plaguicidas usados en el país. La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), indica que actualmente los plaguicidas de mayor uso son los herbicidas e insecticidas, siendo los organofosforados los más utilizados, en especial el Paratión, Metamidofós y malatión (Garza, 2016). En las últimas décadas, el uso de PC (insecticidas, fungicidas y herbicidas) sintéticos ha aumentado notoriamente. De acuerdo con la Secretaría de Economía (2024), los insecticidas encabezaron la lista de preferencias comerciales. Aun así, las entidades federativas con más ventas internacionales (millones de dólares) fueron Ciudad de México (\$118), Jalisco (\$25), Guanajuato (\$1.2). Por su lado, la

FAOSTAT, en el año 2022 se consumieron en México más de 19 mil toneladas de PC (Figura 4), las entidades federativas con más compras internacionales (millones de dólares) de PC fueron la Ciudad de México (\$238), Jalisco (\$113), Estado de México (\$10), Sinaloa (\$3.9) y Nuevo León (\$2.7).

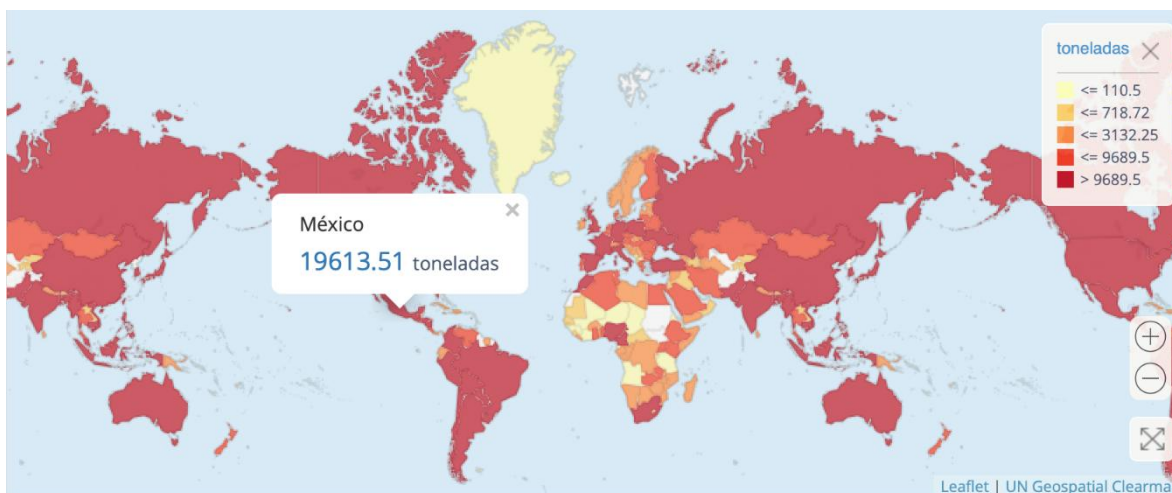


Figura 4. Mapa de uso agrícola de pesticidas en México expresado en toneladas en el período de 2022. Fuente: FAOSTAT. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/RP/visualize>.

1.8 Regulación de pesticidas en México

Los pesticidas pasan por una estricta regulación por parte de las autoridades regulatorias de México como la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), Secretaría de Salud (SALUD), Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), para su número de registro de ingrediente activo, tipo de producto líquido o suspensión y porcentaje de participación del ingrediente activo (OECD, 2021). Adicionalmente, según la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) también existen seis Normas Oficiales Mexicanas (NOM) dictadas en el Diario Oficial de la Federación (SADER, 2019):

- NOM-032-FITO-1995: *requisitos y especificaciones fitosanitarios para la realización de estudios de efectividad biológica de plaguicidas y su dictamen teórico.*
- NOM-033-FITO-1995: *requisitos y especificaciones fitosanitarios para el aviso de inicio de funcionamiento que deberán cumplir personas físicas o morales interesadas en comercializar plaguicidas agrícolas.*

- NOM-034-FITO-1995: *requisitos y especificaciones fitosanitarios para el aviso de inicio de funcionamiento que deberán cumplir las personas físicas o morales interesadas en la fabricación, formulación, formulación por maquila, formulación y/o maquila e importación de plaguicidas agrícolas.*
- NOM-052-FITO-1995: *requisitos y especificaciones fitosanitarios para presentar el aviso de inicio de funcionamiento por las personas físicas o morales que se dediquen a la aplicación aérea de plaguicidas agrícolas.*
- NOM-232-SSA1-2009: *requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico.*

De acuerdo con la FAO, la Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM) posee una gaceta de pesticidas altamente peligrosos y destacan su circulación en todo el país, lo cual se convierte en un riesgo sanitario, cabe mencionar que algunos de estos están prohibidos en otros países por sus efectos tóxicos (FAO, 2019).

A pesar de que existen buenas prácticas agrícolas y de inocuidad para disminuir el riesgo a daño a la salud por exposición, continúan utilizándose compuestos químicos altamente peligrosos y uso de PC prohibidos y en cultivos no autorizados; situación que probablemente se derive de una baja asistencia técnica y limitado acceso a lineamientos para su uso correcto (Aldana et al., 2008).

2. Estado de México

El Estado de México se localiza al centro-sur de la República Mexicana. Su superficie territorial es de 21,461 kilómetros cuadrados, lo que representa el 1.1 por ciento del territorio nacional. Su capital es la ciudad de Toluca de Lerdo que está conformada por 122 municipios con 4,786 localidades. Se divide en 36 Distritos Electorales con 5,921 secciones electorales de las cuales 4,346 son urbanas, 1,193 rurales y 382 mixtas (Gobierno del Estado de México, 2002). El Estado de México cuenta con una variedad de microclimas, predomina el templado subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media entre 10° y 16°, lo que le permite cultivar distintos productos agrícolas que a su vez ocupan el primer lugar en producción a nivel nacional de tuna, haba verde, nopalitos y trigo; seguido de aguacate, granos básicos

como maíz, cebada, sorgo, trigo, avena y frijol (Gobierno del Estado de México, 2020). En esta región del país, se encuentran investigaciones realizadas por Velázquez et al. (2016), quienes informan la utilización y aplicación de diversos PC en cultivos florales, como el Carbendazim (fungicida), Carbofuran (insecticida), Dimetoato (insecticida), Mancozeb (fungicida) y Metamidofos (insectos).

2.1 Daños ocasionados por los pesticidas

Informes recientes del daño ocasionado por PC a nivel mundial se mencionan que estos eventos son más comunes encontrarlos en como países de medianos ingresos y zonas rurales, debido a que la población se dedica a la práctica agrícola, por lo tanto, tienen mayor accesibilidad a estas formulaciones químicas (Eddleston, 2019). Los trabajadores agrícolas se encuentran en poblaciones vulnerables a causa de diversos factores de riesgo como clase social, ubicación y falta de acceso a servicios de salud pública, entonces la exposición a PC puede verse exacerbada a causa de la constante exposición a otros factores de riesgo como radiación ultravioleta (UV), bacterias y virus zoonóticos que culminan en una gran variedad de problemas de salud (Hu, et al., 2020; Blair et al., 2009).

De acuerdo con Nicolopoulou et al. (2016) la exposición a pesticidas puede ser por contacto con la piel, ingestión o inhalación. El tipo de pesticida, la exposición y el estado de salud individual, por ejemplo, deficiencias nutricionales y enfermedades crónicas, pueden ser factores determinantes que agraven los daños a la salud, debido a que, dentro del organismo, los PC pueden metabolizarse, almacenarse o bioacumularse. Entre las alteraciones reportadas a la exposición a PC inorgánicos se encuentran:

- Organoclorados: desórdenes endócrinos, efectos en el desarrollo embrionario y alteraciones en el metabolismo de lípidos, hepáticas y hematológicas.
- Organofosforados: disminución de la secreción de insulina, disrupción del metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos, así como efectos genotóxicos y disrupción de la mitocondria causando un incremento del estrés oxidativo, y desórdenes endócrinos.
- Carbamatos: desórdenes endócrinos y reproductivos, alteraciones en las funciones mitocondriales, citotoxicidad y genotoxicidad en ovarios e inducción de apoptosis y necrosis en células inmunológicas y efectos neuroconductuales.

Según datos del Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CEVECE) en el Estado de México se reportaron 217 casos de intoxicación por PC en toda la entidad federativa, ocupando el cuarto lugar de intoxicación por estos químicos después de Guerrero, Jalisco y Michoacán. Su sector salud no cuenta con un sistema de vigilancia epidemiológica para este tipo de intoxicaciones (CEVECE, 2019).

3. Fungicidas

Los FGC son sustancias químicas utilizados para prevenir y eliminar la erradicación las infecciones provocadas por hongos en cultivos agrícolas con la finalidad de mantener un buen rendimiento y calidad de la cosecha. El mecanismo de acción de los FGC consiste básicamente es suprimir la actividad metabólica y crecimiento de los hongos, siendo los principales mecanismos: la inhibición de la síntesis del RNA ribosomal, inhibición de la síntesis de esteroides, inhibición de la cadena respiratoria en la mitocondria e inhibición de la síntesis de microtúbulos (Smart, 2003).

Los primeros FGC fueron sintetizados a partir de materiales inorgánicos como azufre, cobre y compuestos del mercurio, sin embargo, desde su aplicación aparecieron reportes de intoxicaciones, inclusive muertes de trabajadores del campo por la exposición prolongada a estos (Gammon et al., 2010). En la década 1960, el uso de estos fungicidas declinó y surgieron compuestos orgánicos que representan un 90% de los fungicidas aplicados, entre estos se encuentran el Captan y Clorotalonil (Ollinger et al., 2010)

3.1 Captan

Es un fungicida de amplio espectro cuyo ingrediente activo es N-triclorometiltio-4-ciclohexano-1,2-dicaboximida y pertenece a la familia de ftalimidas, aplicado en cultivos de frutales y hortalizas. El Captan es un fungicida sistémico que actúa por contacto y se recomienda manipularlo portando equipo de protección personal ya que puede causar irritación piel y ojos, y en exposiciones prologadas puede causar neoplasias (Calidad Tridente, s.f.). Una vez en contacto con el hongo, reacciona con enzimas sulfhídricas para la producción tiofosgeno que es altamente tóxico para las células fúngicas ya que es capaz de reaccionar con proteínas tipos tioles y no tioles encontrados en las mismas, inhibiendo de

este modo la respiración celular lo que dificulta la germinación de esporas y el desarrollo micelas (Mezfer Crown, 2022).

3.2 Cloratalonil

También llamado daconil, es un fungicida de amplio espectro cuyo ingrediente activo es el Tetracloroisoftalonitrilo (2,4,5,6-tetracloro-1,3-bencenodicarbonitrilo) y pertenece a la familia de los cloronitrilos. Es aplicado en cultivos frutales y hortalizas (American Vanguard, s.f.). De acuerdo a la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA), el Cloratalonil debe manipularse portando equipo de protección personal ya que puede causar irritación piel, y en exposiciones prologadas puede causar neoplasias (UNA, 2025). Su mecanismo de acción consiste en conjugarse con compuestos tioles y organosulfurados, como el glutatión, que es un péptido antioxidante celular encargado de neutralizar especies reactivas del oxígeno. Dicha supresión provoca la disrupción de la glucolisis, la producción de energía y la supresión de la germinación y crecimiento de los hongos (Albaugh, 2024).

3.3. Toxicidad de los fungicidas Captan y Cloratalonil

A pesar de que la mayoría de los FGC se consideran de baja toxicidad, a menudo se ignoraban los efectos en la salud (Branford et al., 2014). Se encuentran diversos reportes de la toxicidad ocasionada por los FGC Captan y Cloratalonil en diferentes modelos biológicos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Estudios de toxicidad de los FGC Captan y Cloratalonil en distintos modelos experimentales

Fungicida	Toxicidad	Efecto	Modelo	Vía de administración	CMI	País	Referencia
Captan	Inmunológica y Morfológica	Concentración 50 ppm: reducción de la longitud del abdomen, ala delantera y pata trasera. También el ancho de la cabeza.	Larvas de <i>A. mellifera</i> (Abeja Europea)	Oral: Alimento contaminado con el fungicida	Concentración (ppm): 0.8, 0.4, 2, 10 y 50 Volumen aplicado: 1 µL/cel/larva	India	(Kaur et al., (2023)
	Ovárica y endometrial	Concentración de 100mg/kg/día: Inflamación de folículos; aumento de folículos con células granulosas apoptóticas;disminución del desarrollo de ovocitos; apoptosis temprana y autofagia en ovocitos, estrés oxidativo, etc.	Ratones Kunming hembras	S.E.	Concentración (mg/kg/día): 0, 20, 50 y 100	China	(Kuo et al., 2022)
	Cutánea y por inhalación	S.E.	Granjeros y agricultores de manzanas	Contaminación dérmica (parches) e inhalación	Estudio de campo no controlado	Francia	(Bureau et al., 2021)
	S.E.	Incremento del peso del hígado y disminución de plasma y albúminas	Ratas machos	Oral	60 mg/kg bw/día	Unión Europea	(Anastassiadou et al., 2020)
	Genotoxicidad	Concentración de 1 µM: las células deficientes del mecanismo de reparación XRCC1 mostraron una sensibilidad mayor y disminución significativa en la longitud de la pista IdU, (desaceleración de la velocidad de la horquilla de replicación) en presencia de captan.	Células de ovario de hamster chino (CHO) y células humanas HeLa	Adición en medio de cultivo celular	S.E.	Francia	(Fernández et al., 2018)
	Citotoxicidad	Concentración de 1-30 µM:Aumento de células muertas; incremento en la concentración intracelular de Ca ²⁺ y Zn ²⁺ ; apoptosis; mayor vulnerabilidad a estrés oxidativo; disminución de la	Suspensión de células linfocitarias tímicas de ratas Wistar	Disuelto en el medio de cultivo	1, 3, 10 y 30 µM	Japón	(Inoue et al., 2018)

		concentración de tioles celulares.					
	Teratogenicidad	Alteraciones en el feto como edema, alteraciones en esqueleto y tejidos blandos, deformación de la cola.	Fetos de conejo	Oral	30 mg/kg bw/día	Japón	(Food Safety Commission of Japan, 2017)
	Citotoxicidad	Duodeno (intestino delgado): atrofia o embotamiento de las vellosidades, vacuolación de los enterocitos de las vellosidades, necrosis unicelular de las vellosidades e hiperplasia epitelial de las criptas.	Ratones B6C3F1 hembras	Acompañado en la dieta	16,000 ppm	Estados Unidos	(Thompson et al., 2017)
	Citotoxicidad	Atrofia testicular	Ratas	Alimento	10,000 ppm	Estados Unidos	(Song, 2014)
	Citotoxicidad	Incremento de ácido tiobarbitúrico de la peroxidación de lípidos y disminución de enzimas antioxidantes en hepatocitos.	Ratas Wistar	Disuelto en aceite de oliva	Concentración: 100 mg/kg/body wt Volumen de la dosis oral 0.2 mL/100 g bw	España	(Moreno et al., 1999)
	Teratogenicidad	Alteraciones en el feto como edema, alteraciones en esqueleto y tejidos blandos, deformación de la cola.	Conejas embarazadas	Oral	30 mg/kg bw/día	Japón	(Food Safety Commission of Japan, 2017)
Cloratalonil	S.E*	Concentración (4 µg/mL) Elevada actividad enzimática del citocromo p450 para detoxificación y expresión baja de genes que transcriben el receptor toll-like 4.	Larvas de <i>A. mellifera</i>	Acompañado en la dieta	Concentración (µg/mL): 1, 2, 4, 8 y 16	China	(Lü et al., 2023)
	S.E.	Metabolismo de ácidos biliares interrumpido, así como disrupción en la transcripción de genes responsables de su síntesis.	Ratones	Disuelto en agua para beber	Concentración (µg/L): 0, 200, 400 y 800	China	(Tao et al., 2022)
	S.E.	Lesión hepática, inhibición de la β –oxidación de ácidos grasos y desintegración de la estructura de la microbiota intestinal.	Ratones C57BL/6 machos	Mezclado con su alimento	Concentración (mg/kg bw/día): 10-50	China y Estados Unidos	(Wang et al., 2021)

	Toxicidad reproductiva	Disminución de motilidad de espermatozoides, apoptosis, espermatogénesis, disrupción de las histonas y metilación del DNA en testículos.	Ratones ICR machos	Disuelto en aceite de maíz	Concentración: 0.1, 1 y 10 μM	China	(Zhang et al., 2019)
	S.E*	Sin diferencias significativas en la supervivencia, fecundidad y fertilidad.	Peces <i>Pimephales promelas</i> machos y hembras	Disuelto en su pecera	S.E.	Estados Unidos y Reino Unido	(Hamer et al., 2019)
	S.E*	Disminución de la resistencia a infecciones virales, peso corporal, en la cuenta total de carbohidratos, proteínas, macronutrientes y de energía.	<i>A. mellifera</i> (Abeja Europea)	Disuelto en solución de sucrosa 50%	10 $\mu g/L$	Estados Unidos	(O'Neal et al., 2019)
	S.E*	Estrés oxidativo potente, enzimas involucradas en el estrés oxidativo alteradas e inhibición en la actividad enzimática de Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa y acetilcolinesterasa (AChE).	Ostras <i>Crassostrea gigas</i> y moluscos <i>Mytilus edulis</i>	Disuelto en agua salada	Concentración ($\mu g/L$): 0.1, 1 y 10	Corea del Sur	(Haque, et al., 2019)
	S.E*	Daño renal por necrosis tubular	Paciente intoxicado	Oral	S.E.	Estados Unidos	(Suchard, 2017)
	Citotoxicidad	Incremento de la concentración intracelular de Zn ²⁺ .	Suspensión de células linfocitarias tóxicas de ratas	Disuelto en el medio de cultivo DMSO	Concentración disuelta: 0.1-10 mM En suspensión: 0.1-30 mM	Japón	(Ikeda, et al., 2018)
	Teratoenidad	Debilidad general, reducción del peso materno y placenta, aumento de peso en hígado y riñones de las madres. Pérdida de peso del feto, polidactilia.	Ratonas embarazadas	Oral	Concentración (mg/kg/día): 400-600	Egipto	(Farag, et al., 2006)

*S.E= Sin especificar. CIM=concentración mínima inhibitoria.

3.4 Mezcla de pesticidas

De acuerdo con Raimondo, (2007) una práctica a nivel mundial, incluso en México, es la combinación de los pesticidas con la finalidad de ahorrar tiempo y número de aplicaciones y gastos asociados. En la mezcla de PC existen cuatro tipos de interacciones que cambian las propiedades químicas de las formulaciones:

- Adición: la mezcla mantiene la misma respuesta o efectos que los plaguicidas cuando se aplican de forma individual
- Sinergismo: la mezcla aumenta su respuesta o efectos que los plaguicidas cuando se aplican de forma individual.
- Antagonismo: la mezcla disminuye su respuesta o efectos a comparación de cuando se aplican de forma individual.

De acuerdo con el Comité de Acción para la Resistencia de Fungicidas (FRAC), los FGC suelen mezclarse por diversos motivos como (FRAC, 2010):

- Mejorar el control de la enfermedad: ampliar el espectro y aumentar la eficacia del producto.
- Seguridad en el control de enfermedades cuando hay resistencia: la mezcla como una alternativa o estrategia potente comparada con un fungicida individual.
- Manejo de la resistencia: las mezclas pueden asegurar que por lo menos un fungicida presente pueda erradicar una plaga resistente.

De esta manera formulaciones de PC mezclados pueden cambiar la toxicidad prevista de cada pesticida, es decir, cambia la toxicocinética y toxicodinámica de los compuestos individuales, enfatizando que la toxicocinética estudia la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de una sustancia tóxica y pueden ocurrir en todos los niveles de dosis, aunque los efectos pueden no ser mensurables en dosis bajas (Reffstrup et al., 2010); y la toxicodinamia estudia la dosis suficiente necesaria para que dicha sustancia tóxica llegue a un tejido objetivo y cause alguna perturbación de la fisiología normal del organismo. El Grupo Interdepartamental sobre Riesgos para la Salud de los Productos Químicos (IGHRC) menciona que un requisito clave para las interacciones toxicodinámicas es que los niveles de

dosis de cada pesticida sean suficientes para tener un efecto, es decir, por encima del umbral de efecto. (IGHRC, 2009).

Existen estudios en diferentes modelos experimentales que demuestran la combinación tóxica del captan y cloratalonil con otros pesticidas, así como entre ellos mismos y destacan su toxicología en distintos niveles (Cuadro 4). Cabe mencionar que todos los pesticidas son metabolizados en el hígado y se hipotetiza que tienen una contribución significativa en la aparición de alteraciones celulares como un incremento del estrés oxidativo, y metabólicas en este órgano, así como en su carcinogénesis y genotoxicidad. Sin embargo, resultados de estudios epidemiológicos a la exposición de pesticidas son muy inconsistentes (VoPham, et al., 2017).

Cuadro 4. Investigaciones recientes de la toxicidad de la mezcla del Captan y Clorotalonil con diferentes pesticidas									
MEZCLA DE FUNGICIDAS	NOMBRE COMERCIAL	PROPORCION DE LA MEZCLA	TOXICIDAD	EFEECTO	MODELO	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	CMI	PAÍS	REFERENCIA
Clorotalonil (CTL) + Carbendazim (CBZ) + Prochloraz (PCZ)	S.E.	CTL+CBZ+PCZ (6 µg/L+26 µg/L+560 µg/L)	Hepatotoxicidad	Disrupción de metabolitos de la glicólisis y metabolismo de aminoácidos	Pez Zebra	Disueltos en su agua	CTL+CBZ+PCZ (6 µg/L+26 µg/L+560 µg/L)	China	(Yang, et al., 2021)
Clorotalonil (CHL) + Procimidona (PRO)	S.E.	CHL+PRO (5+10, 25+50 mg/kg/day)	S.E.	Inhibición de la β -oxidación de ácidos grasos reduciendo la carnitina y debilitando el transporte iónico intestinal para la síntesis de lípidos.	Ratones C57B1/6J	Suplementación dietética	CHL+PRO (5+10, 25+50 mg/kg/day)	China	(Wang, et al., 2021)
Clorotalonil + Tiofanato metílico	S.E.	Clorotalonil: 500g/kg Tiofanato metílico: 200g/kg.	Embriotoxicidad	Anormalidades en el feto, especialmente en su esqueleto como reducción de la osificación.	Ratas embarazadas	Alimento	Clorotalonil: 500g/kg Tiofanato metílico: 200g/kg.	Brasil	(Da Silva, et., 2020)
Clorotalonil + Metalaxil	S.E.	S.E.	S.E.	Alergias en la piel, diarrea, vómito, incoordinación e irritación respiratoria.	Ratas	Oral	2000 mg/kg	México	(Velsimex, 2024)
Luvalinato + Cumafos + Clorotalonil + Cloropirifos	S.E.	En el mismo orden: 3, 8. 1.5 y 34 mg/L	S.E.	Inhibición de enzimas detoxificantes, glutatión y otras enzimas dependientes de tiol causando la desintegración de las membranas celulares y lisis	Larva de abeja	Mezclados en jalea real	En el mismo orden: 3, 8. 1.5 y 34 mg/L	Estados Unidos	(Zhu, et al., 2014)

Clorotalonil + Metamidofos	Vanox ^R + Metamidofos: Tamaron ^R	Metamodifo: 4 mg/kg Clorotalonil: 200 mg/kg	S.E.	Peso reducido de los fetos	Ratas Wistar embarazadas	Suspensión salina de 0.9%	Metamodifo: 4 mg/kg Clorotalonil: 200 mg/kg	Brasil	(Scherholz y Chiorato, 2007)
Captan + Lambda + cialotrina	S.E.	12.5 mg/kg bw+12.5 mg/kg bw	Toxicocinéticos	metabolitos piretroides CFMP y 3-PBA	Rata Sprague- Dawley	Disueltos en aceite de oliva	12.5 mg/kg bw + 12.5 mg/kg bw	Alemania	(Bossou, et al.,2020)
Captan + Cloropirifos + cipermetrina	S.E.	S.E.	Hepatotoxicidad e inmunotoxicidad	Aumento del colesterol, triglicéridos, proteínas séricas y albúmina. Disminución de células inmunes y aumento de anticuerpos IgG.	Rata Wistar	Dérmica	Captan: 1 mg/kg Cloropirifos: 1 mg/kg Cipermetrina: 1 ml/kg	Tailandia	(Aroonvilairat, et., 2018)
Boscalid + Captan + clorpirifos + tiofanato + tiacloprid + ziram	S.E.	9:1 cada uno en mezcla de methanol:acetona	S.E.	Estatosis hepática e intolerancia a la glucosa, hiperglucemia en ayunas, y aumento de metabolitos urinarios relacionados con la microbiota intestinal como indol 3-indoxil sulfato y fenilacetilglicina.	Ratones C57B1/6J	Dieta	S.E.	France	(Lucowikz, et al., 2018)
Mancozeb + Clorotalonil + Captan + Fluopiram + Boscalida + Difenoconazole	S.E.	Mancozeb: 1.33- 2.88 mg/L Clorotalonil: 3.18- 6.65 mg/L Captan: 15.74- 24.69 mg/L Fluopiram: 1.80- 8.20 mg/L Boscalida: 4.49- 49.25 mg/L	S.E.	Disminución del crecimiento del micelio	Hongo <i>Didymella applanata</i> de Frambuesa de Serbia	Adición en agar con cultivos de micelio tomado de la planta de frambuesa	Mancozeb: 1.33-2.88 mg/L Clorotalonil: 3.18- 6.65 mg/L Captan: 15.74-24.69 mg/L Fluopiram: 1.80-8.20 mg/L Boscalida: 4.49-49.25 mg/L	Serbia	(Mirkovic, et al., 2015)

		Difenoconazole: 0.23-0.49 mg/L					Difenoconazole: 0.23- 0.49 mg/L		
Benomil + Captan + Clorotalonil	Benomil: DuPont Benlate Captan: Chevron Orthocide Clorotalonil: Daconil 2787 ^R	Benomil: 51 mg/kg, Captan: 25 mg/kg Corotalonil: 37 mg/kg	S.E.	Las concentraciones de N inorgánico total (NH ₄ y NO ₃), aumentaron significativamente por un aumento en la mineralización	Microorganismos del suelo y ciclo del nitrógeno	Mezcla de suspensiones acuosas en el suelo	Benomil: 51 mg/kg, Captan: 25 mg/kg Corotalonil: 37 mg/kg	Estados Unidos	(Chen, et., 2001)

*S.E.: Sin especificar. CMI= concentración mínima inhibitoria

3.5 Hígado

El hígado es un órgano crucial encargado de funciones del organismo como metabolismo, inmunidad, digestión, detoxificación, suministro de sangre, etc. Es esencial para la homeostasis metabólica. Los hepatocitos son la unidad funcional de este órgano a la que se le atribuye su actividad metabólica de carbohidratos, lípidos y proteínas, además de sintetizar proteínas séricas como albúmina, factores de coagulación, colesterol y hormonas esteroideas (Kalra et al., 2023).

3.6 Hepatotoxicidad

A pesar de que el hígado está especializado en el metabolismo de fármacos consumidos, en cantidades exacerbadas y a largo plazo pueden provocar lesiones hepáticas, a este fenómeno se le conoce como hepatotoxicidad, también llamada hepatitis tóxica, es una lesión hepática o disfunción inducida por el contacto con sustancias que dañinas o tóxicas, ya sea por tocar, inhalar, beber o comer. Dichas sustancias pueden ser alcohol, fármacos, suplementos alimenticios u otras sustancias químicas (Bashir et al., 2023).

3.7 Citoqueratina CK-18

Las citoqueratinas son el soporte estructural de las células epiteliales, las cuales conforman la red citoplásmica de filamentos intermedios, también llamado citoesqueleto (Browning y Horton, 2004). Las citoqueratinas más abundantes en el epitelio son CK8, CK18 y CK19 que se utilizan extensivamente como marcadores de diagnóstico; en particular la CK18 se libera a la circulación sanguínea como indicador de necrosis y apoptosis celular (Sjöström et al., 2001), la que la vuelve candidata en el estudio y diagnóstico de una variedad de entidades tumorales, es decir, cáncer de distintos órganos y sistemas (Nagel et al., 2018); a su vez, se considera un indicador para predecir cualquier anomalía o enfermedad hepática (Nagel, 2016). Principalmente, es un potente biomarcador de intoxicaciones hepáticas mediadas por fármacos y otras sustancias nocivas (Tajima et al., 2019).

3.8 Inmunohistoquímica Anti- CK-18

La inmunohistoquímica (IHC) o inmunoensayo es un método bioquímico utilizado para medir sustancias o moléculas diana presentes en una muestra biológica, por lo que es

ampliamente utilizado en histopatología. Por ello, utiliza anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de interés encontrados en tejidos y células para facilitar su detección y cuantificación, con tal de asegurar un diagnóstico preciso y determinar del origen de la patología (Taylor, 2014). En caso de que se desee detectar la citoqueratina 18, se requerirán anticuerpos anti-CK18 para identificarla en tejido epitelial de muestras biológicas de órganos, con tal de observar el avance de la patología. Los anticuerpos anti-CK18 son de origen monoclonal (mAbs), es decir, provienen de la clonación artificial de un linfocito diseñados para dirigirse específicamente al antígeno de interés (NIH, 2019).

Eliminar taylor2014

4.- Modelos murinos

El Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NIH, 2023) *“define a los modelos murinos como un ratón modelo utilizado en el estudio de condiciones fisiológicas de salud y enfermedad de los seres humanos, así como su diagnóstico, prevención y tratamiento”*. De acuerdo con Benavides y Guénet, (2003) desde un punto de vista de la medicina, el ratón como modelo experimental es un organismo que ofrece muchas ventajas sobre otros modelos, estas ventajas son:

- Procesos bioquímicos similares a los del ser humano
- Tiempo generacional muy corto (prolíficos)
- Adaptación rápida a las condiciones de bioterio
- En caso de estudios genéticos, existen varias líneas o modelos genéticos con mutaciones y rearrreglos cromosómicos la que la convierte en una excelente opción para conocer patologías humanas relacionadas.

Además, algunas cepas o especies de ratón desarrollan espontáneamente las enfermedades de interés y otras se manipulan genéticamente para desarrollarlas, entre estas se encuentran cáncer, obesidad, glaucoma, inmunodeficiencias, entre otras (Rosenthal y Brown, 2007). La elección del mejor modelo experimental es principalmente debido a su disponibilidad en el mercado, accesibilidad y costos. Utilizar modelos murinos no difiere significativamente del uso de otros modelos cuando se estudian enfermedades o condiciones patológicas (Kohnken et al., 2017). Las cepas de ratón más utilizadas en la investigación biomédica son FVB/N, CD-1, BALB/c, y C57BL/6. C57BL/6 (Treuting et al., 2012). En el caso de las cepas de

ratones, la CD-1 se distingue por su variabilidad fenotípica, sus diferencias en su variación genética son similares a las diferencias genéticas detectadas entre poblaciones humanas (Aldinger et al., 2009), por lo que se selecciona para estudios de toxicología, farmacología e investigación biomédica general (LIDE Biotech, 2023). Las cepas de ratones CD-1 han sido evaluadas para determinar hepatotoxicidad por medio de distintos biomarcadores evaluada en hígado de cepa CD-1 por medio de distintos biomarcadores (Cuadro 5). No se debe perder de vista que los modelos murinos en general pueden presentar algunas desventajas o limitantes como es la concepción e interpretación de datos a causa de la falta de la misma diversidad genética encontrada en humanos y al mismo tiempo puede complicarse la extrapolación de dichos datos (Kohnken et al., 2017)

Cuadro 5. Hepatotoxicidad evaluada en hígado de cepa CD-1 por medio de distintos biomarcadores.

MODELO	TÓXICO	TOXICIDAD	METODOLOGÍA/ENSAYO	CONCENTRACIÓN	PAÍS	REFERENCIA
CD-1	Cadmio (Cd) y nanoselenio (NSe)	Hepatotoxicidad	Análisis histológico, indicadores de estrés oxidativo en suero e hígado	Cadmio: 126 mg/kg Nanoselenio: 0.2 mg/kg	China	(Du et al., 2022)
CD-1 embarazadas	Ácido perfluorooctanóico (PFOA) y Ácido dímero de hexafluoropropileno (HFPO-DA)	Hepatotoxicidad	Análisis fenotípico, PCR cuantitativa (qPCR) y análisis transcriptómico.	Ácido perfluorooctanóico (PFOA): 1-5 mg/kg y Ácido dímero de óxido de hexafluoropropileno (HFPO-DA): 2-10 mg/kg	Estados Unidos	(Blake et al., 2022)
CD-1	Fluorine-9-bisfenol (BHPF)	Hepatotoxicidad	Microarreglos y análisis histológico	2 mg/kg bw/	China	(Yang et al., 2021)
CD-1	Cloruro de Cadmio (CdCl ₂)	Hepatotoxicidad	Análisis histológico, RT-PCR, ensayo de triglicéridos totales y tirosina	550 ppb	Estados Unidos	(Jackson et al., 2020)
CD-1	Extracto de cannabis rico en cannabidiol (CBD) y paracetamol (APAP)	Hepatotoxicidad	Bioquímica sanguínea, análisis histológico, retrotranscripción de cDNA, análisis de glutatión y western blot.	Extracto de cannabis rico en cannabidiol (CBD) + Paracetamol (APAP): 290 mg/kg	Estados Unidos	(Ewing et al., 2019)
CD-1	Permetrina	Hepatotoxicidad	Análisis histológico	5000 ppm	Estados Unidos	(Quist et al., 2018)
CD-1	Dieta alta en ácidos grasos, etanol y mezcla	Hepatotoxicidad	Análisis bioquímico del suero, análisis histológico, inmunoensayo de precursores inflamatorios, perfil de ácidos grasos y análisis de	S.E.	Austria	(Fengler et al., 2016)
CD-1	Ácido perfluorooctanóico (PFOA)	Hepatotoxicidad	Microscopía de transmisión electrónica y análisis histológico	0.3 mg/kg	Estados Unidos	(Quist et al., 2015)
CD-1	Acetaminofén (APAP)	Hepatotoxicidad	Química sanguínea y análisis histológico.	300 mg/kg	Japón	(Taguchi et al., 2015)
CD-1	Paracetamol (APAP)	Hepatotoxicidad	Química clínica y microarreglos	3.5 mmol/kg	Francia	(Williams et al., 2004)

4.- Planteamiento del problema

Los PC son ampliamente utilizados a nivel mundial con más de 3,690,000 toneladas utilizadas en el año 2022. Debido al incremento de la población mundial, la agricultura como recurso alimentario también se incrementa, consecuentemente se prioriza en la expansión de cultivos de calidad mediante el control de plagas. En México, en el año 2022 se consumieron más de 19 mil toneladas de PC, lo que se convierte en un riesgo sanitario para la salud pública debido a la exposición a los PC. A pesar de que existen nuevas alternativas más amigables con el medioambiente como cultivos transgénicos para evitar el uso de estos químicos, no se encuentran al alcance de muchos países y otros simplemente prefieren continuar con su aplicación. Actualmente es escasa la información relacionada a la toxicidad de la mezcla de PC, específicamente a la mezcla de FGC y de su probable efecto en la hepatotoxicidad en seres humanos. La utilización de modelos murinos permitirá conocer el efecto hepatotóxico de la mezcla de FGC utilizados comúnmente en el Estado de México.

4.1 Pregunta de investigación

¿La exposición conjunta de los fungicidas Captan y Cloratalonil causa hepatotoxicidad en hígados de ratones macho CD-1?

II. Justificación

A nivel mundial el uso de PC se ha incrementado debido a la demanda cada vez mayor de alimentos, esto ha generado un uso actual de más de 3,690,000 toneladas utilizadas en el año 2022. En México, actualmente se han utilizado más de 19 mil toneladas de PC, lo que se convierte en un riesgo sanitario para la salud pública debido a la exposición a los PC. A pesar de que existen nuevas alternativas más amigables con el medioambiente como cultivos transgénicos para evitar el uso de estos químicos, no se encuentran al alcance de muchos países y otros simplemente prefieren continuar con su aplicación. Actualmente es escasa la información relacionada a la toxicidad de la mezcla de PC, específicamente a la mezcla de FGC y de su probable efecto en la hepatotoxicidad en seres humanos. Evaluar la toxicidad de los fungicidas en hígado de modelo murinos mediante el ensayo de inmunohistoquímica CK18 permitirá identificar las alteraciones en la microarquitectura tisular. La utilización de modelos murinos permitirá conocer el efecto hepatotóxico de la mezcla de FGC utilizados comúnmente en el Estado de México.

5.- Hipótesis

Hipótesis alterna:

La exposición conjunta a los fungicidas Captan y Cloratalonil causa hepatotoxicidad en hígados de ratones macho CD-1

Hipótesis nula:

La exposición conjunta a los fungicidas Captan y Cloratalonil no causa hepatotoxicidad en hígados de ratones macho CD-1

6.- Objetivos

General

Identificar el efecto hepatotóxico a la exposición conjunta de los fungicidas Captan y Cloratalonil en ratones macho CD-1.

Específicos:

- Suplementar 100mg/kg del FGC Captan en dieta basal de ratones macho CD-1.
- Suplementar 100mg/kg del FGC Cloratalonil en dieta basal de ratones macho CD-1.
- Suplementar 100mg/kg del FGC Captan + 100mg/kg del fungicida Cloratalonil en la dieta basal de ratones macho CD-1.
- Obtener, diseccionar y conservar los hígados de los ratones macho CD-1.
- Realizar cortes histológicos en microtomo
- Realizar tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E)
- Realizar tinción PAS-Schiff a los cortes histológicos
- Realizar tinción de Tricómica de Masson a los cortes histológicos
- Determinar microscópicamente las alteraciones morfológicas hepáticas
- Realizar el inmunoensayo anti-citoqueratina 18 (Anti-CK18) a los cortes histológicos de hígado

7.- Descripción metodológica

7.1 Diseño de Estudio

- Tipo de estudio: experimental, descriptivo, longitudinal.
- Universo: 24 ratones
- Método de muestreo: aleatorio
- Tamaño de muestra: 24 ratones divididos en cuatro grupos experimentales:
 - Grupo Ct =Control de 1 mL agua (sin fungicida).
 - Grupo Capt = fungicida Captan (100 mg/kg de peso diluido en 1mL de agua).
 - Grupo Clor = fungicida Cloratalonil (100 mg/kg de peso diluido en 1mL de agua).
 - Grupo Capt-Clor = fungicida Captan (100 mg/kg de peso) + fungicida Coratalonil (100 mg/kg de peso), ambos diluidos en 1mL de agua.

7.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

- Criterios inclusión: ratones CD-1 machos, 7 semanas de edad, peso 29-39 gramos.
- Criterios exclusión: ratones de otra cepa, edad mayor o menos a 16 semanas de edad, peso mayor o menor a 29-39 gramos.
- Criterios eliminación: ratones muertos, ratones CD-1 hembras.

7.3 Procedimientos

Se determinó la hepatotoxicidad en ratones macho CD-1 (8 semanas de edad, 43-45 g), los cuales fueron obtenidos del bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México. Los animales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12:12h, temperatura de 22-24 °C, con acceso libre, demanda de agua y alimento. Se alojaron aleatoriamente en los grupos experimentales mencionados anteriormente. Para discriminar los efectos por la manipulación, al grupo control se le administró diariamente 1 ml de agua para beber. La manipulación de los contaminantes se realizó bajo los adecuados requerimientos de bioseguridad y los desechos biológicos se almacenaron y entregaron a una empresa de control de residuos biológicos peligrosos para su posterior desecho.

7.3.1 Manejo de animales de experimentación:

Los animales se mantendrán en jaulas de acrílico con agua y alimento a libre demanda, con ciclos de luz-obscuridad de 12 horas por 12 horas, acorde a los lineamientos bioéticos internacionales y de la NORMA Oficial Mexicana NOM- 062- ZOO-1999. Para dar seguimiento, los ratones fueron rotulados y clasificados en grupos de trabajo.

7.3.2 Esquema de suplementación de los fungicidas

Para obtener la concentración final, se tomaron las dosis recomendadas de uso para cada fungicida (Moo, et al., 2021). Se realizaron los cálculos pertinentes, a partir de dichas dosis hasta obtenerlas a 100mg/kg del peso de los ratones. Posteriormente, se pesaron los ratones para ajustar la dosis de 100mg/kg en función a su peso en gramos. Y al final, los volúmenes se redujeron a microlitros. Las dosis suministradas fueron para el fungicida Captan (100mg/kg), para el fungicida Cloratalonil (100mg/kg) y para la mezcla Captan+Cloratalonil (100mg/kg+100mg/kg) en todos los tratamientos los fungicidas fueron diluidos en 100mL de agua. El esquema se inició a partir de las ocho semanas de edad de los animales. Los fungicidas se administraron seis veces por semana, incluyendo días festivos, vía oral por medio de una micropipeta de 200 µl cuidando ante todo evitar el estrés por manipulación.

7.3.2.1 Eutanasia

Al concluir el mes de seguimiento se realizó eutanasia de los animales mediante cámara de dióxido de carbono (CO₂), empleando una presión de 20 mmHg y un flujo de 2 a 2.5 litros/minuto, para un desplazamiento final de O₂ del 20% por minuto. Este método está avalado por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria ya que disminuye el efecto estresante en el roedor.

7.3.2.2 Obtención de muestras biológicas

Posterior a la eutanasia, se realizó un corte longitudinal sobre la línea alba de los músculos abdominales anteriores, posterior a exanguinar se disecaron los órganos abdominales y tejido graso para su conservación en etanol al 70%.

7.3.2.3 Cortes y deshidratación

Se realizó un corte de una fracción del lóbulo grande de los hígados fueron montados en casetes histológicos previamente rotulados, y finalmente deshidratados en volúmenes crecientes de alcohol: etanol 70°, etanol 80°, etanol 96° I, etanol 96° II, etanol 100° I, etanol 100° II, xileno I y xileno II.

7.3.2.4 Inclusión y formación del bloque de parafina

La parafina se calentó en horno eléctrico a 60°C. Una vez transcurridas el tren de deshidratación las se sumergieron en 2 baños de parafina líquida de la siguiente manera: parafina I (1.5 horas) y parafina II (1.5 horas). Con una previa orientación del tejido, la formación del bloque se realizó por medio de moldes metálicos para inclusión. Los moldes fueron llenados con parafina líquida (60°C), después solidificados mediante platina fría; finalmente las muestras fueron desmontadas y almacenadas hasta su uso.

7.3.2.5 Obtención de los cortes histológicos

Para realizar las secciones histológicas, se empleó un micrótopo manual- mecánico tipo Minot, de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se sujetó el bloque de parafina con los brazaletes del micrótopo y alineó al sistema de sujeción de la navaja. Se desgastó la superficie del bloque hasta llegar a la muestra deseada, ajustando el espesor del corte a 4

micras. Las secciones obtenidas fueron depositadas en baño de flotación a 40°C. Posteriormente serán adheridos a los portaobjetos y colocaron en platina térmica a 69.9°C durante 15 minutos. Posteriormente los grupos experimentales fueron sometidos a tinción Hematoxilina y eosina, tinción de Pas-Shift y tinción tricrómica de Masson.

7.3.2.6 Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)

La tinción H&E es ampliamente utilizando en histología para observar la arquitectura tisular tiñendo con hematoxilina en color azul o púrpura los núcleos celulares de naturaleza ácida y por otro lado eosina para otras estructuras y componentes celulares de naturaleza básica en color rosa. Se aplica en histopatología con tal de observar variabilidad en esta arquitectura durante el diagnóstico de enfermedades (University of Oxford, 2025).

Se desparafinaron las muestras de hígado en volúmenes crecientes de alcohol etanol 70°, etanol 80°, etanol 96° I, etanol 96° II, etanol 100° I, etanol 100° II, xileno I y xileno II, en cada uno por 10 mins. Se sometieron a tinción con reactivo de Hematoxilina por 5 mins, se lavaron en agua destilada y alcohol ácido por diez segundos, después en agua amoniacal por 3 mins y lavaron con agua destilada para eliminar residuos de agua amoniacal, de nuevo se sometieron a tinción con reactivo Eosina por 10 mins y finalmente se deshidrataron en volúmenes decrecientes de alcohol xileno II, xileno I, etanol 100° II, etanol 100° I, etanol 96° II, etanol 96° I, etanol 80°, etanol 70°. Una vez concluida la tinción, se procedió al montaje de las laminillas aplicando resina sintética sobre el portaobjetos y encima un cubreobjetos. Finalmente, las muestras se secaron en parrilla de calentamiento por 10 minutos a 70° C (Fischer et al., 2008).

7.3.2.7 Tinción de PAS-Shift (Periodic acid schiff)

Esta tinción es empleada en histología para resaltar la presencia de grupos aldehídos o cetonas sintetizados a partir de la oxidación previa de carbohidratos. Se utiliza el ácido peryódico para incrementar la cantidad de grupos carbonilos de dichos aldehídos y posteriormente con el reactivo Schiff se tiñen de color rosa fucsia. Su uso en el diagnóstico de enfermedades permite visualizar la formación y distribución de carbohidratos, entre estos glucógeno (ITW reagents, 2019).

Se desparafinaron las muestras de hígado en volúmenes crecientes de alcohol (mismo procedimiento que H&E). Se sumergieron en ácido peryódico 0.5% por 25 mins, se lavaron con agua destilada para eliminar residuos del ácido. Se tiñeron con reactivo de Schiff por 25 mins, de nuevo lavaron con agua destilada y con rápido en ácido clorhídrico (HCl) por unos segundos para eliminar residuos del reactivo, de nuevo lavaron con agua destilada y finalmente se deshidratación en volúmenes decrecientes de alcohol (mismo procedimiento que H&E). Una vez concluida la tinción, se procedió al montaje de las laminillas aplicando resina sintética sobre el portaobjetos y encima un cubreobjetos. Finalmente, las muestras se secaron en parrilla de calentamiento por 10 minutos a 70° C (Fu, 2017).

7.3.2.8 Tinción tricrómica de Masson

Tinción indicada para el tejido conjuntivo, cuya función básica es el soporte estructural, por lo que colorea queratina y fibras de colágeno (tono azul o verde), siendo el colágeno tipo I mayormente encontrado en este tejido. Su uso es en el diagnóstico de enfermedades que presentan episodios de fibrosis en hígado, riñón, etc (Fernández, 2025).

Se desparafinaron las muestras de hígado en volúmenes crecientes de alcohol (mismo procedimiento que H&E) y colocó sobre las muestras el reactivo de Bouin 24 hrs previo a la tinción. Al finalizar se lavaron las muestras con agua corriente por 5 mins hasta que el reactivo de Bouin amarillo se aclarara por completo. Se colocó por goteo y sobre las muestras heamtoxilina mezclada con cloruro férrico y dejó reposar por 5 mins, a finalizar el tiempo se enjuagaron sumergidas en agua destilada por 10 mins. Después los siguientes reactivos, fuscina ácida por 15 mins, ácido fosfotungstico por 15 mins, azul de anilina por 20 mins y al final se lavaron con ácido acético al 1% por 5 mins y agua destilada. Finalmente, se deshidratación en volúmenes decrecientes de alcohol (mismo procedimiento que H&E). Una vez concluida la tinción, se procedió al montaje de las laminillas aplicando resina sintética sobre el portaobjetos y encima un cubreobjetos. Finalmente, las muestras se secaron en parrilla de calentamiento por 10 minutos a 70° C (Van de Vlekkert, 2020).

7.3.3 Análisis histopatológico de hígado

La arquitectura hepática se visualizó a través de microscopio de campo claro Carl-Zeiss Axiostar con una magnificación de 400x. Las imágenes capturadas se conservaron en formato

Tiff con el mismo balance blanco mediante cámara Cooled- CCD Tucsén® de 5 MP, a través del software IScapture® V.3.7.8.2. Dichas capturas se sometieron al programa Image Pr plus para cuantificar el área en micras cuadradas de los espacios sinusoidales de la imagen. Los datos numéricos obtenidos se promediaron para ser graficados.

7.3.3.1 Inmunohistoquímica (IHC) anti-CK18

La inmunohistoquímica (IHC) es una técnica para la identificación de antígenos en tejidos y órganos mediante el uso de anticuerpos cuya presencia es indicador en alguna patología. Permite visualizar la distribución y posición exacta de dicho antígeno de interés en el tejido seleccionado. Se realizó la Inmunohistoquímica de detección de citoqueratina 18 (CK18) hepática por medio del producto Immunotag™ Cytokeratin 18 Polyclonal Antibody perteneciente al laboratorio G-Biosciences/Geno Technology Inc. Se desparafinaron de forma habitual en volúmenes decrecientes de alcohol (como se aplicó en las tinciones pasadas). Las muestras se sumergieron en buffer de fosfato (PBS) por 5 mins. Después se sumergieron en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), diluido 1:100 en agua, 5 mins. Las laminillas se sumergieron en buffer de bloqueo al 2% (solución “milagrosa” elaborada a partir de leche en polvo Svetia) por 10 mins. Los portaobjetos se sumergieron en una solución precalentada de citrato-EDTA (pH 7,0, EDTA 2 mM, ácido cítrico 10 mM, Tween 2 al 0,05%) y incubaron durante 10 min. Se incubaron con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 2% durante 5 min y se trataron durante 10 min con BSA al 5% (bloqueo de peroxidasa endógena). Se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-conejo diluido 1:100 en PBS. Después de 24 hrs se cubrieron las muestras con 100 µl de la anterior dilución y los portaobjetos se lavaron con PBS Tween y PBS e incubaron con anticuerpo secundario de anti-conejo conjugado a una dilución de 2:100 en PBS durante 2 hrs a temperatura ambiente y al final se enjuagaron con agua destilada, PBS Tween y PBS. Se aplicó buffer de diaminobencidina (DAB) sobre las muestras durante 15 mins para visualizar las inmunorreacciones. y al final se enjuagaron con agua destilada, PBS Tween y PBS. Finalmente, se contra tiñeron con hematoxilina de Harris por 40 s y deshidrataron en volúmenes crecientes de alcohol.

7.4 Variables de estudio

Tabla 4. Operacionalización de variable de estudio

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Indicador	Análisis Estadísticos
Variable independiente: Fungicida Captan	Fungicida de amplio espectro cuyo ingrediente activo es N-triclorometiltio-4-ciclohexano-1,2-dicaboximida y pertenece a la familia de ftalimidas.	Fungicida administrado vía oral al grupo de ratones con Captan (100 mg/kg/día)	Cuantitativo y cualitativo	Microgramos por mililitro	mg/kg	ANOVA de una vía. Post hoc de comparaciones mediante el método Student-Newman-Keuls (SNK),
Variable independiente: Fungicida Cloratalonil	Fungicida de amplio espectro cuyo ingrediente activo es el Tetracloroisofthalonitrilo (2,4,5,6-tetracloro-1,3-bencenodicarbonitrilo) y pertenece a la familia de los cloronitrilos.	Fungicida administrado vía oral al grupo de ratones con Cloratalonil (100 mg/kg/día)	Cuantitativo y cualitativo	Microgramos por mililitro	mg/kg	ANOVA de una vía. Post hoc de comparaciones mediante el método Student-Newman-Keuls (SNK),
Variable independiente: Combinación de fungicidas (Captan+Cloratalonil)	Mezcla de los fungicidas Captan y Cloratalonil.	Mezcla de fungicidas aplicado al grupo experimental de ratones con suplementación de ambos fungicidas: (concentración) Concentración de 100 mg/kg/día	Cuantitativo y cualitativo	Microgramos por mililitro Razón	mg/kg	ANOVA de una vía Post hoc de comparaciones mediante el método Student-Newman-Keuls (SNK),
Variable dependiente: Efecto hepatotóxico	Lesión o daño al hígado	Análisis de la arquitectura hepática mediante observaciones de cortes sagitales del hígado a través de un microscopio de campo	Cuantitativo y cualitativo	Razón	Histopatología celular	ANOVA de una vía Post hoc de comparaciones mediante el método Student-Newman-Keuls (SNK),

7.5 Implicaciones Bioéticas

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. Menciona que las técnicas de sujeción, manipulación e inmovilización que se realicen en el bioterio deben ser acordes a los principios humanitarios internacionales aceptados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio y el Médico Veterinario supervisor.

7.6 Recolección de datos

7.6.1 Visualización

Las microscopías de tinciones e inmunoensayo fueron capturadas en un microscopio Axiostar (Zeiss Group, Oberkochen, Stuttgart, Alemania) utilizando una cámara INFINITY X-32 MP (Lumenera Corp., Ottawa, ON, Canadá) en formato TIF.

7.6.2 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), posteriormente se realizó a *post hoc* de comparaciones mediante el método Student-Newman-Keuls (SNK), utilizando el software Sigma Plot 10.0. Se consideró un $p < 0.05$ como significativa.

7.6.3 Límite de tiempo y espacio

El estudio se realizó en la Facultad de Medicina Paseo Tollocan esquina Jesús Carranza s/n, Col. Moderna de La Cruz, C. P. 50180 Toluca de Lerdo, Estado de México, en el periodo de agosto 2023 a noviembre 2025.

8.- Resultados

8.1 Carta de envío

Revista Iraní de Salud Pública

Tasks 0

Inglés

Ver sitio

barbara_1997



Envíos

Enviar un artículo

1. Inicio2. Subir envío3. Introducir metadatos4. Confirmación5. Próximos pasos

Envío completo

Gracias por su interés en publicar con Iranian Journal of Public Health.

¿Qué pasa después?

La revista ha sido notificada de su envío y le hemos enviado un correo electrónico de confirmación para sus registros. Una vez que el editor lo haya revisado, se pondrá en contacto con usted.

Por ahora, puedes:

- [Revisar este envío](#)
- [Crear un nuevo envío](#)
- [Regresa a tu panel de control](#)

[IJPH] Submission Acknowledgement



○ Prof. Dariush D. Farhud <ijph@tums.ac.ir>

Para ● BARBARA GALLEGOS INZUNZA

Hoy a las 5:55 p.m.

Barbara Gallegos:

Thank you for submitting the manuscript, "Determination of the Hepatotoxic Effect in CD-1 Mice upon Individual and Joint Exposure to the Fungicides Captan and Chlorotalonil" to Iranian Journal of Public Health. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging into the journal website:

Manuscript URL: <https://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/authorDashboard/submission/41292>

Username: barbara_1997

If you have any questions, please contact us. Thank you for considering this journal as a venue for your precious work.

Please note that we will inform you of the first decision in about 20 days. Also, the peer review time will take about 3-4 months. The time for publication would be about 5-6 months after acceptance. Please let us know for any comment, if any.

Prof. Dariush D. Farhud

8.2 Resumen del artículo

ABSTRACT

Background. A pesticide (PC) is “any substance or mixture of substances intended to prevent, destroy, repel, or mitigate any pest.” According to the latest report from the Food and Agriculture Organization of the United Nations, more than 3,000,000 tons of PC were used worldwide in 2022. Fungicides are PC used for the treatment and control of phytopathogenic fungi in crops. Still, due to the emergence of fungal resistance to fungicides, the use of mixtures is widely recommended. The objective of this study was to determine the hepatotoxic effect caused by individual and combined exposure to the fungicides Captan 50 WP® and Coraza 720S® in CD-1 mice. **Methods:** Male CD1 mice, 8 weeks old and weighing 29-39 kg, were given the fungicides CAPT (Captan Ultra 50 WP®, i.g. Captan 100 mg /kg body weight), CLOR (Coraza 720S® i.a. Chlorothalonil 100 mg /kg body weight) and CAPT+CLOR for four weeks. Histological sections were made and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E), and subsequently immunohistochemistry was performed for the antigenic detection of hepatic cytokeratin 18 (anti-CK18). **Results:** Alterations in the tissue architecture of the centrilobular region of the liver were observed in the groups treated with CAPT, CLOR, and CAPT+CLOR. Differences in anti-CK18 expression were found between the CT group and the CAPT, CLOR, and CAPT+CLOR mixture groups. **Conclusions:** The use of the fungicides CAPT, CLOR, and their mixture causes alterations in the tissue microarchitecture of the centrilobular region of the liver.

8.3 Discusión

Respecto a la tinción PAS-Schiff, en la presente investigación se pudo apreciar alteraciones en los depósitos de glucógeno, en contraste con el grupo control (Ct), especialmente en los grupos tratados con Captan (Capt) y Cloratalonil (Clor) en los que se puede observar distribución anormal del glucógeno. Se apreciaron escasos reservorios de glucógeno rodeando el espacio centrolobulillar que no se encontraron en todos los hepatocitos. Por su lado, el grupo combinado Capt-Clor (Captan-Cloratalonil) se aprecia de forma normal semejante al grupo control. Estos resultados son similares a los reportados por Saber et al. (2004) quienes evaluaron el fungicida Benomil® en hígados de ratas albinos machos vía oral y a los de Wasef et al. (2017), que determinaron la hepatotoxicidad de los fungicidas insecticida Fipronil® (i.g. 5-amino-1-(2,6-dicloro 1,1,1-trifluoro-4-p-tolil)-4-trifluorometilsulfonilpirazol-3-carbonitrilo); ambos autores reportan que la exposición de los fungicidas provocó una reducción considerable de depósitos de glucógeno dentro de los hepatocitos o decaída en almacenamiento de glucógeno en los grupos tratados.

Respecto a los cortes histológicos de hígado teñidos con Tricrómica de Masson (TTM) se observó un incremento de la formación de colágeno, en contraste con el grupo control (Ct). Especialmente en los grupos tratados con Capt y Clor, en los que se observó un engrosamiento marcado rodeado con círculos negros y en color azul o violeta claro, rodeando el espacio centrolobulillar. Por su lado, en los grupos Ct y la mezcla Capt-Clor no se detectó el fenómeno. Estos resultados son similares reportados por Saad et al. (2024), que también observaron engrosamiento de fibras en el parénquima hepático en color verde destacado por la TTM en ratas albinas macho tratadas con fungicida Tioacetamida.

Basado en la utilización de H&E, no se encontró diferencias en la superficie de los capilares sinusoidales (μm^2) entre el grupo Ct y el grupo Capt, pero si se encontraron diferencias entre los grupos Ct, Clor y Capt-Clor. Por su lado, el grupo de fungicidas combinados Capt-Clor indica que los espacios sinusoidales (μm^2) se congestionaron en mayor proporción con respecto al grupo control, en la que se muestran sinusoides que culminan en el espacio centrolobulillar, y núcleos de hepatocitos distribuidos por todo el perímetro y los demás grupos. Investigaciones realizadas por Gök y Deveci, (2022), que evaluaron las alteraciones histopatológicas en el tejido hepático de ratas hembra albinas wistar, tras la exposición al fungicida Mancozeb® disuelto en aceite de maíz. Mediante la tinción **H&E** encontraron una

dilatación sinusoidal, necrosis focal, obstrucción significativa y hemorragia causada por cambios en el parénquima hepático, así como inflamación tisular y apoptosis debido al daño celular causado por la exposición al fungicida; Jalal et al. (2020) evaluaron el fungicida Hexaconazole por vía oral durante 12 semanas en ratas wistar para encontrar posibles lesiones hepáticas y otros desórdenes, mediante la tinción de H&E se encontró que los ratones tratados con el Hexaconazole presentaron congestión de las venas centrolobulillares y las sinusoides, así como la aparición de necrosis comparados con el control.

Respecto a la expresión antigénica anti-CK18, se encontraron diferencias entre el grupo Ct y los grupos tratados con Capt, Clor y, principalmente, con la mezcla Capt-Clor. Investigaciones realizadas por Kakehashi et al. (2010) evaluaron la actividad y presencia de la citoqueratina CK8 y CK18 (CK8/18) como nuevos marcadores de lesiones preneoplásicas en hígado en dos cepas de ratón macho, B6C3F1 y C57B1/6J por la exposición al residuo químico N-nitrosodietilamina (DEN) (10 mg/kg, vía intraperitoneal). Realizaron un análisis histopatológico con H&E y detección inmunoquímica con anticuerpos monoclonales de rata para anti-CK8 y anti-CK18, los resultados obtenidos indican que CK8 y CK18 son capaces de incrementar el número de Antígeno Nuclear de Células Proliferantes (PCNA) encargada de la proliferación de células neoplásicas. Reveló un aumento en el número de células con tinción positiva de PCNA dentro de las áreas de focos CK8/18+ en ambos grupos, así como una sobreexpresión de estas citoqueratinas en todos los carcinomas de células hepáticas (HCC) y adenomas hepatocelulares (AHC).

8.4 Conclusiones

La exposición de los ratones CD-1 expuestos a los fungicidas: Captan Ultra 50 WP® (Capt) (N-(triclorometiltio) ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida), Coraza 720S® (Clor) (Chlorotalonil, 2,4,5,6-Tetracloro Ftalonitrilo) individualmente a concentraciones de 100 mg de fungicida/kg de peso, de cada fungicida individualmente y la combinación de los mismos fungicidas en concentraciones de 100 mg de Captan Ultra 50 WP® /kg + 100 mg de Coraza 720S® /kg, (Capt-Clor) provocaron alteraciones morfológicas en el hígado de los ratones debido a la exposición de los fungicidas utilizados.

8.5 Agradecimientos

Eternamente agradecida con mis papás y hermana por ser los primeros en creer en mí.

Con el equipo del Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología (“el Orfanato”), por inspirarme conocimientos, compañerismo y tenerme mucha paciencia en esta etapa:

- Dr. Rigoberto Oros Pantoja
- Dr. Pablo Moreno
- Lic. Lizbeth Cosme
- Dr. Daniel Velarde
- Dr. Ángel Bárcenas
- Mto. Efrain Molotla

9.- Referencias bibliográficas

- Abubakar, Y., Egbuna, C., Tijjani, H. y Oluwaseun, C. (2020). Pesticides, History, and Classification. *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*. pp.29–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8>. [Consulta: 09 de noviembre de 2023].
- Akashe, M., Pawade, U. y Nikam, A. (2018). Classification of pesticides: a review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 9(4), pp.144–150. DOI: <https://doi.org/10.7897/2277-4343.094131>. [Consulta: 03 de noviembre de 2023].
- Albaugh. (2024). Fungicidas Centauro 720 SC. Departamento Técnico Albaugh. Disponible en: <https://www.albaugh.com/docs/mexicolibraries/productfiles/centauro-technical-bulletin.pdf> [Consulta: 18 de julio de 2025].
- Aldana, M., García, M., Rodríguez, G., Salveira, I. y Valenzuela, A. (2008) Determinación de insecticidas organofosforados en nopal fresco y deshidratado. *Rev Fitotecnica Mex*;31(002):133-9. Disponible en: <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/31-2/6a.pdf> [Consulta: 28 de noviembre de 2023].
- Aldinger, K., Sokoloff, G., Rosenberg, D., Palmer, A. y Millen, K. (2009). Genetic Variation and Population Substructure in Outbred CD-1 Mice: Implications for Genome-Wide Association Studies. *PLoS One*. 4(1): 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0004729 [Consulta: 29 de noviembre de 2023]
- American Vanguard (s.f.). Fungicida Clorotalonil. Bravo 720 fungicida en suspensión acuosa. Disponible en: <https://www.amvac.com.mx/sites/default/files/media/content/FT-Bravo%20720.pdf> [Consulta: 18 de julio de 2025]
- Anastassiadou, M., et al. (2020). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance captan. *EFSA Journal*, 18(9). DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6230>. [Consulta: 26 de febrero de 2025]
- Arroyo, B., Olivero, J. y Guerrero A. (2016). Direct effect of p,p'-DDT on mice liver. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 52 (2). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502016000200007> [Consulta: 18 de octubre de 2025]
- ATSDR. (2002). Agency for Toxic Substances and disease Registry (US). Toxicological profile for DDT, DDE and DDD. U.S. department of health and human services. Public health service. *Agency for toxic substances and disease registry*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK590084/> [Consulta: 26 de octubre de 2025].
- Vos, G., et al. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to European situation. *Crit. Rev. Toxicol.*, 30,71-133. DOI: [10.1080/10408440091159176](https://doi.org/10.1080/10408440091159176) [Consulta: 26 de octubre de 2025].
- Bashir, A., Hoilat, G., Sarwal, P., y Mehat, D. (2023) Liver Toxicity. *StatPearls*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526106/>. [Consulta: 03 de noviembre de 2023]
- Benavides, F. y Guénet, J. (2003). Los roedores de laboratorio como modelos de enfermedades humanas. *Manual de genética de roedores de laboratorio, principios básicos y aplicaciones*. 263-297. [Consulta: 15 de noviembre de 2023]
- Blair, A. y Freeman, L. (2009) Epidemiologic studies in agricultural populations: observations and future directions. *J Agromedicine* 14(2):125–131. DOI: 10.1080/10599240902779436. [26 de octubre de 2025]
- Blake, B., et al. (2022). Transcriptional pathways linked to fetal and maternal hepatic dysfunction caused by gestational exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) or hexafluoropropylene

- oxide-dimer acid (HFPO-DA or GenX) in CD-1 mice. *Ecotoxicol Environ Saf*, 248, p.114314. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114314>. [Consulta: 25 de noviembre de 2023]
- Bossou, Y., et al. (2020). Impact of pesticide coexposure: an experimental study with binary mixtures of lambda-cyhalothrin (LCT) and captan and its impact on the toxicokinetics of LCT biomarkers of exposure. *Archives of Toxicology*, 94(9), pp.3045–3058. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02810-6>. [Consulta: 19 de noviembre de 2023]
- Brancatelli, G. et al. (2018). Hepatic sinusoidal dilatation. Section of Radiological Sciences, Department of Biopathology and Medical Biotechnologies, Di.Bi. Med, University of Palermo. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00261-018-1465-8>
- Branford, P., De la Cruz, E., Solano, K. y Ramirez, O. (2014). Pesticide exposure on sloths (*Bradypus variegatus* and *Choloepus hoffmanni*) in an agricultural landscape of Northeastern Costa Rica. *J. Environ. Biol.* 35, 29-34. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24579518/> [Consulta: 29 de noviembre de 2023]
- Browning, J. y Horton D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* 2004;114(2):147-152. DOI: 10.1172/JCI22422 [Consulta: 05 de junio de 2025]
- Bureau, M., et al. (2021). Pesticide exposure of workers in apple growing in France. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 95(4), pp.811–823. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00420-021-01810-y>. [Consulta: 12 de noviembre de 2023]
- Calidad Tridente. Ficha técnica del Captan 50% WP. Agroquímica Tridente S.A. de C.V. Disponible en: https://www.tridente.com.mx/media/agrproducts/Ficha_Técnica_-CAPTAN_50_WP.pdf [Consulta: 18 de julio de 2025]
- CEVECE. (2019). Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Gobierno del Estado de México. Reporte: Panorama Epidemiológico de las Intoxicaciones por Sustancias Químicas en el Estado de México. Disponible en: https://cevece.edomex.gob.mx/sites/cevece.edomex.gob.mx/files/files/docs/documentostec/reportes/2019/RCERBHMMJEM%2002_0.pdf [Consulta: 29 de noviembre de 2023]
- Chandra, I. y Linthoingambi, N. (2017). Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. *Environ. Sci. & Engg.* Vol. 6: Toxicology. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/313445102_Pesticides_Classification_and_Its_Impact_on_Human_and_Environment [Consulta: 11 de noviembre de 2023]
- Chen, S., Edwards, C. y Subler, S. (2001). Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(14), pp.1971–1980. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(01\)00131-6](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(01)00131-6). [Consulta: 19 de noviembre de 2025]
- Chia R, et al. (2005). The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat Genet* 37(11):1181–6. [Consulta: 26 de octubre de 2025]. DOI: [10.1038/ng1665](https://doi.org/10.1038/ng1665) [Consulta: 26 de octubre de 2025].
- Corona, I. (2016). El desarrollo de la agricultura y el impacto que tendría en las finanzas públicas de México. *Premio Nacional de Finanzas Públicas 2016*. Disponible en: https://cefp.gob.mx/formulario/Trabajo_12a.pdf [Consulta: 10 de noviembre de 2023]
- Da Silva, J, Monteiro, N., Antunes, P. y Favareto, A. (2020). Maternal and developmental toxicity after exposure to formulation of chlorothalonil and thiophanate-methyl during organogenesis in rats. *An Acad Bras Cienc*, 92(4). DOI:<https://doi.org/10.1590/0001-3765202020191026>. [Consulta: 12 de noviembre de 2023]
- DOF. (2001). Dario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

- Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf [Consulta: 24 de noviembre de 2023]
- Du, H., et al. (2022). Nano-Selenium Alleviates Cadmium-Induced Acute Hepatic Toxicity by Decreasing Oxidative Stress and Activating the Nrf2 Pathway in Male Kunming Mice. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.942189>. [Consulta: 24 de noviembre de 2023]
- Eddleston, M. (2019). Poisoning by pesticides. *Medicine*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.12.019> [Consulta: 28 de noviembre de 2023].
- Elkomy, A., et al. (2020). L-Carnitine Mitigates Oxidative Stress and Disorganization of Cytoskeleton Intermediate Filaments in Cisplatin-Induced Hepato-Renal Toxicity in Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.574441>. [Consulta: 20 de octubre de 2025]
- Ewing, L., et al (2019). Paradoxical Patterns of Sinusoidal Obstruction Syndrome-Like Liver Injury in Aged Female CD-1 Mice Triggered by Cannabidiol-Rich Cannabis Extract and Acetaminophen Co-Administration. *Molecules*, 24(12), p.2256. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24122256>. [Consulta: 25 de noviembre de 2023]
- FAO. (2019) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos. *Normas Internacionales de los Alimentos*. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/es/>[Consulta: 28 de noviembre de 2023].
- FAOSTAT. (2021). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Plaguicidas: uso. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/RP/visualize> [Consulta: 28 de noviembre de 2023].
- Farag, A., Karkour, T. y Okazy, A. (2006). Embryotoxicity of oral administered chlorothalonil in mice. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 77(2), pp.104–109. DOI: <https://doi.org/10.1002/bdrb.20074>. [Consulta: 18 de noviembre de 2023]
- Fengler, V., et al. (2016). Susceptibility of Different Mouse Wild Type Strains to Develop Diet-Induced NAFLD/AFLD-Associated Liver Disease. *PLoS ONE*, 11(5).. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155163>. [Consulta: 24 de noviembre de 2023]
- Fernández, S. (2025). Protocolo Tricrómico de Masson. Técnicas histológicas. Atlas de histología vegetal y animal. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-t-masson.php>
- Fernandez, A., et al. (2018). Exposure to the Fungicide Captan Induces DNA Base Alterations and Replicative Stress in Mammalian Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60(3), pp.286–297. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.22268>. [Consulta: 18 noviembre de 2023]
- Fischer, A., Jacobson, K., Rose, J. y Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harb Protoc*. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>. [Consulta: 25 de octubre de 2025]
- Fishel, F. y Ferrell, J. (2013). Managing pesticide drift. Agronomy department. University of Florida, Gainesville, Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pi232>. [Consulta: 11 noviembre de 2023]
- Fu, D. y Campbell, M. (2017). Periodic Acid-Schiff Staining with Diastase. *Methods in Molecular Biology*. pp.145–149. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7163-3_14. [Consulta: 14 de septiembre de 2025]
- FRAC. (2010). Comité de Acción para la Resistencia de Fungicidas. FRAC recommendations for fungicide mixtures designed to delay resistance evolution, 1-7 [Consulta: 19 de noviembre de 2023]

- Garza, S. (2016). Gaceta del Senado LXIII/2PPO-60/67821. Disponible en: https://www.senado.gob.mx/65/gaceta_del_senado/documento/67821#:~:text=Seg [Consulta: 02 de noviembre 2023].
- Gobierno del Estado de México. (2020). Producción agrícola del Estado de México 2011-2020. Unidad de Información, Planeación y Programación y Evaluación Subdirección de Información y Estadística. Disponible en: <https://secampo.edomex.gob.mx/sites/secampo.edomex.gob.mx/files/files/Produccion/Agri cultura.pdf> [Consulta: 28 de noviembre de 2023].
- Gök, E. y Deveci, E. (2022). Histopathological, immunohistochemical and biochemical alterations in liver tissue after fungicide-mancozeb exposures in Wistar albino rats. xperimental Research Center, and Histology and Embryology Laboratory, Medical School, Dicle University, Diyarbakır, Turkey. DOI: <https://doi.org/10.1590/acb370404> [Consulta: 21 de agosto de 2025].
- Gammon, D., Moore, T. y O'Malley, M. (2010). A toxicological assessment of sulfur as a pesticide. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (third ed), vol. 2 pp. 1889-1901*. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00088-4> [Consulta: 26 de octubre de 2025]
- Hamer, M., Maynard, S. y Schneider, S. (2019). A Pulsed-Dose Study Evaluating Chronic Toxicity of Chlorothalonil to Fish: A Case Study for Environmental Risk Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(7), pp.1549–1559. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.4421>. [Consulta: 12 de noviembre de 2023]
- Haque, N., Eom, H., Nam, S., Shin, Y. y Rhee, J. (2019). Chlorothalonil induces oxidative stress and reduces enzymatic activities of Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase in gill tissues of marine bivalves. *PLOS ONE*, 14(4), p.e0214236. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214236>. [Consulta: 12 de noviembre de 2023]
- Hu, R., Shi, L., Lee, D. y Haile, G. (2016). Access to and Disparities in Care among Migrant and Seasonal Farm Workers (MSFWs) at U.S. Health Centers. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved*; 27(3):1484–1502. DOI:10.1353/hpu.2016.0107. [26 de octubre de 2025]
- IGHRC. (2009). Interdepartmental Group on Health Risks from Chemicals (2009). The intergovernmental group on health risks from chemicals. Chemical mixtures: a framework for assessing risk to human health (CR14). Institute of Environment and Health, Cranfield University, Cranfield, UK, Disponible en: http://www.iehconsulting.co.uk/IEH_Consulting/IEHCPubs/IGHRC/cr14.pdf [Consulta: 17 de julio de 2025]
- Ikeda, M. et al. (2018). Some adverse actions of chlorothalonil at sublethal levels in rat thymic lymphocytes: Its relation to Zn²⁺. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 59, pp.61–65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.006>. [Consulta: 18 de noviembre de 2023]
- Inoue, T., Kinoshita, M., Oyama, K., Kamemura, N. y Oyama, Y. (2018). Captan-induced increase in the concentrations of intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ and its correlation with oxidative stress in rat thymic lymphocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, pp.78–83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.017>. [Consulta: 18 noviembre de 2023]
- ITW Reagents. (2019). Tinción de Ácido Peryódico-Schiff (PAS-Schiff). Disponible en https://www.itwreagents.com/download_file/ce_ivd_instructions/CEIVD15/es/CEIVD15_e s.pdf
- Jackson, T., Ryherd, G., Scheibly, C., Sasser, A., Guillette, T. y Belcher, S. (2020). Gestational Cd Exposure in the CD-1 Mouse Induces Sex-Specific Hepatic Insulin Insensitivity, Obesity, and Metabolic Syndrome in Adult Female Offspring. *Toxicological Sciences*, 178(2),

- pp.264–280. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa154>. [Consulta: 24 de noviembre de 2023]
- M., Ishii, N., Okazaki, E., Wei, M., Tachibana, T. y Hideki, W. (2010). Cytokeratin 8/18 as a new marker of mouse liver preneoplastic lesions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(1), pp.47–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.09.013>. [Consulta 20 de octubre de 2025]
- Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C., y Tuma, F. (2023) Physiology, Liver. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/> [Consulta: 03 de noviembre de 2023]
- Kaur, G., Singh, A., Sharma, R., Thakur, A., Tuteja, S., Shyamli y Singh, R. (2023). Effect of fungicidal contamination on survival, morphology, and cellular immunity of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Frontiers in Physiology*, 14. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1099806>. [Consulta: 09 de noviembre de 2023]
- Kaur, R., Mavi, G.K., Raghav, S. y Khan, I. (2019). Pesticides Classification and its Impact on Environment. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(03), pp.1889–1897. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.803.224>. [Consulta: 06 de diciembre de 2023]
- Kuo, Q., et al. (2022). Captan exposure disrupts ovarian homeostasis and affects oocytes quality via mitochondrial dysfunction induced apoptosis. *Chemosphere*, 286, p.131625. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131625>. [Consulta: 18 de noviembre de 2023]
- LIDE Biotech. (2023). Mouse models: applications, types, advantages and disadvantages. Disponible en: <https://www.lidebiotech.com/blog/mouse-models-applications-types-advantages-and-disadvantages> [Consulta: 23 de noviembre de 2025]
- Lü, Y., et al. (2023). Exposure of chlorothalonil and acetamiprid reduce the survival and cause multiple internal disturbances in *Apis mellifera* larvae reared in vitro. *Frontiers in Physiology*, 14. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1114403>. [Consulta: 12 de noviembre de 2023]
- Lukowicz, C., et al. (2018). Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. *Environmental Health Perspectives*, 126(6) pp 1-18. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp2877>. [Consulta: 19 de noviembre de 2023]
- Jalal, M. et al. (2020). Triazole fungicides induce hepatic lesions and metabolic disorders in rats. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 10(2), pp.040–047. DOI: <https://doi.org/10.30574/gscbps.2020.10.2.0002>. [Consulta: 18 de octubre de 2025]
- Mezfer Crown. (2022). Captan 500. Mezclas y Fertilizantes S.A. de C.V. Disponible en: <https://mezfer.com.mx/wp-content/uploads/2023/01/FTE-FUN-PV-02-CAPTAN-500.pdf> [Consulta: 18 de julio de 2025]
- Mirković, B., et al. (2015). Toxicity of mancozeb, chlorothalonil, captan, fluopyram, boscalid, and difenoconazole to *Didymella applanata* isolates from Serbia. *Journal of Environmental Science and Health*. pp 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1062648>. [Consulta: 19 de noviembre de 2023]
- Moo, AJ., Azorín, EP., Ramírez, N., y Moreno, PA. (2021). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of the captan-based fungicides, chlorothalonil-based fungicides and methyl thiophanate-based fungicides in human fibroblasts BJ. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 56(10), 877–883. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1972721>
- Moreno, M., Arenas, J., A. y Fernández, M. (1999). Effects of in Vivo Captan Administration on Cytotoxicity, Gluconeogenesis, ATP Levels, and Parameters Related to Oxidative Stress in

- Rat Liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 64(3), pp.185–193. DOI: <https://doi.org/10.1006/pest.1999.2425>. [Consulta: 18 de noviembre de 2023]
- Nagel M. et al. (2018). Cytokeratin-18 fragments predict treatment response and overall survival in gastric cancer in a randomized controlled trial. *Tumor Biol* 1-8. DOI: 10.1177/1010428318764007 [Consulta: 26 de octubre de 2025]
- Nicolopoulou, P., Maipas, S., Kotampasi, P. y Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in Public Health*. 4(148): 1-8. DOI: 10.3389/fpubh.2016.00148 [Consulta: 29 de noviembre de 2023]
- NIH. (2019). National Human Genome Research Institute. Monoclonal Antibodies. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/monoclonal-antibodies> [Consulta: 25 de octubre de 2023]
- NIH. (2023). National Human Genome Research Institute. Mouse model [en línea]. Disponible en: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mouse-Model> [Consulta: 25 de octubre de 2023]
- O’Neal, S., Reeves, A., Fell, R., Brewster, C. Y Anderson, T. (2019). Chlorothalonil Exposure Alters Virus Susceptibility and Markers of Immunity, Nutrition, and Development in Honey Bees. *Journal of Insect Science*, 19(3). DOI: <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez051>. [Consulta: 12 de noviembre de 2023]
- OECD. (2021). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico. Gobernanza Regulatoria en el Sector de Plaguicidas de México, *OECD Publishing*. DOI: <https://doi.org/10.1787/b4805eb5-es>. [Consulta: 18 de julio de 2025]
- OMS. (2019). Organización Mundial de la Salud. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification*. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005662> [Consulta: 11 de noviembre de 2023]
- OMS. (2020). Organización Mundial de la Salud. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Plaguicidas uso. Disponible en <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/chemical-safety-pesticides> [Consulta: 01 de noviembre de 2023]
- Ollinger, S., Hurt, S., Arce, G., Bui, Q., Tobia, A. y Ravenswaay, B. (2010). Dialkyldithiocarbamates (EBDCs). *Hayes’ Handbook of Pesticide Toxicology (third ed)*, vol. 2 pp.1689–1710. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00078-1>[Consulta: 26 de octubre de 2025]
- Pathak, V., et al. (2022). Current status of pesticide effects on environment, human health and it’s eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, 13. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>. [Consulta: 01 de noviembre de 2023]
- Proteintech. (s.f.). The complete guide to immunohistochemistry. Disponible en: https://www.ptglab.com/media/mjopz1mm/ihc-guide_v13_digital.pdf?srsId=AfmBOoog90ZbuKgRMlm9gy8-iC1rGH-NKIKT1LjY7TiDDYRL2mhqcQwm [Consulta: 26 de octubre de 2025].
- Quist, E., et al. (2018). Reevaluation of Hepatocellular Neoplasms in CD-1 Mice from a 2-year Oral Carcinogenicity Study with Permethrin. *Toxicol Pathol*, 47(1), pp.11–17. DOI: <https://doi.org/10.1177/0192623318809304>. [Consulta: 25 de noviembre de 2023]
- Quist, E., Filgo, A., Cummings, C., Kissling, G., Hoenerhoff, M. and Fenton, S. (2015). Hepatic Mitochondrial Alteration in CD-1 Mice Associated with Prenatal Exposures to Low Doses of Perfluorooctanoic Acid (PFOA). *Toxicol Pathol*, 43(4), pp.546–557. DOI: <https://doi.org/10.1177/0192623314551841>. [Consulta: 24 de noviembre de 2023]

- Raimondo, J. (2007). Mezcla de plaguicidas. Elementos Fundamentales para el Buen Uso de Fitoterapéuticos. 28-31. [Consulta: 19 de noviembre de 2023]
- Ramírez, J. y Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor* 2001;4(2):67-75. Disponible en: https://archivosdeprevencion.eu/view_document.php?tpd=2&i=1270 [Consulta: 11 de noviembre de 2023]
- Reffstrup, T., Larsen, J. y Meyer, O. (2010). Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.09.013> [Consulta: 09 de noviembre de 2023]
- Rosenthal, N., y Brown, S. (2007) The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nat Cell Biol* 9(9):993–9. DOI:10.1038/ncb437 [Consulta: 12 de noviembre de 2023]
- Saad, H., Oda, S., Alexiou, A., Papadakis, M., Mahmoud, M. El-Saber, G. y Khalifa, E. (2024). Hepatoprotective activity of Lactéol® forte and quercetin dihydrate against thioacetamide-induced hepatic cirrhosis in male albino rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 28(8). DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.18196> [Consulta: 15 de septiembre de 2025].
- Saber, A., Hany, A., Samei, A. y Soliman, M. Exploring Hepatotoxicity of Benomyl: Histological and Histochemical Study on Albino Rats (2004). *J. Med. Sci.*, 4(1): 77-83. ISSN: 1682-4474. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Saber-Sakr/publication/46031787_Exploring_Hepatotoxicity_of_Benomyl_Histological_and_Histochemical_Study_on_Albino_Rats/links/00b7d52025b9b34676000000/Exploring-Hepatotoxicity-of-Benomyl-Histological-and-Histochemical-Study-on-Albino-Rats.pdf [Consulta: 15 de septiembre de 2025].
- Sarkar, S., Dias, J., Keeley, J. y Jansen, K. (2021). The use of pesticides in developing countries and their impact on health and the right to food. European Union. DOI: 10.2861/28995 [Consulta: 13 de febrero de 2025]
- Scherholz, V. y Chiorato, S. (2007). Effects of separate and combined exposure to the pesticides methamidophos and chlorothalonil on the development of suckling rats. *Int J Hyg Environ Health*, 210(2), pp.169–176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2006.09.003>. [Consulta: 26 de agosto de 2025]
- SADER. (2019). Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Manual para el buen uso y manejo de plaguicidas en campo. 1º edición. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). DISPONIBLE EN: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/452645/MANUAL_PARA_EL_BUEN_USO_Y_MANEJO_DE_PLAGUICIDAS_EN_CAMPO.pdf . [Consulta: 11 de noviembre de 2023]
- Secretaría de Economía. (2024). Insecticidas código 380891 (sistema armonizado 2012 por 6 dígitos). Gobierno de México. Disponible en: <https://www.economia.gob.mx/datamexico/es/profile/product/insecticidas> . [Consulta: 25 de junio de 2025]
- Sharma, A., et al. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1(11). DOI: <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>. [Consulta: 25 de febrero de 2025]
- Sjöström, J. et al. (2001). Serum tumour markers CA 15-3, TPA, TPS, hCGbeta and TATI in the monitoring of chemotherapy response in metastatic breast cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 61: 431-441. DOI: 10.1080/0036551012567068 [Consulta: 26 de octubre de 2025].
- Smart, N. (2003). Fungicides. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (8) 2832-2842. DOI: <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00543-5> [Consulta: 29 de noviembre de 2025]

- Song, X. (2014). Captan. Merck & Co., Inc Elsevier eBooks, pp.659–660. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386454-3.00105-6>. [Consulta: 18 noviembre de 2023]
- Tajima, S., Yamamoto, N. y Masuda, S. (2019) Clinical prospects of biomarkers for the early detection and/or prediction of organ injury associated with pharmacotherapy. *Biochem Pharmacol* 170:113664. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113664> [Consulta: 26 de octubre de 2025]
- Tao, H., Bao, Z., Jin, C., Miao, W., Fu, Z. y Jin, Y. (2020). Toxic effects and mechanisms of three commonly used fungicides on the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Environmental Pollution*. (263) 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114660>
- Tao, H., Zhaorigetu, B. y Jin, Y. (2022). Chlorothalonil exposure induces ‘liver-gut axis’ disorder in mice. *Acta Biochim Biophys Sin*, 54(7), pp.1030–1033. DOI: <https://doi.org/10.3724/abbs.2022078>. [Consulta: 18 de noviembre de 2023]
- Taylor, C. (2014). Immunohistochemistry in surgical pathology: Principles and practice In: Day CE (ed) Histopathology: methods and protocols. Methods in molecular biology Springer, New York, pp 81–110. DOI: 10.1007/978-1-4939-1050-2_5 [Consulta: 25 de octubre de 2025]
- Treuting, P., Dintzis, S. y Montine, K. (2018). *Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas*. 2nd ed. London: Elsevier/Academic Press, Cop. [Consulta: 26 de octubre de 2025]
- Thompson, C., et al. (2017). Comparison of Toxicity and Recovery in the Duodenum of B6C3F1 Mice Following Treatment with Intestinal Carcinogens Captan, Folpet, and Hexavalent Chromium. *Toxicologic Pathology*, 45(8), pp.1091–1101. DOI: <https://doi.org/10.1177/0192623317742324>. [Consulta: 12 noviembre de 2023]
- UNA. (2025). Universidad Nacional de Costa Rica. Clorotalonil Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas (IRET). Disponible en: <https://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/152-clorotalonil> [Consulta: 18 de julio de 2025]
- University of Oxford. (2025). Hematoxylin and Eosin (H&E) Staining. Oxford Cancer. Disponible en: <https://www.cancer.ox.ac.uk/support/THL/HE-Staining#:~:text=H&E%20staining%20is%20the%20staining,changes%20within%20a%20tissue%20sample> [Consulta: 26 de octubre de 2025].
- Unsworth, J., Nakagawa, Y., Harris, C. y Kleter, G. (2019). The Battelle for a Sustainable Food Supply. Sustainable Agrochemistry: A Compendium of Technologies, Ed. Silvio Vaz Jr., pp.13–84. DOI: [10.1007/978-3-030-17891-8_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-17891-8_2) [Consulta: 26 de octubre de 2025].
- USEPA (2025). Agencia de Protección Ambiental. What is a Pesticide? | US EPA. Disponible en: <https://www.epa.gov/minimum-risk-pesticides/what-pesticide> [Consulta: 19 de junio de 2025]
- Van de Vlekkert, D., Machado, E. y d’Azzo, A. (2020). Analysis of Generalized Fibrosis in Mouse Tissue Sections with Masson’s Trichrome Staining. *Bio-protocol*, 10(10). DOI: <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3629>. [Consulta: 14 de septiembre de 2025]
- Velázquez, et al. (2015). Evaluación del uso, aplicación y transporte de plaguicidas comúnmente empleados en suelos de cultivo florícola en Villa Guerrero, Estado de México. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Química Universidad Autónoma del Estado de México. [Consulta: 25 de octubre de 2025].

- Velsimex. (2024). Metalaxil + Clorotalonil. Ficha técnica. Disponible en: <https://www.velsimex.com/wp-content/uploads/2024/07/Ficha-tecnica-Metanil.pdf> [Consulta: 25 de octubre de 2025]
- VoPham, T., et al. (2017). Pesticide exposure and liver cancer: review. *Cancer Causes Control*, 28(3): 177–190. DOI:10.1007/s10552-017-0854-6. [Consulta: 29 de noviembre de 2023]
- Wang, et al (2021). Effects of chlorothalonil, prochloraz and the combination on intestinal barrier function and glucolipid metabolism in the liver of mice. *Journal of Hazardous Materials*, 410, pp.124639–124639. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124639>. [Consulta: 11 de marzo de 2024]
- Wasef, et al., (2021). The potential ameliorative impacts of cerium oxide nanoparticles against fipronil-induced hepatic steatosis. *Scientific reports*, 11(1). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79479-5> [Consulta: 15 de septiembre de 2025].
- Williams, D., et al (2004). Time Course Toxicogenomic Profiles in CD-1 Mice after Nontoxic and Nonlethal Hepatotoxic Paracetamol Administration. *Chem Res Toxicol*, 17(12), pp.1551–1561. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx049846x>. [Consulta: 25 de noviembre de 2023]
- Yang, G., Wang, Y., Li, J., Wang, D., Zhaorigetu, B., Wang, Q. y Jin, Y. (2021). Health risks of chlorothalonil, carbendazim, prochloraz, their binary and ternary mixtures on embryonic and larval zebrafish based on metabolomics analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 404, pp.1–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124240>. [Consulta: 24 de noviembre de 2023]
- Yang, L., et al. (2021). Hepatic toxicity of fluorene-9-bisphenol (BHPF) on CD-1 mice. *Ecotoxicol Environ Saf*, 219, p.112298. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112298>. [Consulta: 24 de noviembre de 2023]
- Zhang, P., et al. (2019). Low dose chlorothalonil impairs mouse spermatogenesis through the intertwining of Estrogen Receptor Pathways with histone and DNA methylation. *Chemosphere*, 230, pp.384–395. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.029>. [Consulta: 19 de noviembre de 2023]
- Zhu, W., Schmehl, D., Mullin, C. y Frazier, J. (2014). Four Common Pesticides, Their Mixtures and a Formulation Solvent in the Hive Environment Have High Oral Toxicity to Honey Bee Larvae. *PLoS ONE*, 9(1). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077547>. [Consulta: 19 de noviembre de 2025]

10.- Anexos

Carta de aprobación de proyecto por parte del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).


Universidad Autónoma del Estado de México

Toluca, México, a 29 de agosto de 2025
CUCUAL-DISP/10-2025

Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez
Profesor-Investigador, FM-UAEMéx
PRESENTE

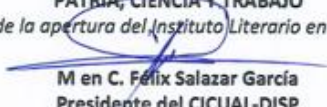
Sirva la presente para informar que la Comisión Revisora del Comité Institucional para el Cuidado de los Animales de Laboratorio - Docencia, Investigación, Servicios y Producción (CICUAL-DISP) de la FMVZ, emite el dictamen correspondiente a la revisión del Protocolo de Investigación *"Determinación del Efecto Hepatotóxico en Ratones CD-1 a la Exposición Conjunta de los Funguicidas Captan y Clorotalonil"* con Clave de Registro MACSSD-03-0224", bajo su responsabilidad y colaboración de Barbara Gallegos Inzuna.

En cumplimiento del buen uso de los animales de laboratorio con sentido Bioético y del Bienestar Animal, los revisores emiten:

Dictamen: Aprobado

Observaciones: Corregir palabras en el protocolo que se escriben en pasado, indicando que la ejecución de la investigación ya se realizó.

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2025, 195 años de la apertura del Instituto Literario en la Ciudad de Toluca"



M en C. Félix Salazar García
Presidente del CICUAL-DISP

c.c.p. Archivo



Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
Docencia, Investigación, Servicios y Producción

