



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Daño genotóxico en linfocitos humanos expuestos *in vitro*
a la mezcla de permetrina-aletrina”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A

LUCIO ANTONIO RAMOS CHÁVEZ

DIRECTORA:

MC. MA. ELENA MORENO GODÍNEZ

CHILPANCINGO, GRO., MARZO DE 2010.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 17 días del mes de febrero de dos mil diez, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “**Daño genotóxico en linfocitos humanos expuestos *in Vitro* a la mezcla de permetrina-aletrina**”, presentada por el alumno Lucio Antonio Ramos Chávez, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

M en C. Ma. Elena Moreno Godínez
Dirección de tesis

Dra. Amalia Vences Velázquez

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dr. Pável Sierra Martínez

M en C. Eugenia Flores Alfaro

Vo. Bo

Dra. Berenice Illades Aguiar
Coordinadora de la Maestría en Ciencias
Biomédicas

Vo. Bo

Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Director de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
UNIDAD ACADÉMICA
DE CIENCIAS
QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental de la Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas, de la Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, y estuvo financiado por los Fondos Mixtos del estado de Guerrero, clave GUE-2008 C02 108764.

Bajo la dirección de

MC. Ma Elena Moreno Godínez

Con la asesoría de

Dra. Amalia Vences Velázquez

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

MC. Eugenia Flores Alfaro

Dr. Pável Sierra Martínez

La colaboración teórico-práctica de

QFB. Monserrat Sordo López

Laboratorio de Epidemiología Celular y Molecular, del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), México, D.F.

Durante el periodo en que el C. Lucio Antonio Ramos Chávez cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas recibió beca CONACYT. Recibió un apoyo del banco Santander Serfín al otorgarle la beca de movilidad Santander Universia durante el período de agosto-diciembre 2008 y beca por parte del proyecto FOMIX-GUE-2008 C02 108764, durante el periodo octubre 2009 a febrero 2010.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial

A mi directora de tesis, la **MC. Ma Elena Moreno Godínez**, por esta segunda oportunidad, por la formación, enseñanzas y consejos.

A la **Dra. Amalia Vences Velázquez**, la **Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero**, la **MC. Eugenia Flores Alfaro** y el **Dr. Pável Sierra Martínez**, por la disposición, el tiempo y empeño invertido en la revisión de este trabajo

A la **Dra. Martha Patria Ostrosky Wegman**, Investigador del laboratorio de Epidemiología Celular y Molecular, del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), por abrirme las puertas de su laboratorio.

A la **QFB. Monserrat Sordo López**, Técnico Académico del laboratorio de Epidemiología Celular y Molecular, del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), por la paciencia y la asesoría teórico-práctica que me brindó.

A la **QBP. Lucía Flores Bello**, auxiliar del laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental, de la Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas (UAG), por el compromiso y responsabilidad para con el trabajo. ¡Gracias Lucy!

A mi maestro de seminario, el **Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez**, por las facilidades dadas y toda la ayuda brindada.

A la **Dra. Gloria Fernández Tilapa**, por haberme permitido trabajar en su laboratorio para el desarrollo de una parte práctica de la tesis. ¡Muchas gracias Doctora!

Al **Dr. Eduardo Castañeda Saucedo**, por toda la ayuda y las sugerencias que mejoraron el trabajo. ¡Gracias Doctor!

DEDICATORIAS

A mis padres, **Lucio Ramos Maldonado** e **Isabel Chávez Ruíz**, por su apoyo moral, por el tiempo lejos de casa y por ser piezas invaluables en mi vida.

A mis hermanos, Patricia, Roxana Grissel y Rubén por las palabras de aliento y por los bonitos recuerdos. *¡Los quiero mucho!*

A mis sobrinos, Diego Yurriel, José Fernando, Brandon Miguel, Ángel Yuruen, Nicolás Rubén, Mairyn Guadalupe, Ximena y para ti que estas por llegar por el cariño que despiertan en mí y por los ratos de alegría que me han regalado.

A mis compañeros de laboratorio, Daniel, Jesús, Faby, Lety, Magaly, Shirley, Yazmin y la Mtra. Blanca por formar parte de esta historia, por el apoyo sincero en esos días de arduo trabajo y por el afecto compartido. ¡Gracias!

A mi amigo de toda la vida, Faustino por el soporte que me diste en los días más difíciles de la tesis por alentarme siempre a seguir, por demostrarme el sentido de una verdadera amistad, y por el mañana por el que se tiene que seguir.

A mis amigos de la maestría, Ady, Mirna, Migue, América, Alin, Jazmín, George, Yazmín, Julio, Luz y luilli por el tiempo, los momentos y los detalles que tuvieron para conmigo. ¡Ah! y a Kimberly y Carlos Daniel por los ratos de alegría.

A mi familia, amigos y personas del ayer y de hoy que no nombre, porque son parte importan de mi vida, por los buenos deseos y por compartir conmigo momento inolvidables.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
RESULTADOS.....	8
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	15
REFERENCIAS.....	21

RESUMEN

Los piretroides son insecticidas sintéticos de amplio uso en los programas de salud pública y en la agricultura. En países de tercer mundo una mezcla de piretroides como la permetrina y aletrina se aplican en forma de rociamiento espacial para controlar la sobrepoblación de vectores transmisores de enfermedades. La permetrina ha mostrado inducir efectos genotóxicos *in vivo* e *in vitro* en diferentes sistemas y modelos experimentales. Los efectos genotóxicos de la aletrina han sido poco estudiados. En este trabajo se evaluó el efecto genotóxico producido por la exposición *in vitro* a la mezcla de permetrina/aletrina, a través del ensayo de micronúcleos (MN) determinando la frecuencia de MN, índice de división nuclear (IDN), puentes nucleoplásmicos (NPBs), gemaciones nucleares (NBUDs), células apoptóticas y necróticas. Se realizaron cultivos de linfocitos de sangre periférica de 5 donadores clínicamente saludables, que fueron expuestos a una mezcla de diferentes concentraciones de permetrina (1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$) y aletrina (0.01, 0.07 y 0.14 $\mu\text{g/mL}$) en dos periodos de tiempo, 24 y 36 h. La mezcla de permetrina/aletrina incrementó la formación de MN en todas las concentraciones probadas a las 24 h ($R^2=0.59$, $P<0.001$) y 36 h ($R^2=0.72$, $P<0.01$). El IDN disminuyó significativamente a partir de la concentración de 5/0.07 $\mu\text{g/mL}$ de la mezcla permetrina/aletrina a las 24 h ($R^2=0.93$, $P<0.001$) y 36 h ($R^2=0.94$, $P<0.001$) con efecto dosis-tiempo dependiente. La exposición a la mezcla incrementó el número de células apoptóticas a las 24 h ($R^2=0.76$, $P<0.001$) y 36 h ($R^2=0.84$, $P<0.001$). Las células necróticas no se observaron alteradas con respecto al control, excepto a la concentración más alta (10/0.14 $\mu\text{g/mL}$) de la mezcla permetrina/aletrina a las 36 h ($P<0.05$); para el caso de los NPBs solo se observó una correlación marginalmente significativa a la concentración más alta en ambos de exposición. La exposición a la mezcla permetrina/aletrina no correlacionó con la formación de NBUDs. Se observó una correlación positiva significativa entre el número de MN presentes por célula binucleada (uno y dos) al aumentar el grado de exposición de la mezcla de permetrina/aletrina a las 24 ($R^2=0.92$, $P<0.01$) y 36 h ($R^2=0.97$, $P<0.05$). Se observó una correlación positiva significativa ($P<0.001$) entre la frecuencia de MN y apoptosis ($r=0.702$), con NPBs ($r=0.626$), y con células necróticas ($r=0.519$), así como una correlación inversa con el IDN ($r=-0.643$). En este estudio se mostró que la mezcla de permetrina/aletrina ocasionó daño genotóxico *in vitro* dependiente de la concentración y tiempo de exposición en linfocitos humanos de sangre periférica, lo que sugiere la necesidad de más estudios para evaluar el potencial genotóxico de ésta mezcla en modelos animales.

Palabras claves: piretroides, genotoxicidad, permetrina, aletrina y mezclas.

ABSTRACT

Pyrethroids are synthetic insecticides widely used in public health programs and in agriculture. In developing countries a mixture of the pyrethroids permethrin and allethrin is used as space spray to control the overpopulation of disease vectors. Permethrin has been shown to induce genotoxic effects *in vivo* and *in vitro* in different systems and experimental models, whereas the genotoxic effect of allethrin has been poorly studied. This study evaluated the genotoxic effect *in vitro* exposure of human lymphocytes to the permethrin/allethrin mixture. We cultured lymphocytes obtained from peripheral blood from 5 clinically healthy donors. Cultured lymphocytes were exposed to a mixture of different concentrations of permethrin (1, 5, and 10 $\mu\text{g/mL}$) and allethrin (0.01, 0.07, and 0.14 $\mu\text{g/mL}$) for 24 and 36 h. Using the micronucleus test (MN) we determined the frequency of MN, Nuclear Division Index (NDI), nucleoplasm bridges (NPBs), nuclear budding (NBUDs), apoptotic and necrotic cells. The mixture of permethrin/allethrin increased MN formation at all concentrations tested at 24 h ($R^2 = 0.59$, $P < 0.001$) and 36 h ($R^2 = 0.72$, $P < 0.01$). The NDI decreased significantly in a dose and time-dependent manner, starting at concentrations of 5/0.07 $\mu\text{g/mL}$ of the permethrin/allethrin mixture at 24 h ($R^2 = 0.93$, $P < 0.001$) and 36 h ($R^2 = 0.94$, $P < 0.001$). Exposure to the permethrin/allethrin mixture increased the number of apoptotic cells at 24 h ($R^2 = 0.76$, $P < 0.001$) and 36 h ($R^2 = 0.84$, $P < 0.001$). An increase in the number of necrotic cells was observed after 36 h of exposure ($P < 0.05$) to the highest concentration tested (10/0.14 $\mu\text{g/mL}$) of permethrin/allethrin mixture. There was a significant increase in the number of NPBs at the higher concentration at 24 h and 36 h. Exposure to permethrin/allethrin mixture did not correlate with the formation of NBUDs. There was a positive correlation between the number of MN in binucleated cells (one and two) to increase the degree of exposure of the mixture of permethrin/allethrin to 24 h ($R^2 = 0.92$, $P < 0.01$) and 36 h ($R^2 = 0.97$, $P < 0.05$). There was a significant positive correlation ($P < 0.001$) between the frequency of MN and apoptosis ($r = 0.702$), with NPBs ($r = 0.626$), and necrotic cells ($r = 0.519$) and inversely correlated with IDN ($r = -0.643$). This study showed that the mixture of permethrin/allethrin caused genotoxic damage on human peripheral blood lymphocytes *in vitro* in a dose and time-dependent manner, suggesting the need to evaluate the genotoxic potential of this mixture *in vivo*, using models animal.

Key words: pyrethroids, genotoxicity, permethrin, allethrin and mixtures

INTRODUCCIÓN

Los piretroides son insecticidas sintéticos derivados de las piretrinas y desarrollados para incrementar la actividad plaguicida de ésta, reduciendo su fotolabilidad (Coats, 1990) y reteniendo la alta lipofilidad (Casida, 1980). Tienen su origen en el *Pyrethrum*, extracto de la flor del crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (Sudakin, 2006). Se clasifican en dos categorías, tipo I y tipo II (Casida, 1980). A diferencia de los tipo I los de tipo II poseen un grupo α -ciano que se ha relacionado a toxicidad en mamíferos ((Soderlund et al., 2002, Sudakin, 2006).

Los piretroides son absorbidos en tracto gastrointestinal de forma incompleta (40 al 60%), se distribuyen rápidamente en todos los tejidos, principalmente en aquellos con alto contenido de lípidos (IARC, 2003). El metabolismo de los piretroides se considera que es un proceso de detoxificación ya que son degradados rápidamente a metabolitos polares por enzimas oxidativas e hidrolíticas de la familia de los citocromos P450 y carboxilasas, seguidos por una rápida hidroxilación hepática y conjugación con ácidos glucorónicos o sulfatos y eliminados así vía urinaria (Ross *et al.*, 2006, Scollon *et al.*, 2008), en los primeros 12 días (Ahn *et al.*, 2006). Dentro de los piretroide de tipo I está la permetrina, un insecticida utilizado en países de tercer mundo para combatir las enfermedades transmitidas por vectores (WHO, 1990). La fuente más común de exposición a este tóxico es a través de residuos en agua de beber, alimentos, por ingestión e inhalación de polvo contaminado o por contacto dérmico (Ahn *et al.*, 2006). Los efectos tóxicos agudos que ocasiona son debidos a la hiperexcitación que causa a nivel de sistema nervioso central por la apertura prolongada de la subunidad α en los canales de sodio (Motomura H, 2000, Abu-Qare and Abou-Donia, 2003, Kolaczinski and Curtis, 2004).

La exposición ocupacional a plaguicidas se ha asociado con daño al ADN, inestabilidad genética y enfermedades neoplásicas (Paz-y-Mino *et al.*, 2002, Bolognesi, 2003, Costa *et al.*, 2006), en ausencia de los procesos de reparación (Pacheco Ade and Hackel, 2002). El contacto continuo con los plaguicidas incrementa de forma significativa la incidencia de cáncer de próstata (Alavanja *et al.*,

2002), sarcoma de tejido blando, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, páncreas (Ji *et al.*, 2001), leucemia y linfomas no-Hodgkin (Meinert *et al.*, 2000). Diversos estudios en población expuesta a mezclas de plaguicidas entre los que destacan los piretroides han mostrado efecto genotóxico positivo entre la exposición y la presencia de aberraciones cromosomales, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos (Bolognesi, 2003).

La genotoxicidad *in vitro* de la permetrina se ha evidenciado en cultivo de linfocitos humanos donde el tóxico incrementó el intercambio de cromátidas hermanas y la frecuencia de micronúcleos en ausencia de activación metabólica (Herrera *et al.*, 1992). Así mismo en células de ovario de hámster y linfocitos humanos la permetrina indujo aberraciones cromosómicas dependiente del tiempo y la concentración (Barrueco *et al.*, 1994), y daño al ADN en células de la mucosa nasal (Tisch *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que puede ocasionar efectos genotóxicos. En experimentos *in vivo* la exposición de ratas a una sola dosis de DEET (N,N-dietil-m-toluamida) y permetrina incrementó las concentraciones urinarias de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, un marcador de daño al DNA (Abu-Qare and Abou-Donia, 2003), y un daño importante al ADN en ratas tratadas por 60 días (Gabbianelli *et al.*, 2004). La Agencia de Protección al Ambiente ha clasificado a la permetrina como posible carcinógeno debido a la limitada evidencia que existe en animales (EPA, 1997). Por lo que es importante seguir evaluando su potencial genotóxico para tener mayor evidencia.

La aletrina, es otro insecticida piretroide de tipo I, el cual es una mezcla de ocho esteroisómeros y comercialmente disponible como repelente para mosquitos (Srivastava *et al.*, 2006). La exposición a este piretroide se da principalmente a través de la vía Inhalatoria y/o captación simultánea vía oral de sus aerosoles (Leng *et al.*, 1999). La OMS clasifica a la aletrina como tóxico clase II (WHO, 2005). El efecto genotóxico de la aletrina ha sido menos estudiado en comparación con la permetrina. La exposición *in vitro* de linfocitos a aletrina mostró la inducción de apoptosis y cambios en la expresión de 346 genes relacionados con el proceso

apoptótico (caspasa 1, 2, 3 y 6) y la transformación celular maligna (NF2 κ - β , NOCH, C-Jun, TGF- β y A-Raf) (Liu *et al.*, 2006).

Los piretroides son altamente efectivos y carecen de persistencia en el ambiente por ello se emplean en programas de salud pública y en la agricultura (Sudakin, 2006). Principalmente en países de tercer mundo (Bhalli *et al.*, 2006). El Esquema para la Evaluación de Plaguicidas de la Organización Mundial de la Salud (WHOPES) en el periodo 2003-2005, reportó mundialmente que las cantidades de permetrina esparcidas fueron de 273,052 kg (Zaim, 2007). Por otra parte no existe registro de las cantidades de aletrina utilizadas.

En Guerrero una mezcla de permetrina 25/75 cis/trans (10.35%) y aletrina (0.14%) es utilizada a gran escala para contrarrestar la sobrepoblación de vectores transmisores de enfermedades. El plaguicida es aplicado en forma de rociamiento espacial en el ambiente intra y extra domiciliario, de esta forma el insecticida ejerce su actividad sobre los mosquitos adultos presentes (SSA, 2006).

El ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica es una técnica útil para evaluar daño en el ADN (Fenech, 2003), a través del incremento en la frecuencia de micronúcleos (MN), así como otras anomalías celulares que se encuentran en vías de validación como biomarcadores de daño genotóxico, como los puentes nucleoplásmicos (NPBs) indicadores de cromosomas dicéntricos que resultan de fusión de los extremos de los telómeros o errores en la reparación del ADN, gemaciones nucleares (NBUDs) un biomarcador que detecta amplificación genética , el *status* de viabilidad celular (apoptosis y necrosis) y el índice de división nuclear (IDN) (Fenech, 2006). El incremento en la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica implica riesgo de cáncer en humanos (Bonassi *et al.*, 2007). Por lo que este ensayo es ideal para medir inestabilidad genética (Fenech, 2006), asociado a la exposición de plaguicidas como los piretroides (Bolognesi, 2003).

La exposición ambiental y ocupacional a plaguicidas comúnmente se da en forma de mezcla, por lo que evaluar la genotoxicidad de un solo plaguicida podría no ser extrapolado a humanos debido a interacciones sinérgicas o antagónicas entre los

componentes activos que incrementan o disminuyen el efecto (Bolognesi, 2003). El efecto genotóxico que la permetrina produce se ha observado en diversos sistemas; sin embargo el efecto que genera en combinación con la aletrina se desconoce, presentación comercial que es empleada en los programas de control de vectores, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto genotóxico producido por la exposición *in vitro* a la mezcla de permetrina/aletrina en cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica en relación a la concentración y el tiempo de exposición, medido a través del ensayo de micronúcleos. Los resultados de esta investigación permitieron conocer la genotoxicidad de éste plaguicida lo que impactará en las directrices ambientales del sector salud para garantizar un ambiente más saludable a la población.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se realizó un estudio experimental en cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica de cinco donadores voluntarios. Los cultivos fueron expuestos a tres concentraciones de la mezcla de permetrina/aletrina (0, 1/0.01, 5/0.07 y 10/0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a dos tiempos de exposición (24 y 36 h).

Los controles negativos no estuvieron expuestos a ningún tratamiento y los controles positivos fueron tratados con arsenito de sodio 1×10^{-6} M (Sigma, CAS 1327-53-3). Los experimentos fueron realizados por duplicado para cada condición y en dos momentos independientes para cada individuo. En cada cultivo se evaluó la frecuencia de MN, IDN, NPBs, NBUDs, células necróticas y apoptóticas.

Plaguicida

El plaguicida Aqua Reslin® Super Bayer FFAST es una mezcla de permetrina 25/75 cis/trans 10.35% y aletrina 0.14% y se preparó utilizando solución salina estéril como diluyente. Las concentraciones utilizadas para los ensayos fueron 0.1/0.01, 5/0.07 y 10/0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de permetrina/aletrina, respectivamente. Esta formulación es utilizada para controlar la sobrepoblación de vectores en México.

Obtención de las muestras sanguíneas

Las muestras de sangre periférica para el cultivo de linfocitos fueron obtenidas de donadores voluntarios (n=5) que aceptaron participar mediante la firma de un consentimiento informado, clínicamente saludables, hombres de edades entre 21-26 años, sin antecedentes de exposición ocupacional a plaguicidas, alcoholismo, suplementación con antioxidantes (vitaminas), enfermedades genéticas, tabaquismo y uso de drogas. Se obtuvieron 10 mL de sangre periférica por venipuntura en tubos Vacutainer con heparina de sodio 50 U/mol (Franklin Lakes, NJ USA) por cada individuo.

Cultivo de linfocitos y ensayo de micronúcleos.

Se sembraron 0.5 mL de sangre completa en 6.3 mL de medio RPMI-1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY) suplementado con 1 % de aminoácidos no esenciales (Flow Laboratories, Scotland), y 1 % de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en tubos cónicos estériles de 15mL (Franklin Lakes, NJ USA). Las células se estimularon con 0.2 mL de fitohemaglutinina forma M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5 % de CO₂. A las 48 horas de cultivo se agregó la citocalasina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una concentración final de 6µg/mL para detener la citocinesis, después de 24 horas de agregada la citocalasina B los cultivos se prefijaron con 1 mL de solución fijadora (metanol/ácido acético 3:1) fría (J.T. Baker, México) y se centrifugaron a 126 g por 10 minutos, posteriormente se hicieron de 3 a 4 lavados con la solución fijadora y las células obtenidas se extendieron en una laminilla (Fenech, 1993). Para la exposición a las 24 h el tratamiento con la mezcla permetrina/aletrina se agregó a las 48h de incubación, y para el tratamiento de las 36 h el tóxico se agregó cuando el cultivo tenía 36h de incubación. De cada condición y ensayo se preparó 1 laminilla. Las preparaciones se tiñeron con el colorante Wright (Merck, Germany). La lectura de la frecuencia de MN, IDN, células apoptóticas, células necróticas, NBUDs y NPBs se realizaron con un microscopio de campo claro OLYMPUS con el objetivo 100X.

La frecuencia de MN, NBUDs y NPBs se determinó en 1000 células binucleadas (CB) siguiendo los criterios de lectura según Fenech *et al.*, (2003), las células apoptóticas, células necróticas se contabilizaron durante el recorrido de lectura de las 1000 CB. La cinética de proliferación o IDN se analizó en las primeras 200 células determinando la frecuencia de células mononucleadas (mono), binucleadas (bi) y polinucleadas (poli), a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de División Nuclear (IDN)} = \frac{[\# \text{ Mono} + 2(\# \text{ Bi}) + 3(\# \text{ Poli})]}{200}$$

Viabilidad Celular

La viabilidad celular se evaluó por el método de tinción simultánea con diacetato de fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y bromuro de etidio (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO) (FDA-EtBr). Esta técnica permitió determinar el estado metabólico de los lisosomas y la integridad de la membrana nuclear. La molécula de FDA (no fluorescente) atraviesa la membrana celular y es hidrolizada por esterasas celulares, esta hidrólisis produce la liberación de la fluoresceína, la cual emite un color verde, tiñendo de este color a las células vivas. Por otro lado, el bromuro de etidio es un compuesto que entra por difusión en las células que no tienen íntegra la membrana y se une a las moléculas de ARN y ADN emitiendo una fluorescencia roja. El porcentaje de viabilidad se calculó contando la proporción de células vivas (verdes) y células muertas (rojas) en un total 200 células (Aeschbacher *et al.*, 1986) utilizando el objetivo de 10X de un microscopio de fluorescencia modelo HBO50 Zeiss.

$$\% \text{ de viabilidad} = [\# \text{ de células vivas} / \# \text{ Total de células contadas (200)}] 100\%$$

Se consideró como una concentración no citotóxica cuando se obtuvieron cuentas de células viables mayor al 80% (Crespo-Lopez *et al.*, 2007). La viabilidad fue evaluada en cada experimento.

Análisis estadístico

Las frecuencias de MN, IDN, células apoptóticas, necróticas, NBUDs y NPBs se expresaron como la media de los experimentos por duplicado. La relación dosis-respuesta se evaluó utilizando un modelo de regresión lineal simple representado gráficamente. Para la correlación entre biomarcadores se utilizó el coeficiente de correlación *Pearson* reportando valores de *r*. La captura de información de las distintas variables y el análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico STATA versión 9.2, considerando un nivel de confianza del 95%, y un valor de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Tres diferentes concentraciones de la mezcla permetrina/aletrina (1/0.01, 5/0.07 y 10/0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 6 diferentes parámetros (IDN, MN, NPBs, NBUDs, células apoptóticas y necróticas) fueron evaluados en dos períodos de tiempo (24 y 36 h) para determinar el efecto genotóxico y citostático de la mezcla en linfocitos humanos de sangre periférica, figura 1.

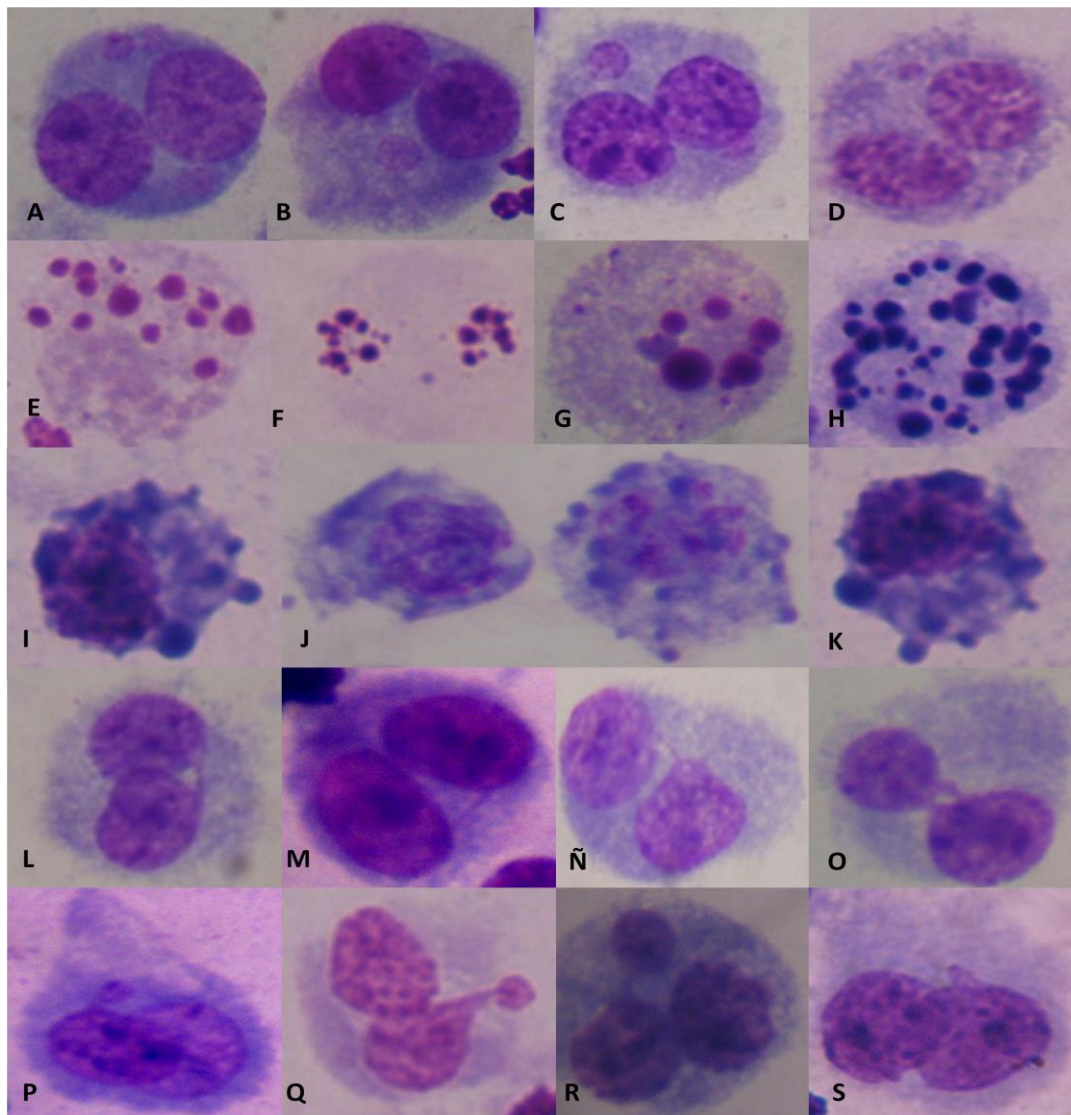


Figura 1. Parámetros evaluados con el ensayo de micronúcleos. Linfocitos humanos periféricos con micronúcleo (A-D), apoptóticos (E-H), necróticos (I-K), con NPBs (L-O) y con NBUDs (P-S) tratados con la mezcla de permetrina-aletrina por 24 h y 36 h. Células teñidas por la técnica de Whright y observada a un aumento de 100X.

Para garantizar que la mezcla de permetrina/aletrina no causara daño citotóxico agudo e interfiriera en la lectura de los parámetros a evaluar, se determinó la viabilidad celular en los cultivos mediante tinción simultánea con FDA/EtBr a las concentraciones de 50/0.69, 100/1.37 y 200/2.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la mezcla de permetrina/aletrina, respectivamente.

En el cuadro 1, se muestran los resultados de los ensayos de viabilidad celular realizados en los cultivos de linfocitos tratados con la mezcla permetrina/aletrina a diferentes concentraciones a las 24 h. El compuesto mostró ser citotóxico (viabilidad <80 %) a concentraciones de 200/2.79, 100/1.37 y 50/0.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la mezcla de permetrina/aletrina, respectivamente, en el tiempo de exposición de 24 h; por lo que se realizó una curva dosis respuesta con concentraciones más bajas de la mezcla permetrina/aletrina (35/0.48, 25/0.46, 15/0.21, 10/0.14, 5/0.07 y 1/0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las concentraciones elegidas fueron 10/0.14, 5/0.07 y 1/0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la mezcla permetrina/aletrina, que fueron tomadas como alta, media y baja exposición para la realización de las evaluaciones genotóxicas en los 5 individuos. Con respecto al tiempo de exposición, a las 48 h el estado morfológico de las células no fue el adecuado para realizar las lecturas, ya que se observaba un alto grado de daño celular con abundantes núcleos desnudos, células con escaso citoplasma y con un tamaño muy reducido en comparación con las células de los cultivos no tratados por lo que se disminuyó el tiempo de exposición y se eligió el tiempo de exposición de 36 h.

Para evaluar los parámetros de daño genotóxico (IDN, MN, NPBs, NBUDs, células apoptóticas y necróticas), los ensayos se realizaron por duplicado para cada condición de estudio y en dos momentos independientes por individuo (n=5). La citotoxicidad fue evaluada en cada ensayo realizado, y para cada condición.

Cuadro 1. Viabilidad celular de linfocitos de sangre periférica tratados con la mezcla permetrina-aletrina a diferentes tiempos de exposición.

Condición de estudio	% de viabilidad celular (n)			
	24 h	36 h	48 h	
Control negativo	98.5 (2)	---	---	
Control positivo As 1×10^{-6} M	92.75 (2)	91 (2)		
Exposición a la mezcla				
[] permetrina	[] aletrina			
200 µg/mL	2.79 µg/mL	16.1 (2)		
100 µg/mL	1.37 µg/mL	59.5 (2)		
50 µg/mL	0.69 µg/mL	61.5 (2)		
35 µg/mL	0.48 µg/mL	39.1 (2)		
25 µg/mL	0.46 µg/mL	43.3 (2)		
15 µg/mL	0.21 µg/mL	77.9 (2)	81.5 (2)	69 (1)
10 µg/mL	0.14 µg/mL	86.75 (2)	83.25 (2)	76 (2)
5 µg/mL	0.07 µg/mL	92 (2)	88.25 (2)	87 (2)
1 µg/mL	0.01 µg/mL	88.25 (2)	89.5 (2)	90.5 (2)

Los controles negativos no tuvieron ningún tratamiento, los controles positivos fueron tratados con 1×10^{-6} M de arsenito de sodio. [] = concentración ; n=número de experimentos realizados. Los resultados mostraron citotoxicidad a concentraciones mayores de 15/0.21 µg/mL de la mezcla permetrina/aletrina, por lo que los tiempos de 36 y 48 horas solo se probaron a concentraciones mas bajas.

La figura 2 muestra el análisis de correlación y la línea de tendencia entre los parámetros celulares evaluados a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición, observando que para algunos parámetros tuvieron un comportamiento dependiendo de la dosis y tiempo de exposición como se explica a continuación.

Con respecto a la frecuencia de MN los resultados mostraron que el tratamiento con la mezcla de permetrina/aletrina a las 24 h solo indujo la formación de micronúcleos, con los tratamientos de 5/0.07 µg/mL ($P < 0.05$), y 10/0.14 µg/mL ($P < 0.001$) observando un incremento promedio significativo con respecto al control de 6.15 y 10.35 MN, respectivamente.

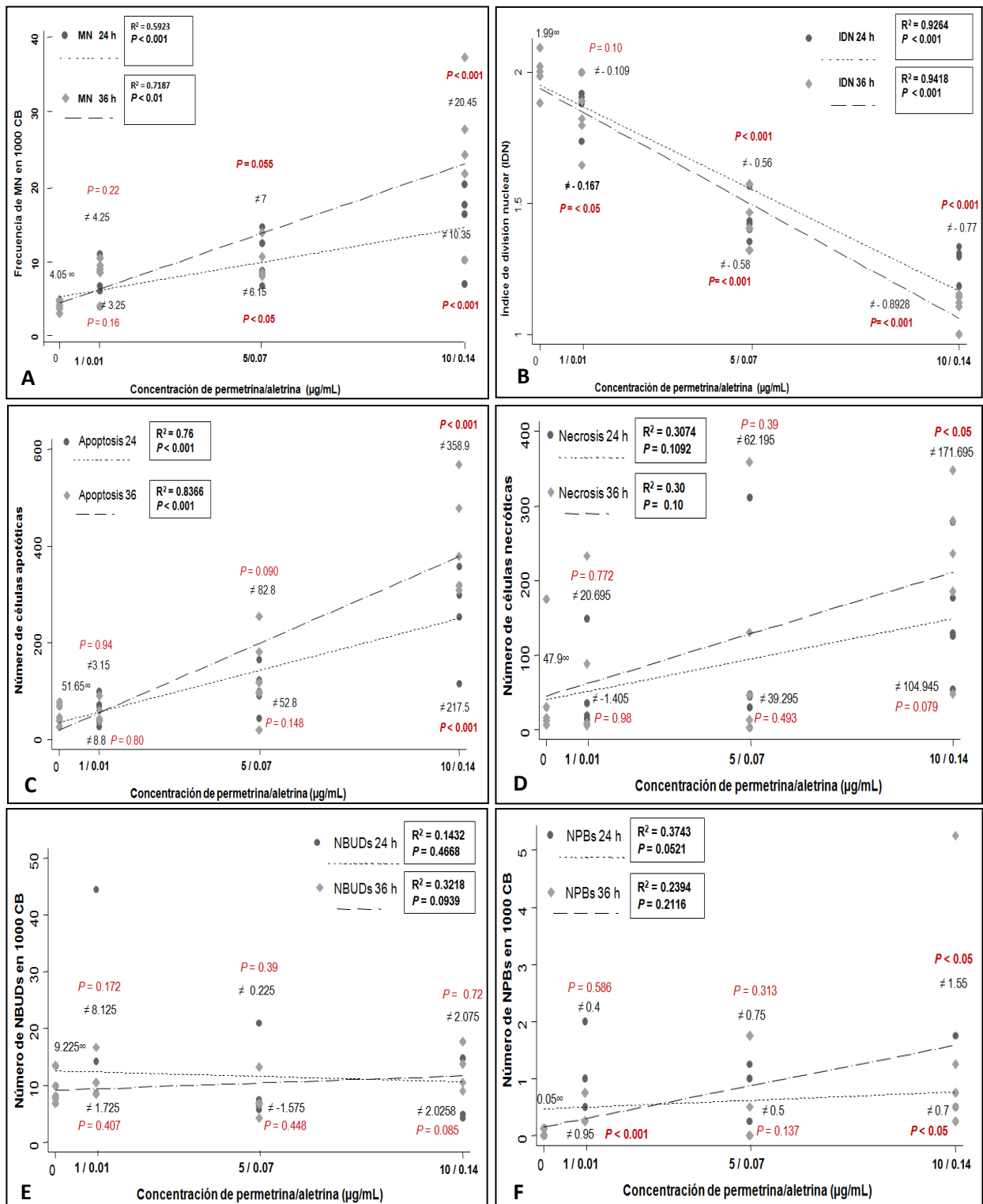


Figura 2. Efecto de la exposición a la mezcla permetrina/aletrina en linfocitos humanos periféricos sobre los parámetros de MN (A), IDN (B), apoptosis (C), necrosis (D), NBUDs (E) y NPBs (F) a las 24 y 36 h de exposición. ∞ , valor promedio; \neq , diferencia promedio con respecto al control; MN, micronúcleos; IDN, índice de división nuclear; NBUDs, gemaciones nucleares; NPBs, puentes nucleoplásmicos, CB, células binucleadas.

A las 36 h de tratamiento de igual manera solo se observó un incremento significativo de MN con respecto al control en los cultivos tratados con 5/0.07 $\mu\text{g/mL}$ y 10/0.14 $\mu\text{g/mL}$ de la mezcla; este incremento fue dependiente de la dosis y tiempo de exposición a las 24 h ($R^2=0.59$, $P<0.001$) y 36 h ($R^2=0.72$, $P<0.01$) (Figura 2A).

El IDN se comportó de manera inversamente proporcional a la concentración, es decir, a mayor concentración de la mezcla de permetrina/aletrina se observó una disminución significativa de forma gradual al IDN en las concentraciones media y alta (5/0.07 y 10/0.14 $\mu\text{g/mL}$) con respecto al control y en ambos tiempos de tratamiento 24 y 36 h, pero que se acentuó a las 36 h, en donde disminuyó hasta en un promedio de 0.89 unidades del IDN a la concentración de 10/0.14 $\mu\text{g/mL}$ de la mezcla; la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ en el tiempo de 24 h no produjo cambios significativos con respecto al control en la proliferación celular. La disminución del IDN en los periodos de tratamiento se comportó de forma dosis-dependiente (a las 24 h, $R^2=0.93$, $P<0.001$ y 36 h, $R^2=0.94$, $P<0.001$). Los controles tanto positivos como negativos siempre presentaron un IDN por arriba de los aceptados como de referencia (1.7), lo cual es indicativo de una buena proliferación celular *in vitro* (Figura 2B).

En lo que respecta a la relación entre la exposición al tóxico de prueba y las células apoptóticas se encontró que la mezcla de permetrina/aletrina su relación fue proporcional a la concentración y tiempo de exposición (a las 24 h, $R^2=0.76$, $P<0.001$ y 36 h, $R^2=0.84$, $P<0.001$) aunque solo se observó un incremento significativo de células apoptóticas en los cultivos tratados con 10/0.14 $\mu\text{g/mL}$ de permetrina/aletrina en ambos tiempos de exposición (Figura 2C).

La exposición a la mezcla de permetrina/aletrina no indujo un incremento significativo en las células necróticas ($P>0.05$ (0.1092), $P>0.05$ (0.10)); sin embargo, se observó un incremento significativo con respecto al control en los cultivos expuestos a la concentración más alta de la mezcla y a las 36 h (Figura 2D).

En lo que respecta a la frecuencia de los NBUDs o gemaciones nucleares no se observó ninguna tendencia significativa ni con la concentración ni con el tiempo de exposición (24 h, $R^2=0.1432$ $P=0.4868$; 36 h, $R^2=0.32$ $P=0.0939$) (Figura 2E).

Los NPBs no se vieron alterados significativamente con el tratamiento de la mezcla de prueba en la mayoría de las concentraciones y tiempos de exposición, excepto en los cultivos tratados con la concentración más alta de la mezcla en ambos tiempos (Figura 2F).

La Figura 3 muestra la distribución de las células binucleadas en base al número de MN (1, 2, 3 y >3) correlacionadas a la concentración de la mezcla de permetrina/aletrina observándose un resultado positivo con significancia estadística tanto para el caso de células binucleadas con un solo micronúcleo ($R^2=0.9216$, $P<0.01$), como para células binucleadas con dos micronúcleos, ($R^2=0.8693$, $P<0.05$) en el tiempo de 24 h de exposición, esto es que la exposición de linfocitos de sangre periférica a la mezcla produjo células micronucleadas con uno y dos micronúcleos al aumentarse la concentración de la mezcla de permetrina/aletrina (Figura 3A), comportamiento que también se observó a 36 h ($R^2=0.9785$, $R^2=0.8912$) (Figura 3B).

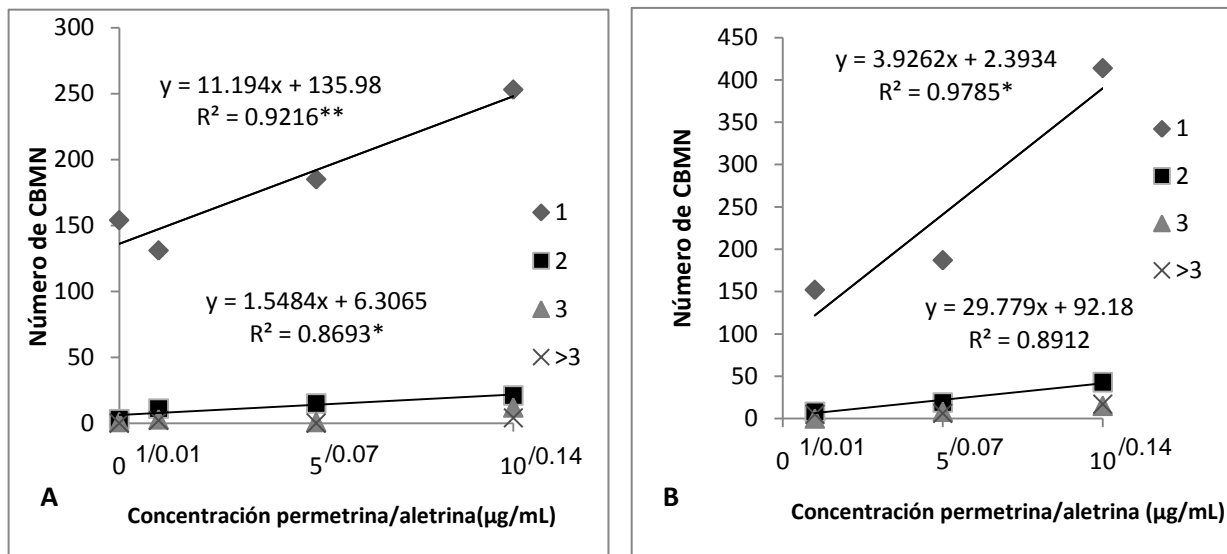


Figura 3. Las gráficas muestran las líneas de tendencia y los coeficientes de correlación (R^2) de la distribución de las células binucleadas con MN (CBMN) en respuesta al tratamiento con la mezcla de permetrina/aletrina a las 24 h (A) y 36 h (B) de exposición en linfocitos humanos periféricos. * $P<0.05$, ** $P<0.01$,

En el cuadro 2 se muestra la relación entre la frecuencia de micronúcleos y los demás biomarcadores evaluados, observándose una asociación significativa entre la frecuencia de micronúcleos y células necróticas ($r=0.519$), los NPBs ($r=0.626$), las

células apoptóticas ($r=0.702$), y una correlación negativa entre MN e IDN ($r=-0.643$), en el caso de los NBUDs se observó una correlación baja ($r=0.096$), sin significancia estadística.

Cuadro 2. Correlación entre la frecuencia de MN y los demás parámetros evaluados en el ensayo de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica tratados con la mezcla de permetrina/aletrina a las 24 y 36 h.

Biomarcador	Micronúcleos	
	<i>r</i>	<i>P</i>
Células apoptóticas	0.702	<0.001
NPBs	0.626	<0.001
Células necróticas	0.519	<0.001
NBUDs	0.096	0.329
IDN	-0.643	<0.001

NPBs, puentes intranucleoplásmicos; NBUDs, gemaciones nucleares; IDN, índice de división nuclear.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los piretroides permetrina/aletrina se encuentran combinados en un plaguicida utilizado anualmente a gran escala en los programas de salud pública, para el control de la sobrepoblación de vectores, en México. Sus componentes activos son rápidamente degradados en el ambiente natural por lo que se consideran seguros (Sudakin, 2006). Sin embargo, existe evidencia del potencial genotóxico *in vitro* de la permetrina en linfocitos humanos (Herrera *et al.*, 1992, Barrueco *et al.*, 1994, Tisch *et al.*, 2002, Undeger and Basaran, 2005, Gabbianelli *et al.*, 2009a) así como *in vivo* (Gabbianelli *et al.*, 2004), no así de la aletrina a la que se le atribuye la inducción de apoptosis y cambios en la expresión de 346 genes relacionados con este proceso (Liu *et al.*, 2006). En nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que muestra evidencia de la genotoxicidad y citotoxicidad en linfocitos humanos periféricos de la formulación comercial de la mezcla de estos dos piretroides a los que está expuesta la población.

En este trabajo se observó que la mezcla de permetrina/aletrina resultó ser más citotóxica que lo referido en la bibliografía en el mismo modelo de estudio, pero con exposiciones separadas, para permetrina a 200 µg/mL (Herrera *et al.*, 1992) y aletrina a 5 µg/mL (Liu *et al.*, 2006). La concentración de la permetrina que se utilizó en este estudio fue hasta de 10 µg/mL y de aletrina hasta de 0.14 µg/mL, disminuyendo 20 veces la concentración de permetrina y 35 veces la concentración de aletrina en comparación con los estudios anteriores para evitar un daño agudo y viabilidad $\geq 80\%$ que permitiera la lectura de MN, IDN, NPBs, NBUDs, células apoptóticas y necróticas. Ésta citotoxicidad incrementada podría ser debido a que ciertos plaguicidas como los piretroides son capaces de interactuar químicamente cuando son combinados en mezclas, principalmente debido al metabolismo de uno de los químicos que puede afectar el metabolismo del otro, generando un efecto adictivo o sinérgico e incluso antagónico en las mezclas (Belden and Lydy, 2000).

Los resultados del presente estudio revelaron que la mezcla de los piretroides incrementó la frecuencia de MN de forma significativa a concentración de 5/0.07 y 10/0.14 µg/mL de permetrina/aletrina en ambos tiempos de exposición (24 y 36 h), observándose un comportamiento dependiente de la concentración y tiempo de

exposición. Ello concuerda con los resultados reportados por Herrera *et al.*, (1992) en donde la exposición *in vitro* de linfocitos humanos a uno de los componentes activos de la mezcla, la permetrina, incrementó el intercambio de cromátidas hermanas y la frecuencia de MN. Así también, fue reportado un incremento en aberraciones cromosómicas en células de ovario de hámster (20-100 µg/mL) (Barrueco *et al.*, 1994), y en células de la mucosa nasal daño al ADN (0.5-1.0 mM), medido por ensayo cometa (Tisch *et al.*, 2002), de forma dosis dependiente; por otro lado, solo existe un estudio de genotoxicidad de la aletrina, el cual no reportó ningún efecto en ensayos de actividad genotóxica de promutágenos en *Drosophila melanogaster* (Osaba *et al.*, 1999).

La generación de daño al ADN, reflejado en la formación de MN en nuestro estudio, puede ser debido a que al menos uno de los compuestos de la mezcla (la permetrina) ha mostrado *in vivo* inducir estrés oxidativo (Abu-Qare and Abou-Donia, 2003), y daño en las membranas plasmáticas (Gabbianelli *et al.*, 2009b). Es bien conocido que las especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden causar rompimientos de las cadenas del ADN (Zegura *et al.*, 2004), iniciar peroxidación lipídica en las células, membrana nuclear y degradación de proteínas citosólicas (Olgun and Misra, 2006) y servir como precursores de cáncer al inducir genotoxicidad (Abdollahi *et al.*, 2004). No se conoce si la mezcla de permetrina/aletrina o sus metabolitos de ambos compuestos, son los responsables del potencial genotóxico. Sin embargo, se ha reportado que los átomos de clorina de la parte ácida de los piretroides como cipermetrina pueden llegar a interactuar directamente con el ADN, y esta interacción puede ser la responsable del efecto genotóxico, a través de la desestabilización de la estructura del ADN y desenrollamiento de su hélice, induciendo así el daño cromosomal (Saxena *et al.*, 2005). También la formación de MN podría estar relacionada con los procesos de hipermetilación de genes que están involucrados en los puntos de revisión del uso mitótico (APC, BUB1 y HCC4) lo que provoca la disminución en su expresión y un incremento en la posibilidad de malsegregación cromosómica (Fenech, 2006), así como con la activación de proteínas de señalización importantes, como el supresor de tumor p53 (Sablina *et al.*, 1998) y proteínas cuya actividad afecta la función de los microtúbulos como la GSK3,

exhibiendo un modo aneudogénico de acción (Mishima *et al.*, 2008). No se ha establecido el mecanismo de genotoxicidad de los piretroides, pero se sabe que cambios en la estructura y número de cromosomas, así como la inestabilidad genética son eventos primordiales en la etiología que conduce al cáncer (Saunders *et al.*, 2000, Gollin, 2005, Iarmarcovai *et al.*, 2008b).

El efecto genotóxico que provocan los plaguicidas se ha reportado en diferentes modelos experimentales (Moretti *et al.*, 2002), así como *in vivo* (Simoniello *et al.*, 2008), mostrando que las mezclas de plaguicidas provocan incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas, formación de aductos de ADN, alteración en vías metabólicas y daño en la integridad genética (Vais *et al.*, 2001, Gabbianelli *et al.*, 2002, Gabbianelli *et al.*, 2004). Otros estudios han demostrado que el daño al ADN es más severo con el producto comercial en comparación con la marca técnica (Costa *et al.*, 2009), puesto que se adicionan coadyuvantes como el butóxido de piperinilo, un inhibidor de la oxidación microsomal, potencial generador de especies reactivas del oxígeno y que se ha visto involucrado en los mecanismos de hepatocarcinogénesis en modelos murinos (Muguruma *et al.*, 2007). De hecho, los ingredientes inertes de marcas comerciales (otros ingredientes, adyuvantes o coformulantes) pueden tener actividad biológica propia, ya que son químicamente activos llevando a incrementar el nivel de exposición y toxicidad en humanos a diferentes niveles, por lo que la evaluación de un solo componente podría no ser lo adecuado para evaluar el riesgo en salud (Cox and Sorgan, 2006).

La mezcla de permetrina/aletrina disminuyó el IDN de forma dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. La disminución en el IDN ilustra el efecto citostático, este comportamiento concuerda con los reportados por (Hahnagy *et al.*, 1999) en cultivo de células V79 expuestas a permetrina (3.1-12.5 µg/mL) donde el índice mitótico disminuyó debido al incremento de metafases anormales, lo que puede provocar la detención del ciclo celular, debido probablemente a la reparación del ADN en la fase M1 (Sognier and Hittelman, 1986). En este sentido, se ha visto que algunos tóxicos causan inhibición de la síntesis del ADN en la fase S (Sudhakar *et al.*, 2001), o detención en G2, imposibilitando que la célula entre a mitosis (El-Ghamery *et al.*, 2000). Interesantemente nuestros resultados también están en

concordancia con lo observado con piretroides tipo II, como la ciflutrina (Ila *et al.*, 2008), la cipermetrina (Singh *et al.*, 2008) y con una formulación comercial de α -cipermetrina (Kocaman and Topaktas, 2009), los cuales poseen en su estructura el grupo α -ciano, que está asociado con una mayor toxicidad (Sudakin, 2006). La disminución del IDN refleja de manera indirecta el efecto citotóxico de la mezcla que puede estar relacionado con los grupos metilo que están en el anillo de ciclopropano de insecticidas tipo piretroides (Surralles *et al.*, 1995).

En este estudio, se encontró un incremento en el número de células apoptóticas, proporcional a la concentración y tiempo de exposición de la mezcla de permetrina/aletrina. Este resultado probablemente se debe a que el proceso de apoptosis es un mecanismo importante para la eliminación de linfocitos con ADN dañado (Dhawan *et al.*, 2003). Se ha establecido que en la toxicidad de piretroides la apoptosis juega un papel crucial, así como la alteración en la expresión de genes como p53, Bax y Bcl-2 (Wu and Liu, 2000a, Wu and Liu, 2000b). Estos resultados coinciden con los encontrados por Abou-Donia *et al.*, (2003) en donde reportaron un incremento en la apoptosis en células testiculares de ratas tratadas con una mezcla de permetrina/N,N-dietil-m-toluamida (DEET). Resultados similares pero en timocitos murinos expuestos a diferentes plaguicidas entre ellos la permetrina, encontraron un incremento dosis dependiente de células apoptóticas y necróticas, aumentando el efecto cuando se realizaron mezclas de los compuestos probados (Olgun *et al.*, 2004). El mecanismo no está bien esclarecido pero se sabe que el incremento en las especies reactivas del oxígeno y la disminución en las enzimas antioxidantes GSH-peroxidasa y reductasa (Kale *et al.*, 1999) juegan un papel importante en la activación de la apoptosis (Olgun and Misra, 2006). Un estudio realizado en cerebros murinos, revelaron que la combinación de permetrina/DEET incrementan de forma significativa la liberación del citocromo c cerebral, no así los compuestos individuales (Abu-Qare and Abou-Donia, 2001), siendo este otro mecanismo para la inducción de apoptosis.

En este estudio la necrosis se encontró relacionada a la concentración y tiempo de exposición solo en las células expuestas a la concentración más alta con respecto al control, lo que probablemente puede indicar que a esta concentración se

generaron condiciones patológicas, liberación del contenido tóxico de algunas enzimas celulares y daño irreversible a nivel de membrana (Kirch-Volders and Fenech, 2001) provocado por la mezcla permetrina/aletrina. Se ha encontrado que en la muerte celular por necrosis existe la participación de ROS, daño al ADN celular, así como disfunción mitocondrial, disminución de ATP y promoción de la actividad lactato deshidrogenasa (Lu *et al.*, 2010).

Los NBUDs representan un mecanismo por el cual las células eliminan ADN amplificado, y por tanto son considerados como un posible marcador de amplificación genética (Fenech, 2002); en este estudio no se encontró relación entre la frecuencia de los NBUDs y la exposición a la concentración y tiempo del exposición al tóxico, aun cuando existe evidencia que plaguicidas como el diclorodifeniltricloroetano incrementan la frecuencia de NBUDs, mostrando dicho parámetro como indicador sensible para la detección de daño primario al ADN (Gajski *et al.*, 2007).

Los NPBs ocurren cuando los cromosomas dicéntricos migran hacia polos opuestos de la célula durante la anafase, indicando errores en la reparación del ADN, rearrreglo cromosomal o fusión de los extremos de los telómeros (Fenech, 2006). El incremento de ellos se ha relacionado a la exposición con agentes que dañan el ADN (Fenech, 2002, Fenech and Crott, 2002). En este trabajo los puentes nucleoplásmicos se relacionaron marginalmente con la concentración de 10/0.14 µg/mL de la mezcla de permetrina/aletrina en ambos tiempos de exposición lo que nos indica probablemente que en estas condiciones la mezcla de permetrina/aletrina fue capaz de provocar rupturas de ADN de doble cadena. La presencia de ellos se ha observado en modelos *in vivo* de cáncer intestinal de roedores (Rudolph *et al.*, 2001). El tiempo de exposición de 24 h correlacionó de forma marginal con la concentración de la mezcla, ello puede ser debido a que las células tuvieron menos tiempo de reparar el daño en comparación con las que se expusieron a 36 h.

El análisis de correlación de *Pearson* entre los biomarcadores evaluados mostró una relación entre los MN y el resto de los parámetros medidos. Los resultados de la relación entre MN y apoptosis y MN-puentes nucleoplásmicos concuerdan con los encontrados por Fenech, (2006). Esto puede ser en respuesta al daño irreparable en el ADN. La relación entre MN y apoptosis ya se había observado

en otros estudios en donde se concluyó que podría ser, al menos en parte, debido a la eliminación específica de células aneuploides por esta vía (Decordier *et al.*, 2002).

El IDN tiene un comportamiento inversamente proporcional a la frecuencia de MN, ello podría ser debido a que al incrementar los MN existe un mayor grado de daño al ADN, lo que activa los mecanismos de reparación y que por consiguiente se propicia el paro de la proliferación celular (Hahnagy *et al.*, 1999).

Por otro lado en este estudio un donador presentó una menor frecuencia de MN cuando sus células fueron expuestas a la mezcla en comparación con la respuesta encontrada en los otros donadores, llegándose a ver el efecto sólo a la concentración más alta de permetrina/aletrina a las 36 h (datos no mostrados), lo que nos permite pensar que puede haber polimorfismos en los genes de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos (*EPHX*, *GSTT1* y *GSTM1*), genes reparadores del ADN (*XRCC1* y *XRCC3*), así como en genes metabolizadores del folato (*MTHFR*) que influyen en el incremento o disminución del efecto (Iarmarcovai *et al.*, 2008a); sin embargo, se necesitan hacer mas estudios que nos permitan evaluar estas vías. Las concentraciones utilizadas en este trabajo son de relevancia biológica por lo menos para la permetrina ya que estuvieron en el rango de 1 a 10 µg/mL, lo que está por abajo de la ingesta diaria permitida de 0.05 mg/kg de peso corporal (Lu, 1995).

Con estos resultados se demuestra el potencial genotóxico y citostático que tiene la formulación comercial de permetrina/aletrina en linfocitos humanos de sangre periférica, evaluado mediante el ensayo de micronúcleos. El incremento en el daño al ADN en linfocitos periféricos u otras células indica el potencial genotóxico que poseen plaguicidas de uso común, y enfatiza la necesidad y la importancia de medidas que protejan a la población, así como el establecimiento de leyes de seguridad para minimizar la exposición a ellos. Sin embargo, se necesitan realizar más estudios *in vitro* e *in vivo*, así como en poblaciones, como personal expuesto ocupacionalmente, donde se tome en cuenta el metabolismo del tóxico y fondo genético de cada individuo, para establecer el daño genotóxico de la mezcla de permetrina/aletrina. Así mismo es necesario realizar la evaluación genotóxica de los componentes de la mezcla por separado para identificar cual es el compuesto responsable del efecto.

REFERENCIAS

- abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S. & Rezaie, A. (2004) Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit*, 10, RA141-7.
- Abu-Qare, A. W. & Abou-Donia, M. B. (2001) Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 4, 313-32.
- Abu-Qare, A. W. & Abou-Donia, M. B. (2003) Combined exposure to DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) and permethrin: pharmacokinetics and toxicological effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 6, 41-53.
- Aeschbacher, M., Reinhardt, C. A. & Zbinden, G. (1986) A rapid cell membrane permeability test using fluorescent dyes and flow cytometry. *Cell Biol Toxicol*, 2, 247-55.
- Ahn, K. C., Ma, S. J., Tsai, H. J., Gee, S. J. & Hammock, B. D. (2006) An immunoassay for a urinary metabolite as a biomarker of human exposure to the pyrethroid insecticide permethrin. *Anal Bioanal Chem*, 384, 713-22.
- Alavanja, M. C. R., Samanic, C., M, D., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C. F., Knott, C., Thomas, K., Hoppin, J. A., Barker, J., Coble, J., Sandler, D. P. & Blair, A. (2002) Use of Agricultural Pesticides and Prostate Cancer Risk in the Agricultural Health Study Cohort. *Am J Epidemiol* 2003, 157, 800-14.
- Barrueco, C., Herrera, A., Caballo, C. & De La Pena, E. (1994) Induction of structural chromosome aberrations in human lymphocyte cultures and CHO cells by permethrin. *Teratog Carcinog Mutagen*, 14, 31-8.
- Belden, J. & Lydy, M. (2000) Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. *Environ Toxicol Chem* 19, 2266-2274.
- Bhalli, J. A., Khan, Q. M., Haq, M. A., Khalid, A. M. & Nasim, A. (2006) Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. *Mutagenesis*, 21, 143-8.
- Bolognesi, C. (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res*, 543, 251-72.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M. R., Zijno, A., Norppa, H. & Fenech, M. (2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28, 625-31.
- Casida, J. E. (1980) Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ Health Perspect*, 34, 189-202.
- Coats, J. R. (1990) Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environ Health Perspect*, 87, 255-62.
- Costa, C., Silvani, V., Melchini, A., Catania, S., Heffron, J. J., Trovato, A. & De Pasquale, R. (2009) Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat Res*, 672, 40-44.
- Costa, C., Teixeira, J. P., Silva, S., Roma-Torres, J., Coelho, P., Gaspar, J., Alves, M., Laffon, B., Rueff, J. & Mayan, O. (2006) Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis*, 21, 343-50.
- Cox, C. & Sorgan, M. (2006) Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ Health Perspect*, 114, 1803-6.

- Crespo-Lopez, M. E., Lima De Sa, A., Herculano, A. M., Rodriguez Burbano, R. & Martins Do Nascimento, J. L. (2007) Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system. *Environ Int*, 33, 141-6.
- Decordier, I., Dillen, L., Cundari, E. & Kirsch-Volders, M. (2002) Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis*, 17, 337-44.
- Dhawan, A., Kayani, M. A., Parry, J. M., Parry, E. & Anderson, D. (2003) Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 18, 487-90.
- El-Ghamery, A., El-Nahas, A. & Mansour, M. (2000) The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia*, 65, 277-287.
- EPA, U. S. (1997) Office of Pesticide Programs Tracking Report.
- Fenech, M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.*, 285 35-44.
- Fenech, M. (2002) Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 181-182, 411-6.
- Fenech, M. (2003) Genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). *Forum Nutr*, 56, 97-100.
- Fenech, M. (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res*, 600, 58-66.
- Fenech, M. & Crott, J. W. (2002) Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res*, 504, 131-6.
- Gabbianelli, R., Falcioni, G., Nasuti, C. & Cantalamessa, F. (2002) Cypermethrin-induced plasma membrane perturbation on erythrocytes from rats: reduction of fluidity in the hydrophobic core and in glutathione peroxidase activity. *Toxicology*, 175, 91-101.
- Gabbianelli, R., Falcioni, M. L., Cantalamessa, F. & Nasuti, C. (2009a) Permethrin induces lymphocyte DNA lesions at both Endo III and Fpg sites and changes in monocyte respiratory burst in rats. *J Appl Toxicol*, 29, 317-22.
- Gabbianelli, R., Falcioni, M. L., Nasuti, C., Cantalamessa, F., Imada, I. & Inoue, M. (2009b) Effect of permethrin insecticide on rat polymorphonuclear neutrophils. *Chem Biol Interact*, 182, 245-52.
- Gabbianelli, R., Nasuti, C., Falcioni, G. & Cantalamessa, F. (2004) Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrethroids: effect of supplementation with Vitamins E and C. *Toxicology*, 203, 17-26.
- Gajski, G., Ravlic, S., Capuder, Z. & Garaj-Vrhovac, V. (2007) Use of sensitive methods for detection of DNA damage on human lymphocytes exposed to p,p'-DDT: Comet assay and new criteria for scoring micronucleus test. *J Environ Sci Health B*, 42, 607-13.
- Gollin, S. M. (2005) Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin Cancer Biol*, 15, 33-42.
- Hadnagy, W., Seemayer, N. H., Kuhn, K. H., Leng, G. & Idel, H. (1999) Induction of mitotic cell division disturbances and mitotic arrest by pyrethroids in V79 cell cultures. *Toxicol Lett*, 107, 81-7.
- Herrera, A., Barrueco, C., Caballo, C. & De La Pena, E. (1992) Effect of permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 20, 218-22.
- IARC (2003) Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*.

- Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R. A. & Orsiere, T. (2008a) Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res*, 658, 215-33.
- Iarmarcovai, G., Ceppi, M., Botta, A., Orsiere, T. & Bonassi, S. (2008b) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. *Mutat Res*, 659, 274-83.
- Ila, H. B., Topaktas, M., Rencuzogullari, E., Kayraldiz, A., Donbak, L. & Daglioglu, Y. K. (2008) Genotoxic potential of cyfluthrin. *Mutat Res*, 656, 49-54.
- Ji, B. T., Silverman, D. T., Stewart, P. A., Blair, A., Swanson, G. M., Baris, D., Greenberg, R. S., Hayes, R. B., Brown, L. M., Lillemoe, K. D., Schoenberg, J. B., Potters, L. M., Schwartz, A. G. & Hoover, R. N. (2001) Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *Am J Ind Med*, 39, 92-9.
- Kale, M., Rathore, N., John, S. & Bhatnagar, D. (1999) Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol Lett*, 105, 197-205.
- Kirch-Volders, M. & Fenech, M. (2001) Inclusion of micronuclei in nondivided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, 16, 51-58.
- Kocaman, A. Y. & Topaktas, M. (2009) The in vitro genotoxic effects of a commercial formulation of alpha-cypermethrin in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 50, 27-36.
- Kolaczinski, J. H. & Curtis, C. F. (2004) Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. *Food Chem Toxicol*, 42, 697-706.
- Leng, G., Kuhn, K. H., Wieseler, B. & Idel, H. (1999) Metabolism of (S)-bioallethrin and related compounds in humans. *Toxicol Lett*, 107, 109-21.
- Liu, Y., Liang, L. Y., Ma, W. L. & Zheng, W. L. (2006) [Effect of S-bioallethrin on human lymphocyte]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 26, 321-4, 327.
- Lu, C. C., Yang, J. S., Huang, A. C., Hsia, T. C., Chou, S. T., Kuo, C. L., Lu, H. F., Lee, T. H., Wood, W. G. & Chung, J. G. (2010) Chrysophanol induces necrosis through the production of ROS and alteration of ATP levels in J5 human liver cancer cells. *Mol Nutr Food Res*.
- Lu, F. C. (1995) A review of the acceptable daily intakes of pesticides assessed by WHO. *Regul Toxicol Pharmacol*, 21, 352-64.
- Meinert, R., Schuz, J., Kaletsch, U., Kaatsch, P. & Michaelis, J. (2000) Leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register-based case-control study in Germany. *Am J Epidemiol*, 151, 639-46; discussion 647-50.
- Mishima, M., Tanaka, K., Takeiri, A., Harada, A., Kubo, C., Sone, S., Nishimura, Y., Tachibana, Y. & Okazaki, M. (2008) Two structurally distinct inhibitors of glycogen synthase kinase 3 induced centromere positive micronuclei in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res*, 643, 29-35.
- Moretti, M., Marcarelli, M., Villarini, M., Fatigoni, C., Scassellati-Sforzolini, G. & Pasquini, R. (2002) In vitro testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: cytogenetic and primary DNA damage. *Toxicol In Vitro* 16, 81-88.
- Motomura H, N. T. (2000) Temperature dependence of pyrethroid modification of single sodium channels in rat hippocampal neurons. *J Membrane Biol* 177, 23-39.
- Muguruma, M., Unami, A., Kanki, M., Kuroiwa, Y., Nishimura, J., Dewa, Y., Umemura, T., Oishi, Y. & Mitsumori, K. (2007) Possible involvement of oxidative stress in piperonyl butoxide induced hepatocarcinogenesis in rats. *Toxicology*, 236, 61-75.

- Olgun, S., Gogal, R. M., Jr., Adeshina, F., Choudhury, H. & Misra, H. P. (2004) Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. *Toxicology*, 196, 181-95.
- Olgun, S. & Misra, H. P. (2006) Pesticides induced oxidative stress in thymocytes. *Mol Cell Biochem*, 290, 137-44.
- Osaba, L., Aguirre, A., Alonso, A. & Graf, U. (1999) Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the Drosophila wing spot test. *Mutat Res*, 439, 49-61.
- Pacheco Ade, O. & Hackel, C. (2002) [Chromosome instability induced by agrochemicals among farm workers in Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil]. *Cad Saude Publica*, 18, 1675-83.
- Paz-Y-Mino, C., Bustamante, G., Sanchez, M. E. & Leone, P. E. (2002) Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environ Health Perspect*, 110, 1077-80.
- Ross, M. K., Borazjani, A., Edwards, C. C. & Potter, P. M. (2006) Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochem Pharmacol*, 71, 657-69.
- Rudolph, K. L., Millard, M., Bosenberg, M. W. & Depinho, R. A. (2001) Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet*, 28, 155-9.
- Sablina, A. A., Ilyinskaya, G. V., Rubtsova, S. N., Agapova, L. S., Chumakov, P. M. & Kopnin, B. P. (1998) Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation. *J Cell Sci*, 111 (Pt 7), 977-84.
- Saunders, W. S., Shuster, M., Huang, X., Gharaibeh, B., Enyenihi, A. H., Petersen, I. & Gollin, S. M. (2000) Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 303-8.
- Saxena, P. N., Chauhan, L. K. & Gupta, S. K. (2005) Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology*, 216, 244-52.
- Scollon, E. S., Starr, J. M., Godin, S. J., Devito, M. J. & Hughes, M. F. (2008) In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab Dispos*.
- Simoniello, M. F., Kleinsorge, E. C., Scagnetti, J. A., Grigolato, R. A., Poletta, G. L. & Carballo, M. A. (2008) DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *J Appl Toxicol*, 28, 957-65.
- Singh, P., Srivastava, A. K. & Singh, A. K. (2008) Cell cycle stage specific application of cypermethrin and carbendazim to assess the genotoxicity in somatic cells of *Hordeum vulgare* L. *Bull Environ Contam Toxicol*, 81, 258-61.
- Soderlund, D., Clark, J., Sheets, L., Mullin, L., Piccirillo, V., Sargent, D., Stevens, J. & Weiner, M. (2002) Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171, 3-59.
- Sognier, M. A. & Hittelman, W. N. (1986) Mitomycin-induced chromatid breaks in HeLa cells: a consequence of incomplete DNA replication. *Cancer Res*, 46, 4032-4040.
- Srivastava, A., Srivastava, M. K. & Raizada, R. B. (2006) Ninety-day toxicity and one-generation reproduction study in rats exposed to allethrin-based liquid mosquito repellent. *J Toxicol Sci*, 31, 1-7.
- SSA (2006) Manual para la Vigilancia, Diagnóstico, Prevención y Control del Dengue. 89-103.
- Sudakin, D. L. (2006) Pyrethroid insecticides: advances and challenges in biomonitoring. *Clin Toxicol (Phila)*, 44, 31-7.
- Sudhakar, R., Ninge Gowda, K. & Venu, G. (2001) Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. *Cytologia* 66, 235-239.

- Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. & Marcos, R. (1995) Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*, 341, 169-84.
- Tisch, M., Schmezer, P., Faulde, M., Groh, A. & Maier, H. (2002) Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 259, 150-3.
- Undeger, U. & Basaran, N. (2005) Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch Toxicol*, 79, 169-76.
- Vais, H., Williamson, M. S., Devonshire, A. L. & Usherwood, P. N. (2001) The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest Manag Sci*, 57, 877-88.
- WHO (2005) WHO specification and evaluations for public health pesticides. Bifenthrin.
- WHO, W. H. O. (1990) Permethrin. Environmental Health Criteria 94. Geneva, Switzerland: World Health Organization, United Environment Programme, and International Labor Organization.
- Wu, A. & Liu, Y. (2000a) Apoptotic cell death in rat brain following deltamethrin treatment. *Neurosci Lett*, 279, 85-8.
- Wu, A. & Liu, Y. (2000b) Deltamethrin induces delayed apoptosis and altered expression of p53 and bax in rat brain. *Environ Toxicol Pharmacol*, 8, 183-189.
- Zaim, M. J., P. (2007) Global insecticide use for vector-borne disease control. (WHOPES).
- Zegura, B., Lah, T. T. & Filipic, M. (2004) The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology*, 200, 59-68.