

**CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LA MEZCLA DE PLAGUICIDAS
LORSBAN Y DITHANE UTILIZADOS EN EL CULTIVO DE PAPA EN LA
PROVINCIA DE PAMPLONA.**

KENDRY VANESSA TEQUIA DIAZ

1046427501

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
PAMPLONA, COLOMBIA**

2017

**CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LA MEZCLA DE PLAGUICIDAS
LORSBAN Y DITHANE UTILIZADOS EN EL CULTIVO DE PAPA EN LA
PROVINCIA DE PAMPLONA.**

KENDRY VANESSA TEQUIA DIAZ

1.046.427.501

Directora:

MsC MERCEDES PEÑALOZA SILVA

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
PAMPLONA, COLOMBIA**

2017

TITULO

**CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LA MEZCLA DE PLAGUICIDAS
LORSBAN Y DITHANE UTILIZADOS EN EL CULTIVO DE PAPA EN LA
PROVINCIA DE PAMPLONA.**

DEDICATORIA

A la persona más importante en mi vida que me apoyo y siempre ha estado conmigo en los buenos y malos momentos, a la que le debo en gran parte lo que soy, mi madre EUCLIDES DIAZ.

A mi padre JORGE TEQUIA que aunque fuese desde la distancia siempre me apoyo.

A mis hermanos JUNIOR, BERNARDO, TATIANA, DAYANI, ELENA por ser mi apoyo incondicional durante este proceso.

A mi hija DANNA SOFIA ARDILA que es mi motor, la que cada vez que me levanto me da las fuerzas para seguir adelante y no desfallecer nunca.

A mis sobrinas VALERIA Y VALENTINA que son uno de los regalos más grande que me pudo dar la vida.

A Dios por permitirme hacer parte de esta gran familia.

AGRADECIMIENTOS

De la manera más profunda y sincera quiero agradecer,

A mi familia, quienes me dieron el impulso y la motivación para lograr cumplir con mi objetivo de ser profesional de la Biología.

A mi tutora, Mercedes Peñaloza Silva, por todo lo que me enseñó, por su comprensión, paciencia, por su dedicación a este trabajo del cual me siento satisfecha y orgullosa, gracias por ser ese apoyo en los momentos difíciles ya que más que mi tutora fue mi amiga.

A los docentes Luis Roberto Sánchez, Emoelio Mantilla, Fredy Solano, por asesorías y apoyo logístico brindados en la ejecución de este trabajo.

A los auxiliares de laboratorio en la Unidad de Genética y Biología Molecular de la Universidad de Pamplona.

A los auxiliares de laboratorio en la Unidad de Biología de la Universidad de Pamplona

A los apreciados señores campesinos de las veredas Monteadentro, Chíchira y el Rosal por permitirme tomar las muestras.

A todos mis amigos, Danny, Livis, Yesid, Karen, Maria, Geivis, Narlis, por su valiosa amistad y apoyo durante estos 6 años.

A Jehová Dios por haber puesto en mí camino a las personas indicadas que me apoyaron durante este proceso de manera desinteresada e incondicional, que siempre me dieron ánimos para levantarme cada vez que sentí desfallecer, demostrándome que no hay imposibles y que todo lo que uno se proponga se logra con empeño y dedicación.

CONTENIDO

	Pág
RESUMEN	10
Palabras claves	11
1. Introducción	11
2. Marco de Referencia	15
2.1 Generalidades de la papa (<i>solanum tuberosum</i>)	15
2.2 Pesticidas y su clasificación.....	17
2.3 Pruebas o técnicas empleadas en el estudio de toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad.	23
2.3.1 Prueba de micronúcleos	24
2.3.2 Test de <i>Allium cepa</i>	27
2.3.3 Índice mitótico	31
3. Objetivos	32
3.1 General	32
3.2 Específicos	32
4. Materiales y Métodos	32
4.1 Área de estudio	32
4.2 Químicos	33
4.3 Cultivos celulares y tratamiento con los pesticidas	34
4.4 Tamaño y procedencia de los bulbos	34
4.5 Preparación de los bulbos	34

4.6	Condiciones del cultivo celular	34
4.7	Preparación de soluciones	35
4.8	Controles	35
4.9	Toxicidad	35
4.10	Citotoxicidad y Genotoxicidad	36
4.10.1	Fijación y coloración de las muestras	36
4.10.2	Evaluación de las muestras <i>in vitro</i>	37
4.11	Evaluación genotóxica por exposición laboral	37
4.11.1	Tomas de las muestras	38
4.11.2	Tratamiento y evaluación de las muestras	39
5.	Análisis estadístico	40
6.	Resultados	41
7.	Discusión	53
8.	Conclusiones	62
9.	Recomendaciones	64
10.	Bibliografía	65
	Anexos	86

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Área de estudio, Veredas Chíchira, Monteadentro y el Rosal.	33
Figura 2. Encuestas y toma de muestras.	39
Figura 3. Tinción de muestras	40
Figura 4. Curva dosis respuesta de la longitud (cm) de crecimiento de la raíz de <i>Allium cepa</i>	41
Figura 5. Número de anomalías en diferentes tiempos y concentración	43
Figura 6. Anomalías observadas en 40X	44
Figura 7. Número de micronúcleos en diferentes tiempos y concentración.....	47
Figura 8. Micronúcleos observados en 40X	50
Figura 9. Número de micronúcleos por tiempo de exposición en cultivadores de papa expuestos a los plaguicidas. **	51
Figura 10. Micronúcleos por exposición laboral	52

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla N_o 1. Longitud promedio del crecimiento de las raíces de <i>Allium cepa</i>	41
Tabla N_o 2. Índice mitótico y promedios de anormalidades	46
Tabla N_o 3: Promedios de micronúcleos observados en las diferentes concentraciones y tiempos de exposición	49
Tabla N_o 4: Promedios de micronúcleos por exposición laboral	52

RESUMEN

Los efectos citogenéticos de numerosos químicos potencialmente mutagénicos han sido estudiados porque pueden causar daño en el DNA. Varios test han sido usados para evaluar los efectos tóxicos, citotóxicos y genotóxicos de agroquímicos utilizados para eliminar gran cantidad de organismos que dañan la producción de las cosechas. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial genotóxico de la mezcla de dos agroquímicos, Dithane y Lorsban utilizados por los agricultores en el cultivo de papa de la provincia de Pamplona Norte de Santander, utilizando *Allium cepa*; la toxicidad se determinó midiendo el crecimiento de la raíz, la citotoxicidad induciendo alteraciones cromosómicas y evaluando el IM. Células en interfase del meristemo de la raíz fueron examinadas para evaluar la genotoxicidad de la mezcla de los químicos haciendo un conteo del índice de MN. Igualmente se determinó el riesgo genotóxico por exposición laboral de los agricultores, en células exfoliadas de la mucosa bucal para establecer la presencia de MN, en tres veredas del municipio. Todos los índices evaluados *in vitro* se hicieron a diferentes concentraciones (20, 40, 60 y 80%) y tiempo de exposición (12, 24, 48 y 72 horas).

Nuestros resultados revelan el efecto tóxico de los químicos por separado, siendo Lorsban y la mezcla más tóxicos en todos los tiempos y concentraciones después de 15 días de exposición de las raíces *Allium cepa* con un $p=0,000$. La presencia de diferentes alteraciones nucleares para evaluar citotoxicidad muestran la gran cantidad de anormalidades en la mezcla de los químicos a la concentración del 80% y 72 horas de exposición con un promedio de $26,25 \pm 4,79$ y un $p=0,020$. El IM muy alto observado en la mezcla a la más alta concentración puede indicar que

el crecimiento y el desarrollo de los meristemas es afectado por la sinergia probable de los insecticidas con un ($p=0,000$), cuando es comparado con el control negativo.

En este estudio también se evaluó la genotoxicidad determinado por el índice de MN de los insecticidas donde se observan las diferencias significativas al compararlos entre Lorsban y control negativo ($p=0,009$, $p<0,05$), Mezcla y control negativo ($p=0,010$, $p<0,05$).

El estudio comparado de 15 trabajadores agrícolas en tres comunidades rurales con 5 individuos no expuestos, muestra el daño en el DNA cuando la frecuencia de MN se incrementa. Hay estudios que factores como el estilo de vida, tiempo de exposición edad, consumo de alcohol afectan la genotoxicidad por exposición laboral. En todos los individuos estudiados los p-valores ($P=0,000$; $P<0,05$), fueron altamente significativos cuando se comparan con el control negativo.

Los ensayos realizados en la presente tesis aportaron información sobre la severidad de daño celular y molecular por la mezcla de los pesticidas, además de establecer el posible riesgo de la salud humana asociado con la exposición. Existe dificultad para la identificación de los efectos individuales de los plaguicidas, ya que frecuentemente se utilizan mezclas complejas.

Palabras claves: Toxicidad, Citotoxicidad, Genotoxicidad, Exposición Laboral, Pesticidas, MN, mezcla, Dithane, Lorsban, IM.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de agroquímicos es la estrategia más común para la fertilización de suelos, control de malezas, artrópodos herbívoros, y enfermedades de los cultivos, pero también constituye un

factor importante que afecta a los recursos naturales, así como la salud de los trabajadores rurales y los consumidores potenciales (Lopez et al., 2012). Se estima que aproximadamente 1,8 millones de personas en todo el mundo se dedican a la agricultura y la mayoría utilizan pesticidas para proteger los alimentos y productos comerciales que producen (ML Larramendy & N Nikoloff, 2014). Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2003) envenenamientos involuntarios matan a 355.000 personas en el mundo cada año. En los países en desarrollo, donde se producen las dos terceras partes de estas muertes, estas intoxicaciones se asocian fuertemente con la exposición excesiva. A pesar de los muchos beneficios de la utilización de plaguicidas en los cultivos de campo y al del estilo de vida, los pesticidas también pueden ser peligrosos si no se utilizan de manera adecuada y muchos de ellos pueden representar riesgos potenciales, lo que puede dar lugar a graves problemas de salud para los humanos (ML Larramendy & N Nikoloff, 2014). Una de las causas por las que se incrementa el uso de plaguicidas está dado por la aplicación continua de las mismas formulaciones, que llevan a la aparición de resistencias en los organismos que se pretenden controlar (Coalova, Mencacci & Fassiano, 2013).

Dada la ausencia de un plan estratégico que contemple estos eventos, los productores suelen incrementar tanto la cantidad de aplicaciones como las dosis y el mal uso; ya sea durante su formulación, producción o utilización, que puede tener efectos adversos en la salud y el medio ambiente. Estos efectos no siempre están relacionados con lesiones inmediatas y aparentes, sino que pueden tardar incluso años en manifestarse. El material genético puede sufrir diversos daños, como consecuencia de las condiciones ambientales perjudiciales y pueden llevar a mutaciones puntuales y cromosómicas, llevando a una transformación celular. Si tales alteraciones ocurren en protooncogenes o genes supresores de tumores, los cuales están involucrados en el crecimiento y diferenciación celular, pueden ocasionar el desarrollo de

cáncer en cualquier órgano, al envejecimiento prematuro o producir enfermedades vasculares, autoinmunes o degenerativas (Ascarrunz, Tirado, Gonzáles, Cuti, & Huici, 2006). Otros efectos observados incluyen citotoxicidad y genotoxicidad, alteraciones endocrinas de los receptores de andrógenos y estrógenos y el daño del ADN en líneas celulares (Benachour & Séralini, 2009).

La exposición de las poblaciones a plaguicidas, se presenta en forma de mezclas complejas afectadas por distintos factores ambientales, siendo poco factible calcular el grado y la calidad de la exposición (Coalova, Mencacci, & Fassiano, 2013). Por lo tanto, el hombre se encuentra expuesto a mezclas de distintos pesticidas en su lugar de residencia (a través de los alimentos) y en las zonas rurales, por exposición laboral. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas (Organización World Health, 2012). Los pesticidas pueden entrar al cuerpo por absorción dérmica, inhalación o absorción oral. Después de que una sustancia química entra en contacto con el cuerpo, se inicia un proceso de toxicocinética, que incluye cuatro pasos complejos de absorción, distribución, metabolismo y excreción. Las mediciones de biomarcadores específicos después de la etapa de absorción, o durante cada etapa subsiguiente del proceso, son utilizadas para evaluar la exposición mediante la estimación de la dosis interna, que se define como la cantidad de producto químico absorbido por el cuerpo después de haberse producido una exposición. Los trabajadores agrícolas están expuestos principalmente a través de la piel, ya sea por el manejo de pesticidas, rociar los campos tratados, durante la mezcla, la carga de pesticida o al limpiar el equipo y desechar los contenedores vacíos. Otras actividades relacionadas con la exposición, son la siembra de semillas preservadas con plaguicidas, el deshierbe y cosecha de cultivos previamente rociados (Kapka, Cyranka, Skrzypczak, & Kruszewski, 2011). Pero sin duda la combinación con frecuencia de uno o más productos y la

aplicación al mismo tiempo de estas mezclas para ahorrar tiempo, trabajo, combustible y maquinaria crean una reacción química que no puede observarse a simple vista lo que puede resultar no solo en la pérdida de efectividad contra la plaga que se desea controlar sino también en un incremento muchísimo mayor de la toxicidad hacia el aplicador (Raimondo, 2007), de hecho se ha demostrado que en muchos casos la mezcla de dos plaguicidas del mismo o distinto grupo provoca mayor efecto al que resulta de la suma de las acciones individuales de cada uno de ellos por separado. Estudios realizados reportan que las mezclas son más tóxicas para el humano que la exposición a un solo plaguicida. El efecto genotóxico de mezclas de plaguicidas usualmente utilizadas en el campo fue evaluado en huevos de caimán (*Caiman latirostris*). Los resultados mostraron que la mezcla de formulaciones de glifosato (Roundup), endosulfán (Galgofan) y cipermetrina (Atanor) presentaron mayores índices de genotoxicidad (frecuencia de MN, daño al ADN observado mediante EC y malformaciones), acompañados de alteraciones metabólicas, cuando se comparó con la aplicación sola de la formulación de Roundup (Poletta et al., 2011). Otros Estudios realizados en eritrocitos policromatófilos de médula ósea de ratón, tratados con un insecticida (imidacloprid) y un fungicida (metalaxil), habitualmente aplicados en conjunto, revelaron un aumento de la frecuencia de MN al administrar los pesticidas por separado y un efecto sinérgico de los pesticidas administrados en conjunto (Demsia, et al., 2007). Por estas y otras razones las recomendaciones para el uso de plaguicidas están dadas para que estos productos sean utilizados por separado. Sin embargo, en la práctica el agricultor se encuentra con situaciones que lo obligan a tomar medidas para manejar varios problemas en forma simultánea: dos o más enfermedades, enfermedades y plagas, los dos casos anteriores y deficiencias de nutrientes en el cultivo, entre otros casos. Por esta razón en un mismo tanque de aplicación se mezclan varios pesticidas con distintos principios activos, aditivos y para distintos

organismos blanco, cuando las formulaciones están diseñadas para ser usadas individualmente disueltas en agua. En estas mezclas se desestiman las posibles interacciones no sólo entre los principios activos, sino también entre los aditivos de las distintas formulaciones. En general, un análisis comparativo de los resultados reveló, que el daño inducido por las formulaciones comerciales de los plaguicidas es, en general, y sin importar el tipo del ingrediente activo, mayor que la producida por los compuestos puros por ellos mismos (ML Larramendy & N Nikoloff, 2014).

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Generalidades de la papa (*Solanum tuberosum*)

La papa *Solanum tuberosum* ($2n = 4x = 48$), pertenece a la familia de las *Solanaceae*. Las primeras papas cultivadas probablemente fueron seleccionadas entre 6.000 y 10.000 años atrás, al norte del lago Titicaca, en los Andes del sur de Perú. Allí, a partir de las especies silvestres *Solanum bukasovii*, *S. canasense* y *S. multisectum*, pertenecientes al complejo *S. brevicaulae*, se cree que se originó *S. stenotomum*, que es considerada la primera papa domesticada. Esta, a su vez, habría dado origen a *S. andigena* a través de repetidos procesos de poliploidización sexual en diferentes zonas de cultivo, con la hibridación interespecífica e intervarietal que permitió ampliar la diversidad y adaptabilidad genética de la papa de los Andes. Los cultivares chilenos se derivaron posteriormente por hibridación de poblaciones andinas cultivadas con la especie silvestre *S. tarijense*. En el siglo XVI la papa migró a Europa y se dispersó por todo el mundo. Actualmente las papas cultivadas que se siembran en el mundo son conocidas colectivamente bajo el nombre de *S. tuberosum*. (Rodríguez, 2010). Esta especie se cultiva y se encuentra

primordialmente en zonas de climas templados, aunque también son tolerantes a climas más calientes pero frescos; el intervalo altitudinal de esta especie va de los 1300 a 3300 msnm, aunque pueden adaptarse a menor y mayor altitud dependiendo de la variedad y germina entre 15 y 20° C. Las plantas de esta especie parecen no ser tan estrictas a las condiciones medioambientales, ya que son tolerantes a bajas temperaturas, aunque no a las heladas constantes. La luz tiene una incidencia directa, los fotoperíodos cortos son más favorables a la tuberización y los largos inducen el crecimiento (CONABIO, 2002).

En Colombia las variedades de papa más cultivadas son: tuquerreña o sabanera, parda pastusa, pastusa suprema, rubí, salentina, carriza, diacol capiro-r12, ICA única, ICA nevada, ICA Nariño, milenio-1, diacol Monserrate y yema de huevo (DANE, 2013). Su importancia alimenticia radica en que el tubérculo posee un gran contenido de micronutrientes, vitaminas y minerales esenciales para la salud. Una papa de tamaño medio contiene una gran cantidad de potasio y casi la mitad de la vitamina C necesaria a diario para los adultos. También es una fuente importante de vitaminas del complejo B y minerales, como el fósforo y el magnesio (FAO, 2008).

La papa es un alimento natural cultivado en la provincia de Pamplona, Norte de Santander, Colombia el cual según datos de AGRONET plataforma virtual del Ministerio de Agricultura, reporta que en el departamento hasta el 2014 la producción fue de 91.185 toneladas equivalente al 3.31% de la producción nacional (AGRONET, 2014). El cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) a nivel mundial es una de las actividades agrícolas que consume más plaguicidas por unidad de área. Este alto uso de plaguicidas se debe a que el cultivo está expuesto al ataque de numerosas plagas, patógenos y malezas, la mayoría de las cuales se

incrementan en condiciones de alta humedad. Su producción en monocultivo siempre ha estado ligada a una alta dependencia de plaguicidas y fertilizantes (Muñoz, Leiva, Ruepert, & Ardón, 2014). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, el uso de plaguicidas químicos en la papa está aumentando en los países en desarrollo, conforme los agricultores intensifican la producción y empiezan a producir en zonas y en temporadas no tradicionales para el cultivo. Varias de estas sustancias químicas usadas con frecuencia son muy tóxicas y se aplican con insuficiente o ningún equipo de protección por parte del agricultor (FAO, 2008.).

2.2 Pesticidas y su clasificación

La FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) define a un plaguicida como “una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedad humana o animal, especies indeseadas de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma en la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o mercado de los alimentos, otros productos agrícolas, madera y sus derivados o alimentos animales, o que pueden ser administrados a los animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas” (WHO 1990).

Su dependencia se remonta a los años 60s, período conocido como la revolución verde; pues desde esta época empieza a experimentarse el mayor desafío a nivel mundial para lograr un uso racional de estos insumos químicos. Aunque es una herramienta importante en el desarrollo de la agricultura, estos agroquímicos tienen la naturaleza de ser tóxicos y en muchos casos quedan residuos en los alimentos y por lo tanto producen cierta clase de efectos cuando las

concentraciones superan el límite máximo de residuos (LMR). (Rekha & Prasad, 2006). Estos compuestos presentan más de 1000 ingredientes activos que son comercializados como insecticidas, herbicidas y fungicidas. Los plaguicidas son un conjunto de sustancias con características muy diversas, entre los que se distinguen dos grandes grupos: según el organismo en el que actúa, como los insecticidas, los herbicidas, los acaricidas, los fungicidas, los raticidas, etc. y el otro de acuerdo a la estructura química de la sustancia organoclorados, organofosforados, carbamatos y los piretroides (Vega, 1985).

Los organoclorados, son compuestos que contienen carbono, cloro e hidrógeno. No se descomponen fácilmente y pueden permanecer en el ambiente y en los organismos mucho tiempo después de la aplicación y exposición. Algunos de estos compuestos que pueden ser altamente tóxicos, como el DDT, han sido prohibidos en los Estados Unidos, debido a su dificultad para degradarse y posterior bioacumulación. La exposición a compuestos organoclorados se ha relacionado con un aumento de la incidencia de cáncer de mama (Recio et al., 2011). Los organoclorados son una clase de pesticidas químicos que actúan como xenoestrógenos por interrumpir la función endocrina normal (Schug, Janesick, Blumberg, & Heindel, 2011). Hale y California (2010) llevaron a cabo un estudio de proteómica para evaluar la vía molecular y alteraciones endocrinas inducidas por los insecticidas metoxicloro y toxafeno mediante la utilización de las líneas celulares de cáncer de mama, MCF7 (ER+) y MDA-MB-231 (ER-). Se encontró una elevada expresión de un pequeño subconjunto de proteínas mitocondriales como respuesta a la exposición a largo plazo de estos compuestos organoclorados.

Los organofosforados es un término genérico para incluir a todos los insecticidas que contiene fósforo. Todos se derivan del ácido fosfórico, a este grupo pertenece, el glifosato, el

herbicida más vendido en el mundo. Un estudio piloto que se llevó a cabo en trabajadores para evaluar la exposición de pesticidas organofosforados se detectó daño oxidativo del DNA en cultivos celulares de linfocitos (Kisby, et al, 2009). En este estudio metabolitos organofosforados se encontraron en muestras de orina, con niveles significativamente altos y también especies reactivas de oxígeno con niveles reducidos de glutatión el cual es un marcador de estrés oxidativo. Otro estudio realizado por López et al. (2007) en 81 trabajadores dedicados a la agricultura, se evaluó los cambios en las enzimas antioxidantes en eritrocitos después de una temporada de aplicación de plaguicidas. Estos autores concluyeron que como consecuencia del período de alta exposición, los niveles de superóxidodismutasa (SOD) y glutatión reductasa disminuyeron en comparación con los controles. Así, los autores plantearon la hipótesis de que la disminución de las actividades enzimáticas está vinculada a los efectos adversos para la salud y relacionada con la toxicidad crónica de los plaguicidas.

Otro grupo importante son los carbamatos, ésteres derivados de los ácidos N-metil o dimetil carbónico, que actúa inhibiendo la acetilcolinesterasa y se encuentra en los insecticidas, herbicidas, fungicidas y nematicidas. Algunos carbamatos contienen tiourea de etileno (ETU), en bioensayos realizados en roedores y se conoció la capacidad que tiene ETU para inducir el desarrollo de tumores en la tiroides y otros sitios (Chhabra et al., 1992).

El cuarto grupo son los piretroides que tienen su origen en insecticidas naturales derivados del extracto de piretro obtenido de las flores del crisantemo. Estos plaguicidas son los más comúnmente utilizados debido a su alta potencialidad insecticida y baja toxicidad en los mamíferos (Nasuti et al., 2008). Sin embargo, ciertos piretroides tienen un potencial genotóxico y cancerígeno (Yamada et al., 2009). George et al (2011) realizaron un estudio en el que expusieron la piel de ratones a cipermetrina (insecticida perteneciente a este grupo) observando

deficiencias en proteínas que juegan un papel importante en muchas funciones celulares, incluyendo respuesta al estrés oxidativo, la proliferación, la unión de iones calcio y la apoptosis.

En Colombia, los plaguicidas son utilizados ampliamente en diferentes campos, principalmente en la agricultura para mejorar la calidad y la cantidad de los alimentos, a nivel doméstico para eliminar insectos y a nivel de la salud pública para el control de vectores transmisores de enfermedades. Entre los efectos adversos se puede citar la contaminación ambiental y la toxicidad en humanos (Fernández A., 2010).

Lorsban® 4E (O, O -dietil-O- 3, 5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato), su ingrediente activo es el clorpirifo el cual es un plaguicida con actividad insecticida organofosforado de amplio uso en la agricultura y en las viviendas (ATSDR, 1997). Los compuestos organofosforados son ésteres del ácido fosfórico y de sus derivados, que comparten como característica farmacológica la acción de inhibir enzimas con actividad esterásica, más específicamente de la acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas, lo que genera una acumulación de acetilcolina y como consecuencia se altera el funcionamiento del impulso nervioso (Fernández, Mancipe, & Fernández., 2010). El clorpirifo puede entrar en el cuerpo por la boca, los pulmones y la piel, entre los principales síntomas que aparecen a causa de la exposición por poco tiempo (un día) a niveles bajos (miligramos), puede causar mareos, fatiga, secreción nasal, lagrimeo, salivación, náuseas, molestia intestinal, sudor y cambios en el ritmo cardíaco. La exposición oral de corta duración a niveles más altos (gramos) de clorpirifos puede causar parálisis, convulsiones, desmayos y muerte (Buitrago, González, Vera, & Ramírez., 2014). Estudios realizados por la exposición aguda y crónica a clorpirifos se observó un daño significativo en el ADN en tejido de ratas, como hígado, cerebro, riñón y bazo, después de 24 horas de tratamiento. El daño se reparó parcialmente a las 48 y 72 horas siguientes al tratamiento (Ojha A., 2013). Otro estudio

mostró que el clorpirifos causa ruptura del ADN e hipometilación en linfocitos de ratón (Cui Y., 2011). También se encontró un aumento de micronúcleos, alteraciones cromosómicas y daño en el ADN en células de hígado y eritrocitos de *Bufo bufo gargarizans* expuestos a concentraciones subletales de clorpirifos (Yin X., 2009). Un estudio a 54.383 aplicadores de plaguicidas varones, mostró 2.070 neoplasmas malignos, con aumento de cáncer de pulmón, riñón y cerebro, sólo el de pulmón fue estadísticamente significativo, comparado con individuos no expuestos. Las personas que estaban expuestas a una intensidad mayor pero no durante toda la vida, presentaron aumentos significativos en cánceres linfo-hematopoyético, leucemia y cerebro, en comparación con individuos no expuestos (Lee WJ, 2004).

Dithane® M-45 (Etilenbis ditiocarbamato de manganeso y zinc), es un fungicida protector de amplio espectro, pertenece al grupo de los Dithiocarbamatos que constituyen los fungicidas más usados actualmente en el control de plagas (Yáñez., 2002). Los pesticidas ditiocarbamato de etilenbis se considera en general que la toxicidad en mamíferos es baja a corto plazo. Sin embargo, una preocupación toxicológica importante, es etilentiourea (ETU), un contaminante industrial y un producto de degradación de mancozeb y otros pesticidas (EPA., 1992.). A pesar de esto mancozeb forma parte de la lista de plaguicidas con solicitudes de prohibición y de severa restricción sugerido por el Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales. Allí también se presenta la clasificación de toxicidad aguda tipo IV (ligeramente tóxico), con una dosis letal oral de 6 250 mg/kg de peso y cutánea de 12 500 mg/kg de peso (OLCA, 1999.). Los efectos adversos del mancozeb en humanos no han sido muy estudiados. Se ha encontrado que los Dithiocarbamatos están implicados en neurotoxicidad dopaminérgica y en disfunción mitocondrial en roedores y humanos y la enfermedad de Parkinson (Harrison Brody A, 2013.). Además, también pueden ser absorbidos por el organismo a través de la piel, membranas

mucosas y el tracto gastrointestinal y respiratorio (World Health Organization W. 1988). Otros estudios demuestran que la tiroides, el hígado y el riñón sufren cambios anatomopatológicos en función de la dosis y del tiempo de exposición al fungicida. El efecto deletéreo del mancozeb sobre glándulas endocrinas, ha sido puesto de manifiesto especialmente sobre la tiroides (Kackar R, 1997). La hipertrofia de la tiroides y consiguiente disminución en la captación de yodo, se producen tras la exposición subcrónica a los fungicidas ditiocarbámicos, debido a uno de los metabolitos finales, la etilentiourea (ETU) (Graham SL, 1975). Se ha encontrado que tras una exposición aguda de 24 horas, mancozeb produce pérdidas celulares en el mesencéfalo específicamente en las células dopaminérgicas y gabaérgicas, debido a que la dopamina es altamente vulnerable. También tiene la capacidad para producir estrés oxidativo y causar destrucción selectiva de la sustancia nigra (Miranda-Contreras L, 2005). Ratas tratadas con Dithiocarbamatos, mostraron signos de depresión, adinamia, disminución del tono, perturbaciones en coordinación, paresias y parálisis de las extremidades combinados con debilidad general, falta de apetito y postración. En algunos estudios realizados a finales del siglo pasado e inicios del presente la OMS alerta sobre el efecto del fungicida en la vida prenatal, al administrarse mancozeb en ratas con una dosis de 1320 mg/kg en el día 11 de gestación. A dosis altas se observaron incrementos en las malformaciones (World Health Organization, 1988.). Otros estudios se encontró que mancozeb afecta a las células somáticas de los folículos ováricos de mamíferos mediante la inducción de un estado premaligno, y tal daño se produce en la misma medida, tanto en ratones como en seres humanos. Estos resultados corroboran aún el concepto de que mancozeb debe ser considerado como un tóxico para la reproducción (Paro R, 2012).

2.3 Pruebas o técnicas empleadas en el estudio de toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad.

Los marcadores biológicos o biomarcadores son los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o marcador de la exposición a un agente tóxico (Garte & Bonassi 2005). Los biomarcadores suelen utilizarse como indicadores del estado de salud o del riesgo a enfermedades y se emplean en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Martínez-Valenzuela & Gómez-Arroyo, 2007).

Aunque sabemos que la población en general está expuesta a muchos agentes tóxicos, los agricultores se constituyen en un grupo de alto riesgo y por lo tanto requieren de estudios para evaluar las enfermedades agudas y crónicas ocasionadas por la exposición a plaguicidas (Larrea, Tirado, & Ascarrunz, 2010). Con el fin de reconocer si un sujeto está padeciendo de exposición integrada a una sustancia peligrosa, o incluso la intoxicación accidental, se han establecido procedimientos analíticos estandarizados para la investigación diagnóstica de los materiales biológicos (Budnik, 2009). Uno de estos procedimientos es la biomonitorización humana útil para estimar el riesgo que supone una exposición integrada a mezclas complejas de sustancias químicas. Esta depende del uso de biomarcadores, definido como indicadores cuantitativos de eventos moleculares y celulares en los sistemas biológicos, relevantes para la salud humana, el desarrollo y el envejecimiento. Estos biomarcadores son medidas en materia biológica obtenida de sujetos voluntarios en estudios observacionales o de intervención (Lopez et al., 2012).

La importancia de los indicadores o biomarcadores es que son útiles para detectar una exposición, determinar las consecuencias biológicas de la misma, detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, identificar los individuos sensibles de una población y

fundamentar la decisión de intervenir tanto a nivel individual como ambiental (Nikoloff, 2013). Es importante considerar que los estudios de exposición a plaguicidas y efecto genotóxico deben tomar en cuenta la confiabilidad del daño de la exposición, la solidez de los estudios, la similitud de los grupo testigo y los protocolos usados para determinar la genotoxicidad (Bull, Fletcher, Boobis, & Battershill, 2006). El daño citogenético ocasiona cambios y alteraciones en el número o la estructura de los cromosomas, estos efectos han sido evaluados a través de biomarcadores como aberraciones cromosómicas (AC), micronúcleos (MN) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) además ha sido posible determinar alteraciones que se manifiestan mediante cambios en la cinética de proliferación celular, lo que puede ser observado y evaluado durante la mitosis (Zhurkov & Yakovenko, 1976). Así mismo se ha utilizado la electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa para evaluar el daño y reparación del ADN tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Moretti, Villarini, Sforzolini & Pasquini, 2000).

2.3.1 Prueba de Micronúcleos (MN)

El ensayo de MN es una prueba gran utilidad por su sensibilidad para detectar daño en el DNA, por la rapidez con que se realiza y por su utilidad potencial para evaluar cualquier población celular eucariótica (Larrea et al., 2010). La frecuencia de micronúcleos es una medida fiable tanto de la pérdida del cromosoma y la rotura, lo que la hace única en comparación con otras pruebas citogenéticas (Collins et al., 2008). Una de las ventajas del ensayo de MN es la capacidad de evaluar el potencial clastogénico y aneugénico de compuestos utilizando el mismo punto final *in vitro e in vivo* (Kapka, Cyranka & Skrzypczak, 2011).

Evaluando el daño cromosómico que se origina durante la división celular, tanto por fragmentos acéntricos (evento clastogénico) o por cromátidas enteras o cromosomas rezagados (evento aneugénico) que no han sido incorporados en los núcleos hijos al momento de la citocinesis y que requieren de una división celular para expresarse (Nikoloff, 2013). Este ensayo fue utilizado en sus comienzos por Thoday en 1951 quien analizó el efecto de radiaciones ionizantes en raíces de *V. faba*. Posteriormente el ensayo fue adaptado por EVANS HJ, 1959 empleando también raíces de *V. faba* y en estudios *in vivo* en células de medula ósea de ratón por M. Von Ledebur, 1973. Otras ventajas de este ensayo son: identificación fiable de las células que han completado sólo una división nuclear, la precisión, velocidad y simplicidad, la capacidad de seleccionar grandes números de células y buena reproducibilidad (Serap et al., 2007). Por su simplicidad, constituye una de las metodologías más empleadas para la identificación de alteraciones en el material genético utilizando diferentes matrices bióticas. Esta técnica está validada internacionalmente y se ha constituido como una herramienta de estudio obligatoria durante el proceso de admisión para productos farmacéuticos y químicos, entre otros (Nikoloff, 2013). El papel de la prueba de micronúcleos como criterio de valoración intermedia de la carcinogénesis ha recibido mucho apoyo en la literatura, pero la evidencia más fuerte está disponible sobre la asociación entre el tipo de aberraciones cromosómicas estructurales y el riesgo de cáncer (Minasi, Costa, Silva & Melo, 2011). El número de publicaciones con relación a la prueba de micronúcleos se ha incrementado exponencialmente en años recientes. Este fenómeno se debe a diversos factores, entre los que se incluyen la relativa sencillez de la prueba, el hecho de que la obtención de la muestra es mínimamente invasiva y su costo bajo (Benítez et al., 2010). Muestra de esto es que el ensayo de MN es uno de los mejores candidatos para un amplio uso en las estrategias de salud pública, y, potencialmente, en la evaluación del riesgo

individual. La sensibilidad y fiabilidad del ensayo de MN para detectar daños en el ADN, así como su capacidad para ser aplicado a diferentes tipos de células, hace que sea un buen método para analizar el potencial daño citogenético de los contaminantes ambientales, incluyendo los pesticidas (Murgia et al, 2008). Por lo tanto la prueba de micronúcleos (MN) representa una oportunidad para realizar estudios epidemiológicos del impacto del estilo de vida, exposición ocupacional, nutrición, evolución de enfermedades crónico degenerativas, procesos de envejecimiento, exposición a genotóxicos, utilizando las células de la mucosa oral para evaluar el efecto genotóxico y citotóxico en poblaciones en alto riesgo (Bonassi, Coskun, Ceppi & Lando, 2011), ya que se ha descrito a la cavidad oral como el espejo que refleja la salud del individuo, pues en la mucosa que recubre la boca se observan cambios indicativos de enfermedad, por lo tanto las características del epitelio de la mucosa oral favorecen su utilización en pruebas para evaluar genotóxicos o citotóxicos, debido a que es de fácil acceso, además es el punto de contacto con muchos agentes potencialmente peligrosos. De hecho, la mucosa oral representa una barrera protectora para potenciales carcinógenos que, al ser metabolizados, generarían múltiples metabolitos reactivos; este tejido protege al resto del organismo de que estos compuestos penetren a otros órganos; sin embargo, al estar expuesta a estos agentes, la mucosa es susceptible de sufrir daño. Otra característica que impulsa a utilizar este tejido como punto de estudio es el que este epitelio cuenta con una capacidad especial proliferativa, lo que permite que la población celular se mantenga constante; no obstante, esta particularidad lo vuelve más vulnerable a lesiones producidas en el ADN, por lo que cobra relevancia, ya que se calcula que el 90% de todos los tipos de cáncer tienen origen epitelial. De tal manera la mucosa oral puede ser usada para monitorear eventos genotóxicos tempranos causados por cancerígenos inhalados o ingeridos (Torres-Bugarín & Ramos-Ibarra, 2013). Por otra parte, es importante

considerar que aproximadamente el 60% del total de la superficie de revestimiento oral es epitelio no queratinizado; lo que favorece la absorción de colorantes y facilita a la vez la observación e identificación de características morfológicas del núcleo y membrana celular a través del microscopio. Otra ventaja que presentan las células de este epitelio, es que presentan abundante citoplasma y conservan el núcleo al momento de ser exfoliadas (Squier & Kremer, 2001); aunado a que son de fácil acceso y es posible colectarlas mediante técnicas mínimamente invasivas y relativamente indoloras, lo que produce mínimo estrés a las personas que se les toma la muestra por lo que es bien aceptada; e incluso, estas células se pueden estudiar sin necesidad de realizar cultivos celulares, facilitando y disminuyendo el costo de la técnica (Bonassi, Coskun, Ceppi & Lando, 2011).

2.3.2 Test de *Allium cepa*

El test de *Allium cepa* es uno de los biomarcadores usado para el diagnóstico de toxicidad de diferentes compuestos tanto farmacéuticos, alimenticios y contaminantes (Frainer et al., 2006; Konuk, 2007; Olusegun et al., 2010). Frente a la utilización de biocidas en cultivos de importancia agronómica, la utilización del test de *Allium cepa* permite obtener un buen registro de la ocurrencia de estas anomalías (Grant, 1982 & Rank, 2003), ya que este test aprovecha la consecuencia de la disminución del índice mitótico, expresada en el menor desarrollo radicular, observando así diferencias significativas entre compuestos a distintas concentraciones, y tiempos de exposición (Fiskesjo, 1985).

El uso del test de *Allium cepa* permite determinar la toxicidad de muchos compuestos por su gran sensibilidad (Fiskesjo, 1988) es por ello que en la actualidad se viene usando para

monitorear el grado toxicológico de distintos compuestos como el azufre, magnesio, boro, cromo, pesticidas, farmacéuticos entre otros (Fiskesjo, 1993, Peña et al., 1999; Espinoza et al., 2007; Feretti *et al.*, 2007; Shukla et al., 2002; Tartar *et al.*, 2006; Grant, 1978; Mustafa et al., 2008), debido a que las células de los meristemos apicales de cebolla muestran fácilmente un amplio rango de alteraciones citológicas, lo que constituye el trabajo con raíces de esa especie vegetal en material biológico sensible para detectar sustancias potencialmente peligrosas tanto para la salud humana como para el medio ambiente en general. Los análisis de alteraciones nucleares o fisiológicas junto con las aberraciones cromosómicas clastogénicas (inducción de rupturas cromosómicas en la división celular) y/o aneugénicas (alteración en las estructuras de la célula, como el huso mitótico), han demostrado ser biomarcadores sensibles para investigar la acción de los diferentes agentes evaluados en relación con sus efectos sobre el ADN de los organismos expuestos (Leme & Marin-Morales 2009).

Además de los MN Tolbert et al. (1991) describe otro tipo de anormalidades (AN), que podrían ocurrir en procesos normales de diferenciación celular, indicadores de daño al ADN, citotoxicidad y muerte celular; ya que las alteraciones más sugestivas en la morfología de las células neoplásicas se producen en el núcleo, donde las modificaciones son en el tamaño, densidad y distribución de la cromatina. Estas anormalidades se pueden distinguir de células normales por sus alteraciones ya sea en el citoplasma o en la morfología del núcleo, entre ellas se encuentran la cromatina condensada (CC), cariorrexis (CR), núcleo picnótico (NP), cariolisis (CL), núcleo lobulado también llamado prolongación nuclear, “bud cell” o “broken eggs” (NL, BE) y la presencia de células con dos núcleos, llamadas células binucleadas (BN). Por todas estas características ya señaladas, la prueba de identificación de AN se usa con frecuencia como marcador de daño al ADN (al analizar MN y NL); defectos en la citocinesis (por la presencia de

varias células BN); evidencia de muerte celular (al observar CC, CR, PN, y CL); indicadores de diferentes etapas de necrosis (cuándo se presentan varias células con PN, CC, CR, CL); así como un identificador de respuesta al daño celular (al manifestarse células con PN y CC). Para su identificación, básicamente se usan los criterios establecidos por Tolbert en 1991 los cuales se describen a continuación (Thomas et al., 2008; Tolbert et al., 1991, 1992).

Células Normales (CN): El núcleo esta uniformemente teñido, es redondo u oval, se distinguen de las células basales porque son de mayor tamaño y el núcleo es más pequeño en relación al citoplasma. No contienen ningún otro cuerpo o estructura aparte del núcleo que contenga ADN, estas células son consideradas como células totalmente diferenciadas y no se observan divisiones celulares (Thomas *et al.*, 2009; Tolbert *et al.*, 1991).

Célula Micronucleada (CMN): Se caracteriza por la presencia de un núcleo principal y uno o más pequeñas estructuras nucleares denominadas MN. Un MN tiene la forma redonda o almendrada y mide entre 1/3 y 1/16 del núcleo principal, presenta la misma intensidad, textura y plano focal que el núcleo y es un fragmento o un cromosoma completo que al momento de la mitosis no se integra a uno de los núcleos de las células hijas (Thomas *et al.*, 2009; Tolbert et al., 1991).

Célula binucleada (BN): Son células que contienen dos núcleos principales, usualmente los núcleos están muy próximos e incluso podrían hacer contacto, ambos con morfología y tinción similar a un núcleo normal. No parecen implicar una interacción directa con el ADN, sino que involucra la interferencia con los hechos ocurridos a finales de la división celular. Se piensa que es un evento que tiene lugar en dos etapas, en primer lugar ocurre la mitosis que dará origen a dos núcleos pero el citoplasma no se divide, en consecuencia se forma una célula binucleada que será eliminada si pertenece a un epitelio de revestimiento, pero si este fenómeno ocurre en una

célula del epitelio basal o pertenece a otro tejido entonces ambos núcleos de la célula binucleada entraran en mitosis al mismo tiempo, cuando las membranas nucleares se desintegren, simultáneamente los cromosomas de ambos núcleos quedaran incluidos en el mismo huso y serán arrastrados juntos, así que en el momento de que la mitosis esté completa, habrá dos células con doble material genético cada una, o bien una célula tetraploide, si se repite el fenómeno de interrupción de la citocinesis (Shi & King, 2005; Thomas et al., 2009; Tolbert et al., 1991).

Núcleo picnótico (PN): Estas células se caracterizan por tener un núcleo pequeño, con alta densidad de material nuclear uniforme e intensamente teñido. El diámetro del núcleo es aproximadamente de 1/3 del núcleo normal y se piensa que estas células tal vez son una forma de muerte celular; sin embargo, el mecanismo preciso sigue siendo desconocido. Hasta el momento, solo se correlaciona con diferenciación y maduración de las células epiteliales (Thomas et al., 2009; Tolbert et al., 1991).

Cariolisis (CL): Estas células están completamente vacías de ADN y por lo tanto, no tienen núcleo. Es probable que representen una fase muy avanzada en el proceso de muerte celular. La correlación positiva entre células picnóticas y cariolisis, sugiere que estas últimas, se derivan directamente a partir de células con cromatina condensada o indirectamente a través de células picnóticas (Thomas *et al.*, 2009; Tolbert *et al.*, 1991).

Puentes Anafásicos: Barbara McClintock (1938) demostró que la pérdida de la región distal de un cromosoma provoca que se fusionen las cromátidas hermanas, formándose a lo largo de las mitosis ciclos de fusión-puente-rotura, esto se da por la migración de las cromátidas a los polos, ya que la continuidad de dos de ellas en un brazo provoca un puente anafásico. Este puente puede resolverse de dos maneras con el mismo resultado en ambas: la primera es que la tensión

rompa las cromátidas continuas por un punto aleatorio y la segunda que el puente persista (supongamos que las cromátidas unidas fuesen largas) y cuando se forme la envoltura nuclear un segmento quede fuera del núcleo y se pierda. La consecuencia es la misma, en cada polo hay un cromosoma con una cromátida que tiene una pérdida de un segmento. Este segmento no es el mismo en los dos cromosomas (la rotura es aleatoria) y normalmente en un polo habrá un cromosoma con un nuevo segmento de menos y en el otro polo, además del segmento inicial perdido ahora se acumulará la duplicación de otro segmento. La consecuencia de este fenómeno es que se vuelve a empezar un ciclo fusión-puente-rotura en cada una de las células resultantes y así sucesivamente, pero además se van acumulando desequilibrios cromosómicos, normalmente por acumulación de pérdidas, que en organismos superiores (animales sobre todo) hace inviables los productos de las mitosis.

2.3.3 Índice Mitótico

Se considera como un parámetro que refleja la frecuencia de la división celular y la velocidad de crecimiento de los meristemas. Es una porción de células en cualquier fase de la mitosis dentro de la población celular analizada, se calcula contando un determinado número de células (por ejemplo 100) y viendo cuantas de ellas están en mitosis, es decir el número de células en mitosis se divide entre el número total de células contadas (Letty Marcano et. al, 1998).

3. OBJETIVOS

3.1 General

- Evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de la mezcla entre los plaguicidas Lorsban y Dithane utilizados en el cultivo de papa.

3.2 Específicos

- Estimar la toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad de los plaguicidas Dithane y Lorsban y su mezcla en la raíz de *Allium cepa* in vitro como especie bioindicadora.
- Determinar la genotoxicidad de la mezcla de los plaguicidas por exposición laboral.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

La investigación se realizó en tres veredas de la Provincia de Pamplona (Norte de Santander), donde se cultiva la papa y otros productos como fresa, ajo, trigo, morón, maíz, frijol, arveja y zanahoria: Monte Adentro entre las coordenadas gráficas 07° 20' 37.0" N - 72° 40' 6.6" OC con una altura de 2715 m y 07° 20' 33.8" N - 72° 40' 23.0" OC con 2908 m de altura, el Rosal entre las coordenadas gráficas 07° 21' 28.8" N - 72° 40' 8.1" OC con una altura de 2640 m y 07° 21' 29.07" N - 72° 40' 9.6" OC con 2640 m de altura y Chíchira entre 07° 22' 23.3" N - 72° 37' 17.6" OC con una altura de 2407 m y 07° 22' 30.8" N - 72° 37' 17.7" OC con 2397 m de altura.

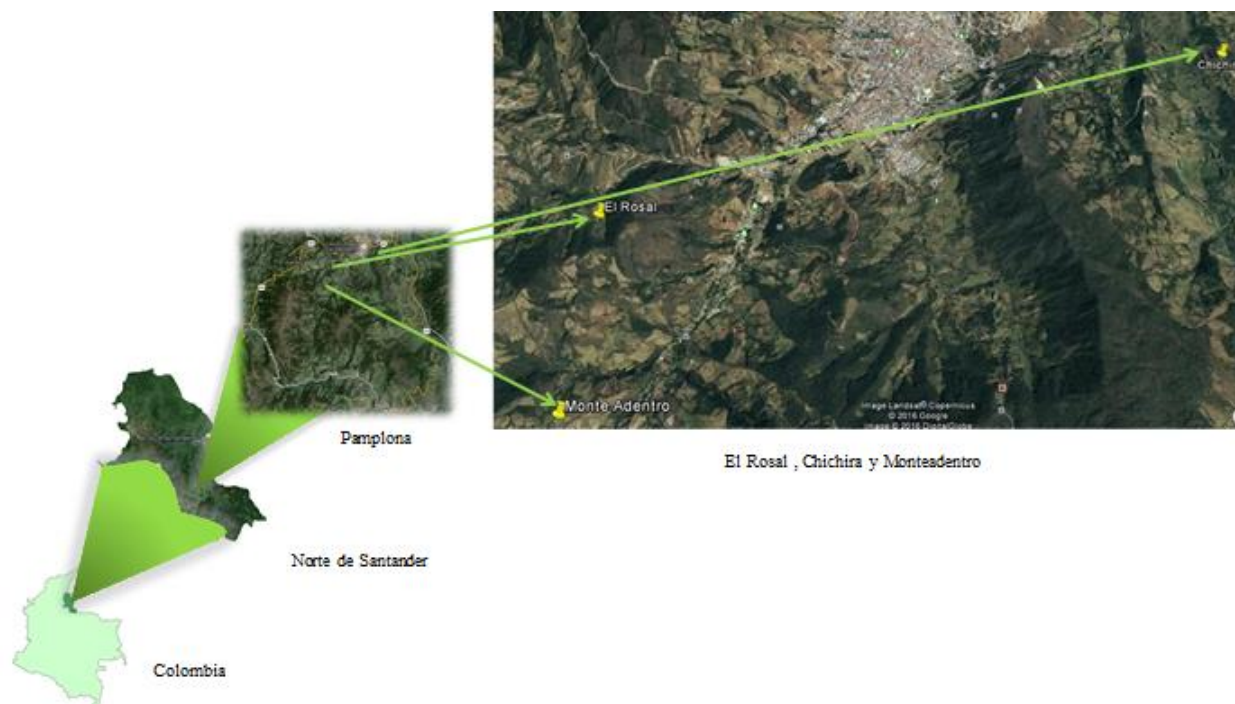


Figura 1: Área de estudio, veredas Chíchira, Monteadentro y el Rosal.

4.2 Químicos

Dithane m-45 (Etilenbis ditiocarbamato de manganeso con sal de zinc), y Lorsban (O, O -dietil-O- 3, 5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato), compuestos comerciales más utilizados según los agricultores y casas comerciales en los principales cultivos de la región (papa y fresa) en el municipio de Pamplona. Los químicos fueron obtenidos por los cultivadores de papa en las concentraciones estándar para desarrollar los bioensayos de toxicidad y genotoxicidad *in vitro* en *Allium cepa* en el laboratorio de Biología Molecular y Genética.

4.3 Cultivos Celulares y Tratamiento con los Pesticidas

En este estudio *in vitro* se utilizó como bioindicador la raíz de *Allium cepa* ($2n = 16$), para los bioensayos de toxicidad y genotoxicidad de los pesticidas Dithane, Lorsban y la mezcla de los dos. Todos los tratamientos se hicieron por triplicado considerando que cada bulbo de cebolla representa a un sistema experimental y cada raicilla una unidad experimental.

4.4 Tamaño y procedencia de los Bulbos.

Los bulbos fueron seleccionados por un tamaño uniforme (± 3 cm de diámetro), de una misma procedencia y tiempo de cosecha.

4.5 Preparación de los Bulbos.

Se extrajeron las catáfilas exteriores secas y se limpió cuidadosamente el disco radicular eliminando todas las raicillas secas sin dañar dicho disco. Se hizo el lavado en agua corriente durante 2 horas. De esta manera se asegura eliminar sustancias que quedan sobre las hojas durante el transporte o el almacenamiento.

4.6 Condiciones del Cultivo Celular.

Los bulbos de cebollas se mantuvieron en la oscuridad para que las raíces alcanzaran una longitud de 2-3 cm, a temperatura uniforme a lo largo de todo el bioensayo (22°C), cambiando el agua diariamente y manteniéndola aireada, con un pH neutro (6-8). Las condiciones ambientales

del cultivo durante todo el bioensayo fueron controladas. Preparados los bulbos se hicieron los tratamientos para los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad.

4.7 Preparación de Soluciones.

Según las casas comerciales las diluciones recomendadas son: Dithane 1000gr /200L y el Lorsban 250ml/200L H₂O. Las concentraciones que se utilizaron para los ensayos fueron preparadas al 20%, 40%, 60% y 80%, utilizando recipientes de un volumen de 115 ml. Para mantener siempre la misma concentración de los químicos evaluados en los diferentes tiempos las diluciones fueron hechas en el momento de realizar el cambio cada 24 horas y además mantener siempre el mismo volumen, ya que algunos químicos pueden ser inestables en solución. Cada recipiente fue rotulado con la concentración y fecha del tratamiento.

4.8 Controles.

Como los químicos a evaluar son hidrosolubles se utilizó agua como control negativo.

4.9 Toxicidad.

Los bulbos preparados fueron colocados en recipientes de 115ml con cada tratamiento manteniendo sumergido solo el disco radicular. La evaluación de la toxicidad de cada químico y la mezcla, en las diferentes concentraciones se hizo después de 15 días de exposición. Se escogió nueve raicillas al azar de cada bulbo y se midió la longitud de las raíces de *Allium cepa*, ya que es la forma como ellas responden y es el parámetro macroscópico que se tiene en cuenta para esta variable.

4.10 Citotoxicidad y Genotoxicidad

Se seleccionaron los bulbos de *Allium cepa* con mayor cantidad de raicillas con una longitud promedio de 2 a 3cm, para utilizarlos en los diferentes tratamientos y concentraciones a evaluar 20%, 40%, 60% y 80% a las 12, 24, 48 y 72 horas de exposición de Dithane, Lorsban y la mezcla. Terminado cada uno de los ensayos las raíces se lavaron con agua destilada para retirar cualquier residuo del químico y se colocaron en recipientes limpios con agua destilada por 24h para establecer el período de recuperación de un ciclo celular completo y fijar el daño genético.

4.10.1 Fijación y coloración de las muestras.

Se hicieron cortes de unos 3 a 4 cm de las raíces de los bulbos con tratamiento, se colocaron en una mezcla fijadora llamada solución hidrolizante (50ml de agua, 45ml ácido acético, 3ml de etanol y 2ml de ácido clorhídrico), por 30 minutos. A las raíces hidrolizadas se le hicieron cortes con un bisturí de los ápices radiculares y fueron colocados en un portaobjeto limpio, se cubrió el material a observar con una laminilla, se presionó con el dedo pulgar para extender la muestra, luego se retiró el cubreobjeto, se añade una gota de colorante aceto-orceína al 5% y nuevamente se coloca la laminilla; el exceso de colorante se retiró con papel absorbente y se sellaron las placas para evitar su deshidratación.

4.10.2 Evaluación de las muestras *in vitro*.

El análisis citotóxico de las células meristemáticas de *Allium cepa sp* sometidas a los diferentes tratamientos con los plaguicidas evaluados, se determinó microscópicamente contando el número y tipo de anormalidades NP, CL, BN, PA, CA y PR en el citoplasma o en la morfología del núcleo en 100 células observadas y el índice mitótico (IM) para estimar la velocidad del crecimiento tisular, utilizando la siguiente ecuación:

$$IM = NCM / NTC \times 100$$

IM= Índice Mitótico

NCM= Número Células en Mitosis

NTC= Número Total de Células Observadas

El análisis genotóxico de las células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa sp* sometidas a los diferentes tratamientos con los químicos evaluados en las diferentes concentraciones (20%, 40%, 60% y 80%) y tiempos (12, 24, 48 y 72 horas), se determinó contando el número de micronúcleos / 1000 células en interfase. Todos los tratamientos fueron hechos por triplicado.

4.11 Evaluación Genotóxica por Exposición Laboral.

La evaluación por exposición laboral en la población de estudio para evaluar daño genético se hizo en células epiteliales descamadas de la mucosa bucal, utilizando como biomarcador la frecuencia de MN. Este tejido es considerado ideal para aplicar la técnica de MN y detectar

anormalidades, lo que representa una oportunidad para realizar estudios epidemiológicos en poblaciones de alto riesgo.

La población de estudio recibió una explicación clara de los objetivos de la investigación. Se tomaron tres veredas de la provincia de Pamplona, Monte Adentro, El Rosal y Chíchira, cultivadores de papa, como uno de los productos fuente de su economía. Un promedio de cinco trabajadores por vereda expuestos a plaguicidas, fueron seleccionados para un total de 15 personas. Como grupo control negativo se escogieron cinco estudiantes universitarios no expuestos a los químicos, con hábitos saludables. Las personas seleccionadas para el proyecto contestaron una encuesta (ver anexo 4) previamente tabulada que permitió establecer y caracterizar a través de las entrevistas, los hábitos, costumbres y actitudes de su estilo de vida que pudieran inferir en los resultados. En la evaluación también se hizo una inspección a pie de los sitios de trabajo y las condiciones de protección y seguridad de los agricultores observables durante el recorrido.

4.11.1 Toma de las Muestras.

Se seleccionaron 15 trabajadores agrícolas cultivadores con un promedio de edad de 42,86 años que han estado expuestos a los agroquímicos Dithane y Lorsban utilizados en la siembra, cosecha y recolección de papa, por lo menos durante dos años.

Para la obtención de las muestras cada persona se hizo un enjuague vigoroso con agua potable de la cavidad bucal. Las células de la mucosa bucal se obtuvieron mediante un raspado de la cara interna de la mejilla con un palillo de madera y se realizó un extendido del tejido en un

portaobjetos codificado, previamente tratado con etanol al 75% para retirar las impurezas. Cada muestreo se hizo por triplicado.

Los portaobjetos con las muestras se colocaron en una caja hermética, para evitar que se contaminaran y fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular y Genética, donde posteriormente se trataron.



Figura 2. Encuestas y toma de muestras.

4.11.2 Tratamiento y Evaluación de las muestras.

Para el análisis, las muestras fueron coloreadas con Giemsa al 5% por 10 minutos (Speit G, 1985), se retiró el exceso de colorante de las laminillas con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Los frotis fijados fueron observados en un microscopio (ZEISS Primo Star, 176045) a un aumento de 40X. Se hizo el conteo de 1000 células epiteliales

de cada persona para registrar el número de células con MN (Paul R. Andreassen, 2004). Para evaluar los micronúcleos se tuvo en cuenta los criterios sugeridos por Titenko Holland.

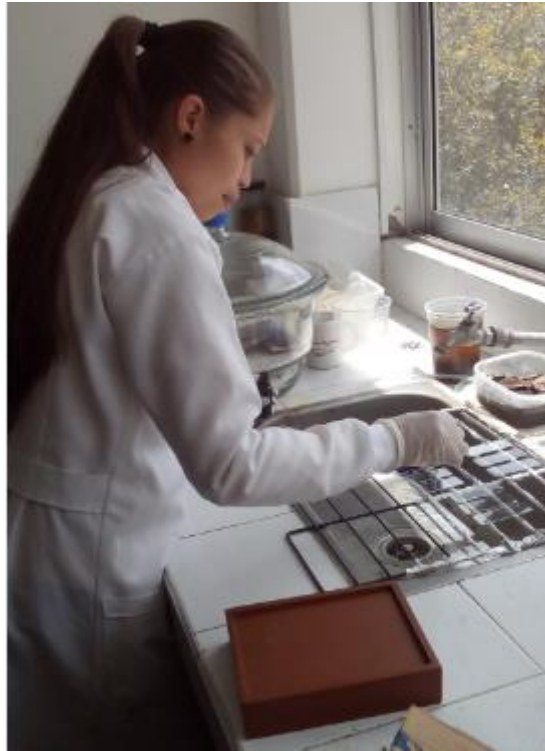


Figura 3. Tinción de muestras

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA). El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el software SPSS versión 22.0, a un nivel de significancia de 0,05 utilizando como herramientas estadísticas descriptivos y pruebas no paramétricas Kruskal Wallis y Mann Whitney ya que los datos de las mediciones no cumplen con los supuestos para la aplicación de la prueba ANOVA.

Para el análisis de exposición laboral se utilizan herramientas de estadísticos descriptivos y prueba ANOVA que nos sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa, para

contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes o con distribución normal.

6. RESULTADOS

Toxicidad. La Figura N°4, el eje de la X representa las diferentes concentraciones evaluadas en los dos químicos y la mezcla y el eje de la Y la longitud en centímetros de las raíces de *Allium cepa sp*, después de 15 días de tratamiento. Se observa que la longitud de las raíces disminuye a medida que aumentan las concentraciones en los tres tratamientos. Al comparar la toxicidad de los dos químicos y la mezcla se observa que Lorsban y la mezcla fueron más tóxicos que el Dithane.

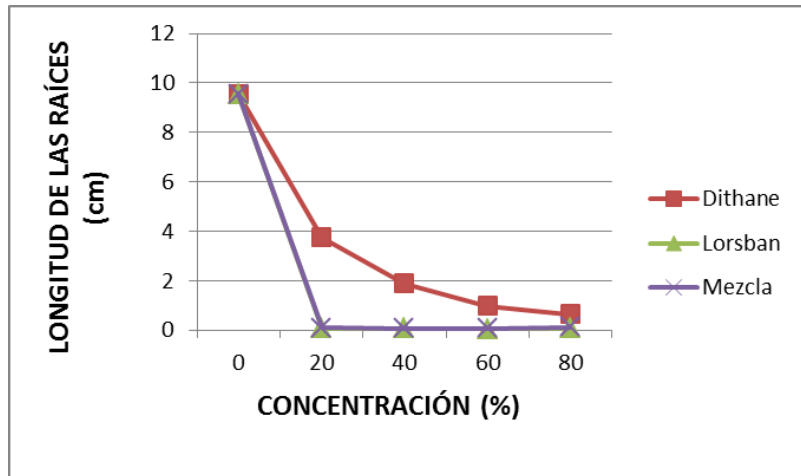


Figura 4. Curva dosis respuesta de la longitud (cm) de crecimiento de la raíz de *Allium cepa* expuestas durante 15 días a las diferentes concentraciones de los químicos Lorsban, Dithane, la mezcla y el control negativo.

Concentración % Químicos	Longitud de Raíz (cm) Promedio ± DE
DITHANE	
20	3,76 ± 1,77
40	1,90 ± 1,20
60	0,98 ± 0,77
80	0,64 ± 0,48**
LORSBAN	
20	0,09 ± 0,04
40	0,08 ± 0,04
60	0,07 ± 0,03
80	0,05 ± 0,06
MEZCLA	
20	0,11 ± 0,05
40	0,09 ± 0,02
60	0,08 ± 0,04**
80	0,07 ± 0,03
CONTROL NEGATIVO (-)	9,56 ± 2,13

Tabla N^o 1. Longitud promedio del crecimiento de las raíces de *Allium cepa* sometidas a las diferentes concentraciones de los químicos Lorsban, Dithane y la Mezcla.** Altamente significativo. Las diferencias en Dithane se presentan entre las concentraciones: 20% y 40% (p = 0,000; p<0,05), 20% y 60% (p = 0,000; p<0,05), 20% y 80% (p = 0,000; p<0,05), 40% y 60% (p = 0,001; p<0,05), y finalmente entre 40% y 80% (p = 0,000; p<0,05). En la mezcla la significancia estadística en 40% y 60% (p = 0,0016; p<0,05).

El control negativo presenta el promedio de longitud de raíces más alto, con $9,56 \pm 2,13$, le siguen los valores promedio del químico Dithane en las concentraciones del 20% con $3,76 \pm 1,77$, 40% de $1,90 \pm 1,20$, 60% de $0,98 \pm 0,77$ y 80% de $0,64 \pm 0,48$, estos resultados muestran que existen diferencias altamente significativas entre las diferentes concentraciones del químico Dithane ya que el P valor en todas las concentraciones es inferior al nivel de significancia $p = 0,000$.

En los químicos Lorsban y mezcla los resultados promedio son muy bajos y similares. En Lorsban van desde $0,09 \pm 0,04$, seguido de $0,08 \pm 0,04$, luego $0,07 \pm 0,03$ y finalmente $0,05 \pm 0,06$ para las concentraciones de 20%, 40%, 60% y 80% respectivamente, y para la mezcla los

resultados fueron $0,11 \pm 0,05$, $0,09 \pm 0,02$, $0,08 \pm 0,04$ y $0,07 \pm 0,03$ en el mismo orden de las concentraciones anteriores, presentándose diferencias significativas entre las concentraciones 40% y 60% de la mezcla de los químicos con un $p = 0,0016$; $p < 0,05$. (Tabla 1).

Los resultados obtenidos por la exposición de las raíces de *Allium cepa* a los dos químicos evaluados y a la mezcla comparados con el control negativo dan cuenta del efecto tóxico, observados en los procesos de crecimiento de la raíz mostrando una relación dosis respuesta en el tratamiento con Dithane, mientras Lorsban y la mezcla muestran una toxicidad muy parecida y muy alta en todas las concentraciones donde el crecimiento de la raíz fue casi nulo, como se observa en la Figura 1.

Citotoxicidad.

La figura N^o. 5a el eje de la X representa el tiempo evaluado en horas de los dos químicos, la mezcla y el control negativo, en el eje de la Y el número de anomalías en 100 células después del tiempo de tratamiento. La figura N^o. 5b muestra las concentraciones de los diferentes tratamientos en relación con el número de anomalías por 100 células representados sobre el eje Y.

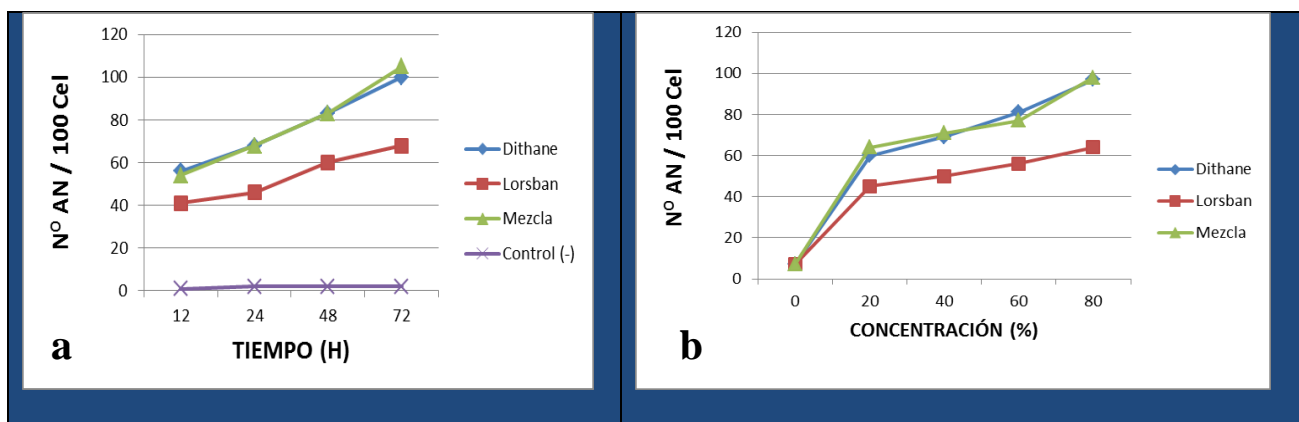
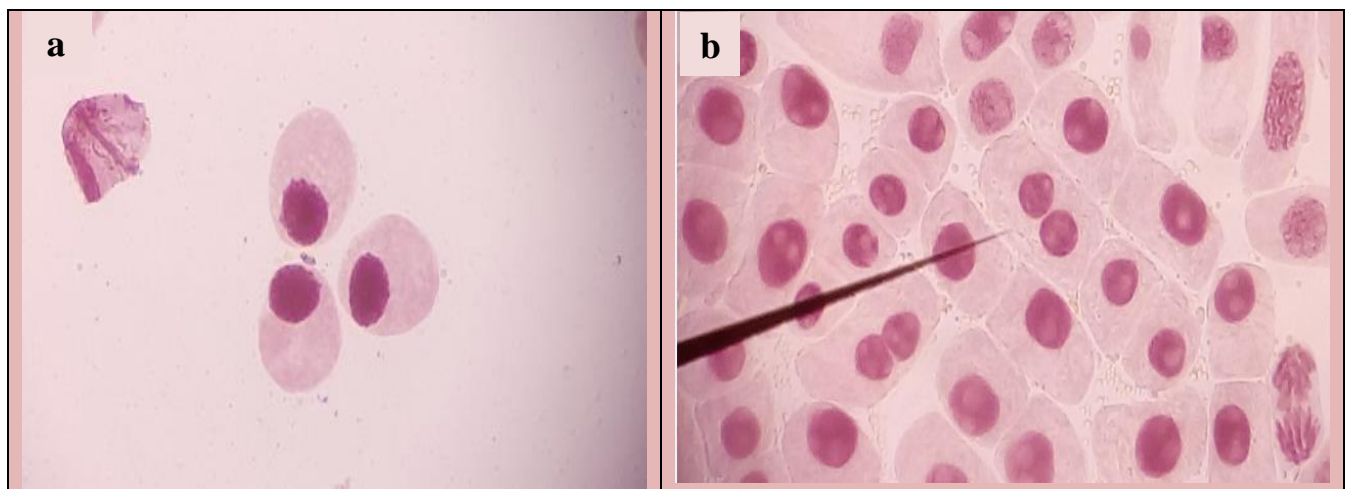


Figura 5. Gráfico comparativo entre el tiempo y la concentración con el número de anomalías. a (N^o de anomalías / 100 células Vs tiempo de exposición), b (N^o de anomalías / 100 células Vs concentración).

Lo que se puede observar en las dos graficas es que a medida que aumenta el tiempo y la concentración hay un incremento en el número de anomalías, el químico Lorsban presenta una citotoxicidad menor que el pesticida Dithane y la mezcla de los dos tienen efecto citotóxico muy marcado al compararlos con el control (fig. 6).

En la Tabla N^o 2 se observa que el mayor promedio de variabilidad de anomalías se presentó en la mezcla de los químicos en la concentración del 80% a las 72 con un promedio de $26,25 \pm 4,79$ seguido del Dithane con un promedio de $25,00 \pm 4,40$ en la misma concentración y tiempo de exposición, el promedio de anomalías más bajo se observó en el control negativo, con un promedio de $1,75 \pm 0,50$. Al aplicar prueba de ANOVA se observa que solo existen diferencias significativas en la concentración del 80 % a las 72 horas en los químicos Lorsban, Dithane y mezcla, con un valor P inferior al nivel de significancia ($p = 0,020$).



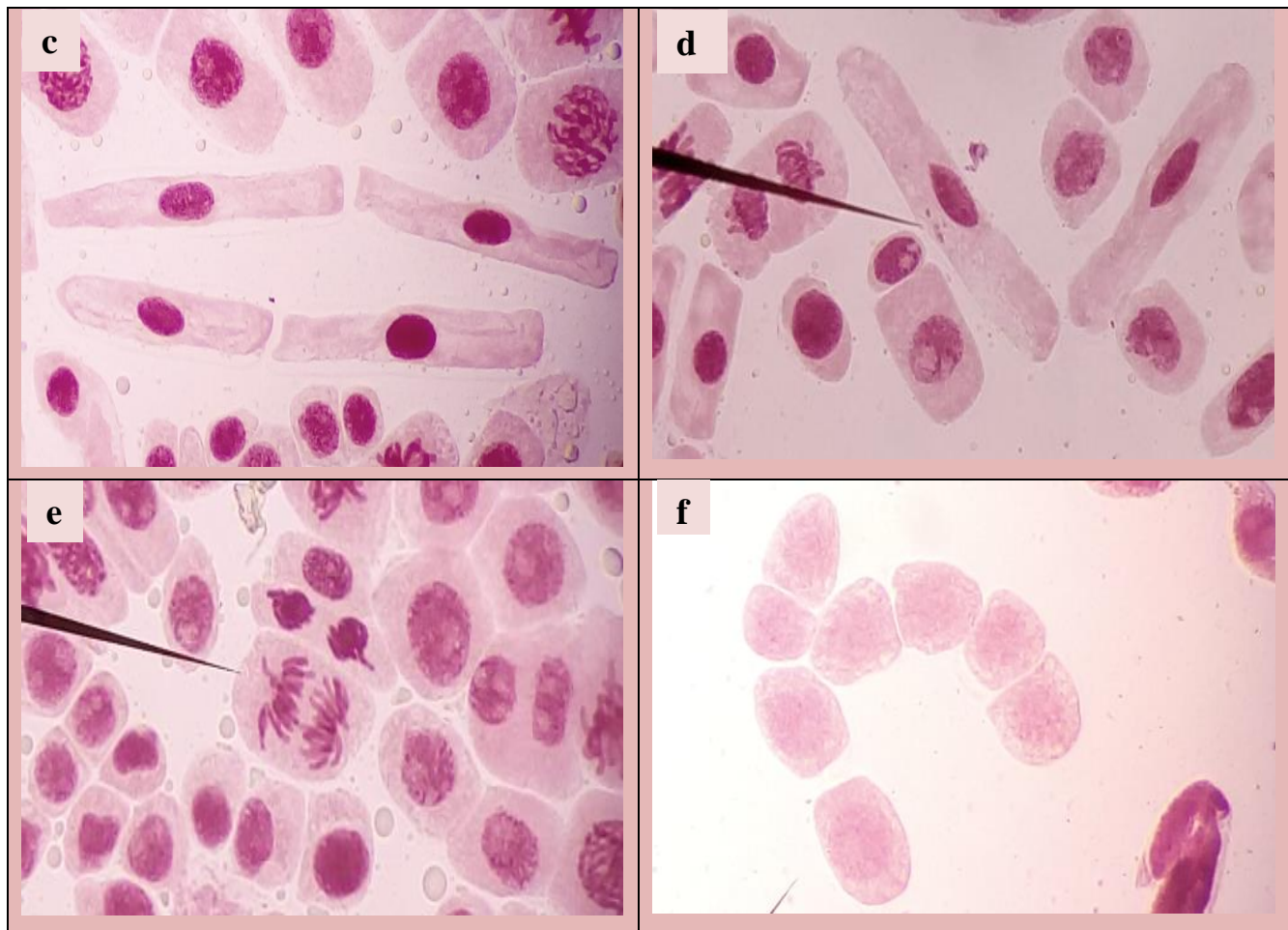


Figura 6. Anormalidades observadas en las diferentes concentraciones y tiempos de exposición. a. Núcleo periférico (PR), b. Célula binucleada (BN), d. Núcleo picnótico (NP), e. Puentes anafásicos (PA), f. Cariolisis (CL).

Concentración Químicos	Tiempo (H)	Tipos de Anormalidades						Total	IM	Promedio ± DE		
		BN	PA	PR	NP	CA	CL			Concentración	Tiempo	
DITHANE	12	2	3	2	2	1	1	11	7	15,00 ± 3,92	12	14,00 ± 3,16
	24	2	2	3	2	2	2	13	5			
	48	3	3	3	2	3	2	16	4			
	72	2	7	3	3	2	3	20	11			
40	12	2	3	2	1	2	2	12	6	17,25 ± 4,79	24	17,00 ± 3,92
	24	3	2	4	2	2	2	15	4			
	48	2	4	4	3	4	2	19	3			
60	12	2	2	3	2	4	2	15	4	20,25 ± 5,12	48	20,75 ± 4,65
	24	4	3	3	2	4	2	18	3			
	48	4	5	3	2	4	3	21	11			
80	12	2	5	2	3	3	3	18	4	24,25 ± 5,32	72	25,00 ± 4,40*
	24	4	6	4	3	3	2	22	3			
	48	4	6	5	4	4	4	27	12			
	72	6	4	5	6	5	4	30	12			
TOTAL		51	68	54	43	50	41	307				
LORSBAN												
20	12	3	0	3	0	0	2	8	8	11,25 ± 2,75	12	10,25 ± 2,22
	24	2	1	4	0	0	3	10	5			
	48	5	0	4	0	2	2	13	10			
	72	5	2	4	0	3	0	14	12			
40	12	3	2	4	0	0	0	9	6	12,50 ± 3,11	24	11,50 ± 1,73
	24	4	0	2	0	2	3	11	4			
	48	2	1	6	0	4	1	14	4			
	72	5	2	2	0	0	7	16	11			
60	12	4	1	3	0	2	1	11	5	14,00 ± 3,56	48	15,00 ± 1,83
	24	6	0	2	0	0	3	11	4			
	48	4	3	3	0	3	3	16	10			
	72	6	3	3	0	2	4	18	13			
80	12	5	2	4	0	1	1	13	4	16,00 ± 3,16	72	17,00 ± 2,58*
	24	6	0	3	0	2	3	14	3			
	48	4	4	3	0	3	3	17	12			
	72	5	4	4	0	4	3	20	15			
TOTAL		69	25	54	0	28	39	215				
MEZCLA												
20	12	4	0	3	0	3	0	10	8	16,00 ± 5,16	12	13,50 ± 3,42
	24	6	0	3	0	4	1	14	7			
	48	8	0	4	0	3	3	18	4			
	72	8	4	4	2	2	2	22	12			
40	12	6	2	3	0	0	1	12	5	17,75 ± 5,06	24	17,00 ± 2,94
	24	9	0	2	0	1	4	16	6			
	48	9	0	5	0	2	3	19	5			
	72	9	4	4	1	2	4	24	13			
60	12	6	1	3	0	2	2	14	3	19,25 ± 5,12	48	20,75 ± 3,59
	24	6	2	4	1	1	3	17	3			
	48	5	4	2	2	3	4	20	11			
	72	8	4	5	2	3	4	26	13			
80	12	5	3	2	2	2	4	18	3	24,50 ± 6,56	72	26,25 ± 4,79*
	24	5	5	2	3	3	3	21	2			
	48	9	5	4	3	2	3	26	10			
	72	9	8	5	4	3	4	33	16			
TOTAL		112	42	55	20	36	45	310				
CONTROL NEGATIVO (-)	12	0	0	1	0	0	0	1	10	1,75 ± 0,50		1,00 ± 0
	24	0	0	1	0	1	0	2	9			
	48	0	0	1	0	1	0	2	8			
	72	0	0	0	0	1	1	2	8			
TOTAL		0	0	3	0	3	1	7				

Tabla N.º 2. Índice mitótico y promedios de anormalidades observadas en las diferentes concentraciones y tiempos de exposición. BN (células binucleadas), PA (puentes anafásicos), PR (núcleo periférico), NP (núcleo picnótico), CA (células alargadas), CL (cariolisis). *: Diferencias significativas en la concentración del 80% a las 72 horas de exposición en los químicos Lorsban, Dithane y mezcla, con un valor P inferior al nivel de significancia (p = 0,020).

La citotoxicidad evaluada con el índice mitótico (IM), se muestra en la Tabla N^o 2 donde los valores más altos se presentan en todas las concentraciones a las 72 horas en todos los tratamientos al compararlos con el control y los más bajos en Dithane en las concentraciones de 40%, 60% y 80% a las 12 y 24 horas. En Lorsban a las 12 y 24 horas en todas las concentraciones y en la mezcla a las 48 y 72 horas en las concentraciones 60% y 80% se observa una disminución del IM. Se aplicaron pruebas Post-hoc para establecer entre qué químicos se encuentran las diferencias significativas y se determinó que para el número de anormalidades estas existen entre: Dithane y Lorsban ($p=0,011, p<0,05$), Dithane y control negativo ($p=0,000, p<0,05$), Lorsban y mezcla ($p=0,008, p<0,05$), Lorsban y control negativo ($p=0,001, p<0,05$) mezcla y el control negativo ($p=0,000, p<0,05$).

Genotoxicidad.

La figura N^o. 7a el eje de la X representa el tiempo evaluado en horas de los dos químicos, la mezcla y el control negativo y el eje de la Y el número de micronúcleos en 1000 células después del tiempo de tratamiento. La figura N^o. 7b muestra las concentraciones de los diferentes tratamientos en relación con el número de micronúcleos por 1000 células representados sobre el eje Y.

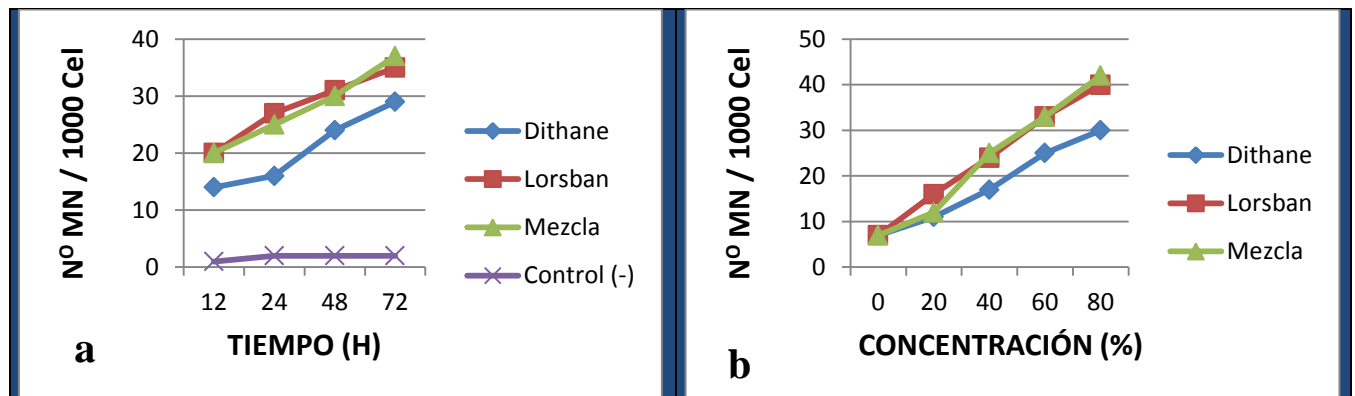


Figura 7. Gráfico comparativo entre el tiempo y la concentración con el número de micronúcleos. a (N^o de micronúcleos / 1000 células Vs tiempo de exposición), b (N^o de micronúcleos / 1000 células Vs concentración).

En las dos graficas se puede observar que a medida que aumenta el tiempo y la concentración hay un incremento en el número de micronúcleos, el químico Dithane presenta una genotoxicidad menor que el pesticida Lorsban y la mezcla viéndose un marcado efecto dosis respuesta al compararlos con el control.

En la Tabla N^o 3 se muestra que el mayor promedio de micronúcleos se presentó en la mezcla de los pesticidas en la concentración del 80% a las 72h con un promedio $9,25 \pm 3,86$ seguido del pesticida Lorsban con un promedio $8,75 \pm 3,50$ en la misma concentración y tiempo al compararlos se observó el control negativo el cual fue de $1,75 \pm 0,50$. Lo que se muestra es que el índice de genotoxicidad entre la mezcla y Lorsban es muy similar a la más alta concentración. Al aplicar pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis se observa que no existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones y tiempos de exposición de los dos químicos y la mezcla ya que los P-valores en todos los casos son superiores al valor de significancia ($P > 0,05$).

Se aplicaron pruebas post-hoc para establecer entre qué químicos se encuentran las diferencias significativas y se determinó que para el número de micronúcleos las diferencias existen entre Lorsban y control negativo ($p=0,009$, $p<0,05$), Mezcla y control negativo ($p=0,010$, $p<0,05$).

Concentración % Químicos	Tiempo (h)	Número de micronúcleos	Promedio ± DE		
			Concentración	Tiempo	
DITHANE					
20	12	2	2,75 ±,96	12	3,50±1,29
	24	2			
	48	3			
	72	4			
40	12	3	4,25±1,50	24	4,00±1,83
	24	3			
	48	5			
	72	6			
60	12	4	6,25±2,22	48	6,00±2,58
	24	5			
	48	7			
	72	9			
80	12	5	7,50±2,38	72	7,25±2,75
	24	6			
	48	9			
	72	10			
TOTAL		83			
LORSBAN					
20	12	3	4,00±0,82	12	5,00±1,83
	24	4			
	48	4			
	72	5			
40	12	4	6,00±1,41	24	6,75±2,22
	24	6			
	48	7			
	72	7			
60	12	6	8,25±1,71	48	7,75±2,99
	24	8			
	48	9			
	72	10			
80	12	7	10,00±2,58	72	8,75±3,50
	24	9			
	48	11			
	72	13			
TOTAL		113			
MEZCLA					
20	12	2	3,00±,82	12	5,00±2,58
	24	3			
	48	3			
	72	4			
40	12	4	6,25±2,22	24	6,25±2,99
	24	5			
	48	7			
	72	9			
60	12	6	8,25±2,22	48	7,50±3,42
	24	7			
	48	9			
	72	11			
80	12	8	10,50±2,08	72	9,25±3,86
	24	10			
	48	11			
	72	13			
TOTAL		112			
CONTROL NEGATIVO (-)	12	1	1,75±0,50	12	1,00 ± 0
	24	2		24	2,00 ± 0
	48	2		48	2,00 ± 0
	72	2		72	2,00 ± 0
	TOTAL	7			

Tabla N_o 3. Promedios de micronúcleos observados en las diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

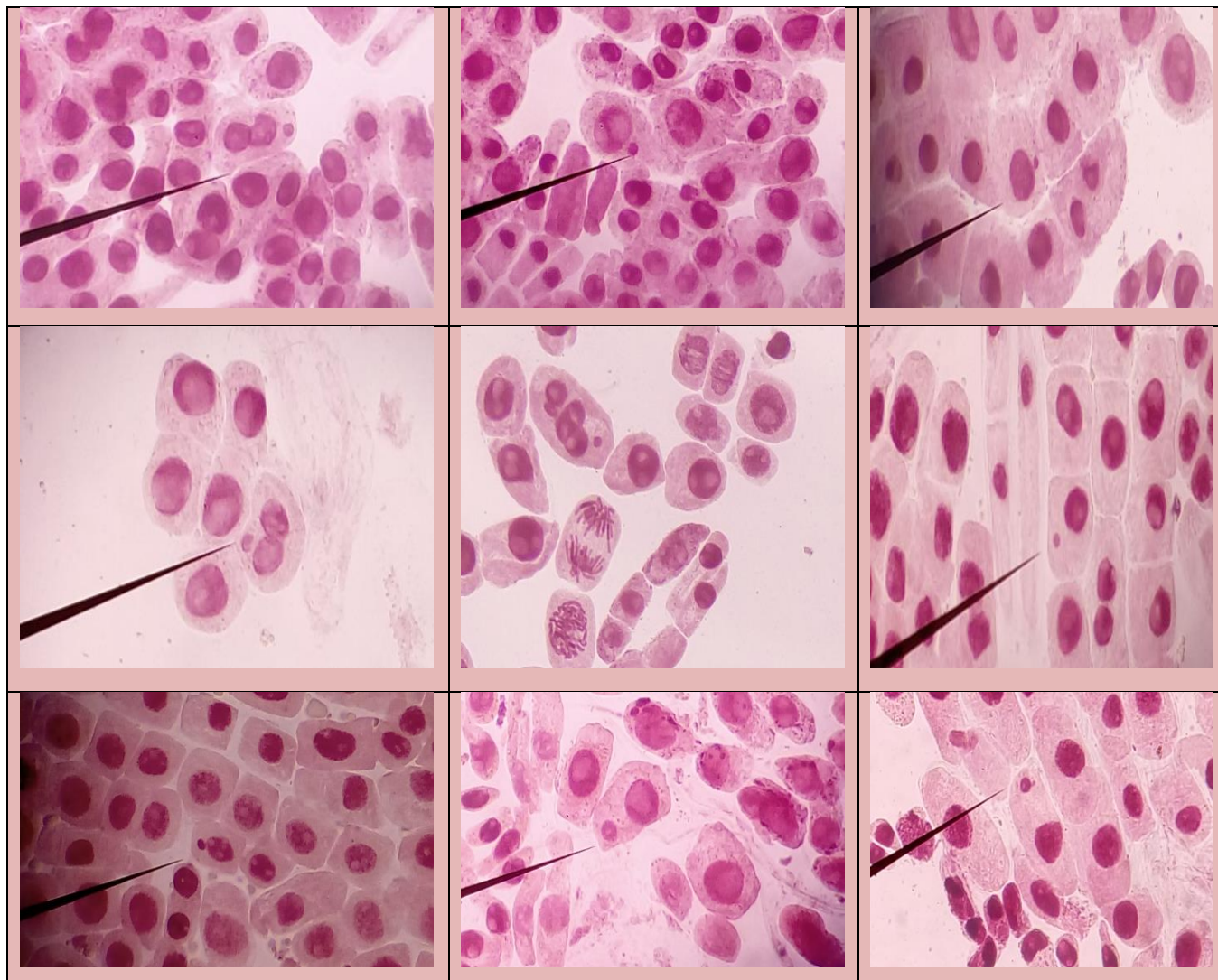


Figura 8. Micronúcleos (MN) observados en las diferentes concentraciones y tiempos de exposición en 40 X.

Exposición laboral.

La Figura N^o 9 el eje de la X representa el tiempo de exposición evaluado en años de cultivadores de papa con un período mínimo de dos años y el control negativo de personas no expuestas, con hábitos saludables; el eje de la Y el número de micronúcleos en 1000 células de la mucosa epitelial de los trabajadores expuestos a los químicos Dithane, Lorsban y la mezcla.

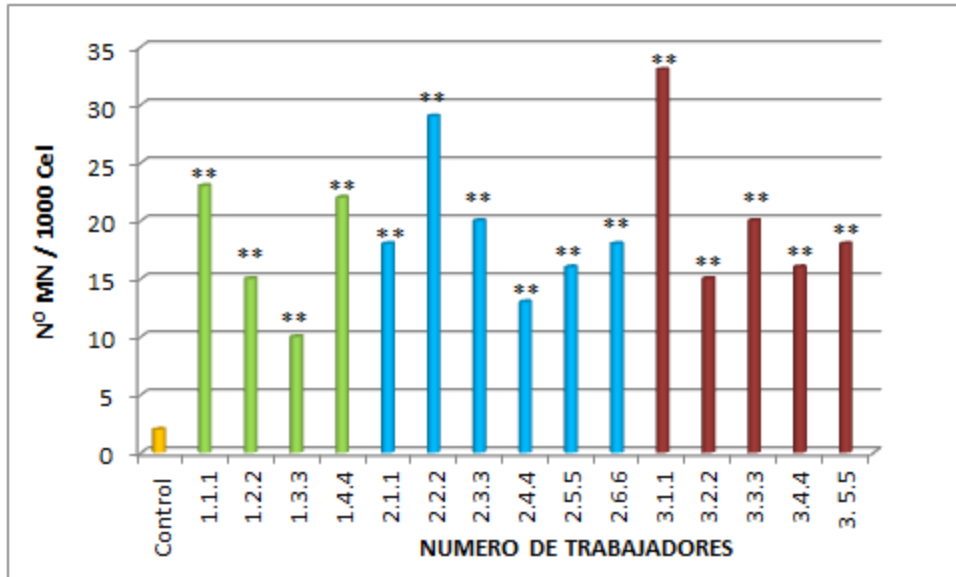


Figura 9. Número de micronúcleos por exposición laboral en cultivadores de papa expuestos a los plaguicidas. ** Diferencia altamente significativa respecto al control negativo, (P=0,000; P<0,05).

Lo que se puede observar en la gráfica es que el número de micronúcleos no siempre es directamente proporcional al tiempo de exposición, ya que la presencia del índice de MN está relacionado no sólo con la exposición a los agroquímicos sino a los hábitos de vida que tienen los trabajadores. Características que se tuvieron presentes para el análisis de los resultados, lo cual se verificó en la encuesta aplicada.

En la Tabla N_o 4 se puede observar que el 20% de las personas muestreadas presentaron el mayor número de micronúcleos con un rango entre 23 a 33 micronúcleos, el número menor de micronúcleos se presentó en el 26% de las personas muestreadas con un rango de 10 a 15 micronúcleos, el resto de las personas muestreadas es decir el 53% presentaron un rango entre 16 a 22 micronúcleos, estos resultados difieren al compararlos con el control en el que se observó un promedio de 2 micronúcleos.

Con la prueba estadística T2 de Tamhane de comparaciones múltiples diferencias se determinó que existen diferencias altamente significativas entre las personas expuestas laboralmente y el control negativo con un valor de $P=0,000$; $P<0,05$, como se muestra en la Figura 9.

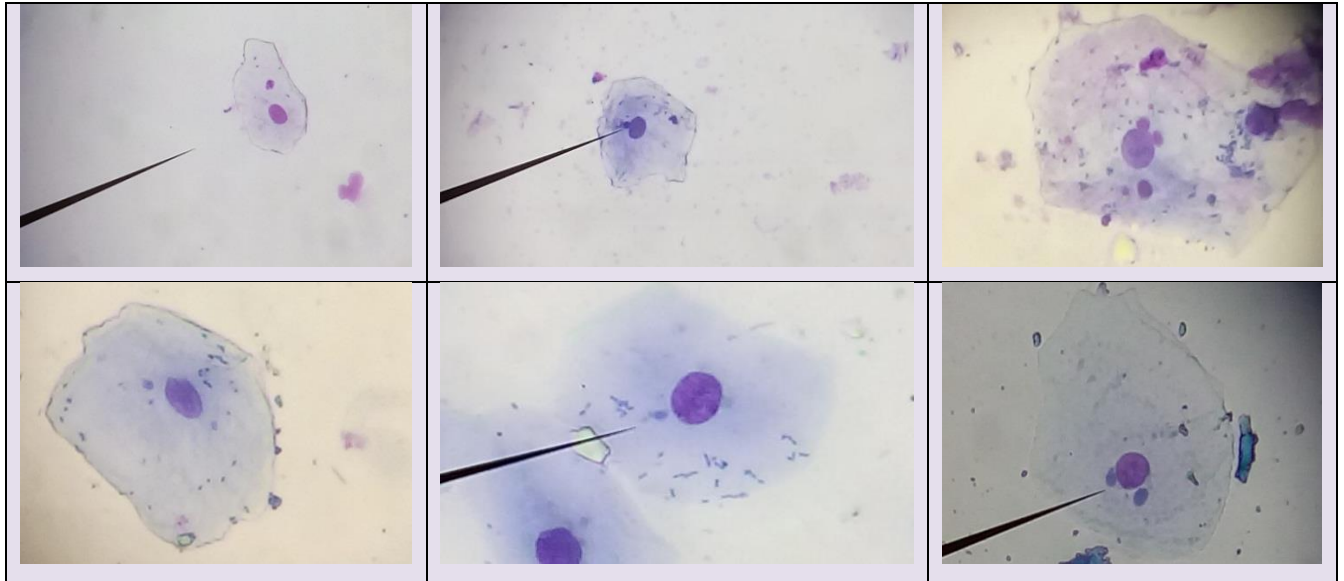


Figura 10. Micronúcleos por exposición laboral. Muestras de 15 trabajadores expuestos a los plaguicidas Lorsban, Dithane y mezcla observado en 40 X.

Veredas	Código	N ^o Total Micronúcleos	Promedio \pm DE Micronúcleos
Chíchira	1.1.1	23	$7,67 \pm 2,52$
	1.2.2	15	$5 \pm 1,73$
	1.3.3	10	$3,33 \pm 0,58$
	1.4.4	22	$7,33 \pm 1,15$
Monte Adentro	2.1.1	18	6 ± 2
	2.2.2	29	$9,67 \pm 3,51$
	2.3.3	20	$6,67 \pm 2,31$
	2.4.4	13	$4,33 \pm 0,58$
	2.5.5	16	$5,33 \pm 2,08$
	2.6.6	18	$6 \pm 2,65$
El Rosal	3.1.1	33	$11,00 \pm 1,00$
	3.2.2	15	$5,00 \pm 1,00$
	3.3.3	20	$6,67 \pm 3,21$
	3.4.4	16	$5,33 \pm 1,53$

	3. 5.5	18	6,00±2,00
Control	0.1.1	4	1,33±0,58
	0.2.2	2	0,67±0,58
	0.3.3	1	0,33±0,58
	0.4.4	1	0,33±0,58
	0.5.5	2	0,67±0,58

Tabla N^o 4. Promedios de micronúcleos por exposición laboral en personas muestreadas en las diferentes veredas comparadas con el control negativo. El 20% de las personas muestreadas presentaron el mayor número de micronúcleos con un rango entre 23 a 33 micronúcleos, el número menor de micronúcleos se presentó en el 26% de las personas muestreadas con un rango de 10 a 15 micronúcleos y el 53% restante presentaron un rango entre 16 a 22 micronúcleos.

7. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los métodos estandarizados tanto de toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad aplicados en *Allium cepa* constituyen la prueba de elección para este tipo de monitoreo entre las diferentes posibilidades que utilizan plantas vasculares (Fiskesjo, 1993). En la literatura se muestra que los valores basales propios de los controles para distintos parámetros evaluados mediante la prueba de *Allium cepa*, tales como el índice mitótico (IM), frecuencia de alteraciones y frecuencia de micronúcleos (MN), presentan una importante variabilidad. Esta variabilidad es el reflejo de las diferentes condiciones experimentales en las que se realizan los ensayos.

La estimulación del crecimiento de las células del bulbo de cebolla (*Allium sp.*) permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando es expuesta a sustancias químicas la división celular de los meristemas radicales puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y, por tanto, su elongación.

La cuantificación del efecto tóxico se puede realizar mediante la comparación de la longitud de las raíces y el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces expuestas al compuesto.

Los resultados obtenidos por la exposición de las raíces de *Allium cepa* a los químicos Lorsban, Dithane y la mezcla muestran el efecto tóxico de estos compuesto sobre los procesos de crecimiento de la raíz mostrando una relación dosis respuesta. Las concentraciones diferentes de la mezcla evaluada inhibe el crecimiento de la raíz en más del 50 % con respecto al control. A medida que las células meristemáticas se dividen, parte de éstas pasan a formar el tejido de elongación. En dicho tejido, las células ya no se dividen y se alargan por debilitamiento de la pared celular y ordenamiento de microfibrillas de celulosa, como se pudo observar en el crecimiento de las raíces tratadas con los químicos y reportado por otros investigadores (Pedregosa et al., 2005). Es así que la raíz crece por contribución de dos procesos, la división mitótica en el meristema, que permite la proliferación de las células y el aporte a los nuevos tejidos y el alargamiento de las células, cuando pasan a formar el tejido de elongación. En la Fig.4 se puede observar que la toxicidad de Lorsban y la mezcla son muy parecidos, aunque Dithane muestra una toxicidad menor que la de Lorsban sin embargo probablemente el efecto sinérgico con el Dithane multiplica la acción tóxica de la mezcla (Raimondo, 2007). La cuantificación del efecto se realiza considerando dos respuestas: estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces expuestas al compuesto, respecto a la longitud promedio de las raíces con el control y con el diagnóstico microscópico, para establecer el índice mitótico y las anormalidades cromosómicas que se presentaron.

Los niveles de citotoxicidad de los compuestos evaluados fueron determinados por el incremento o decrecimiento en el índice mitótico (IM) usado como parámetro de citotoxicidad en estudios de biomonitoreo ambiental (Fernandes et al., 2007).

El IM se define como el número de células por unidad (100) que sufren mitosis durante un determinado período de tiempo de exposición y se utiliza principalmente como estimación de la

velocidad del crecimiento tisular. En términos generales, valores del IM inferiores al valor del control negativo (agua) indican alteraciones inhibitorias, derivadas de las sustancias químicas utilizadas en el ensayo. Caso contrario, valores del IM superiores al control negativo indican un incremento en la división celular, mostrando un desorden en la proliferación, evidenciando que la sustancia química tiene el potencial para formación de tejido tumoral (Lobo & Bolaños, 2014).

Nuestros resultados del IM para evaluar citotoxicidad son mostrados en la Tabla N_o 2, en todos los tratamientos de los químicos y la mezcla, en los dos primeros tiempos el IM fue menor que el control negativo por lo que se ve el efecto de los químicos sobre el crecimiento y desarrollo del meristemo de *Allium cepa*, mientras que en las concentraciones más altas y en el mayor tiempo de exposición hubo un incremento en el IM, solo fue significativo a la concentración del 80% en la mezcla, que puede ser manifiesto por el detrimento de las células, indicando una acción tóxica y destructiva en las células meristemáticas de la raíz de cebolla, demostrando una inducción a la apoptosis por estos compuestos químicos (Rank & Nielsen, 1997). Figura N_o 5 se manifiesta la relación concentración respuesta, antes referida en la citotoxicidad.

Este resultado se puede interpretar considerando que muchas células aberrantes mueren o quedan detenidas en interfase y que ello se refleja en la inhibición del IM. Dado que los resultados se expresan como número.

El estudio microscópico para evaluar la citotoxicidad a través de las figuras mitóticas como indicador del efecto de los químicos evaluados y la mezcla en el tejido meristemático de las células de la cebolla con el insecticida Dithane mostró que la mayoría de las células presentaron anomalías en todas las concentraciones y los tiempos de exposición, en la Tabla N_o 2 se relaciona la cantidad de figuras que se observaron, evidenciando una variedad de alteraciones de

los cromosomas que pueden sufrir las estructuras genéticas tanto por agentes químicos como físicos .

En nuestra investigación, Tabla N° 2 Figura 6 los resultados también muestran diferentes tipos de alteraciones cromosómicas, en Lorsban y la mezcla. La prueba estadística Post-hoc determinó que existe diferencias significativas para el número de anormalidades entre: Dithane y Lorsban ($p=0,011$, $p<0,05$), Dithane y control negativo ($p=0,000$, $p<0,05$), Lorsban y mezcla ($p=0,008$, $p<0,05$), Lorsban y control negativo ($p=0,001$, $p<0,05$) mezcla y el control negativo ($p=0,000$, $p<0,05$).

El efecto del compuesto Lorsban fue muy diferente a Dithane, como se observa en la Tabla N_o 2. La frecuencia mayor, de alteraciones nucleares: células binucleadas, células en cariólisis, células picnóticas y otras, indican alteración en la citoquinesis y muerte celular. Mientras que en Lorsban no se observó células picnóticas, la significancia biológica de las células picnóticas y el mecanismo de formación es desconocido, puede ser un mecanismo alternativo de desintegración nuclear diferente a las otras figuras mitóticas observadas con el Dithane (Kumar & Panneerselvam, 2008). Esto implica que el tejido fue dañado a nivel cromosomal y que hubo quiebre cromosómico y alteraciones en el uso mitótico representado en anormalidades tales como picnosis, cariólisis y otros brotes nucleares. De acuerdo a Tolbert et al (1992), la picnosis está asociada con citotoxicidad (necrosis y queratinización) y genotoxicidad, mientras que la cariólisis solamente está relacionada con citotoxicidad. En contraste los otros brotes nucleares están relacionados con quiebres anafásicos, el cual ocurre como resultado de alteraciones cromosómicas, sin embargo el origen nuclear de los brotes y su significancia son desconocidos (Titenko et al., 1997).

Otros trabajos muestran que las alteraciones nucleares como yemas nucleares y/o picnosis, entre otras han sido producidas en *Allium cepa* con: metacid-50 (Pandey et al., 1994), blitox (Anirban Paul, 2013), DDVP y glifos (Findikli & Türkoğlu, 2010), endosulfán y furadán (Ananthakrishnan et al., 2013), gramoxone (El-Abidin Salam et al., 1993) y trifluralín (Fernandes et al. 2007). Daños similares son producidos por fenitrotión y fenpropatríen Vicia faba (Bu et al., 2011) y por fusilade en *Lens culinaris* (Aksoy et al., 2008).

La aglutinación cromosómica es otro efecto, además de cromosomas pegajosos, Çavuşoğlu et al. (2012a) describen la inducción de contracción cromosómica por el insecticida cipermetrina en *Allium cepa*. Los mismos efectos son encontrados con los herbicidas fuzila de ppoog, herbstop, treflán y U-46 en Vicia faba (Shahin & El-Zahrini, 1993).

En términos generales, las ACs (anormalidades celulares) como puentes y rompimientos, indican acciones clastogénicas, mientras que las ACs como cromosomas errantes o perdidos, mutilaciones, cromosomas pegajosos, multipolaridad y C-metáfase, resultan de efectos aneugénicos Figura 6. Cuando las alteraciones morfológicas causadas por la acción de los agentes químicos ocurren en la interfase nuclear se llaman aberraciones nucleares. Generalmente, estas alteraciones se manifiestan principalmente como núcleos lobulados, núcleos desplazados, polinúcleos y micronúcleos (Nikoloff, 2013). Teniendo en cuenta lo anterior, el ensayo en esta investigación consistió en el diagnóstico al microscopio de las ACs, con los químicos evaluados y la mezcla.

Para el criterio de evaluar la genotoxicidad de los insecticidas estudiados y la mezcla con el índice de MN, se tuvo en cuenta que el aumento de la frecuencia de micronúcleos es un indicio de que las células se desprendieron de parte del material genético. En el contexto de los resultados obtenidos, el material genético contenido en los micronúcleos podría estar constituido por

cromosomas rezagados o por ADN en exceso que es extruido de la célula (Lindberg et al., 2007; Fernández et al., 2007). La formación de MN puede ser resultado de daños directos a los cromosomas o alteraciones al huso y al aparato mitótico (Çavuşoğlu et al. 2012a).

En algunos casos el tamaño de los MN puede ser un criterio efectivo para evaluar los efectos clastogénicos y aneugénicos de los compuestos. Los MN grandes pueden indicar un efecto aneugénico como resultado de la pérdida de un cromosoma completo, mientras que los MN pequeños pueden indicar una acción clastogénica ya que son el resultado de fragmentos cromosómicos. Sin embargo, otras técnicas citogenéticas, tales como el bandeo cromosómico (bandas-C, fluorocromos NOR y base-específicos) y la hibridación in situ (FISH), pueden ser aplicadas para hacer el análisis más seguro y adecuado (Leme & Morales 2009).

Se evaluó el efecto genotóxico del Dithane, Lorsban y la mezcla, los resultados mostraron que en la mezcla se presentó un mayor índice de genotoxicidad, como se observa en la figura 7 y la Tabla N^o 3. Aunque no hay diferencias significativas entre lo químicos evaluados y la mezcla, se puede observar que el índice de MN de Lorsban y la mezcla comparado con el control negativo, aumentan con la concentración y el tiempo de exposición; estableciéndose un efecto dosis respuesta. Los resultados obtenidos del efecto genotóxico de la mezcla ($9,25 \pm 3,86$) puede ser aditivo por Lorsban sobre el Dithane, ya que este último muestra que tiene un metabolismo rápido y los procesos de biotransformación se evidencian cuando se mezclan los dos químicos. (Córdoba, 2001). Hay que señalar que en compuestos organofosforados como Lorsban, el grupo fosforilo es un sitio electrofílico potencial que puede reaccionar con el ADN y su grupo alquilo tiene la capacidad de interaccionar con centros nucleofílicos de la molécula. De este modo, el clorpirifos

podrían estar actuando como agente alquilante (AA). Los AA pueden reaccionar con centros altamente nucleofílicos del ADN (átomos de nitrógeno) o poco nucleofílicos (átomos de oxígeno).

La alquilación de los oxígenos está relacionada con efectos mutagénicos y oncogénicos. La polaridad del fosforilo podría favorecer la unión de los plaguicidas al ADN, lo que lleva a la formación de aductos en la molécula que se traducen en rupturas cuando se realiza el ensayo cometa. La acción del clorpirifos sobre el ADN se caracteriza por la inhibición de la síntesis del ADN (Qiao et al., 2003).

Diversos estudios han empleado este biomarcador en diferentes sistemas vegetales, encontrándose resultados positivos con isoproturón (Chauhan & Sundararaman, 1990), tribunil (El-Khodary et al., 1990), paratión metílico y tri-miltox (Ahmad & Yasmin, 1992) en *Allium cepa*. Torres et al. (1992), *Allium cepa* (Pandey et al. 1994, Chauhan et al. 1999, Gömürgen 2000, Soliman 2001, Marcano et al. 2004, Chauhan & Gupta 2005, Yildiz & Arıkan 2008, Kaymak & Goc Rasgele 2009, Srivastava & Mishra 2009, Dragoeva et al. 2012 ditane M-45, diurón, diurón/deltametrina, esterán 48, fenbuconazole, fenitrotión, fenpropatrín, goal, hidrazida maleica, isoproturón/deltametrin).

La vida media de los organofosforados y sus productos de degradación es relativamente corta (horas o días). Su biotransformación se realiza principalmente a nivel hepático mediante oxidación, hidrólisis y conjugación, aunque las esterases plasmáticas pueden desempeñar un papel destacado en la exposición crónica.

Los agricultores de papa de la Provincia de Pamplona se encuentran expuestos a mezclas de distintos pesticidas, evidencias experimentales sugieren la existencia de un efecto genotóxico

producido por la exposición aguda o crónica; sin embargo, la información sobre genotoxicidad en seres humanos expuestos a mezclas de los mismos es limitada, particularmente en nuestra región donde se han hecho pocos estudios de exposición laboral. Varias investigaciones señalan que algunos plaguicidas causan mutaciones, daño sobre el ADN en poblaciones ocupacionalmente expuestas. El biomarcador de genotoxicidad empleado con mayor frecuencia es el ensayo de micronúcleos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas (World Health Organization 2012). Se han comprobado de manera fehaciente propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas en muchos de los más utilizados (International Agency For Research On Cancer (IARC) 1976, 1986, 1987,1991).

El estudio por exposición laboral reveló que tanto los trabajadores en contacto directo de las tres veredas evaluadas como aquéllos que se encontraban en contacto indirecto presentaban alteraciones en los parámetros analizados de número de MN en relación al grupo control. Además, se hizo el análisis de la influencia de los factores de confusión, como la edad, el sexo, tiempo de trabajo, el tabaquismo, el consumo de alcohol y la utilización del equipo de protección personal (EPP). Este resultado refuerza la relación entre la exposición a plaguicidas y el daño citotóxico y genotóxico. El promedio tan alto de MN de los agricultores 3.1.1 y 2.2.2 puede reflejar probablemente el tiempo de exposición o mejor el hecho que estuvieran expuestos desde muy temprana edad cuando eran adolescentes Tabla N° 4. El 20% de las personas presentaron el mayor número de micronúcleos con un rango entre 23 a 33 micronúcleos, con un promedio de edad de 41 años, tiempo de exposición de 24 años, ingerían alcohol y fumaban, El número menor de micronúcleos se presentó en un 26% con un rango de 10 a 15 micronúcleos, con un promedio de edad de 54 años, tiempo de exposición indirecta de 37 años, en su mayoría eran mujeres que no

fumaban ni consumían alcohol. El 53% restante presentaron un rango entre 16 a 22 micronúcleos, con un promedio de edad de 38 años, tiempo de exposición de 21 años, algunos fumaban y consumían alcohol. Como característica general todos los grupos no utilizaban EPP (Simoniello & col. 2008; Simoniello & col. 2010), ni habían consumido ningún tipo de medicamento en los últimos cuatro meses.

Estos resultados concuerdan con los estudios realizados en 259 trabajadores agrícolas de distintas zonas de La Paz, Bolivia, donde se evaluó el efecto genotóxico de la exposición ocupacional a pesticidas en LSP, a través de la frecuencia ICH, el índice de proliferación celular (PRI), la frecuencia de Mn, la presencia de AC y el daño al ADN medido con el EC. Se observó que los trabajadores agrícolas presentaron un aumento significativo en la frecuencia de ICH, Mn, AC e índice del EC en relación a los controles. Otros estudios muestran que las personas expuestas a plaguicidas tenían 1,49 veces más probabilidad de sufrir daño genotóxico que los no expuestos (Ascarrunz & col. 2006). En otra zona de La Paz, realizado por Poma y col. (2010) mostró que una población de 118 agricultores, expuestos a plaguicidas organofosforados, piretroides o sus mezclas, sin EPP, tenían mayores índices de daño al ADN y un aumento en la frecuencia de Mn en células del epitelio bucal.

Cabe destacar, que los agricultores de nuestra provincia constituyen un grupo de alto riesgo de exposición ocupacional y ambiental. Además, existe dificultad para la identificación de los efectos individuales de los plaguicidas, ya que frecuentemente se utilizan mezclas complejas, tanto por la aplicación de diferentes agentes químicos en simultáneo, como por la presencia de aditivos en formas comerciales (Coalova et al., 2013).

Adicionalmente, se corre el riesgo de contraer distintos tipos de cáncer, incluidos cáncer de piel y labio, cerebro, próstata, estómago, sistema linfopoyético (Partanen, Monge, & Wesseling, 2009), cáncer de ovario (Alavanja et al., 2005), y cáncer de mama (Weichenthal, Moase, & Chan, 2012) . El impacto de la exposición a plaguicidas sobre la Incidencia de Cáncer de mama de Costa Rica se asocia con la exposición ocupacional a plaguicidas (Mostafalou & Abdollahi, 2013). Recientemente, revisiones bibliográficas han recopilado una variedad de publicaciones que relacionan diferentes tipos de neoplasias: leucemia, mielomas, melanomas, cáncer de pulmón, colón, recto, páncreas, vejiga con los distintos grupos de plaguicidas, aunque algunos de estos estudios han diferido en la obtención de una conclusión definitiva (Santamaria, 2006). Es evidente la necesidad de armar baterías de ensayos que consideren varios niveles de distinta complejidad en distintos modelos y así poder tener una aproximación más precisa del daño genotóxico.

8. CONCLUSIONES

- Los bioensayos vegetales como la prueba con *Allium cepa*, constituyen sistemas de prueba eficientes y seguros para la evaluación rápida de la citotoxicidad y genotoxicidad de agentes químicos. Los grupos de plaguicidas más evaluados en sistemas vegetales son los organofosforados, seguidos por los carbamatos, los piretroides y las triazinas.
- La inducción de mutaciones o alteraciones genéticas son algunos de los diferentes impactos comúnmente conocidos de los plaguicidas. Como puede observarse en esta

investigación, la mezcla de los químicos evaluados son capaces de inducir más citotoxicidad y gentoxicidad que separadamente.

- El índice mitótico (IM) es uno de los parámetros importantes para evaluar sustancias químicas, ya que este nos permite estimar la velocidad del crecimiento tisular y así determinar si dichas sustancias están alterando el proceso normal de división celular. En términos generales, valores del IM inferiores al valor del control negativo (agua) indican alteraciones inhibitorias, derivadas de las sustancias químicas utilizadas en el ensayo. Caso contrario, valores del IM superiores al control negativo indican un incremento en la división celular, mostrando un desorden en la proliferación celular evidenciando una sustancia química con potencial para formación de daños.

- El ensayo de MN es una herramienta valiosa que permite de forma rápida y confiable, la detección de alteraciones en el material genético en biomarcadores biológicos *in vitro* expuestas a sustancias tóxicas como los plaguicidas. Es un método que ha sido validado internacionalmente.

- En cuanto a la exposición laboral y la frecuencia de MN, se observó una correlación positiva con el grupo no expuesto. Es una variable difícil de cuantificar. En el caso de exposiciones crónicas, los efectos que se observan son resultado de una exposición continua a diferentes compuestos y en concentraciones desconocidas, que se puede acumular en el organismo con diferentes manifestaciones sobre la salud.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir haciendo investigaciones sobre la toxicidad, genotoxicidad y citotoxicidad de las mezclas de los plaguicidas, ya que son pocos los estudios realizados en nuestra región y el efecto que causan la mezcla de los químicos en los trabajadores agrícolas es mucho mayor que el de los plaguicidas por separados, como se demostró en este trabajo.

Es necesario evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de la mezcla de los plaguicidas Lorsban, y Dithane con otros biomarcadores diferentes a *Allium cepa* con el fin de comparar resultados y así tener bases sólidas acerca de los efectos que la mezcla de estos plaguicidas causan tanto a nivel celular como genético.

Se debe seguir haciendo estudios en la población rural del Municipio de Pamplona ya que la mayor parte de sus habitantes se dedican a la agricultura y se encuentran expuestos a mezclas complejas, sin utilizar ningún elemento de protección personal.

Utilizar el ensayo de micronúcleo como biomarcador, es un método confiable, de gran sensibilidad para detectar daño del DNA, además es sencillo, la obtención de la muestra es mínimamente invasiva y su costo es bajo.

Es necesario que los entes gubernamentales, a través de la educación promuevan principios y prácticas para la gestión ambientalmente responsables de los plaguicidas químicos de uso agrícola en las veredas de la Provincia de Pamplona, abordando aspectos relacionados con el

almacenamiento, transporte, uso y manejo de sus residuos, orientados a lograr sustentabilidad, productividad responsable y competitividad del sector agrícola. Implementar charlas pedagógicas que concienticen a los agricultores sobre la importancia del uso racional de los plaguicidas y la utilización de elementos de protección al manipular estos químicos.

10. BIBLIOGRAFIA

Anirban Paul, S. N. and K. S. (2013). Cytological effects of Phosalone on root meristem of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 3(5), 2250–3153. <http://doi.org/10.1508/cytologia.54.429>.

Ascarrunz, M. E., Tirado, N., Gonzáles, A. R., Cuti, M., & Huici, O. (2006). Evaluación de riesgo genotóxico : biomonitorización de trabajadores agrícolas de Caranavi , Guanay , Palca y Mecapaca , expuestos a plaguicidas. *Cuadernos de Hospital de Clinicas*, 51(1), 7–18.

Ananthkrishnan M., Kumarasamy K. y Antony A.S. (2013). Genotoxic effects of furadan and endosulphan on (*Allium cepa*) root tips. *Asian J. Pharmac. Clin. Res.* 6: 126-131.

Aksoy O., Ekici N. y Dane F. (2008). Mitotic changes in root meristems of *Lens culinaris* treated with fusilade (fluazifop-p-buthyl). *Asian J. Cell Biol.* 3, 34-40.

Ahmad S. y Yasmin R. (1992). Effects of methyl parathion and tri-miltox on the mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia* 57, 155-160.

Alavanja MC, Sandler D, Knott C, Lubin J, Tarone R, Dosemeci M, et al. Cancer incidence in the Agricultural Health Study. *Scand J Work Environ Health*.2005;31:39–45.

AGRONET. (2014). *Sistema de Estadísticas Agropecuarias- SEA. Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*. Obtenido de <http://www.agronet.gov.co/Paginas/estadisticas.aspx>

Andrew R. Collins, A. A. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis vol. 23* , 143–151.

ATSDR, A. p. (1997). *Clorpirifo*. EE.UU.: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU.

Benachour, N., & Séralini, G. E. (2009). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22(1), 97–105. <http://doi.org/10.1021/tx800218n>.

Benítez-Leite S , Macchi ML , Fernández V , Franco D , Ferro EA , Mojoli A, C. F., & Alfonso J, S. L. (2010). Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas (Cell Damage in a Pediatric Population Potentially Exposed to Pesticides) | Luciana Isabel Sales - Academia.edu. *Pediatría. (Asunción)*, 37, 97–106. Retrieved from http://www.academia.edu/488138/Dano_celular_en_una_poblacion_infantil_potencialmente_expuesta_a_pesticidas_Cell_Damage_in_a_Pediatric_Population_Potentially_Exposed_to_Pesticide

s_

Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A. R., & Battershill, J. M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: A review. *Mutagenesis*, 21(2), 93–103. <http://doi.org/10.1093/mutage/ge1011>.

Bu N., Wang S.H., Yu C.M., Zhang Y., Ma C.Y., Li X.M. y Ma L.J. (2011). Genotoxicity of fenpropathrin and fenitrothion on root tip cells of *Vicia faba*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 517-521.

Budnik, X. B. (2009). The Assessment of Environmental and Occupational Exposure to Hazardous Substances by Biomonitoring. *Deutsches Arzteblatt International* , 91–97.

Buitrago, J. C., González, S. C., Vera, M. E., & Ramírez., E. C. (2014). Contaminación de Operarios con Clorpirifos, por Práctica de “Embolsado” de Banano (*Musa sp.*) en Urabá, Antioquia. *Revista Luna Azul*, núm. 38 , 191-217.

Coalova, I., Mencacci, Santiago, & Fassiano, A. V. (2013). Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes? Pesticide mixtures genotoxicity: More than the sum of its parts? *Acta Toxicol. Argent*, 21(1), 5–14.

CONABIO. (2002). *Solanum tuberosum*. *Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad*, 1–27.

Córdoba-Pedregosa, M. D. C., Villalba, J. M., Córdoba, F., & González-Reyes, J. A. (2005).

Changes in intracellular and apoplastic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation induced by enhanced ascorbate content in *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany*, 56(412), 685–694. <http://doi.org/10.1093/jxb/eri051>.

Córdoba D, Toledo D. Cocaína y base de cocaína. Basuco. En: Córdoba D. Bogotá “Toxicología”. ed Editorial El Manual Moderno. 2001: 445-449.

Çavuşoğlu K., Kaya A., Yılmaz F. y Yalçın E. (2012a). Effects of cypermethrin on *Allium cepa*. *Environ. Toxicol.* 27, 583-589.

Cui, Y., Guo, J., Xu, B., & Chen., Z. (2011). Genotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin to ICR mouse hepatocytes. *Toxicol Mech Methods.* , 70-4.

Chauhan L.K.S., Saxena P.N. y Gupta S.K. (1999). Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environ. Exp. Bot.* 42, 181-189.

Chauhan L.K.S. y Gupta S.K. (2005). Combined cytogenetic and ultrastructural effects of substituted urea herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Pest. Biochem, Physiol.* 82, 27-35.

Chauhan L.K.S. y Sundararaman V. (1990). Effect of substituted ureas on plant cells I. Cytological effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium cepa* L. *Cytologia* 55, 91-98.

Chhabra, R. S., Eustis, S., Haseman, J. K., Kurtz, P. J., & Carlton, B. D. (1992). Comparative carcinogenicity of ethylene thiourea with or without perinatal exposure in rats and mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 18(3), 405-417. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590\(92\)90139-9](http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590(92)90139-9).

DANE. (2013). El cultivo de la papa, *Solanum tuberosum* Alimento de gran valor nutritivo, clave en la seguridad alimentaria mundial. *Boletín Mensual Insumos Y Factores Asociados a La Producción Agropecuaria*, 15, 92.

Daniel G. Fernández A., L. C. M. y D. C. F. . (2010). Intoxicación por organofosforados. *Semergen*, 33(1), 21–23. [http://doi.org/10.1016/S1138-3593\(07\)73839-X](http://doi.org/10.1016/S1138-3593(07)73839-X).

Dragoeva A., Koleva V., Hasanova N. y Slanev S. (2012). Citotoxic and genotoxic effects of diphenyl-ether herbicide GOAL (oxyfluorfen) using the *Allium cepa* test. *Res. J. Mutag.* 2, 1-9.

Demsia, G., Vlastos, D., Goumenou, M., & Matthopoulos., D. P. (2007). Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* , 32–39.

El-Abidin Salam A.Z., Hussein E.H.A., El-Itriby H.A., Anwar W.A. y Mansour S.A. (1993). The mutagenicity of gramoxone (paraquat) on different eukaryotic systems. *Mutat. Res.* 319, 89-101.

El-Khodary S., Habib A. y Haliem A. (1990). Effects of the herbicide tribunil on root mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia* 55, 209-215.

Elena Murgia, M. B. (2008). Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutation Research* , 27-34.

EPA., E. P. (1992.). *Ethylene bisdithiocarbamates (EBDCs); Notice of intent to cancel and conclusion of Special Review. Federal Register US GAO*. Washington.: 7434-7530.

EVANS HJ, N. G. (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology* , 216-229.

Espinoza F., Palacio S., Módenes A., Szymanski N., Silva N., Rizzutto A. 2007. Toxic effects on the *Allium cepa* L. roots by Cr⁶⁺-doped river waters. Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Activity Report.

FAO. (2008). La papa. *División de Producción Y Protección de La FAO*, 13.

Fernandes, T.C.C., D.E.C. Mazzeo & M.A. Marin-Morales (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88: 252-259.

Findikli Z. y Türkoğlu Ş. (2010). Glyphos ve DDVP' nin *Allium cepa* L.' da Mitoz Bölünme ve Kromozomlar. Üzerine Etkisi. *Fen Bilimleri Dergisi*. 31, 49-62.

Fernández, D. G., Mancipe, L. C., & Fernández., D. C. (2010). Intoxicación por Organofosforados. *fac. med* , 84-92.

Feretti D., Zerbini I., Zani C., Ceretti C., Moretti C., Monarca S. 2007. *Allium cepa* chromosome abberation and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Additives and Contaminants*. 24 (6): 561-572.

Frainer M., Ferreira C., Scotti T., Bosio S. 2006. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. *Genetics and Molecular Biology*. 29: 539-542.

Geirid Fiskesjö. The allium test in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology*. 1993; Volume 8, Issue 3: Pages 291–298.

Geirid Fiskesjö. *Allium* test in front of video display units. *Hereditas*, 1988; Volumen 108, Issue 2: Pages 239–242.

Geirid Fiskesjö. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 1985; Volumen 102, Issue 1: Pages 99–112.

Graham SL, D. K. (1975). Effects of prolonged ethylene thiourea ingestion on the thyroid of the rat. *Food Cosmet Toxicol.* , 493-9.

Gömürgen A.N. (2000). Cytological effect of the herbicide 2, 4-D isooctylester 48% on root mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia* 65, 383-388.

Grant W. 1978. Chromosome Aberrations in Plants as a Monitoring System. *Environmental Health Perspectives*. 27: 37-43.

Grant W. 1982. Chromosome aberration assays in *Allium* A report of the US Environmental Protection Agency gene tox program. *Mutation Research*. 99: 273–291.

George, J., & Shukla, Y. (2011). Pesticides and cancer: Insights into toxicoproteomic-based findings. *Journal of Proteomics*, 74(12), 2713-2722. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.024>.

Garte S. y Bonassi S. (2005). Linking toxicology to epidemiology: biomarkers and new technologies-Special issue overview. *Mutat. Res*. 592, 3-5.

Hale, J. A., & California State University, F. D. o. B. (2010). *Proteomic Evaluation of Pesticide-resistant Breast Cancer Cell Lines*: California State University, Fresno.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some carbamates, thiocarbamates and carbazides. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, Lyon, 1976:282.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some halogenated hydrocarbons and pesticide exposures. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Lyon, 1986:434.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, 1987;1 a 42:440.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Occupational exposures in insecticide application and some pesticides. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Lyon, 1991:612.

Kapka-Skrzypczak, L., & , Małgorzata Cyranka , Maciej Skrzypczak, M. K. (2011). Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure - state of the art. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 18(2), 294–303.

Kisby, G. E., Muniz, J. F., Scherer, J., Lasarev, M. R., Koshy, M., Kow, Y. W., & McCauley, L. (2009). Oxidative Stress and DNA Damage in Agricultural Workers. *Journal of Agromedicine*, 14(2), 206-214. doi: 10.1080/10599240902824042.

Harrison Brody A, C. E.-S. (2013.). Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. *Neurotoxicology*. , 74-81.

Kumar, L. P., & Panneerselvam, N. (2008). Toxic Effects Of Pesticides : A Review On

Cytogenetic Biomonitoring Studies Cytogenetic biomonitoring studies The large majority of cytogenetic monitoring studies, *15*(2), 46–50.

Kaymak F. y Goc Rasgele P. (2009). Genotoxic effects of raxil on root tips and anthers of *Allium cepa* L. *Caryologia* 62, 1-9.

Kackar R, S. M. (1997). Studies on rat thyroid after oral administration of mancozeb: morphological and biochemical evaluations. *J Appl Toxicol.* , 369-75.

Konuk M., Liman R., Cigerci I. 2007. Determination of Genotoxic effect of Boron on *Allium cepa* root meristemático cells. *Pakistan Journal of Botany.* 39(1): 73-79.

Larrea, M., Tirado, N., & Ascarrunz, M. E. (2010). Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. *Biofarbo*, 18(2), 31–43.

Lobo, T. M., & Bolaños, A. (2014). Micronúcleos: Biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*, 18(2), 18–26.

Lindberg S1, Bullock R, Ebinghaus R, Engstrom D, Feng X, Fitzgerald W, Pirrone N, Prestbo E, Seigneur C; Panel on Source Attribution of Atmospheric Mercury. A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. *Ambio.* 2007 Feb; 36(1):19-32.

Leme D.M. y Marin-Morales M.A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring, A review on its application. *Mutat. Res.* 682, 71-81.

Lee WJ, B. A. (2004). Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. *J Natl Cancer Inst.* , 1781-9.

Letty Marcano, Xiomara Montiel, Ingrid Carruyo, Mariadel Pilar Bracho Y Lorena Atencio. Efecto Mitotóxico Y Genotóxico El Cadmio En Celulas Meristemáticas De Cebolla (*Allium Cepa L.*). *Ciencia* 6 (2), 93 - 99, 1998. Maracaibo, Venezuela.

M. Von Ledebur, W. S. (1973). The micronucleus test methodological aspects. *Mutation Research* , 109-117.

Miranda-Contreras L, D.-O. R.-D.-C.-P. (2005). Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse cerebellar cortex. *Brain Res Dev* , 19-27.

Moretti M., V. M.-S. (2000). Pesticide-induced primary DNA damage in peripheral blood leukocytes of farm workers evaluated by the computerized comet assay. *Biomarkers*. 192-204.

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

Minasi¹, L. B., , E.O.A. Costa^{1, 3} , D.M. Silva^{3, 4}, C. O. A. M., Almeida³, J. G. de , T.C. Vieira^{1, 2, 3} , R.L. Silva Júnior^{1, 3} , C.L.Ribeiro^{2, 3} , C.C. da Silva^{2, 3}, and, & Cruz, A. D. da. (2011). Cytogenetic damage in the buccal epithelium of Brazilian aviators occupationally

exposed to agrochemicals. *Genetics and Molecular Research*, 10(4), 3924–3929.
<http://doi.org/10.4238/2011.December.12.5>

ML Larramendy, N Nikoloff, C. R. de A. and S. S. (2014). Genotoxicity and Cytotoxicity Exerted by Pesticides in Different Biotic Matrices-An Overview of More Than a Decade of Experimental Evaluation. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 4(4).
<http://doi.org/10.4172/2161-0525.1000225>.

Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157–177.
<http://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>.

Marcano L., Carruyo I., Del Campo A. y Montiel X. (2004). Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. *Environ. Res.* 94, 221-226.

Mustafa Y., Suna E. 2008. Destroy Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia*. 61(1): 45-52.

McClintonck B (1938), The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring- shaped chromosomes. *Genetics* 23: 315-376.

Nikoloff, N. (2013). Genotoxicidad de herbicidas de importancia agroeconómica en Argentina, 6–151.

Nasuti, C., Falcioni, M. L., Nwankwo, I. E., Cantalamessa, F., & Gabbianelli, R. (2008). Effect of permethrin plus antioxidants on locomotor activity and striatum in adolescent rats. *Toxicology*, 251(1–3), 45-50. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2008.07.049>.

Organización World Health. (2012). *Report 2012*. <http://doi.org/10.2853/54866>.

Partanen, T., Monge, P., & Wesseling, C. (2009). Revisión Causas y prevención del cáncer ocupacional. *Acta Médica Costarricense*, (1), 195–205.

Ojha A., Y. S. (2013). Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and in mixture, in rat tissues. *Environ Toxicol.* , 543-52.

OLCA, O. L. (1999.). *Plaguicidas con solicitudes de prohibición y de severa restricción*. Chile.

Organization World Health, (2012). *Pesticides*. Germany.

Olusegun S., Fidelia I., Odeigah P. 2010. Cytogenotoxicity evaluation of two industrial effluents using *Allium cepa* assay. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 4(1): 021-027.

Pandey, H.D., Tripathi, G. and Tripathi, V.K. (1994). Growth of a spike on a Gaussian radio wave in the lower ionosphere. *Journal of Geophysical Research* 99: doi: 10.1029/93JA01770. issn: 0148-0227.

Poma M.L., Tirado Bustillos N., Ascarrunz M.E. Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. *Biofarbo*. 2010;18(2):31-43.

Paro R, T. G. (2012). The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* , 155-61.

Paul R. Andreassen, A. D. (2004). ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev.* , 1958–1963.

Poletta, G. L., Kleinsorge, E., Paonessa, A., Mudry, M. D., Larriera, A., & Siroski., P. A. (2011). Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 852–859.

Peña C., Añez B., Dávila M. 1999. Respuesta de la cebolla (*Allium cepa* L.) a la aplicación de azufre, magnesio, cinc y boro en un suelo alcalino. *Revista Forestal Venezolana*. 43(2): 173-182.

Qiao ShiYan; Li DeFa; Jiang JianYang; Zhou HongJie; Li JingSu; Thacker, P. A., 2003. Effects of moist extruded full-fat soybeans on gut morphology and mucosal cell turnover time of weanling pigs . *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 16 (1): 63-69.

Qinghua Shi & Randall W. King., 2005 Cell biology: Nondisjunction, aneuploidy and tetraploidy (Reply). *Nature Cell Biology* News and Views.

Raimondo, J. (2007). Dosis , Modo De Acción Y Prevención De Deriva Mezclas De Plaguicidas Dosis , Modo De Acción Y Prevención De Deriva, 28–31.

Ramírez-Muñoz, F., Fournier-Leiva, M. L., Ruepert, C., & Hidalgo-Ardón, C. (2014). Uso de agroquímicos en el cultivo de papa en Pacayas, Cartago, Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 337. <http://doi.org/10.15517/am.v25i2.15441>.

Rodríguez, L. E. (2010). Origen Y Evolución De La Papa Cultivada . Una Revisión. *Agronomía Colombiana*, 28(1), 9–17.

Rank J, Nielsen MH. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide and ethyl methane sulfonate. *Mutat Res.* 1997; 390(1-2):121–127.

Rank J. 2003. The method of *Allium* anaphase – telophase chromosome aberration assay. Department of environment, technology social studies. Ekologija. Activity Report.

Recio-Vega, R., Velazco-Rodríguez, V., Ocampo-Gómez, G., Hernandez-Gonzalez, S., Ruiz-Flores, P., & Lopez-Marquez, F. (2011). Serum levels of polychlorinated biphenyls in Mexican

women and breast cancer risk. *Journal of Applied Toxicology*, 31(3), 270-278. doi: 10.1002/jat.1672.

Rekha, Naik, S. N., & Prasad, R. (2006). Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. *Journal of Chemical Health and Safety*, 13(6), 12-19. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chs.2005.01.012>.

Serap Ergene, A. Ç. (2007). Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environment International*, 877-885.

Speit G, H. S. (1985). On the mechanism of differential Giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *Hum Genet.*, 126-9.

Stefano Bonassi, E. C. (2011). The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research*, 88-97.

Squier CA, K. M. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr.*, 7-15.

Santamaria, C. (2006). The impact of pesticide exposure on breast cancer incidence: evidence from Costa Rica, 1996-2000. TT -. Retrieved from <http://paa2006.princeton.edu/download.aspx?submissionId=61422>.

Silvia L. Lopez, Delia Aiassa, S. B.-L., & Rafael Lajmanovich, Fernando Mañas, Gisela Poletta, Norma Sánchez, María Fernanda Simoniello, A. A. E. C. (2012). *Pesticides used in South American GMO-based agriculture. A review of their effects on humans and animal models. Advances in Molecular Toxicology* (Vol. 6). <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-59389-4.00002-1>.

Shahin. S.A. y El-Zahrini N.H. (1993). Cytogenetic studies on *Vicia faba* using some herbicides commonly used in Saudi Arabia. *J.K.A.U. Sci.* 5, 15-24.

Soliman M.I. (2001). Genotoxicity testing of neem plant (*Azadirachta indica* A. Juss.) using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *OnLine J. Biol. Sci* 1, 1021-1027.

Srivastava K. y Mishra K.K. (2009). Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Pest. Biochem. Physiol.* 93, 8-12.

Simoniello M.F., Kleinsorge E.C., Carballo M.A. Evaluación bioquímica de trabajadores rurales expuestos a pesticidas. *Medicina (Buenos Aires)*. 2010;70:489-498.

Simoniello M.F., Kleinsorge E.C., Scagnetti J.A., Grigolato R.A., Poletta G.L., Carballo M.A. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *J Appl Toxicol.* 2008; 28:957-965.

Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B., & Heindel, J. J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3–5), 204–215. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.007>.

Torres-Bugarín, O., & Ramos-Ibarra, M. L. (2013). Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2), 650–657. <http://doi.org/10.4067/S0717-95022013000200050>.

Tolbert, P. E.; Shy, C. M. & Allen, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.*, 271(1):69-77, 1992.

Tolbert, P. E.; Shy, C. M. & Allen, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am. J. Epidemiol.*, 134(8):840-50, 1991.

Titenko-Holland N, Windham G, Kolachana P, Reinisch F, Parvatham S, Osorio Am, *Et Al*. Genotoxicity Of Malathion In Human Lymphocytes Assessed Using The Micronucleus Assay In Vitro And In Vivo: A Study Of Malathion-Exposed Workers. *Mutat Res.* 1997;388(1):85-95.

Torres, C., Surrallés J., Ribas G., Carbonell E., De Marco A., De Simone C., Testa A., Xamena N., Creus A. y Marcos R. (1992). Genotoxicity of several herbicides. Results with three different short-term tests. *Mutat. Res.* 271, 175.

Thomas, P.; Holland, N.; Bolognesi, C.; Kirsch-Volders, M.; Bonassi, S.; Zeiger, E.; *et al.* Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.*, 4(6):825-37, 2009.

Thomas, P.; Harvey, S.; Gruner, T. & Fenech, M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat. Res.*, 638(1-2):37-47, 2008.

Thoday, J. (1951). The effect of ionizing radiations on the broad bean root. Chromosome breakage and the lethality of ionizing radiations to the root meristem. *British Journal of Radiology*, 572-576.

Tartar G., Kaymak F., Gokalp F. 2006. Genotoxic Effects of Avenoxan on *Allium cepa* L. and *Allium sativum* L. *Caryologia*. 59(3): 241-247.

Vega, S. 1985. Toxicologia I: evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, 69 pp.

Weichenthal, S., Moase, C., & Chan, P. (2012). Revisão sobre a exposição aos pesticidas e a incidência de câncer em estudo de coorte da saúde dos agricultores. *Ciência & Saúde Coletiva*, 17(1), 255–270. <http://doi.org/10.1590/S1413-81232012000100028>.

WHO. (2003). *Shaping the future of global health*. Geneva: Bulletin of the World Health Organization.

World Health Organization. Genova, 1990. Public Health Impact Of Pesticide Used In Agriculture.

World Health Organization, W. (1988.). *International Programme on Chemical Safety, Task Group on Environmental Health Criteria for Dithiocarbamate Pesticides, Ethylenethiourea and Propylenethiourea: a general introduction*. Geneva.

Yáñez., M. G. (2002). *Evaluación de la Eficiencia de Productos Alternativos para el Control de Lancha Phytophthora infestans (Mont.) de Bary en Papa, CUTUGLAHUA – PICHINCHA*. Quito - Ecuador: Universidad Central del Ecuador; Facultad de Ciencias Agrícolas.

Yamada, T., Uwagawa, S., Okuno, Y., Cohen, S. M., & Kaneko, H. (2009). Case Study: An Evaluation of the Human Relevance of the Synthetic Pyrethroid Metofluthrin-Induced Liver Tumors in Rats Based on Mode of Action. *Toxicological Sciences*, 108(1), 59-68. doi: 10.1093/toxsci/kfp007.

Yildiz M. y Arikan E.S. (2008). Genotoxicity testing of quizalofop-p-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia* 61, 45-52.

Yin X., Z. G. (2009). Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test. *Mutat Res.* , 2-6.

Zhurkov V., Y. K. (1976). The culture of human lymphocytes as a test for evaluation of mutagenic activity of chemicals. *Mutagenesis* , 107–112.

Anexo.

Anexo N_o 1. Fotografía De La Preparación De La Mezcla De Lorsban Y Dithane.



Anexo N^o 2. Fotografía de la Primera Fumigación de la Siembra de Papa.



Anexo N^o 3. Fotografía del Montaje de los Bioensayos



Anexo N^o 4. Encuesta Realizada a las Personas Muestreadas.

**CUESTIONARIO PARA EL ESTUDIO DE LA GENOTOXICIDAD PRODUCIDA POR
EXPOSICION LABORAL EN CULTIVADORES DE PAPA EN LA PROVINCIA DE
PAMPLONA (NORTE DE SANTANDER)**

Con este estudio se pretende determinar el nivel del daño en el DNA por la exposición laboral a la mezcla de plaguicidas Lorsban y Dithane en el cultivo de papa.

INFORMACION PERSONAL

Código _____

Fecha de Nacimiento Mes _____ Día _____ Año _____

Lugar de nacimiento: Ciudad _____ Departamento _____

Residencia actual: Ciudad _____ Departamento _____

Tiene hijos? Si ___ No ___ Cuantos _____

1. Actualmente fuma? Sí ___ No ___

Cuantos cigarrillos fuma al día _____

2. Actualmente ingiere alcohol?. Si ___ No ___

Con que frecuencia? _____

3. Normalmente como es su alimentación

Harinas Sí ___ No ___

Vegetales Sí ___ No ___

Frutas Sí ___ No ___

Proteínas (carnes) Si ___ No ___ Algunas veces

4. ¿Esta o ha estado tomando algún medicamento durante los últimos cuatro meses?

Sí ___ No ___

Cuál _____ Desde _____ hasta _____

Razón _____

5. ¿Padece o padeció usted de lo siguiente?

Asma SI ___ NO ___

Eczema SI ___ NO ___

Pulmonía SI ___ NO ___

6. Ha tenido algún problema respiratorio ? _____

7. ha tomado medicamentos para este problema? Sí ___ No ___

Nombre del medicamento _____ método de suministro _____

Pastillas _____

8. Ha tenido algún tipo de cirugía?. SI ___ NO ___ Cuál?

Por favor describa cualquier problema médico que haya tenido en el pasado.

Especialmente los que requirieron hospitalización.

9. Después de su jornada de trabajo:

a. Se ducha totalmente con jabón removiéndose las partículas impregnadas en la piel?

b. Se asea sólo la cara y los brazos

c. Utiliza otro tipo de sustancia que le retire de su piel las partículas de los químicos.

10. Cuántos años de trabajo cultivando papa _____

11. Utiliza elementos de protección personal al manipular los plaguicidas?

Si_____ No_____ Algunas veces _____

INFORMACIÓN DEL AREA DE TRABAJO

Por favor describa su historia o vida de trabajo que ha tenido en el cultivo de papa.

# de individuo	Año de inicio de trabajo	Edad en que inicio a trabajar	Lugar de trabajo	Tiempo de trabajo	Hora de entrada	Hora de salida

