



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
“Dr. Ernesto Palacios Prú”



**VALORES HEMATOLOGICOS ASOCIADOS A DOSIS SUBCRÓNICA DE
MANCOZEB EN RATONES MACHOS EN EDAD COMPRENDIDA DE P10
A P75**

www.bdigital.ula.ve

AUTORA:

Emigrey del V. García J.

CI: 21.085.272

TUTORA:

Prof. Yasmin Morales.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO ANTE UN JURADO DE
LA ILUSTRE UNIVERSIDAD DE LOS ANDES COMO REQUISITO PARA
OPTAR POR EL TÍTULO EN BIOANÁLISIS

Mérida, Agosto de 2019

DEDICATORIA

Primeramente al protagonista de todas mis metas y logros DIOS, por acompañarme siempre y guiar mi vida, por llenarme de sus bendiciones cada día.

A mis Padres: Emilia Jaimes y José García, este logro también es de ustedes, por apoyarme siempre, por dar lo mejor durante todo este recorrido. Los Amo.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Agradezco día a día a ti mi Dios por estar presente en cada paso que doy, por escuchar mis oraciones y guiarme por el mejor camino.

Gracias totales a mis Padres, por ser mis pilares, mi apoyo, por brindarme la oportunidad de estudiar fuera de mi ciudad y siempre darme esas palabras de aliento y motivación. *¡LOS AMO!*

A mis hermanos y primos, que siempre me acompañaron y apoyaron sin importar la distancia, especialmente Greimi y Junior gracias por tanto.

A mi Tutora Yasmin Morales, por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo de grado, por sus consejos, paciencia y todas las enseñanzas que me dejaste en este recorrido. *¡DIOS TE BENDIGA!*

Al Centro de Microscopia Electrónica “*Dr. Ernesto Palacios Pru*” por abrirme sus puertas, agradecida con todos lo que me ayudaron con su granito de arena para lograr este trabajo, en especial a la Profesora Leticia Miranda por su apoyo siempre, *¡GRACIAS!*

A mis hermanas que me regalo la Universidad Victoria y Luixys, por haber sido incondicionales durante todo este recorrido y hacer mis días más divertidos. *¡Las Adoro!*

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y a los profesores que hacen vida en ella, por acogerme en sus aulas de clases y dejar en mí vida conocimientos de gran valor.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, por permitirme ser parte de tan respetada y honorable casa de estudio, y por formarme como profesional.

Finalmente a todos mis familiares y amigos que estuvieron presentes de una u otra manera durante todo este largo camino. *¡GRACIAS TOTALES!*

ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice de Contenido	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas	viii
Resumen	ix
Introducción	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	6
Planteamiento del Problema	6
Justificación de la investigación	7
Objetivos de la investigación	8
Objetivo general	8
Objetivo específico	8
Alcances y limitaciones	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	10
Trabajos previos	10
Bases teóricas	14
Hemoglobina	14
Leucocitos	14
Segmentados	15
No segmentados	15
Plaquetas	16
Índices Plaquetarios	16
Hematocrito	16
Frotis de sangre periférica	17
Aplicaciones de la biología molecular en hematología	17
Valores Hematológicos Normales	17

Generalidades de los plaguicidas	18
Fungicidas Ditiocarbamatos	18
Mancozeb	19
Toxicocinética de los fungicidas	20
Hipótesis	21
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	23
Tipo de investigación	23
Diseño de la investigación	24
Población y muestra	24
Procedimientos o metodología	24
Diseño de Análisis	25
Materias y reactivos	26
Técnicas de procesamientos	26
Camino metodológico	28
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
Resultados	29
Discusiones	47
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
Conclusiones	53
Recomendaciones	54
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	Pp.
FIGURA 1. Estructuras químicas de algunos plaguicidas ditiocarbamatos.	19
FIGURA 2. Estructura química del Mancozeb.	20
FIGURA 3. Variación del peso corporal en función del tiempo y los grupos de ratones evaluados.	29
FIGURA 4. Valores de Glóbulos Blancos.	32
FIGURA 5. Valores de Hemoglobina.	33
FIGURA 6. Valores de Hematocrito.	34
FIGURA 7. Valores de Plaquetas.	35
FIGURA 8. Valores de Plaquetocrito.	36
FIGURA 9. Valores de Volumen Plaquetario.	37
FIGURA 10. Valores de Distribución de volumen plaquetario.	38
FIGURA 11. Valores de Linfocitos.	39
FIGURA 12. Valores de Monocitos.	40
FIGURA 13. Valores de Granulocitos.	41
FIGURA 14. Valores de Linfocitos.	42
FIGURA 15. Valores de Monocitos.	43
FIGURA 16. Valores de Neutrófilos.	44
FIGURA 17. Valores de Basófilos.	45
FIGURA 18. Valores de Eosinófilos.	46

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	Pp.
TABLA 1. Valores de referencias en ratones machos.	17
TABLA 2. Operacionalización de las variables.	21
TABLA 3. Valores Hematológicos y frotis de sangre periférica de los grupos de estudio.	31

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
“Dr. Ernesto Palacios Pru”



VALORES HEMATOLÓGICOS ASOCIADOS A DOSIS SUBCRÓNICA DE
MANCOZEB EN RATONES MACHOS EN EDAD COMPRENDIDA DE P10
A P75

Trabajo de Grado

Autor:

Emigrey Del V. García J.

CI: 21.085.272

Tutora:

Prof. Yasmin Morales.

RESUMEN

El Mancozeb (MZ) es un fungicida perteneciente a la clase de los ditiocarbamatos, siendo este un polímero complejo del etilenbistiocarbamato que contiene manganeso y zinc, su toxicidad aguda por vía oral y dérmica en mamíferos es muy baja, la dosis letal 50 (DL₅₀) es 5000 mg/Kg peso corporal, el **objetivo principal** de este trabajo fue evaluar la relación entre los valores hematológicos y la dosis subcrónica de Mancozeb en ratones machos NMRI BIOU, en edad comprendida de p10 a p75, empleando una **Metodología** de investigación evaluativa con diseño experimental, conformada por 20 ratones divididos en dos grupos con n=10 (control y MZ), la vía de administración fue intraperitoneal e interdiaria con un volumen de inyección de 0,2µl, la dosis utilizada de MZ fue de 50 mg/kg de peso corporal, el control se les administro solución fisiológica, de igual manera fueron pesados antes de administrar la dosis. Se tomaron muestras sanguíneas vía retroorbital para el frotis de sangre periférica y hematología en la edad de p75, posteriormente fueron sacrificados. Los **resultados** fueron analizados en el programa estadístico SPSS versión 21, la variación del peso corporal en función del tiempo y los grupos evaluados, demostraron diferencias significativas en la disminución de peso en comparación al grupo control, los resultados hematológicos más importantes fueron los índices plaquetarios, presentando trombocitosis y en el frotis sanguíneo predominó la eosinofilia, con el grupo tratado MZ, en **conclusión** la exposición subcrónica de MZ a dosis de 50 mgMZ/kg produce alteración en la variación de pesos de los ratones desde edad temprana, afectando su crecimiento y desarrollo normal, se demostró sensibilidad de los índices plaquetarios como indicador de la exposición a este fungicida.

Palabras claves: Eosinofilia, Frotis, Hematología, Mancozeb, Trombocitosis.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha observado que el hombre está constantemente expuesto a diversas sustancias tóxicas, que pueden ser perjudiciales para la salud, tal es el caso de los plaguicidas los cuales son sustancias ampliamente utilizados en la producción agrícola para prevenir o controlar plagas, enfermedades y otros patógenos de plantas, en un esfuerzo para reducir o eliminar pérdidas en la cosecha y mantener una alta calidad de los productos (Ichikawa H, 2015). Sin embargo, existen preocupaciones serias sobre los riesgos a la salud humana causados bien sea, por una exposición ocupacional, a través de residuos de plaguicidas en alimentos o en el agua para consumo humano (Morales C, Rodríguez N, 2004; Flores-García M, y cols. 2011). A pesar de que se han realizado muchos estudios sobre la toxicidad de los plaguicidas y sus efectos en el ambiente, existe cierta incertidumbre sobre los daños que puedan causar a largo plazo, en particular a dosis bajas sobre la salud humana (Alavanja C.R, y cols. 2004; Payán R.R, y cols. 2013).

Los plaguicidas se pueden clasificar de acuerdo con su uso, su estructura química o su toxicidad; sin embargo, la orientación terapéutica para los casos de intoxicación se enfoca en su estructura química.

Las vías de exposición de los plaguicidas pueden ser por vía inhalatoria, oral, dérmica, ocular y parenteral (intramuscular, subcutáneo o intravenoso), sus mecanismos de biotransformación son propios siendo incluso en algunos casos los metabolitos más tóxicos que los mismos plaguicidas, se pueden eliminar lentamente del organismo a través de las heces, la orina, ya sea en metabolitos o de forma inalterado. (Grupo de vigilancia y control de factores de riesgo ambiental, 2010).

Las intoxicaciones por plaguicidas de acuerdo al tiempo de exposición se clasifican en agudas, presentan su cuadro clínico en las primeras 24 horas de exposición al toxico, cuyos signos y síntomas dependen del grupo químico al que pertenecen. En este tipo de intoxicación los principales efectos son: respiratorios (depresión respiratoria, taquipnea, etc.); efectos gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarreas, etc.); renales (anuria, oliguria) se pueden detectar al momento de la intoxicación, sin embargo, la intoxicación crónica presenta un Cuadro clínico luego de exposiciones repetidas a dosis bajas de plaguicidas por periodos de tiempo prolongados, con efectos a largo plazo sobre la salud como (cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos, entre otros). Los efectos que se presentan en las intoxicaciones crónicas comprenden: neurológicos (neurotoxicidad retardada), cambios de conducta, lesiones en el sistema nervioso central (SNC), neuritis; trastornos reproductivos (esterilidad en hombres), disminución del índice de fertilidad; efectos cutáneos (dermatitis, alergias, reacciones foto alérgicas, etc.); oftalmológicas (atrofia del nervio óptico, cataratas); efectos pulmonares (fibrosis quística, neumonitis); efectos inmunológicos, lesiones hepáticas (cirrosis, cáncer).

Ahora bien, es de gran importancia aplicar técnicas que nos permitan ir evaluando de alguna manera los procesos de toxicidad en un individuo expuestos bien sea, ocupacionalmente o de manera pasiva a este tipo de sustancias toxicas como los plaguicidas, que actúan de manera muy silenciosa y a muy bajas dosis en el organismo generando graves problemas a la salud, lo que se podría hacer a través de parámetros bioanalíticos como la hematología.

La hematología es el estudio de la sangre a través de sus células, que son los eritrocitos, leucocitos y trombocitos o plaquetas, estas células componen aproximadamente entre 45 y 50% del volumen de la sangre. Para el estudio de la hematología es esencial una comprensión básica de la

morfología celular, ya que muchos trastornos hematológicos se acompañan de anormalidades o cambios en la morfología de componentes celulares o subcelulares, así como también de modificaciones en sus concentraciones (McKenzie, 2000).

Este examen puede utilizarse para determinar muchas de las anormalidades relacionadas tanto con la producción como la destrucción de las células sanguíneas; ya que las variaciones en la cantidad, el tamaño o la madurez de estas células pueden indicar una infección o enfermedad. Asimismo, el estudio y la práctica de la hematología ha sufrido una transformación fundamental en los últimos años, ya que el conocimiento de la biología molecular ha permitido comprender mejor los procesos fisiológicos normales de la sangre y la fisiopatología de las enfermedades hematológicas. En fechas más recientes, estos conocimientos se han traducido en avances terapéuticos para los pacientes con enfermedades de la sangre (Jaime y Gómez, 2012).

Aunado a esto, se denominan valores hematológicos a los estudios cualitativos y cuantitativos de los elementos sanguíneos y se refieren a la concentración de cada uno de ellos en un volumen determinado de sangre. Estos indican a través de parámetros numéricos las alteraciones que se pueden dar en un cuerpo, diagnosticando diversas patologías que se generan en el organismo al estar expuesto a factores externos y sustancias tóxicas, tales como, los plaguicidas (Urdaneta, 2013).

Leticia y cols., reportaron que los niños que viven en áreas agrícolas donde se tratan los cultivos con pesticidas, tienen mayor riesgo de presentar problemas graves de salud como cáncer, daños en el sistema inmunológico, estados de desnutrición, con exposiciones indirecta debido a que viven y estudian cerca de zonas con grandes cultivos, que son tratados con varios tipos de plaguicidas sin control en las fumigaciones. Ellos examinaron los

efectos de la exposición a pesticidas en parámetros hematológicos y bioquímicos, obteniendo una trombocitosis en 48%, recuentos promedios de linfocitos, monocitos y neutrófilos disminuidos de los niños expuestos indirectamente en comparación a los niños control. Esto demuestra que tanto los niños como la colectividad en general que habita en zonas agrícolas están expuestos a estos problemas de salud producto del uso de pesticidas, es decir, son más vulnerables a los efectos tóxicos de dichas sustancias (Miranda L, y cols. 2017).

Con el presente estudio se pretende evaluar mediante el frotis sanguíneo y hematología completa las alteraciones que puede causar el fungicida MZ después de aplicar varias dosis de mancozeb de 50mg/Kg de peso corporal en ratones machos desde p10 a p75. Siendo el mancozeb un fungicida perteneciente a la clase de los ditiocarbamatos que se utiliza para eliminar los hongos en diversos cultivos, con un amplio espectro de enfermedades fúngicas. Esta sustancias químicas son estructuras poliméricas que poseen estabilidad ambiental y proporcionan buena protección foliar, así como un orden bajo de toxicidad aguda, el mancozeb es una mezcla polimérica de una sal de zinc y sustancia química maneb. No se han demostrado que tenga efectos teratogenicos en ratas, pero si se ha demostrado que actúa como un disruptor endocrino alterando los espermatozoides (Klaassen y Watkins III, 2001).

Ha sido demostrado en animales de experimentación la neurotoxicidad del fungicida mancozeb por alteración de la transmisión sináptica y de los mecanismos de la homeostasis del sistema neuroendocrino, lo cual explica la acción del mancozeb como disruptor endocrino. Los investigadores destacan que los momentos de particular sensibilidad de la exposición a plaguicidas disruptores endocrinos son las etapas tempranas de la vida como: durante el desarrollo embrionario y la primera infancia, períodos en los cuales los procesos de crecimiento son controlados por las hormonas afectando el

desarrollo del cerebro, el sistema inmune y otros órganos como el sistema reproductor y tiroideo (Morales Y., y cols. 2014).

Cabe destacar que el proyecto de investigación será distribuido en tres capítulos que serán desglosados de la siguiente manera: en el capítulo I, denominado El Problema, se consideran los siguientes subtítulos: Planteamiento del Problema, Justificación de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. En el capítulo II, denominado Marco Teórico, se consideran los siguientes subtítulos: Trabajos Previos, Bases Teóricas, Operacionalización de las variables. Así mismo, en el capítulo III, denominado Marco Metodológico, se consideran los siguientes subtítulos: Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Procedimiento o Metodología de la investigación, Diseño de Análisis, Materiales y Reactivos y Técnicas de Procesamiento.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

El Problema

Planteamiento del Problema

En la región andina el uso de plaguicidas ha ido en incremento por causa de la expansión de actividades ganaderas y agrícolas, lo que va a la par del aumento de casos de intoxicación por dichas sustancias, quedando demostrado que estos a largo plazo afectan al ser humano incluso en bajas concentraciones, siendo más vulnerables los individuos que se encuentran en las etapas tempranas de vida. Tomando en cuenta que algunos estudios han referido que los valores hematológicos de un ser vivo pueden ser alterados por diversos agentes como: virus, bacterias, hongos, parásitos y sustancias tóxicas; los cuales al entrar en contacto con el organismo pueden generar estados de desnutrición, infecciones, alergias, entre otros (Pesantes, 2015).

En este caso particular se hará referencia al plaguicida de acción fungicida MZ, siendo este uno de los más ampliamente usados en cultivos para la conservación de frutas y verduras. El MZ tiene una DL50 moderadamente alta para producir un efecto toxico en una exposición aguda, sin embargo en exposiciones crónicas se han reportado efectos neurotóxicos, daños en la función neuroendocrina. De acuerdo a esto, conocer los valores hematológicos, la morfología celular después de un periodo de exposición al fungicida es importante ya que los mismos pueden ser indicadores de algunas alteraciones patológicas, estos son relativamente de rápido y bajo costo de procesamiento. Varios autores han demostrado

que en humanos y animales expuestos a dosis crónicas y bajas del MZ, pueden causar efectos de neurotoxicidad y daño en el sistema endocrino como hipotiroidismo, alterando así el funcionamiento del aparato reproductor de ambos géneros. (Morales y cols., 2014; Axelstad y cols., 2011).

En este sentido, se plantea la siguiente interrogante: ¿Cuál es la relación entre los valores hematológicos y la dosis subcrónica de Mancozeb en ratones machos en edad comprendida de p10 a p75, en el Centro de Microscopia Electrónica “*Dr. Ernesto Palacios Pru*” área de Neuroquímica, de la Universidad de Los Andes, desde Abril 2015 hasta Mayo 2017?

Justificación de la Investigación

El ser humano en su día a día se encuentra expuesto a una cantidad de agentes externos que pueden ser tóxicos a su organismo e inciden negativamente en el buen funcionamiento de la salud, una de estas sustancias son los plaguicidas, que actualmente son empleados en gran cantidad de forma indiscriminada y sin control sanitario a nivel mundial, especialmente en las zonas agrícolas. Dichas sustancias son de fácil absorción por parte de los humanos y animales, ya sea por vía inhalatoria, oral o dérmica; lo que puede generar daños crónicos, si no son detectados a tiempo.

En consecuencia, debido a los diversos daños que han sido reportados sobre los efectos tóxicos del MZ, esta investigación permite aportar mediante técnicas sencillas y de bajo costo la detección orientativa de alguna posible patología que pudiera estar padeciendo aquellas personas que están expuestas directas e indirectamente a este tipo de sustancias e inclusive niños, con los parámetros hematológicos, creando referencia de los mismos

con este tipo de tóxicos, de igual manera alertar a la colectividad en cuanto el uso y efectos que tiene en el organismo la exposición repetitiva de este fungicida; asimismo incentivar la sustitución de sustancias fungicidas que tengan efectos tóxicos sobre la salud y además servir de precedente para futuras investigaciones en la rama.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la relación entre los valores hematológicos y la dosis subcrónica de Mancozeb en ratones machos en edad comprendida de p10 a p75, en el Centro de Microscopia Electrónica “*Dr. Ernesto Palacios Pru*” área de Neuroquímica, de la Universidad de Los Andes, desde Abril 2015 hasta Mayo 2017.

Objetivos Específicos

- Realizar la medición del peso corporal de los ratones machos NMRI interdiarios durante la exposición subcrónica de Mancozeb.
- Determinar los valores hematológicos, tales como hemoglobina, hematocrito, glóbulos blancos y plaquetas de los animales expuestos a dosis subcrónica de Mancozeb, mediante un equipo automatizado (Mindray BC-2600).
- Analizar los frotis de sangre en los ratones experimentales y control.

Alcances y Limites de la Investigación

En toda investigación su alcance se relaciona con la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. Establece la visión que posee el investigador para lograr los objetivos. Del alcance depende la estrategia de investigación, así, el diseño, los procedimientos y otros componentes del

proceso serán distintos en estudios con alcances exploratorio, descriptivo, correlacional, o explicativo (Hernández Sampieri y cols., 2010).

En este sentido el alcance de esta investigación, es conocer los efectos que va a causar el MZ en la unidad de estudio y luego evaluar la relación entre los valores hematológicos y la dosis subcrónica de mancozeb en ratones machos en edad comprendida de p10 a p75.

Para desarrollar esta investigación se presentaron algunas limitaciones relacionadas con: disponibilidad de trabajos previos, teorías específicas sobre el problema de estudio, reactivos y recursos económicos.

Resaltando en esta investigación, en relación a los trabajos previos, hubo gran dificultad por no haber casi trabajos con este tipo de fungicida, con respecto a los reactivos hubieron problemas para encontrarlos por lo costosos que salieron y la ausencia del producto, así como la disponibilidad, de tener 20 ratones machos en edad p10 en el bioterio.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

Marco Teórico

Trabajos Previos

Aroonvilairat y cols., (2018), en su estudio titulado: Efectos de la exposición tópica a una mezcla de clorpirifos, cipermetrina y captan sobre los sistemas hematológicos e inmunológicos en ratas Wistar macho. La mayoría de los cultivadores de orquídeas tailandesas usaban mucho las mezclas de pesticidas, y se demostró que tenían varias alteraciones hematológicas / inmunológicas. El presente estudio investigó el efecto de la exposición de ratas Wistar macho a una mezcla de tres pesticidas (clorpirifos, cipermetrina y captan) que son los más utilizados por los agricultores. Tres grupos de 10 ratas se expusieron dérmicamente a tres dosis diferentes (alta, media y baja) durante 28 días consecutivos. Las ratas mostraron cambios significativos en el peso corporal, hepático, renal y suprarrenal. Se observaron cambios significativos en diversos parámetros biológicos, incluida la hematotoxicidad (aumento del recuento de leucocitos y plaquetas, porcentaje de neutrófilos, disminución del recuento de glóbulos rojos, porcentaje de linfocitos y eosinófilos), hepatotoxicidad (aumento de la AST en suero, disminución de la ALP en suero, colesterol, triglicéridos, proteína de suero y albúmina). e inmunotoxicidad (disminución en el número de células NK, disminución de la respuesta proliferativa esplénica a LPS y aumento de la IgG sérica). Estos resultados confirman el peligro potencial para la salud de la exposición a estas mezclas de plaguicidas en los cultivadores de orquídeas.

Morales y cols., (2018), en la presente investigación titulada: La exposición del desarrollo a mancozeb indujo alteraciones neuroquímicas y morfológicas en el hipotálamo de ratón macho adulto. La neurotoxicidad del mancozeb en el desarrollo del hipotálamo del ratón se evaluó mediante la exposición subcrónica de ratones *Mus musculus* macho a dosis altas y bajas de mancozeb (30 y 90 mg / kg de peso corporal, respectivamente) desde el neonato tardío hasta la adolescencia. Se observó un aumento dependiente de la dosis en la relación de excitación / inhibición en el hipotálamo expuesto a mancozeb, lo que indica un estado general de excitotoxicidad. Los estudios histopatológicos y ultraestructurales mostraron un aumento de la apoptosis, neuroinflamación y desmielinización, lo que demuestra la citotoxicidad inducida por mancozeb en células neurosecretoras hipotalámicas. En resumen, los datos neuroquímicos y morfológicos revelaron alteraciones inducidas por mancozeb durante el desarrollo de circuitos hipotalámicos que son críticos para la maduración del sistema neuroendocrino.

www.bdigital.ula.ve

Miranda y cols., (2017), en su artículo denominado: Parámetros hematológicos y bioquímicos alterados en escolares residenciados en una comunidad agrícola del Estado Mérida, Venezuela. El objetivo de este trabajo fue examinar los efectos de la exposición crónica a pesticidas en parámetros hematológicos y bioquímicos de niños que habitan en zonas agrícolas en comparación a los de zonas urbanas. Los niños se sometieron a un examen clínico, una evaluación nutricional, una muestra de sangre para hemograma completo y un análisis bioquímico de las funciones hepáticas y renales, el metabolismo de los lípidos y glucosa, la colinesterasa plasmática, las hormonas tiroideas y la capacidad antioxidante total. Se encontró una prevalencia de desnutrición tanto en niños expuestos como en los niños control. Los resultados hematológicos más importantes fueron trombocitosis en el 48% de los niños que residen en las zonas agrícolas, el aumento de los recuentos medios de linfocitos y monocitos, disminución de los recuentos

medios de neutrófilos en comparación con los niños control. La actividad de la butirilcolinesterasa disminuyó en el 35% de los niños de zonas agrícolas. Se observaron alteraciones en los parámetros bioquímicos entre los grupos expuestos y de control, sin embargo, la mayoría de los resultados estuvieron dentro de lo normal, excepto la disminución significativa en la capacidad antioxidante total. Este estudio demuestra que los niños que viven en las comunidades agrícolas están expuestos a los peligros para la salud por estos plaguicidas, la desnutrición y la higiene dental inadecuada afecta el estado de salud general de los niños y es probable que aumente su vulnerabilidad a los efectos tóxicos de estas sustancias.

García y cols., (2016), realizaron una investigación titulada: Exposición ocupacional de plaguicidas y efectos adversos para la salud a nivel clínico, hematológico y bioquímico. El objetivo fue evaluar los posibles efectos de la exposición a los pesticidas. La metodología: Se midieron los síntomas clínicos, los signos de los exámenes físicos, los parámetros hematológicos y de química clínica en 189 trabajadores agrícolas intensivos y 91 sujetos sanos de control del litoral de Almería. Los resultados que se obtuvieron de los trabajadores de invernadero mostraron algunos signos oculares y cutáneos diferentes en comparación con los controles en el período de alta exposición a plaguicidas; sin embargo, no se observaron diferencias en los síntomas clínicos. La acetilcolinesterasa de eritrocitos disminuyó significativamente en los trabajadores de invernadero en relación con los controles en ambos períodos. La evaluación de los parámetros hematológicos reveló un aumento de los recuentos de eritrocitos, leucocitos, plaquetas y hemoglobina en los trabajadores de invernadero en relación con los controles, y también en el período de alta versus baja exposición a pesticidas. Los cambios en los parámetros de la química clínica incluyeron niveles disminuidos de glucosa, creatinina, colesterol total, triglicéridos y

fosfatasa alcalina en los trabajadores de invernadero en relación con los controles.

Peña y cols., (2016), presentaron en su trabajo de investigación: La atrazina y el mancozeb inducen excitotoxicidad y citotoxicidad en cultivos primarios de la corteza cerebelosa de ratón. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la neurotoxicidad de atrazina y mancozeb mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), evaluación de neurotransmisores y morfológicamente mediante citometría de flujo y análisis ultraestructural utilizando microscopía electrónica de transmisión de cultivos primarios de la corteza cerebelosa de ratón. Este último reveló daño mitocondrial, alteraciones sinápticas y neuroinflamación, mientras que los resultados neuroquímicos mostraron una liberación aumentada de neurotransmisores excitadores con el consiguiente aumento en la relación de excitación / inhibición de los cultivos tratados con atrazina y mancozeb. Ellos demostraron con este estudio que la exposición a la atrazina y el mancozeb puede conducir a daños neuronales asociados con la excitotoxicidad y la citotoxicidad.

Morales Y. (2014), presento el trabajo especial de grado para optar al título Magister en Ciencias Médicas Fundamentales titulado: Efectos neurotóxicos inducidos por la exposición subcrónica a atrazina y mancozeb durante el desarrollo posnatal tardío hasta adulto joven en el hipotálamo. El objetivo general fue: Determinar si la exposición subcrónica de atrazina y mancozeb, causa alteraciones neuroquímicas y morfológicas durante el desarrollo hipotalámico. La Metodología fue: Utilizo 80 ratones machos en total, por cada plaguicida se utilizaron 40 ratones distribuidos en dos grupos experimentales y un grupo control, a los cuales fueron administrado por vía peritoneal, dosis conocida. Los resultados obtenidos con el grupo de atrazina con respecto al estudio neuroquímico encontró un aumento significativo en los niveles de neurotransmisores exitatorios, siendo más

significativo el aumento de los neurotransmisores con el grupo de mancozeb, por otra parte a nivel morfológico se encontraron evidencias concluyentes de procesos de neurodegeneración por exitotoxicidad con ambos plaguicidas, y procesos de gliosis provocados por muerte de células neurosecretoras y desmielinización axonal con el grupo de mancozeb. Los resultados obtenidos pudieron concluir, que la exposición de ambos plaguicidas causa alteración de la neurotransmisión aminoacérgica y daños en las células neurosecretoras por exitotoxicidad, lo cual puede estar afectando el funcionamiento normal del sistema neuroendocrino, demostrando con estos hallazgos los efectos neurotóxicos de estos plaguicidas.

Bases Teóricas

Hemoglobina

Es el pigmento rojo que le da el color en la sangre. Constituye una molécula tetramérica y con formación de dos pares de cadenas polipeptídicas (globina) uniéndose en su interior a un grupo prostético funcional, el hem de este modo está formado por un átomo de hierro y una protoporfirina. Sirve para transportar oxígeno a las células de los tejidos desde los pulmones y dióxido de carbono en sentido contrario (Guyton, 2006).

Leucocitos

Glóbulo blanco, uno de los elementos formes de la sangre. Hay cinco tipos de leucocitos que se clasifican según la presencia o ausencia de gránulos en el citoplasma celular. Los no segmentados (agranular) se dividen en linfocitos y monocitos. Los segmentados (granular) comprenden los neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Entre las funciones más importantes figuran la fagocitosis de bacterias, hongos, virus y cuerpos extraños (Anderson, 2005).

Segmentados Neutrófilos

Son lisosomas que tienen distintas enzimas como peroxidasa, lisozimas, colagenasas, lactoferrinas, se relaciona con la fagocitosis y destrucción de microorganismos, estimulan la coagulación, participan en la producción de ácido araquidónico y de pirógeno. Constituyen la primera línea en los tejidos y están aumentados en infección bacteriana, intoxicación y neoplasias (Rodak, 2005).

Segmentados Basófilos

Es una célula de núcleo segmentado con gránulos escasos. Sus gránulos contienen histamina, proteoglicanos, heparina, serotonina, peroxidasa y factores quimiotácticos de eosinófilos y neutrófilos cuya función principal es actuar como mediador en la respuesta inflamatoria aguda (Rodak, 2005).

Segmentados Eosinófilos

Es una célula con núcleo segmentado de 2-3 lóbulos. La producción de ellos se da en la médula ósea, pero independiente de este dura entre 3 y 5 días, pasando a la sangre y desplazándose a los tejidos. Su núcleo es generalmente bilobulado, presenta gránulos en el citoplasma con grandes cantidades de histamina, peroxidasa, IgE, IgG; están frecuentemente en pulmones, aparato digestivo y piel. Controla procesos alérgicos y parasitarios (Rodak, 2005).

- ***No segmentados***

Monocitos

Constituyen un sistema de células fagocitadas producidas en la médula ósea, a partir de una célula madre mieloide, que origina el monoblasto, transformándose en promonocito y luego al monocito. Se caracteriza por un gran núcleo, en forma arriñonada. Su periodo de maduración dura 6 días y

pasa a circulación, donde permanece alrededor de 3 días y para llegar a los diferentes tejidos y transformarse en macrófago pero según sea su ubicación y ambiente tendrá un tipo de célula diferente (Rodak, 2005).

Linfocitos

Son células aproximadamente de 7μ de diámetro similar a los glóbulos rojos se producen en la medula ósea y en otros órganos linfogénicos (ganglios linfáticos, bazo, timo, y tejido linfoide de amígdalas e intestinos). Se caracterizan por tener un núcleo redondeado y citoplasma escaso. Las células madres linfoides generan células pre-linfocíticas T y B transformándolas en linfocitos T y B. Ellos circulan continuamente en la sangre favoreciendo el contacto rápido con los antígenos que penetran a todos los lugares del organismo (Rodak, 2005).

Plaquetas

Son fragmentos citoplasmáticos pequeños con función hemostática (Corrons, 2006).

Índices Plaquetarios

Hematocrito plaquetario o Plaquetocrito (PCT): Porcentaje del volumen de plaquetas sobre el volumen total de sangre.

Volumen Plaquetario Medio (MPV): Mide el tamaño promedio de las plaquetas.

Distribución de volumen plaquetario o Ancho de distribución de plaquetas (PDW): Es un indicador de la variabilidad de tamaño del volumen de las plaquetas. (Budak, Y., y cols. 2016).

Hematocrito

Es la medida del volumen de una fracción de sangre compuesta de eritrocitos, se expresa en porcentaje del volumen sanguíneo total (Guyton, 2006).

Frotis de Sangre Periférica

El frotis de sangre periférica es un examen que proporciona información acerca del número y forma de las células sanguíneas a través de una inspección visual con la ayuda del microscopio. Es útil como complemento de la biométrica hemática que ayuda a establecer el diagnóstico de gran parte de las enfermedades hematológicas (Jaime y Gómez, 2012).

Aplicaciones de la biología molecular en hematología

Son múltiples áreas de la hematología en la que se aplican técnicas de biología molecular con fines diagnósticos. El laboratorio clínico moderno donde se atiende a pacientes de enfermedades hematológicas no puede predecir de esta tecnología (Jaime y Gómez, 2012).

Valores Hematológicos Normales

Tabla 1: Valores de referencia en ratones machos.

PARÁMETRO	RANGO	UNIDAD
Hemoglobina	16,88-18,55	g/dl
Hematocrito	50-59	%
Glóbulos Rojos	3,85-9,20	$10^6/\mu\text{L}$
Glóbulos Blancos	7,30-15,6	$10^3/\mu\text{L}$
Neutrófilos	1-29	%
Basófilos	0	%
Eosinófilos	0-7	%
Linfocitos	73-80	%
Monocitos	0-7	%
Plaquetas	408-411	$10^3/\mu\text{L}$

Fuente: Arcila, V., y cols. (2010); Ávila, J., Mamani, B., y Ruiz, G. (2013).

Generalidades de los plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias químicas altamente tóxicas y persistentes en el ambiente, algunos de ellos permanecen durante muchos años sin degradarse causando trastornos en la salud de los seres vivos. Estos son ampliamente utilizados en la agricultura para el control de plagas y por el sector salud para el combate de vectores que transmiten enfermedades endémicas (Tapia, 2006).

Existen diferentes criterios para la clasificación de los plaguicidas: a) De acuerdo con su uso y tipo de organismo que afectan (insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, desinfectantes, y fumigantes; b) Destino de aplicación y acción específica (contacto, ingestión, fumigante, sistémicos); c) Grado de toxicidad (ligeramente peligroso, moderadamente peligroso, altamente peligroso, extremadamente peligroso); d) Composición química (organoclorados, organofosforados, carbamatos, ditiocarbamatos, triazinas, piretroides, bupiridilos, derivados de urea, entre otros); e) Por su vida media de efectividad (no persistente, moderada, persistente, permanente); f) Por el destino de aplicación: agrícola, urbano, pecuario, industrial, forestal, doméstico (Morales, 2013).

Fungicidas Ditiocarbamatos

Los fungicidas son compuestos empleados extensamente en la industria, agricultura, y el hogar para controlar los hongos que puede infectar y causar enfermedades en plantas, animales o el hombre; no se necesitan grandes dosis de estas sustancias para producir su efecto. Con pocas excepciones, la mayoría de estos fungicidas producen toxicidad baja en mamíferos, aunque se ha demostrado mediante pruebas de mutagenicidad microbiana in vitro que los fungicidas son citotóxicos.

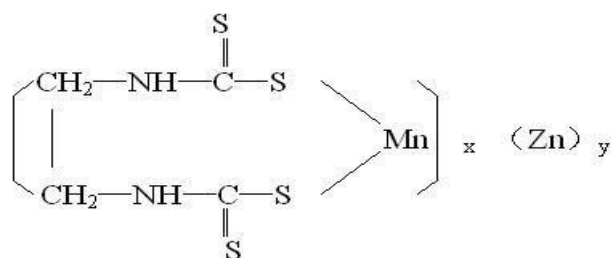


Figura 2. Estructura química de mancozeb.

Toxicocinética de los fungicidas

Vías de Absorción: Los fungicidas ingresan por vía inhalatoria, oral, dérmica y otras que sean de acuerdo a la solubilidad de la sustancia.

Biotransformación y excreción: Cuando el ditiocarbamato es ingerido, probablemente ocurre una degradación inicial del compuesto en el tracto gastrointestinal en donde se reduce a ácido carbámico, el cual se absorbe aceleradamente y se metaboliza por las enzimas hepáticas. Parte del ácido se excreta como un glucurónido, mientras que otra porción es metabolizada, y libera sulfuro de carbono. Los dimetil-ditiocarbamatos se pueden degradar a dimetil-tiocarbamatos, sulfatos y formaldehído mediante reacción de metilación y oxidación en los tejidos corporales. El ácido dimetil-tiocarbámico se elimina como un glucurónido. El mancozeb se metaboliza dando lugar a un producto de degradación conocido como Etilentiourea (ETU) o imidazolidina-2-tiona, agente cancerígeno, mutagénico y teratogénico. La principal vía de eliminación, tanto de los compuestos, originales como de los productos metabólicos es la orina a excepción del zineb que se elimina sin alterar, por las heces (Vallejo, M., 2000).

Tabla 2. Operacionalización de las Variables.

Variable	Tipo	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador
Mancozeb	Independiente	Es un fungicida perteneciente a la clase de los ditiocarbamatos, se utiliza en muchos cultivos, contra un amplio espectro de enfermedades fúngicas.	Exposición y dosis de la sustancia.	Efecto sobre los valores hematológicos.
Valores Hematológicos	Dependiente	Son aquellos que indican a través de parámetros numéricos las alteraciones que se pueden dar en el organismo.	Toma de muestra sanguínea, vía retroorbital, utilizando un capilar con anticoagulante y se realiza un frotis de sangre periférica.	Valores de la hematología completa y frotis sanguíneo.

Fuente: García, E, Morales, Y. (2019).

Hipótesis

Arias (2012) define que: La hipótesis es una suposición que expresa la posible relación entre dos o más variables, la cual se formula para responder tentativamente a un problema o pregunta de investigación. Para el presente proyecto de investigación se manejará una hipótesis explicativa, la cual para el mismo autor, es aquella que expresa la posible

causa de un hecho; y que a su vez, es predictiva – experimental; ya que plantea el posible efecto o consecuencia de un hecho.

Existe una relación directa entre los valores hematológicos y la dosis subcrónica de mancozeb, en ratones machos en edad comprendida de p10 a p75, en el Centro de Microscopia Electrónica “*Dr. Ernesto Palacios Pru*” área de Neuroquímica de la Universidad de Los Andes, desde Abril 2015 hasta Mayo 2017.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

Marco Metodológico

En este capítulo se presenta en forma detallada cada uno de los aspectos relacionados con la metodología que se seleccionó para llevar a cabo la investigación. Al respecto Arias (2006) afirma que: “La metodología del proyecto incluye el tipo o tipos de investigación, las técnicas y los instrumentos que serán utilizados para llevar a cabo la indagación. Es el cómo se realizará el estudio para responder al problema planteado” (Pág.110).

Tipo de Investigación

Pertenece al tipo de investigación evaluativa. La cual Hurtado (2015), refirió que “su objetivo es evaluar los resultados de uno o más programas, que han sido, o están siendo aplicados dentro de un contexto determinado. Este tipo de investigación se diferencia de la confirmatoria en que los resultados que intenta obtener son más específicos y se orientan hacia la solución de un problema concreto en un contexto social o institucional determinado” (Pág.131).

Por consiguiente, la investigación planteada es de tipo Evaluativa, ya que consistió en indagar si los objetivos que se han planteado están siendo o no alcanzados, y descubrir cuales aspectos del proceso han contribuido o entorpecido el logro de dichos objetivos.

Diseño de la Investigación

Arias (2012), “El diseño de investigación es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado”. Con base a esto, se van a recolectar datos en la realidad directamente del fenómeno para así evaluar la relación de los valores hematológicos asociados a dosis subcrónica de mancozeb en los ratones, por lo tanto se realizara un diseño experimental, el cual, según Arias (2012), define la investigación experimental como un proceso que consiste en someter a un objeto o grupo de individuos, a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente).

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La unidad de estudio estará representada por ratones machos en edad comprendida de p10 a p75.

Selección del Tamaño Muestral

Se analizaron un número de muestras de acuerdo a la disponibilidad de reactivos en el laboratorio. Por lo tanto se trabajó con 20 ratones cepas NMRI machos, los cuales se dividieron en dos grupos un grupo experimental con un n=10 ratones y un grupo control, n=10.

Procedimientos o Metodología

Los ratones machos cepa Naval Medical Research Institute (NMRI) proporcionados por el Bioterio Central de la Universidad de Los Andes, se les

administro vía intraperitoneal, una dosis de 50mg/kg peso corporal de mancozeb interdiarios y de solución fisiológica al grupo control, desde edad postnatal (P10) hasta adulto joven (P75). Se realizó el pesaje de todos los animales antes de suministrar las dosis para así sacar el peso promedio, y determinar los mililitros de solución a aplicar, cuando llegaron a la edad de adulto joven (P75), se procedió a la toma de muestra de sangre, la cual fue tomada con un capilar con anticoagulante por vía retroorbital, después de que se obtuvieron todas las muestras, se realizaron los frotis de sangre y la hematología completa, para observar si hay alteraciones en las células sanguíneas y en los valores hematológicos.

Diseño de Análisis

Los resultados de esta investigación fueron analizados a través del enfoque cuantitativo, el cual, según Hernández Sampieri y cols., (2014) refieren que: “El enfoque cuantitativo se centra en los usos y la interpretación de los métodos, más que en los procesos de cálculo, debido a que los análisis se realizan con ayuda de una computadora”. En la presente investigación los datos cuantitativos se presentaron con medidas de tendencia central y dispersión (media e intervalos de confianza 95%); la asociación estadística de datos cuantitativos se evaluó a través de la prueba t de Student. Los cambios en el peso corporal en función del tiempo y del tratamiento se analizaron como series temporales, determinando en cada punto de tiempo la media y el error estándar, la diferencia entre grupos se evaluó mediante ANOVA de dos vías. La significancia estadística se consideró para valores de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron con los programas SPSS versión 21 (IBM Corporation, New York, US), Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, US) y GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, USA)

Materiales y Reactivos

- Guantes
- Inyectadoras
- Tubos de eppendorf
- Capilares con anticoagulante
- Cubreobjetos (Laminillas)
- Colorante de Wright

Técnica de procesamiento

-Extracción de sangre vía retroorbital: Se realiza puncionando la vena ocular hasta colectar la muestra.

-Frotis de sangre periférica: Un frotis de sangre preparado en forma adecuada es esencial para asegurar la evaluación correcta de la morfología celular. A continuación se describen los métodos a utilizar en el presente estudio:

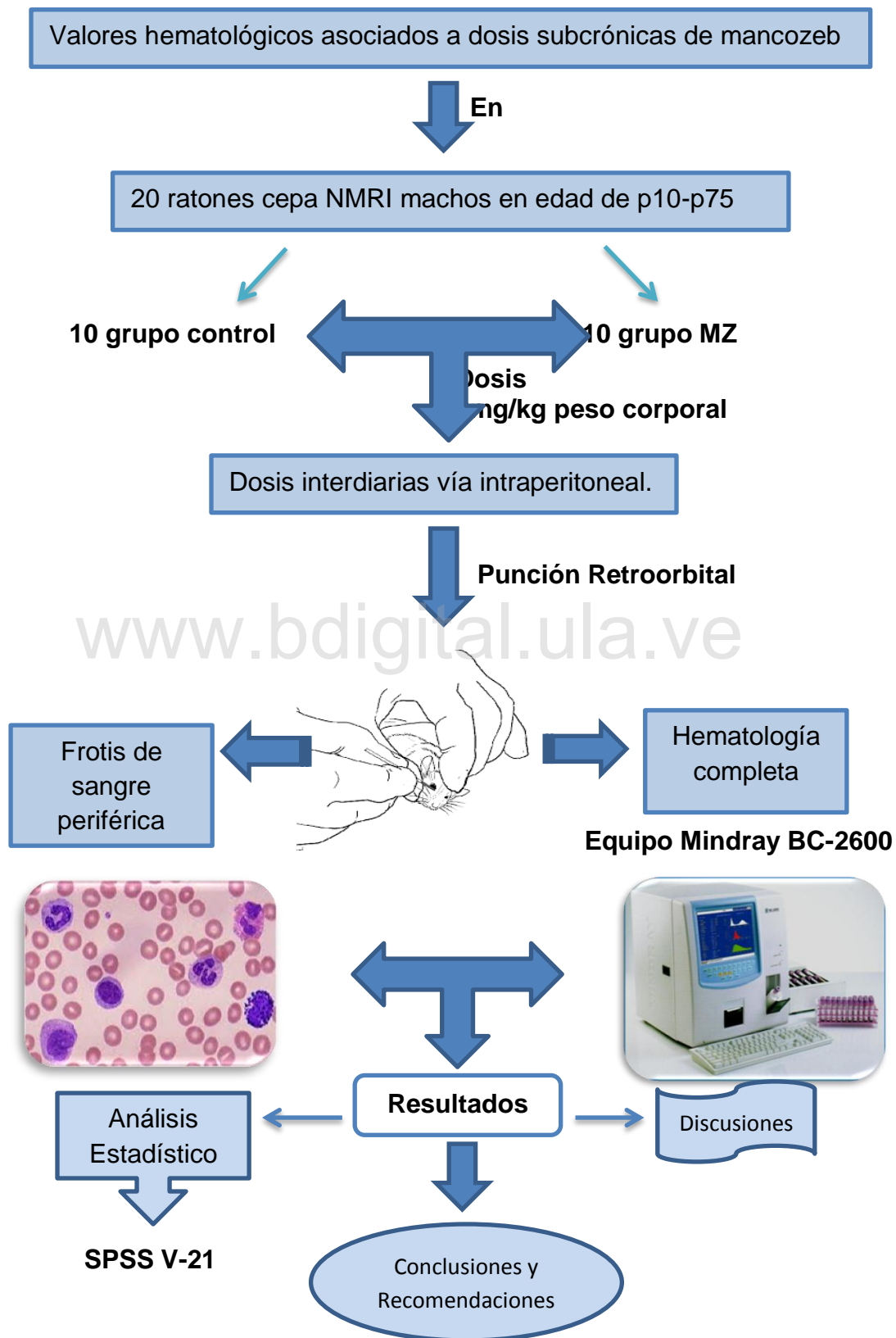
-Preparación de frotis de sangre con la técnica de cubreobjetos (laminillas): Es el resultado de la extensión de una gota de sangre de manera uniforme sobre una laminilla. El objetivo es obtener una delgada capa de sangre que luego debe teñirse con una coloración específica. No obstante, el tamaño de la gota es importante; las gotas demasiado grandes forman extendidos gruesos, mientras que las que son pequeñas producen extendidos delgados (Mckenzie, 2000; Carr y Rodak, 2012).

-Tinción de frotis de sangre: El objetivo de teñir los frotis sanguíneos es identificar las células y reconocer fácilmente la morfología a través del microscopio. Los métodos empleados para teñir las células de la sangre se

basan en la utilización de colorantes tipo Romanowsky. Consiste en azul de metileno y eosina, por lo tanto se denominan tinciones policrómicas. Las propiedades de tinción dependen del enlace de los colorantes a las estructuras químicas celulares; de manera que los componentes celulares ácidos (como los ácidos nucleicos, proteínas de los núcleos celulares, y el citoplasma inmaduro reactivos) fijan los colorantes básicos (azul de metileno), mientras que las estructuras celulares básicas (como hemoglobina y proteínas básicas de ciertos gránulos) fijan los colorantes ácidos (eosina). (Mckenzie, 2000; Carr y Rodak, 2012).

www.bdigital.ula.ve

Camino Metodológico



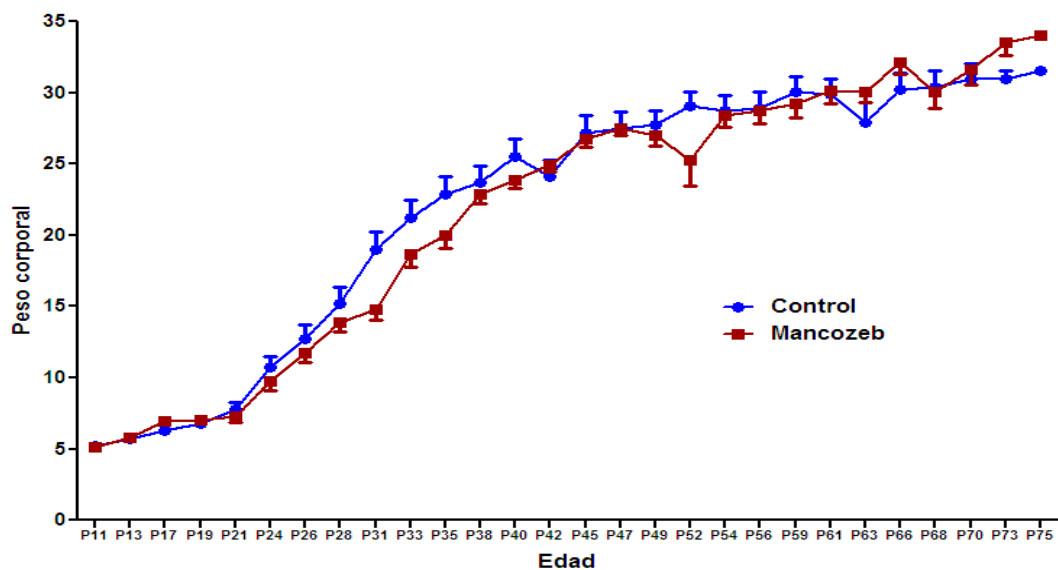
CAPÍTULO IV

Resultados y Discusiones

Variación del peso corporal

Para evaluar la relación entre los valores hematológicos y la dosis sub-crónica de Mancozeb se utilizó una muestra conformada por 20 ratones cepa NMRI machos en edad comprendida de p10 a p75, los cuales fueron divididos en dos grupos (control y mancozeb). Los resultados obtenidos fueron analizados en el programa estadístico SPSS versión 21 (IBM Corporation, New York, US), Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, US) y GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, USA).

Figura 3. Variación del peso corporal en función del tiempo y los grupos de ratones evaluados.



Cada serie temporal muestra los valores promedio y el error estándar respectivo (n=10). La diferencia entre los grupos se evaluó con ANOVA de dos vías, se determinó un valor de $p = 0,046$ para el peso corporal de los ratones y de $p < 0,001$ para el tiempo. En la figura 3, se observa como fue la variación del el peso corporal en función del tiempo y los grupos evaluados y el análisis estadístico demostraron que las diferencias fueron significativas y los ratones expuestos al fungicida mancozeb expresaron un menor peso corporal hasta edad de periadolescente (p54), sin embargo luego se evidencia como el grupo tratado con mancozeb iguala el peso al grupo control y en edad de adulto joven se observa un aumento.

Valores Hematológicos y frotis sanguíneos

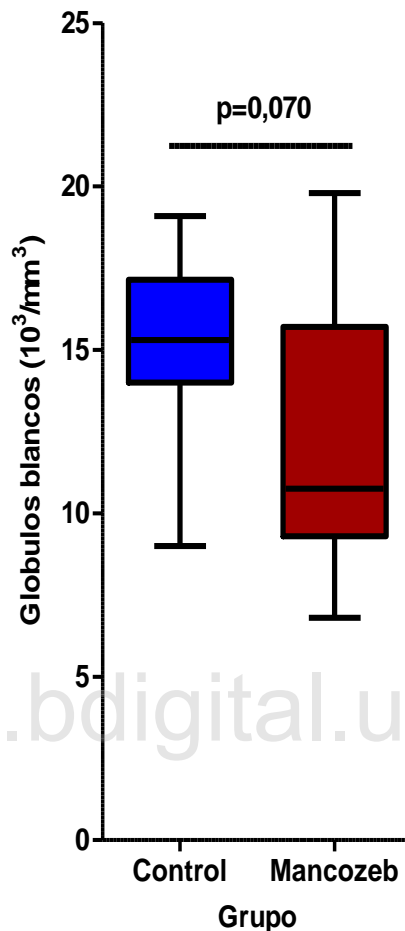
Para estudiar el efecto sub-crónico del mancozeb en los ratones se determinaron los valores hematológicos utilizando un equipo automatizado marca Mindray BC-2600, aunado a esto se realizó el frotis. En la tabla 5 se resumen los valores hematológicos hallados en los grupos de estudio los cuales se presentan a continuación:

Tabla 3. Valores hematológicos y frotis de sangre periférica de los grupos de estudio.

	Grupo		Valor de p
	Control n= (9)	Mancozeb n= (10)	
Glóbulos blancos (WBC)	15,2 (13 - 17,3)	12 (9,17 - 14,9)	<u>0,070</u>
Hemoglobina (HGB)	15,4 (14,5 - 16,4)	15,7 (14,8 - 16,6)	0,649
Hematocrito (HCT)	46,9 (44,2 - 49,5)	47,5 (44,8 - 50,2)	0,719
Plaquetas (PLT)	357 (320 - 394)	464 (435 - 493)	<u>0,0001</u>
Plaquetocrito (PCT)	0,317 (0,281 - 0,354)	0,415 (0,382 - 0,448)	<u>0,0005</u>
Volumen plaquetario medio (MPV)	8,99 (8,81 - 9,17)	7,99 (6,66 - 9,32)	<u>0,081</u>
Distribución de volumen plaquetario (PDW)	15,3 (15,2 - 15,5)	15,1 (14,9 - 15,2)	<u>0,027</u>
Linfocitos ($10^3/\text{mm}^3$)	6,92 (2,31 - 11,5)	8,56 (6,43 - 10,7)	0,396
Monocitos ($10^3/\text{mm}^3$)	2,5 (0,535 - 4,47)	2,34 (0 - 5,08)	0,899
Granulocitos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,72 (1,28 - 8,16)	3,76 (1,63 - 5,89)	0,529
Linfocitos (% frotis)	62,1 (56,2 - 68)	64,5 (57,2 - 71,8)	0,569
Monocitos (% frotis)	0,9 (0 - 1,99)	0,9 (0,113 - 1,69)	0,999
Neutrófilos (% frotis)	36,4 (30,8 - 42)	32,1 (24,6 - 39,6)	0,312
Eosinófilos (% frotis)	0,4 (0,0306 - 0,769)	2 (0,738 - 3,26)	<u>0,013</u>
Basófilos (% frotis)	0,2 (0 - 0,502)	0,3 (0 - 0,783)	0,696

Se muestran los valores promedios y los intervalos de confianza (entre paréntesis). La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

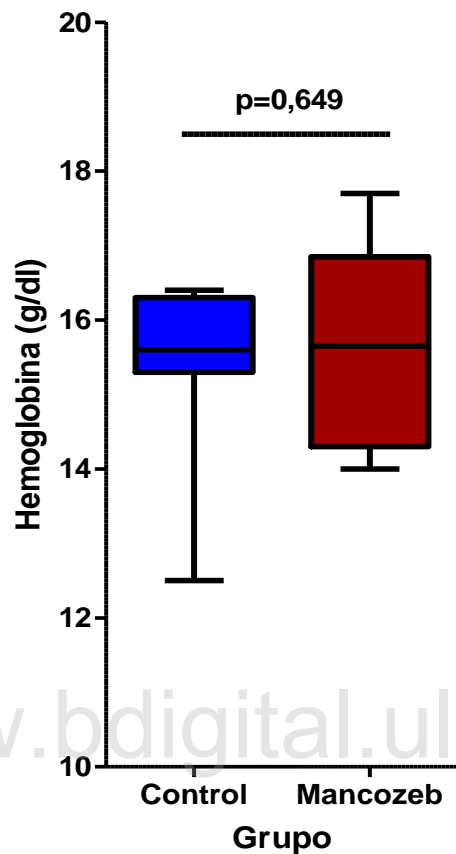
Figura 4. Valores de Glóbulos blancos.



El gráfico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. En esta gráfica se evidencia como los glóbulos blancos fueron notablemente menor en el grupo mancozeb lo cual fue estadísticamente significativo.

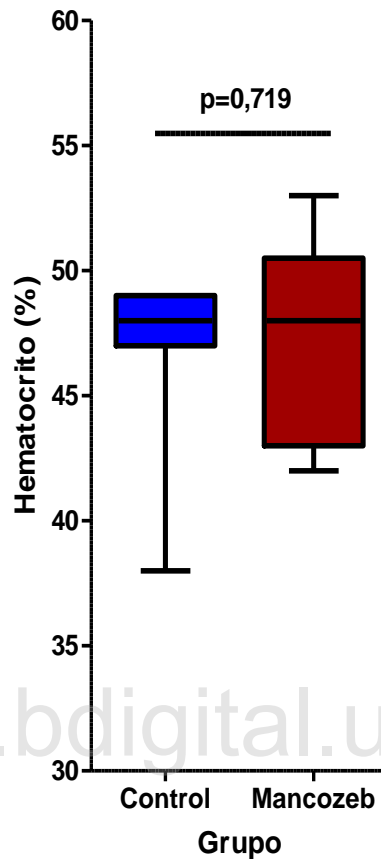
No se obtuvo diferencia en los grupos cuando se midió la hemoglobina (figura 5) y hematocrito (figura 6)

Figura 5. Valores de Hemoglobina.



El gráfico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

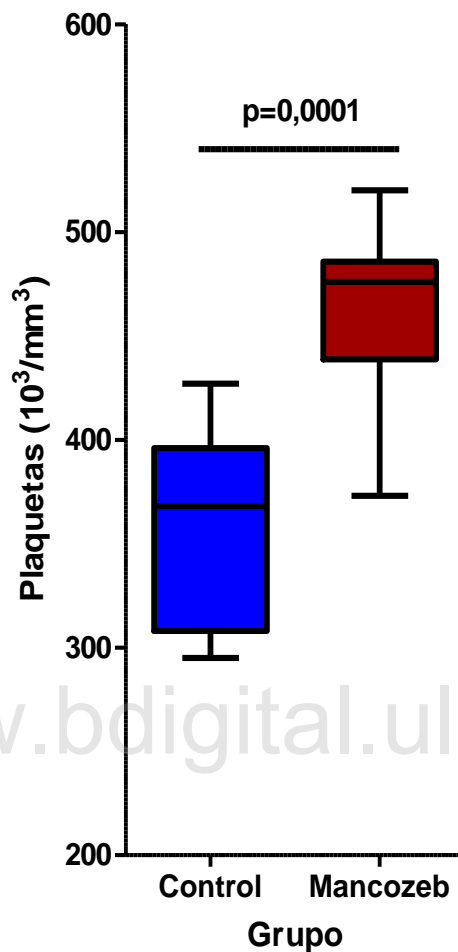
Figura 6. Valores de Hematocrito.



El grafico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

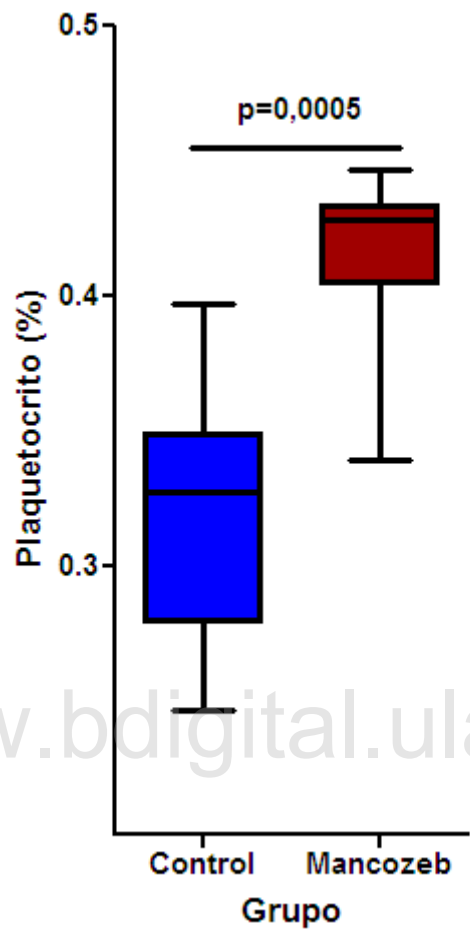
Se encontraron diferencias estadísticamente significativas y muy notorias en lo que fue plaquetas, plaquetocrito (PCT), volumen plaquetario medio (MPV) y distribución de volumen plaquetario (PDW) como se observa en las siguientes figuras:

Figura 7. Valores de Plaquetas.



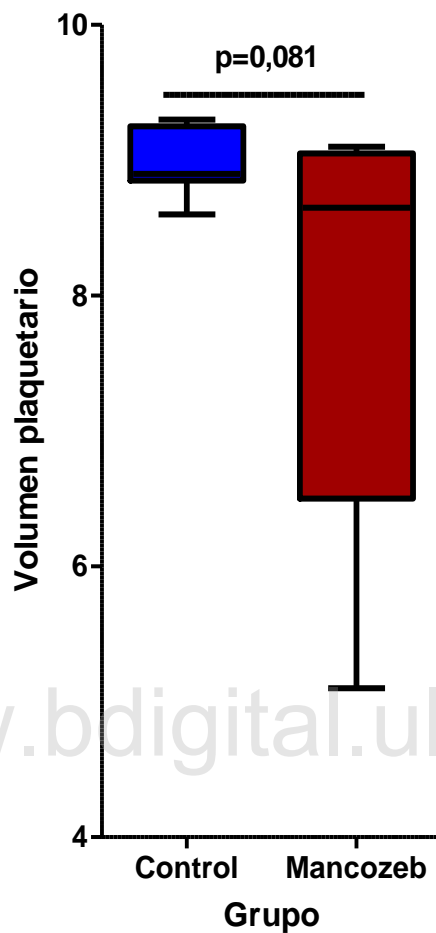
El gráfico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Figura 8. Valores de Plaquetocrito.



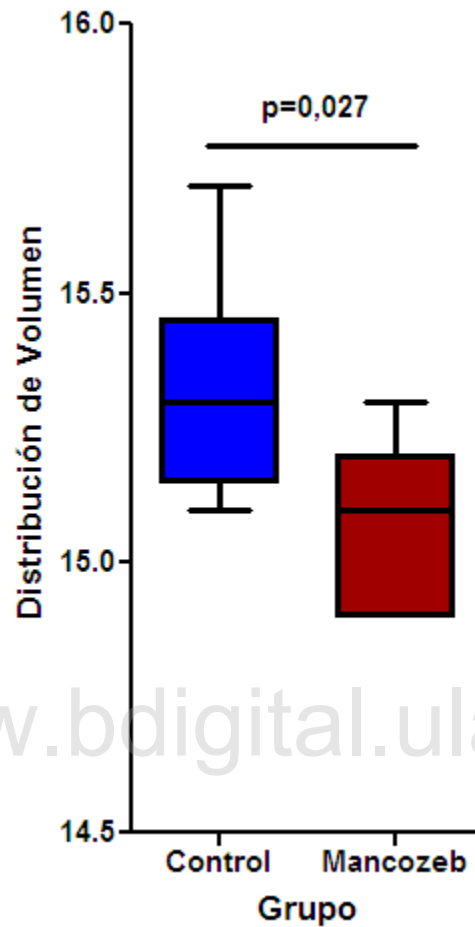
El grafico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Figura 9. Valores de Volumen plaquetario.



El gráfico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

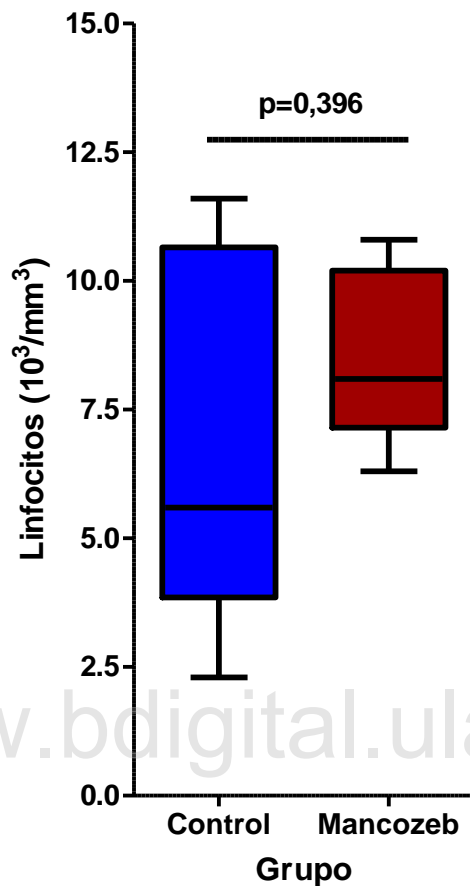
Figura 10. Valores de Distribución de volumen plaquetario.



El gráfico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

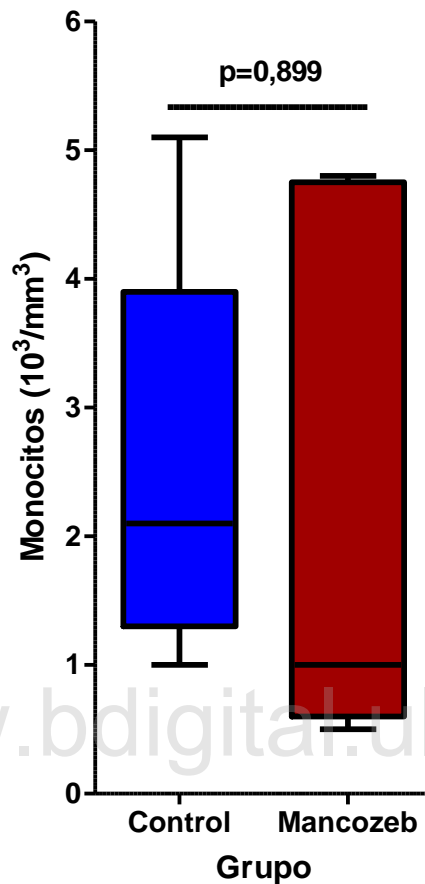
Los valores hematológicos analizados de linfocitos (figura 11), monocitos (figura 12) y granulocitos (figura 13), no presentaron diferencias significativas de los animales experimentales con respecto al grupo control con $p > 0,05$.

Figura 11. Valores de Linfocitos.



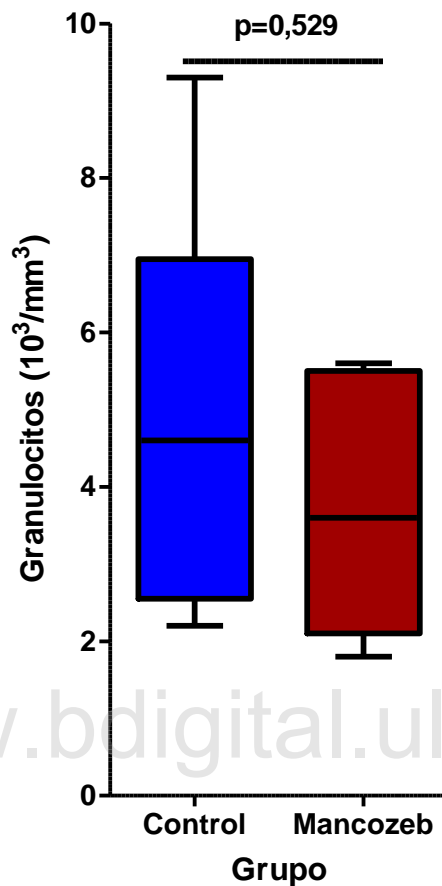
El gráfico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Figura 12. Valores de Monocitos.



El grafico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

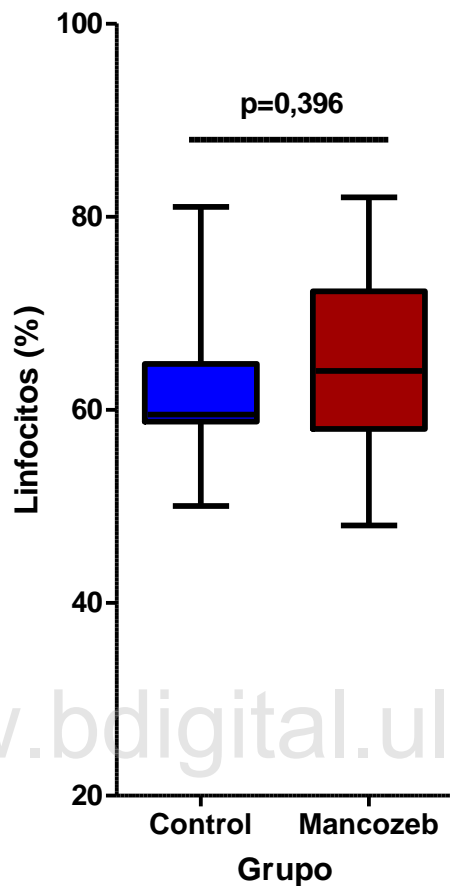
Figura 13. Valores de Granulocitos.



El gráfico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

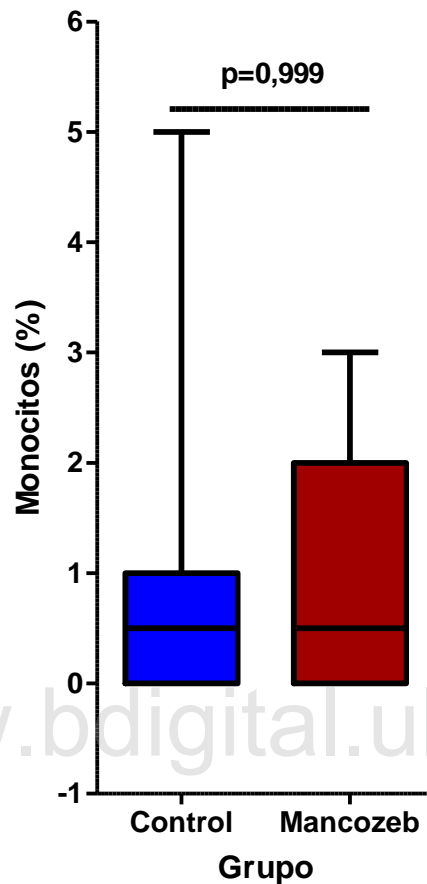
Después de realizar el conteo celular mediante el frotis de sangre periférica, no se observaron variaciones significativas en los linfocitos, monocitos, neutrófilos y basófilos de los ratones expuestos al fungicida con respecto al grupo control.

Figura 14. Valores de Linfocitos.



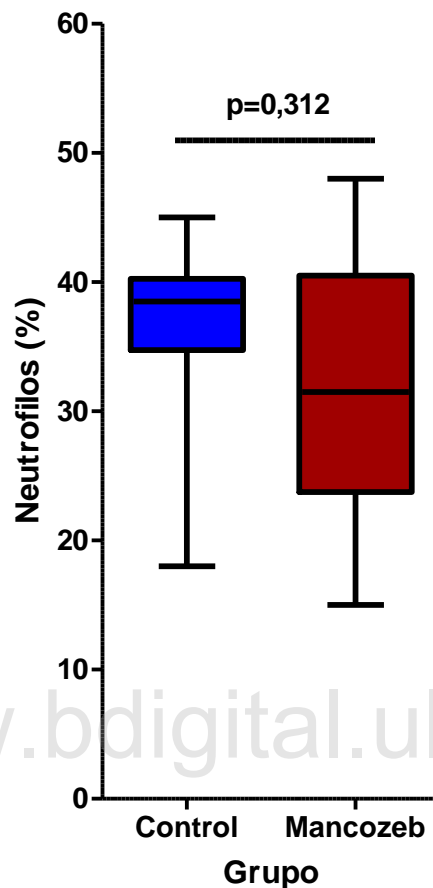
El gráfico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Figura 15. Valores de Monocitos.



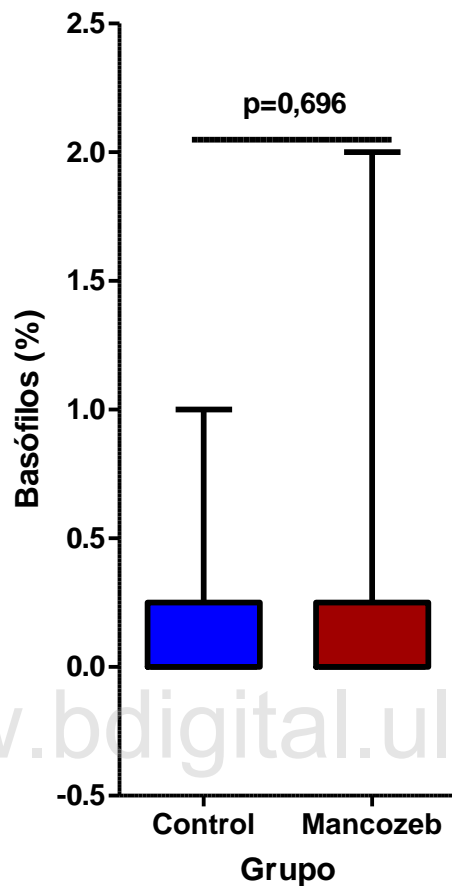
El grafico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Figura 16. Valores de Neutrófilos.



El gráfico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

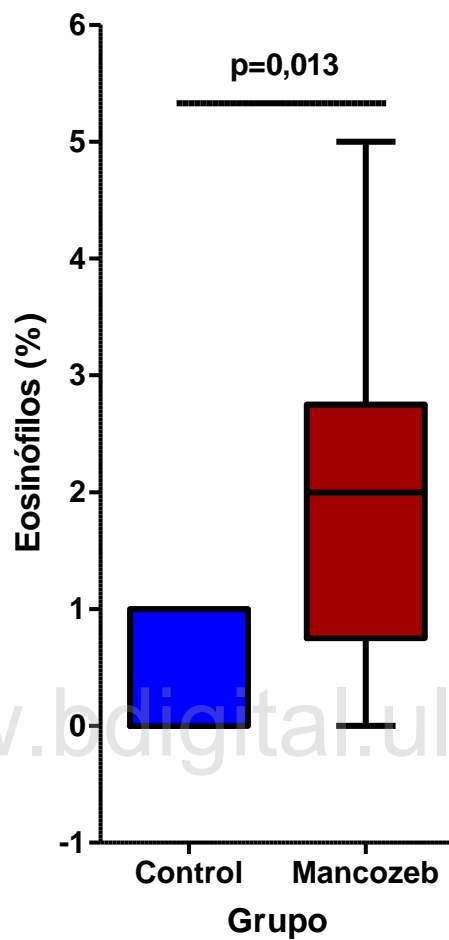
Figura 17. Valores de Basófilos.



El grafico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Es importante resaltar que en estos frotis de sangre periférica, los eosinófilos mostraron una gran diferencia significativa como se observa en la figura 18, estos se encuentran aumentados en el grupo de mancozeb.

Figura 18. Valores de Eosinófilos.



El gráfico de cajas y bigotes representa los valores máximos, mínimos (bigotes) y la distribución de los datos entre los percentiles 25 y 75 (cajas), se muestra además el valor del percentil 50 o mediana. La significancia estadística se evaluó con la t de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Discusiones

Variación del peso corporal

Los ratones tratados con el fungicida mancozeb se encuentran relacionados con problemas de factores de crecimiento porque si hubo una variación de peso corporal en comparación con el grupo control, resaltando que esto coincide con ciertos autores donde refieren que a diferentes dosis, los plaguicidas (organofosforados, piretroides y los fungicidas), producen variación en los pesos corporales de los animales (Aroonvilairat y cols 2018). Aunado a esto en un estudio que se hizo con este fungicida en la tiroides, se demostró que los niveles séricos de T3 y T4 disminuyeron notablemente (Kwon, D., et al. 2018). Por otra parte el mancozeb causa alteración de la neurotransmisión aminoacérgica y daños en las células neurosecretoras por neurotoxicidad, lo cual puede estar afectando el funcionamiento normal del sistema neuroendocrino (Morales, Y. 2014), lo cual pudiera estar relacionado con la sinergia de la hormona de crecimiento.

Valores Hematológicos y frotis sanguíneos

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar la relación de los valores hematológicos y la dosis subcrónica de mancozeb en ratones machos NMRI, durante el desarrollo, desde la etapa neonatal hasta la adultez, entre P10 y P75. El estudio hematológico fue hecho de dos maneras, mediante un hemograma completo automático y por frotis de sangre periférica. Un análisis comparativo de los resultados del recuento de las células sanguíneas fue hecho entre los grupos control y experimental, y mediante la prueba de "t" Student, se determinó las diferencias significativas entre ambos grupos, considerando los valores de $p < 0,05$ estadísticamente significativos.

Los resultados del estudio hematológico, en ratones expuestos a la dosis única de 50 mg MZ/kg peso corporal durante el desarrollo, mostraron

cambios ligeramente significativos en el recuento de glóbulos blancos y sus diferentes tipos celulares no fueron significativos como: los linfocitos, los monocitos, los neutrófilos, los basófilos, con la excepción de los eosinófilos, en comparación con los de animales control (Tabla 5). Se observó un incremento significativo del porcentaje de eosinófilos en el grupo expuesto a MZ con respecto al grupo control ($2\pm 1,26$ versus $0,4\pm 0,37$, respectivamente; $p=0,013$), el cual indica una activación del sistema inmune. Los eosinófilos están implicados en el control de las alteraciones que se producen en el contexto de las reacciones alérgicas y de defensa frente a los parásitos, infecciones u otras patologías (Fawcett, 1995). Se ha demostrado que la exposición a MZ afecta la expresión de ciertos factores de transcripción del complejo del sistema inmune, que contribuye a la disfunción inmunitaria (Mandarapu y Prakhya, 2016). La inmunotoxicidad inducida por plaguicidas es una preocupación importante ya que eventualmente puede provocar enfermedades asociadas con el mal funcionamiento del sistema inmune, tales como la hipersensibilidad, autoinmunidad y cáncer (Corsini y col., 2008).

Los niveles de hematocrito, que mide la cantidad de eritrocitos en la sangre, y de hemoglobina, la proteína contenida en los eritrocitos que se especializan en la función primaria de transportar oxígeno de los pulmones a los tejidos y dióxido de carbono desde los tejidos a los pulmones, se encuentran dentro del mismo rango de valores en ambos grupos experimental y control, demostrando que la exposición crónica a baja dosis de 50 mg MZ/kg peso corporal (1/100 DL50) no afectó la producción de las células sanguíneas rojas ni las blancas generadas en la médula ósea.

La sangre es un tejido líquido constituido por eritrocitos, leucocitos y plaquetas, suspendidos en un medio líquido denominado plasma sanguíneo. Un resultado importante obtenido en este trabajo de investigación fue la detección de altos niveles de plaquetas y sus índices plaquetarios, tales como: el Hematocrito plaquetario (PCT, siglas en inglés), el Amplitud

plaquetaria (PDW, siglas en inglés) y el Volumen medio de plaquetas (MPV, siglas en inglés) en los ratones expuestos a MZ durante el desarrollo (Tabla 5). Se detectó un incremento significativo ($p < 0,0001$) en los niveles de plaquetas, siendo la media del grupo control igual a $357 \pm 37 \times 10^3/\mu\text{l}$, mientras que la del grupo expuesto, $464 \pm 29 \times 10^3/\mu\text{l}$. En relación a los índices plaquetarios, hay un aumento significativo ($p < 0,0005$) en el PCT del grupo expuesto ($0,415 \pm 0,033\%$) en comparación con el grupo control ($0,317 \pm 0,037\%$), el cual correlaciona con el incremento en el nivel de plaquetas en los animales expuestos a MZ. El análisis comparativo de MPV entre el grupo control ($8,99 \pm 0,18 \text{ fL}$) y experimental ($7,99 \pm 1,33 \text{ fL}$) mostró una disminución importante pero no estadísticamente significativo ($p < 0,081$). Con respecto al PDW, se encontró una diferencia significativa ($p < 0,027$) entre los grupos control y expuesto ($15,3 \pm 0,2 \%$ versus $15,1 \pm 0,2 \%$, respectivamente), sin embargo, los valores se encuentran dentro del rango de referencia, entre $8,3\%$ y $56,6\%$, indicando un funcionamiento normal de las plaquetas. El PDW representa la variabilidad del tamaño de plaquetas y es un marcador más específico que el MPV de la activación de las plaquetas (Budak y col., 2016).

Cuando el nivel de plaquetas se encuentra por encima del límite superior de normalidad (en el hombre, $>450 \times 10^3/\mu\text{L}$), se denomina trombocitosis. Según su origen, la trombocitosis se clasifica en formas primaria y secundaria. La trombocitosis primaria es una enfermedad extremadamente rara en la infancia, con el recuento de plaquetas generalmente por encima de $1000 \times 10^3/\mu\text{L}$ y puede estar asociado con eventos hemorrágicos. La trombocitosis secundaria o reactiva se debe a una variedad de afecciones, como las infecciones bacterianas y virales, enfermedades inflamatorias, malignidad, deficiencia de hierro, vitaminas E y B12, anemia hemolítica, reacciones alérgicas, efectos secundarios con medicamentos, entre otros (Kucine y col., 2014). En este estudio, los ratones expuestos a MZ durante el desarrollo mostraron un recuento plaquetario significativamente ($p < 0,0001$)

elevado en comparación con el del grupo control, que podría estar asociado como un mecanismo de defensa y una respuesta inflamatoria de los ratones a la toxicidad de MZ. Este hecho se ha demostrado como una reacción alérgica confirmado por el aumento significativo ($p=0,013$) en el porcentaje de eosinófilos circulantes (Tabla 5 y Figura 18).

Los resultados de nuestro estudio no detectaron alteraciones en los parámetros hematológicos relacionados con los eritrocitos y leucocitos. Esto puede deberse a la baja dosis de MZ (1/100 DL50) utilizado en el estudio. Sin embargo, otros investigadores han demostrado alteraciones hematológicas y bioquímicas en roedores de experimentación usando dosis más altas y diferentes tiempos de exposición al fungicida. Yahia y col. (2015) trataron ratas Wistar macho, vía oral, con dos diferentes dosis de MZ: 500 y 1000 mg/kg peso corporal/ día (1/10 LD50 y 1/5 LD50, respectivamente), durante 8 semanas, y encontraron un aumento significativo en el recuento de glóbulos blancos, en contraste, una disminución en el recuento de glóbulos rojos, así como en los niveles de hemoglobina y hematocrito; se comprobaron alteraciones en el funcionamiento del hígado y los riñones con los resultados bioquímicos. Al-Amoudi (2012) expuso a ratones albinos, vía oral, al fungicida metalaxyl, 130 mg/kg peso corporal (1/10 LD 50), durante 4 semanas. El tratamiento con el fungicida provocó una disminución significativa en el recuento de glóbulos rojos, el contenido de hemoglobina y el número de plaquetas en la sangre, en contraste, se detectó un aumento significativo en el recuento de glóbulos blancos. La exposición al fungicida también causó deterioro en las funciones hepática y renal. Estos estudios concluyeron que los efectos tóxicos inducidos por los fungicidas, como el MZ y el metalaxyl, podrían atribuirse al estrés oxidativo, que a su vez conduce a signos de toxicidad.

El estrés oxidativo se refiere al proceso de deterioro celular dependiente de la producción excesiva de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species, por sus siglas en inglés), y se producen en

las células y tejidos cuando existe una perturbación del equilibrio entre las sustancias pro-oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras (Pupo y col., 2017). Es bien conocido que los efectos adversos de la exposición a los fungicidas ditiocarbamatos, como el MZ y el maneb, están vinculados a la generación de ROS y a la respuesta inflamatoria que estimula más la producción de ROS (Domico y col., 2007; Peña-Contreras y col., 2016). Asimismo, debido al estrés oxidativo, está ampliamente demostrado la neurotoxicidad de los fungicidas, particularmente a las neuronas que liberan dopamina como neurotransmisor, causando la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y contribuyendo a la disfunción motora, que conlleva al desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa de Mal de Parkinson (Domico y col., 2007).

La serotonina es otro neurotransmisor del sistema nervioso central (SNC) que es sensible a los efectos de los radicales libres (Harris y col., 2014) y juega un papel vital en la agregación plaquetaria y la regulación del tono vascular. Las plaquetas y las neuronas serotoninérgicas utilizan el mismo transportador de serotonina para el transporte y almacenamiento del mismo dentro de la célula (Ransing y col., 2017). Adicionalmente, estudios previos han demostrado que los niveles de serotonina en el líquido cefalorraquídeo y las plaquetas están significativamente correlacionados (Audhya y col., 2012). Los parámetros plaquetarios, tales como el recuento de las plaquetas, PCT y MPV, reflejan las funciones centrales serotoninérgicas y se consideran las ventanas de las funciones serotoninérgicas del cerebro debido a la dificultad de entrar y analizar el SNC (Ransing y col., 2017).

Así como las neuronas dopaminérgicas, las neuronas serotoninérgicas también son sensibles a los efectos tóxicos de MZ. Estudios llevados a cabo en *Caenorhabditis elegans*, un nematodo beneficioso del suelo, han demostrado que el MZ induce disfunción conductual, un ejemplo, la alteración del comportamiento de puesta de huevos mediado por serotonina, y daños morfológicos (Raley-Susman y col., 2017). En este sentido, la

trombocitosis secundaria observada en los ratones expuestos a MZ durante el desarrollo podría estar asociada con la respuesta del SNC al xenobiótico.

Numerosas evidencias han demostrado los efectos adversos de la exposición crónica a MZ, que incluyen neurotoxicidad, inmunotoxicidad, defectos en el sistema reproductivo y disrupción endocrina, tanto para las dosis altas así como las bajas, consecuentemente, el MZ ha sido considerado como un factor de riesgo para el desarrollo y la reproducción en los seres humanos (Runkle y col., 2017).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

- En el presente trabajo pudimos evidenciar que el mancozeb con una dosis de 50 mg Mz/kg peso corporal, produce una alteración en la variación de pesos de los ratones expuestos a este fungicida desde una edad temprana, con lo cual pudiera estar afectando el crecimiento y desarrollo normal de un individuo, trayendo consecuencias negativas a la salud en etapas posteriores de la vida.
- Se demostró que la exposición subcrónica durante el desarrollo a una dosis baja de mancozeb produjo alteraciones significativas en los parámetros plaquetarios, y no se detectaron variaciones en los otros parámetros hematológicos, el cual demuestra la sensibilidad de los índices plaquetarios como indicador de la exposición subcrónica a este fungicida.

Recomendaciones

- Se recomienda continuar con este estudio de investigación utilizando diferentes dosis tanto altas como bajas de mancozeb, con el fin de confirmar si el fenómeno observado es dosis-dependiente.
- Además, es recomendable realizar los estudios hematológicos conjuntamente con algunos parámetros bioquímicos relacionados con el estado de la salud hepático, renal y tiroideo.
- Adicionalmente, para correlacionar los cambios hematológicos con los efectos neurotóxicos al aumentar la dosis de mancozeb, es interesante estudiar las variaciones morfológicas que ocurren en algunas regiones del Sistema Nervioso Central.
- Alertar a toda la colectividad, mediante diferentes medios de comunicación, sobre los efectos tóxicos de este tipo de sustancias a la población expuesta directa e indirectamente, indicando las medidas de protección adecuadas para el uso de este tipo de sustancias.

BIBLIOHEMEROGRAFIA

- Alavanja, C., Hoppin, J., y Kamel, F. (2004). Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. 25:155-197.
- Al-Amoudi, WM. (2012). Hematological and biochemical effects of metalaxyl fungicide on albino mice. *American Journal of Biochemistry*, 2(5): 62-66.
- Anderson, k. (2005). *Diccionario de Medicina Océano Mosby*. Barcelona, España: Océano.
- Arcila, V., Conde, C., Nieto, J., y García, F. (2010). Comparación de los valores de referencia hematológicos en ratas wistar / UIS (*Rattus norvegicus*) con parámetros estabilizados en laboratorios de altos estándares. *Revista Spei Domus*, 6(12), 49.
- Arias, F. (2012). *En el proyecto de investigación. Introducción a la metodología científica*. 6ª edición. (pp. 27-112). Caracas-Venezuela: Editorial Episteme.
- Arias, F. (2006). *El proyecto de investigación. Introducción a la metodología científica*. 5ª edición. (pp.110). Caracas Venezuela: Editorial Episteme.
- Aroonvilairat, S., Tangjarukij, C., Sornprachum, T., Chaisuriya, P., Siwadune, T., y Ratanabanangkoon, K. (2018). Effets of topical exposure to a mixture of chlorpyrifos, cypermethrin and captan on the hematological and immunological systems in male Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 59: 53-60.
- Ávila, J., Mamani, B., y Ruiz, G. (2013). Determinación de valores de referencias hematológicos y bioquímicos en ratones albinos swiss criados y reproducidos en el bioterio de la facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. La Paz-Bolivia. *Rev. Cs. Farm. y Bioq.* 1(1). Recuperado de

http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652013000100009&lng=es&nrm=iso

- Audhya, T., Adams, JB., y Johansen, L. (2012). Correlation of serotonin levels in CSF, platelets, plasma, and urine. *Biochim Biophys Acta*, 1820:1496-501.
- Axelstad, M., Boberg, J., Nellemann, C., Kiersgaard, M., Jacobsen, PR., Christiansen,.... Hass, U. (2011) Exposure to the widely used fungicide mancozeb causes thyroid hormone disruption in rat dams but no behavioral effects in the offspring. *Toxicol sciences*, 120(2): 439-46.
- Budak, YU., Polat, M., y Huysal, K. (2016). The use of platelet indices, plateletcrit, mean platelet volume and platelet distribution width in emergency non-traumatic abdominal surgery: a systematic review. *Biochemia Medica*, 26(2):178-93.
- Carr, J., y Rodak, B. (2012). *Atlas de Hematología Clínica*. 3ª edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Chandrasekhar, V. (2013). Plateletcrit as a screening tool for detection of platelet quantitative disorders. *J Hematol*, 2(1):22-26.
- Corsini, E., Liesivuori, J., Vergieva, T., Loveren. H., y Colosio, C. (2008). Effects of pesticide exposure on the human immune system. *Human Exp Toxicol*, 27:671-680.
- Corrons, J., y Bascompte, J. (2006). *Manual de técnicas de laboratorio en hematología*. 3ª edición. Barcelona (España): El sevier.
- Corsini, E., Birindelli, S., Fustinoni, S., De Paschale, G., Mammone, T., Visentin, S., Galli, CL.,....Colosio, C. (2005). Immunomodulatory effects of the fungicide mancozeb in agricultural workers, *Toxicol Appl Pharmacol*, 208: 178-185.

- Domínguez, LM., Cooper, KR., Bernard, LP., y Zeevalk, GD. (2007). Reactive oxygen species generation by the ethylenebis-dithiocarbamate (ebdc) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology*, 28(6): 1079–1091.
- Fawcett, DW. (1995). *Tratado de histología*. 12ª Edición. Interamericana McGraw-Hill, Nueva York, pp 121-147.
- Ferreira, GS., Masson, G., Costa, E., Lima, D., Oliveira, G., Soares, FN.,... Souza AMA. (2009). Plateletcrit, Mean Platelet Volume and Platelet Distribution Width: Its expected values and correlation parameters in dogs from northern region of Brazil. *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings*.
- Flores, M., Molina, Y., Balza, A., Benítez, P., y Miranda, L. (2011). Residuos de plaguicidas en aguas para consumo humano en una comunidad agrícola del Estado Mérida. *Invest Clin*, 52(4): 295-311.
- García, C., Parrón, T., Requena, M., Alarcón, R., Tsatsakis, A., y Hernández, A. (2016). Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sciences*, 145, 245-283.
- Grupo de vigilancia y control de factores de riesgo ambiental (2010). Protocolo de vigilancia y control de intoxicaciones por plaguicidas. [Documento en línea]. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/INTOXICACION_POR_PLAGUICIDAS.pdf [Consultada: 2016, Noviembre 26].
- Guyton, C. G. y Hall, J. (2006). *Tratado de la Fisiología Médica*. 11ª edición. Madrid, España: El sevier.

- Harris, KD., Weiss, M., y Zahavi, A. (2014). Why are neurotransmitters neurotoxic? An evolutionary perspective [v2; ref status: indexed, <http://f1000r.es/4sz>] F1000Research 3:179.
- Hernández-Sampieri R., Fernández, C., y Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación*. 6ª edición. (pp. 270). México: Mc Graw Hill.
- Hernández-Sampieri R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). Definición del alcance de la investigación a realizar: exploratoria, descriptiva, correlacional o explicativa. *Metodología de la investigación* (pp. 76). Chile: Mc Graw Hill.
- Hurtado, J. (2015). El proyecto de investigación, comprensión holística de la metodología y la Investigación. *Compresión holística de la metodología y la investigación*. 8ª edición. (pp.131). Caracas: Ediciones Quirón.
- Ichikawa, H. (2015). Neurotoxicology of pesticides. *Brain Nerve*, 67 (1):39-48.
- Jaime, J., y Gomez, D. (2012). *Hematología. La sangre y sus enfermedades* 3ª edición. México: McGraw-Hill.
- Klaassen, CD., y Watkins III JB. (2001). *Manual de toxicología*. 5ª edición. (pp. 646-648). McGraw-Hill-Interamericana.
- Kucine, N., Chastain, KM., Mahler, MB., y Bussel, JB. (2014). Primary thrombocytosis in children. *Hematological* 99:620-628.
- Kwon, D., Chung, HK., Shin, WS., Park, YS., Kwon, SC., y Song, J. (2018). Toxicological evaluation of dithiocarbamate fungicide mancozeb on the endocrine functions in male rats. *Molecular & Cellular Toxicology*, 14 (1), 105-112.

- Mandarapu, R., y Prakhya, BM. (2016). Exposure to cypermethrin and mancozeb alters the expression profile of THBS1, SPP1, FEZ1 and GPNMB in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunotoxicology* 13(4): 463-473.
- McKenzie, S. (2000). *Hematología Clínica*. 2ª edición. México: Editorial Manual Moderno.
- Miranda, L., Osuna, J., Cruz, I., Morales, Y., Camacho, N., Cicchetti, R.,... Sanchez, B. (2017). Altered Hematological and Biochemical Parameters in Schoolchildren Living in an Agricultural Community of Mérida State, Venezuela. *J Environ Anal Toxicol*, 7:1.
- Morales, C., y Rodríguez, N. (2004). El clorpirifos: posible disruptor endocrino en bovinos de leche. *Rev Col Ciene Pec*, 17 (3): 255-266.
- Morales, Y., Miranda, C., Peña, Z., Dávila, D., Balza, A., Sánchez, B., y Mendoza, R. (2018). Developmental exposure to mancozeb induced neurochemical and morphological alterations in adult male mouse hypothalamus. *Environ Toxicol Pharmacol*, 64:139-146.
- Morales, Y. (2014). *Efectos neurotóxicos inducidos por la exposición subcrónica a atrazina y mancozeb durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven en el hipotálamo*. Tesis para optar al título de magister en ciencias médicas fundamentales. Universidad de Los Andes, Facultad de Medicina. Mérida (Venezuela).
- Morales, Y., Miranda, L., y Di Bernardo, M. (2014). *Neurotoxicidad de los plaguicidas como agentes disruptores endocrinos: Una revisión*. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", 45, (2), 58.
- Morales, Y. (2013). *Neurotoxicidad de la exposición crónica a mezcla de plaguicidas disruptores endocrinos: Una revisión breve*. Monografía para

- post grado en ciencias médicas fundamentales. (pp. 4-9). Universidad de Los Andes, Facultad de Médica. Mérida (Venezuela).
- Payan, R., Garibay, C., Rangel, A., Preciado, M., Beltran, M., Mena, M.,... Celis, R. (2013). Effect of chronic pesticide exposure in farm workers of a Mexico community. *Environmental y occupational Health*, 67(1): 22-30.
- Peña, Z., Miranda, L., Morales, Y., Colmenares, M., Dávila, D., Balza, A.,... Briceño, R. (2016). Atrazine and mancozeb induce excitotoxicity and cytotoxicity in primary cultures of mouse cerebellar cortex. *Toxicological y Environmental Chemistry. Technological and Artistic Development of the University of Los Andes, Mérida, Venezuela*. 98: 8, 959-976.
- Pesantes, K. (2015). *Determinación de alteraciones morfológicas de células sanguíneas en personas expuestas a la contaminación laboral por Pb y Hg en trabajadores de la mina Cristo De Oro des sitio Muyuyacu, cantón Ponce Enríquez, provincia del Azuay, 2013*. (Trabajo de titulación). UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Química y de la Salud, Machala, Ecuador.
- Pupo, EV., Robles, LG., y Campaña, IR. (2017). Estrés oxidative. CCM 1:171-186.
- Raley-Susman, KM., Chou, E., y Lemoine, H. (2017). Use of the model organism caenorhabditis elegans to elucidate neurotoxic and behavioral effects of commercial fungicides. *IntechOpen*, 37-53, Recuperado de <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70994>
- Ransing, RS., Patil, B., y Grigo, O. (2017). Mean platelet volume and platelet distribution width level in patients with panic disorder. *J Neurosci Rural Practice* 8(2): 175-178.
- Rodak, B. (2005). *Hematología. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas*. 2ª edición. Madrid, España: Panamericana.

- Runkle, J., Flocks, J., Economos, J., y Dunlop, AL. (2017). A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. *Environ Int* 99: 29–42.
- Şahin, F., Yazar, E., y Yıldız, P. (2012). Prominent features of platelet count, plateletcrit, mean platelet volume and platelet distribution width in pulmonary tuberculosis. *Multidiscip Respir Med* 7(1): 38-48.
- Tapia, P. (2006). *Determinación de plaguicidas organoclorados (POC) en niños residentes del Ejido Guadalupe Victoria, Valle del Yaqui, Sonora*. Tesis para obtener el título de Ingeniera Biotecnóloga. Instituto Tecnológico de Sonora. México.
- Urdaneta, Z. (2013). *Valores hematológicos y perfil de Hierro en preescolares con estado de nutrición normal y obesos*. Tesis de postgrado para optar al título de especialista en puericultura y pediatría. (pp. 22). Universidad del Zulia, Facultad de Medicina. Zulia (Venezuela).
- Vallejo, M. (2000). Plaguicidas. En D. Córdoba (Ed.), *Toxicología* (pp.107-113). Bogotá, Colombia. Editorial Manual Moderno.
- Yahia, E., Aiche, MA., Chouabbia, A., y Boulakoud, MS. (2015). Biochemical and hematological changes following long term exposure to mancozeb, *Adv Biores* 6(2): 83-86.