



**UTPL**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
Y EXACTAS**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**Ensayo de cierre de herida en líneas celulares de próstata  
tras la exposición a plaguicidas**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Autor:** Puglla Ganazhapa, Ricardo Luis

**Directora:** Arévalo Jaramillo, Ana Paulina

LOJA

2024



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2024

## Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Loja, 04 de octubre de 2024

Magister,  
Claudia Teresa Cruz Erazo  
**Director de la carrera de Bioquímica y Farmacia**  
Ciudad. -

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Titulación denominado: Ensayo de cierre de herida en líneas celulares de próstata tras la exposición a plaguicidas, realizado por Ricardo Luis Puglla Ganazhapa y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Directora Mgtr. Ana Paulina Arévalo Jaramillo

C.I.: 1104205933

Correo electrónico: aparevalo1@utpl.edu.ec

### **Declaración de autoría y cesión de derechos**

Yo, Ricardo Luis Puglla Ganazhapa, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor del Trabajo de Titulación denominado: Ensayo de cierre de herida en líneas celulares de próstata tras la exposición a plaguicidas, de la carrera de Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Capítulo uno: Marco Teórico. Capítulo dos: Metodología. Capítulo tres: Resultados y Discusiones, siendo Ana Paulina Arévalo Jaramillo, directora del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”, en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Ricardo Luis Puglla Ganazhapa

C.I.:1104668874

Correo electrónico: [rlpuglla@ utpl.edu.ec](mailto:rlpuglla@utpl.edu.ec)

### **Dedicatoria**

El presente trabajo investigación está dedicado a mi familia, de manera muy especial a mi madre María Miria Rosa Ganazhapa, por su dedicación, su tiempo, su esfuerzo y por su ejemplo de vida, y en especial por ser padre y madre a lo largo de mi vida y ser mi motor para lograr esta meta profesional. Así mismo se lo dedico a mis abuelitos José Nicanor Ganazhapa Puchaicela y María Asunción Guamán Morocho por su incomparable apoyo hacia mí en el trayecto de mi vida desde el día que nací.

Además, se lo dedico a mis ángeles que están en el cielo, mi tío Juan Puglla (+), mi abuelita María de Jesús Placencia (+), por haberme dado la fuerza para no rendirme por más difícil que sea la vida, enseñándome los valores que nunca deben faltar dentro una familia, de manera especial a mi nuevo ángel, mi abuelito José Antonio Puglla (+), a quien Dios lo llamo hace pocos días para estar junto a él en cielo para desde ahí observarme y cuidarme en cada paso que dé hacia nuevas metas.

También dedico este trabajo a mis compañeros y mejores amigos: Pablo, Marco y Nathaly, ya que han sido un apoyo incondicional desde el inicio de la vida universitaria, además de ser unas personas con las que se puede en los buenos y malos momentos.

## **Agradecimiento**

Agradezco principalmente a Dios y a la Virgen de Cisne por permitirme cumplir un sueño de todas las metas y objetivos propuestos a lo largo de mi vida. Seguidamente agradezco a mi tutora de tesis Mgtr. Ana Paulina Arévalo, quien me brindo la oportunidad y me abrió las puertas del Laboratorio de Biología Molecular Humana, para poder continuar mi formación profesional además de permitirme trabajar junto a ella en los proyectos de investigación, en la cual su paciencia, confianza, constancia y su manera característica de brindar el apoyo necesario a sus estudiantes y tesisistas que se ve reflejado en el diario vivir dentro y fuera del laboratorio y donde los cuales me dejan un aprendizaje, enseñanzas inolvidables, así mismo como una experiencia única

Asimismo, agradezco a los miembros del tribunal, al Ph.D. Luis Guamán y a la Mgtr. María Isabel Ramírez, por ser unos excelentes profesionales y guías tanto en las aulas, en el laboratorio y no obstante fuera de las mismas.

Además, agradezco a mi novia quien ha sido esa persona especial en mi vida y que ha estado apoyándome en el proceso dándome ese ánimo, cariño y amor cuando más lo necesitaba para seguir en este duro camino lograr esta meta, también agradecer a la BqF. Thalía Bravo por siempre estar presta a brindar su ayuda con los diferentes equipos y materiales necesarios para el desarrollo del presente trabajo, y por ultimo y no menos importante a mis compañeros de laboratorio Diana, Danilo, Nicole, Gina, Ariana y Jenner con los cuales pude compartir mi etapa de tesisista durante todo este tiempo en el cual pudimos compartir momentos buenos y malos dentro y fuera del laboratorio.

## Índice de contenido

Carátula .....	I
Aprobación del director del Trabajo de Titulación .....	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria .....	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de contenido .....	VII
Resumen.....	1
Abstract .....	2
Introducción .....	3
Marco Teórico .....	6
Capítulo uno.....	6
1.1 Tóxicos en el medio ambiente .....	6
1.1.1 <i>Plaguicidas</i> .....	6
1.2 Exposición a plaguicidas y su efecto celular .....	7
1.3 Ensayo de cierre de herida.....	8
Capítulo dos .....	10
Metodología.....	10
2.1 Líneas celulares .....	10
2.2 Plaguicidas .....	10
2.3 Ensayos celulares.....	11
2.3.1 <i>Ensayo de viabilidad celular</i> .....	11
2.3.2 <i>Ensayo de cicatrización o cierre de herida</i> .....	11

<b>Capítulo tres</b> .....	<b>14</b>
<b>Resultados y Discusiones</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1 Resultados</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2 Discusión</b> .....	<b>18</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>21</b>
<b>Recomendaciones</b> .....	<b>22</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>23</b>

#### Índice de tablas

<b>Tabla 1 Concentraciones usadas de los plaguicidas</b> .....	<b>10</b>
--	-----------

#### Índice de figuras

<b>Figura 1 Procesamiento de Imágenes en el software Imagen J</b> .....	<b>12</b>
<b>Figura 2 Ensayo de viabilidad celular PNT2</b> .....	<b>14</b>
<b>Figura 3 Ensayo de viabilidad celular PC3</b> .....	<b>15</b>
<b>Figura 4 Graficas del ensayo de cierre de herida línea celular PNT2</b> .....	<b>16</b>
<b>Figura 5 Graficas del ensayo de cierre de herida línea celular PC3</b> .....	<b>16</b>
<b>Figura 6 Graficas del radio de migración de la línea celular PNT2</b> .....	<b>17</b>
<b>Figura 7 Graficas del radio de migración de la línea celular PC3</b> .....	<b>17</b>

## Resumen

Los plaguicidas, compuestos químicos de uso generalizado en la agricultura para el control de plagas, han sido identificados como un peligro, ya que a largo plazo son una problemática tanto para el medio ambiente como para la salud humana; estos pueden encontrarse en el ambiente e incluso en alimentos. Se ha descrito que los plaguicidas provocan toxicidad, afectando diferentes procesos celulares tales como la muerte celular y varias vías de señalización. Este estudio se ha enfocado en determinar alteraciones celulares *in vitro* de las líneas celulares PNT2 y PC3 expuestas a plaguicidas a través del ensayo de cierre de herida, para lo cual se usó diferentes formulaciones comerciales de plaguicidas; las diferencias entre los tratamientos y el control se analizaron mediante análisis de varianza ANOVA. Se observó diferencias significativas en el ensayo de viabilidad de la línea celular PNT2, en la cual se observó aumento en la viabilidad a las 48 horas, y no observaron diferencias significativas en el cierre de herida y ratio de migración. No se encontraron diferencias significativas en los análisis con la línea celular PC3.

*Palabras clave:* plaguicidas, cierre de herida, migración.

### Abstract

Pesticides, chemical compounds widely used in agriculture for pest control, have been identified as a hazard, as they pose long-term problems for both the environment and human health; they can be found in the environment and even in food. It has been reported that pesticides cause toxicity, affecting different cellular processes such as cell death and various signaling pathways. This study focused on determining *in vitro* cellular alterations in PNT2 and PC3 cell lines exposed to pesticides through a wound healing assay, using different commercial pesticide formulations; the differences between treatments and the control were analyzed by analysis of variance (ANOVA). Significant differences were observed in the viability assay of the PNT2 cell line, where an increase in viability was observed at 48 hours, and no significant differences were observed in wound closure and migration rate. No significant differences were found in the analyses with the PC3 cell line.

*Keywords:* pesticides, wound closure, migration.

## Introducción

A lo largo de los años, se ha evidenciado un gran incremento en el uso de plaguicidas a nivel mundial, lo que ha conducido a la contaminación ocupacional y a la exposición de la población en general por medio de alimentos, agua y suelos tratados (Leveque et al., 2019). La exposición a estos tóxicos se ha relacionado con la producción de radicales libres y estrés oxidativo. El estrés oxidativo estaría alterando las vías de señalización celular y conduciendo al desarrollo de diversas enfermedades como diabetes, neurodegeneración, esquizofrenia, trastornos respiratorios, envejecimiento, síndromes de inmunodeficiencia, hipertensión y cáncer (Kaur & Kaur, 2018).

El término “cáncer” es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. El cáncer es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única, sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y de la célula de origen (Goldman, 2014).

El cáncer de próstata es un problema de salud mundial, cuyas tasas de incidencia y mortalidad varían de país en país. En el año 2018 causó 358989 muertes a nivel mundial lo que representó el 3.8 % de todos los tipos de cáncer. Su incidencia y mortalidad en todo el mundo se relacionan con el aumento de la edad y la etnia, siendo los hombres afroamericanos los que presentan incidencia y mortalidad superiores; se estima que para el año 2040 la incidencia llegará a 2293818 nuevos casos, siendo Latinoamérica y el Caribe, junto con África y Asia los lugares donde se estima un incremento de 100% o más en el número de casos respecto del año 2018 (Rawla, 2019).

En Ecuador, el cáncer es la segunda causa de defunción a nivel nacional, aproximadamente 15 de cada 100 personas fallecen a causa de cáncer; datos extraídos del Registro Nacional de Tumores señalan que para el país el cáncer de mama en las mujeres y el de próstata en hombres prevalecen en los patrones de cáncer (Solca, 2014). Los datos sobre el cáncer de próstata en nuestro país indicaron una tasa de mortalidad de 22.0 casos por cada 100.000

habitantes, con mayor prevalencia en hombres entre los 70 a 74 años, siendo prácticamente inexistente antes de los 45 años (Solca, 2013).

En el cáncer, “la patogénesis se desarrolla por la acumulación de alteraciones genéticas que resultan en la proliferación celular, estas células adquieren habilidades de invasión, metástasis y proliferación a distancia” (Delgado, 2016, p. 708). Existen varios factores que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de próstata, entre los que se mencionan la edad, la dieta, el consumo de tabaco, historia familiar, la etnia, así como carcinógenos ambientales, entre los que se incluyen a los plaguicidas (Delgado, 2016, p. 708).

A nivel celular, se conoce que los plaguicidas provocan toxicidad a través de respuestas mediadas por oxidantes, como la muerte celular por apoptosis o necrosis, la peroxidación lipídica, la perturbación metabólica, la desregulación de varias vías de señalización o la alteración de las uniones estrechas que se relacionan ampliamente con el mantenimiento de la homeostasis y la polaridad en los tejidos. La pérdida de la función normal de las uniones estrechas es una señal de importancia en la progresión del cáncer, ya que se ve comprometida en la compartimentalización creada por los epitelios alterando el microambiente tumoral de algunos tejidos (Abdel-Halim & Osman, 2020).

La migración celular es una conducta sistémica fundamental y estrictamente regulada de todas las células dotadas de motilidad direccional, este comportamiento está involucrado en las principales etapas del desarrollo de todos los organismos complejos, como son la morfogénesis, embriogénesis, organogénesis, remodelación de tejidos adultos, cicatrización de heridas, actividades inmunológicas de las células, angiogénesis, reparación y regeneración de tejidos, diferenciación celular, así como en la infinidad de condiciones patológicas como el desarrollo del cáncer (de la Fuente & López, 2020).

Estudios reportan que los plaguicidas, solos o en combinación, causan citotoxicidad en varios tipos de líneas celulares, alterando aspectos como la viabilidad y proliferación celular e induciendo la producción de ROS y daño de componentes celulares e incluso desencadenar en la muerte celular (Wang et al., 2021), por lo cual el presente trabajo busca evaluar las

alteraciones en líneas prostáticas normales y cancerígenas luego de ser expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de cierre de herida.

## **Marco Teórico**

### **Capítulo uno**

#### **1.1 Tóxicos en el medio ambiente**

A menudo, los seres vivos nos encontramos expuestos de forma directa o indirecta a distintas sustancias contaminantes conocidos como tóxicos que se albergan en el ambiente. Estos agentes dañinos se definen como cualquier sustancia física, química y biológica que tiene un efecto perjudicial sobre la vida de los organismos. Algunas de las fuentes de contaminantes ambientales incluyen: minería y procesamiento de minerales, combustión de combustibles fósiles, agricultura y bosques, producción industrial y consumismo (D'Surney & Smith, 2005).

Los plaguicidas han sido identificados como un peligro ya que a largo plazo son una problemática tanto para el medio ambiente como para la salud humana, por ello existe una rigurosa restricción de estos, tanto así que algunos de ellos esta prohibidos por convenios internacionales vigentes (PAN, 2021). Los plaguicidas, debido a su composición, se consideran contaminantes que no son fáciles de disipar del medio ambiente, lo cual conlleva a que permanezcan un tiempo prolongado; por su función son usados en la agricultura para controlar las plagas en los cultivos. La contaminación está dada por la aplicación directa en el suelo, agua, filtraciones en el almacenamiento o la inadecuada eliminación de los residuos (RAP-AL, 2007).

##### **1.1.1 Plaguicidas**

Los plaguicidas son sustancias químicas de origen sintético o natural, destinadas al control de plagas o de vectores causantes de enfermedades humanas, animales y vegetales (E.Z. Violante,2012), (M.L. Costrejón,2014). Estas sustancias están diseñadas para ser tóxicas con los enemigos de la agricultura (R. Valencia, et al.,2013). Se clasifican de acuerdo con el tipo de organismos que controlan, así como por su toxicidad y composición química. Numerosos plaguicidas han sido clasificados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en el grupo 2A, como probablemente cancerígenos para los seres humanos (K.Z.Guyton, 2015).

Los pesticidas o plaguicidas son sustancias químicas ampliamente utilizadas en el sector agrícola para prevenir, controlar y/o mitigar plagas dañinas y malas hierbas (Mahmood et al., 2016). Por el tipo de organismo que controlan se clasifican como: insecticidas, herbicidas, rodenticidas, bactericidas, fungicidas y larvicidas, cada uno ataca a plagas específicas (Holt, 2013). Los herbicidas se usan para destruir malezas y otra vegetación no deseada, los insecticidas para controlar una amplia variedad de insectos, fungicidas que se usan para prevenir el crecimiento de moho y hongos, desinfectantes para prevenir la propagación de bacterias y compuestos como los rodenticidas que se usan para controlar ratones y ratas (Suárez-Larios et al., 2017).

Debido al uso generalizado de productos químicos agrícolas en la producción de alimentos, las personas están expuestas a bajos niveles de residuos de pesticidas a través de sus dietas (Holt, 2013). La exposición a pesticidas se ha asociado con efectos negativos para salud, tales como problemas neurológicos (problemas cognitivos y enfermedad de Parkinson), reproductivos, respiratorios (asma), metabólicos (diabetes y obesidad), problemas de desarrollo y cáncer (Suárez-Larios et al., 2017).

Diversos estudios han puesto en evidencia el riesgo potencial de la exposición crónica a plaguicidas, teniendo en cuenta que pueden provocar alteraciones en el material genético, como mutaciones y/o alteraciones cromosómicas (Arafa, 2013). A pesar de que el conocimiento sobre los efectos nocivos de los plaguicidas ha aumentado en los últimos años, es todavía limitado lo que se conoce acerca del daño celular y genómico inducido.

## **1.2 Exposición a plaguicidas y su efecto celular**

A nivel celular, se conoce que los plaguicidas provocan toxicidad a través de respuestas mediadas por oxidantes, como la muerte celular por apoptosis o necrosis, la peroxidación lipídica, la perturbación metabólica, la desregulación de varias vías de señalización o la alteración de las uniones estrechas que se relacionan ampliamente con el mantenimiento de la homeostasis y la polaridad en los tejidos. La pérdida de la función normal de las uniones estrechas es una señal de importancia en la progresión del cáncer, ya que se

ve comprometida en la compartimentalización creada por los epitelios alterando el microambiente tumoral de algunos tejidos (Abdel-Halim & Osman, 2020).

Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS, por sus siglas en inglés respectivamente) alguna vez se consideraron como simples subproductos del metabolismo celular (Hobbs et al., 2014), ahora son consideradas como inductores de patologías, ya que producen daño a moléculas como lípidos, proteínas y ADN (Schieber & Chandel, 2014). La exposición a pesticidas ocasiona la producción de ROS, estos radicales libres son considerados moléculas inestables ya que poseen electrones desapareados, los cuales conducen al estrés oxidativo y, por consiguiente, al daño oxidativo de las biomoléculas (ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y componentes celulares), roturas de cadena y mutaciones del ADN, y finalmente cáncer (Ceja et al., 2021).

Hobbs et al (2014) consideran que tanto los ROS como los RNS funcionan como reguladores de varios procesos fisiológicos críticos, donde se incluye la supervivencia, proliferación, diferenciación, migración y adhesión celular. Se han mencionado factores involucrados en la regulación de la migración celular: adherencias de matriz celular, la familia de Rho de pequeñas GTPasas y proteasas (Trepap et al., 2012), los cuales pueden estar modificados por especies reactivas de oxígeno (Hobbs et al., 2014).

Estudios reportan que los plaguicidas solos o en combinación causan citotoxicidad en varios tipos de líneas celulares, alterando aspectos como la viabilidad y proliferación celular e induciendo la producción de ROS y daño de componentes celulares e incluso desencadenar en la muerte celular (Wang et al., 2021).

### **1.3 Ensayo de cierre de herida**

El ensayo de cierre de herida permite evaluar la tasa de migración celular y porcentaje de cierre de herida de cultivos en monocapa, además de que es una técnica que permite evaluar el comportamiento de las líneas celulares luego de ser sometidas a diferentes compuestos, los cuales pueden afectar la migración celular ya sea acelerando o ralentizando el proceso. Los resultados que se obtienen por medio de este tipo de ensayos proporcionan información que puede ser utilizada para plantear diferentes formulaciones de tratamientos y

determinar las concentraciones adecuadas o de interés, antes de realizar experimentos *in vivo*. (Pinto et al., 2019) .

Los ensayos *in vitro* de cicatrización o cierre de herida poseen diferentes técnicas, las cuales implican realizar una herida que rompa el monocapa celular, lo que permite que la región que no posee células debido a la lesión realizada se repare, para lo cual existen pasos exclusivos en el ensayo que incluyen: realizar la herida, el monitoreo del proceso de cicatrización o reparación celular y análisis de datos. La recopilación de datos se realiza por microscopia en tiempos determinados para evaluar el proceso de reparación celular. Los métodos de lesión celular son varios, entre ellos se encuentra la herida térmica, eléctrica, estampado, laser, manual o por rasguño. (De Ieso & Pei, 2018; Stamm et al., 2016).

El ensayo de herida por rasguño es una técnica manual comúnmente utilizada para medir la migración celular. Consiste en crear una herida lineal en una monocapa confluyente de células cultivadas y capturar imágenes para medir la tasa de migración celular a lo largo del tiempo (De Ieso & Pei, 2018). Este ensayo es considerado simple pero efectivo, ya que permite obtener datos representativos sobre la migración celular de manera eficiente. Este ensayo tiene algunas limitaciones, en primer lugar, la longitud de la herida suele ser mayor que el campo de visión utilizado, lo que dificulta la captura de imágenes en la misma posición a lo largo del tiempo, la cuantificación visual de las imágenes puede ser subjetiva y la variabilidad en la ubicación de los bordes de la herida afecta la fiabilidad de los resultados, así como que no se tiene en cuenta la proliferación celular en la tasa de cierre aparente de la herida en la mayoría de los estudios (De Ieso & Pei, 2018).

Para llevar a cabo el análisis de imágenes se utilizan herramientas bioinformáticas especializadas que automatiza la medición del tamaño de cicatrización de heridas, ajusta el ancho promedio considerando la inclinación, y cuantifica parámetros clave como área, fracción de área, ancho promedio y desviación del ancho en imágenes obtenidas de ensayos de cicatrización de heridas (Suarez et al., 2020)

## Capítulo dos

### Metodología

El trabajo de tipo experimental realizado tiene como objetivo determinar alteraciones celulares *in vitro* de las líneas celulares PNT2 y PC3 expuestas a plaguicidas a través del ensayo de cierre de herida.

#### 2.1 Líneas celulares

Se trabajó con la línea celular PNT2, que son células epiteliales normales de próstata humana. Se utilizaron las condiciones de cultivo celular que menciona la casa comercial Sigma Aldrich (2022). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10%, L-glutamina 2 mM, antibiótico-antimicótico 1X y HEPES 20 mM, en una atmósfera de 37° C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad de 95%. También se trabajó con la línea celular PC3, que son células tumorales de próstata humana. Las células se cultivaron en medio HAMF-12 suplementado y mantenidas a las condiciones indicadas anteriormente.

#### 2.2 Plaguicidas

Se trabajó con cuatro productos comerciales de uso frecuente en la provincia de Loja. Las formulaciones contienen: atrazina, pendimetalina, clorpirifós y cipermetrina, y finalmente un fertilizante mineral que incluye como principales componentes: Nitrógeno, Fósforo, Potasio. Las dosis analizadas en este trabajo se indican en la **Tabla 1** y tienen como referencia a aquellas planteadas por la OMS y la norma INEN1108 como límite máximo permitido de estos compuestos en agua de consumo humano (OMS, 2018)

**Tabla 1**

*Concentraciones usadas de los plaguicidas*

Plaguicidas	Concentración (µg/mL)
Atrazina	0.1
Pendimetalina	0.02

<b>Atrazina + Pendimetalina</b>	0.1 + 0.02
<b>Clorpirifós/Cipermetrina</b>	0.003
<b>Fertilizante</b>	10
<b>Clorpirifós /Cipermetrina + Fertilizante</b>	0.03 10

## 2.3 Ensayos celulares

### 2.3.1 *Ensayo de viabilidad celular*

En una placa de 96 pocillos se sembraron 4000 células por pocillo en 100  $\mu$ L de medio suplementado y se incubaron por 24 horas. Luego, se sustituyó el medio por 100  $\mu$ L de medio de cultivo con los diferentes tratamientos y se incubó por tiempos de 48 y 72 horas para PNT2 y 24 y 48 horas para PC3. La determinación de células viables se lo realizó mediante el método colorimétrico, se utilizó el kit comercial CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay de Promega de acuerdo a las especificaciones del inserto. Finalmente, se realizó la lectura de absorbancias a 490 nm en el espectrofotómetro EPOCH microplate reader de Biotek. Se realizaron dos ensayos por triplicado, incluyendo blanco de reactivo, control sin tratamientos y como control positivo DMSO al 10%.

### 2.3.2 *Ensayo de cicatrización o cierre de herida*

Para el ensayo de cicatrización o cierre de herida se usó el método propuesto por Liang et al (2007) adaptado a nuestras condiciones de trabajo. Se utilizó placas de 12 pocillos, se mantuvo el cultivo hasta alcanzar una confluencia entre el 90 y 100% en un periodo aproximado de 48 horas, se realizó la "herida" con una punta de pipeta de 200  $\mu$ L, posteriormente se incubó y se realizó un registro fotográfico al momento de realizar la herida (tiempo 0), y de forma periódica hasta que se haya cerrado completamente la herida del control sin tratamiento, usando el microscopio Primovert Zeiss con el objetivo 10X con cámara Axiocam 208 color Zeiss. Se realizaron tres ensayos por duplicado, considerándose dos puntos en cada pocillo para el registro fotográfico.

El procesamiento de imágenes se lo realizó mediante el software ImageJ, utilizando el plugin Wound Healing Size Tool, que permite cuantificar el área de la herida, ancho de la herida, entre otros parámetros. El porcentaje de cierre de herida y tasa de migración celular fueron calculados con las siguientes fórmulas (Ec1 y Ec2):

$$\% \text{ cierre de cierre de herida} = \frac{A_{t=0} - A_{t=\Delta t}}{A_{t=0}}$$

Nota.

$A_{t=0}$  es el área de la herida inicial,

$A_{t=\Delta t}$  es el área de la herida después de  $n$  horas del rasguño inicial, ambos se expresan en  $\mu\text{m}^2$ .

$$\text{tasa de migración} = \frac{W_i - W_f}{t}$$

Nota.

$W_i$ =promedio del ancho de la herida inicial en  $\mu\text{m}$

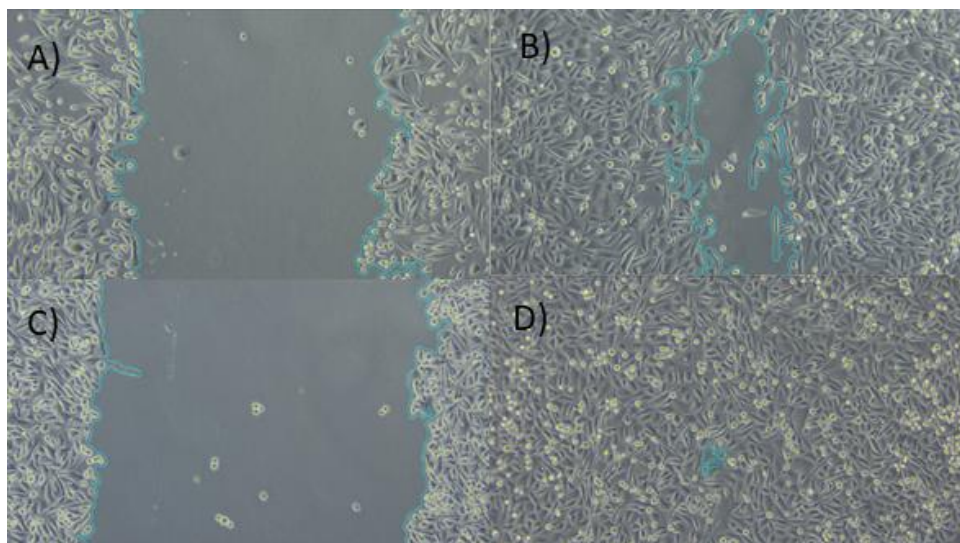
$W_f$ = promedio del ancho final en  $\mu\text{m}$

$t$ = lapso de tiempo del ensayo en horas

La Figura1 muestra el fenómeno de migración celular entre las células tratadas con pesticidas y el control (células sin tratamiento) a la hora 0 y a la hora 70.

### Figura 1

*Procesamiento de Imágenes en el software Imagen J*



*Nota.* Línea celular PC3 procesada en el software imagen J. A) Pendimetalina hora 0, B) Pendimetalina hora 70, C) Control en hora 0 y D) Control en hora 70

Para analizar las diferencias entre tratamientos y el control sin tratamiento, los datos recolectados fueron analizados mediante un análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia de  $p < 0,05$  usando el programa GraphPad Prism 8.0.1.

## Capítulo tres

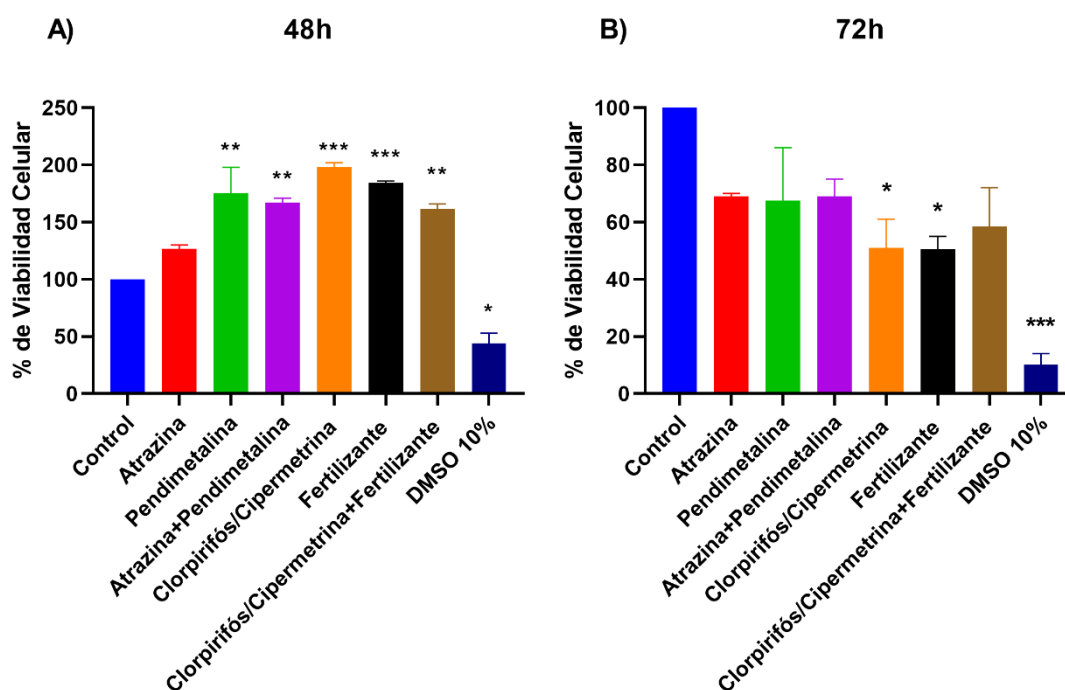
### Resultados y Discusiones

#### 3.1 Resultados

El análisis de viabilidad en células PNT2 tratadas con pesticidas durante períodos de exposición de 48 y 72 horas mostró diferencias significativas respecto al control (**Figura 2**). A las 48 horas los datos indican un incremento en la viabilidad celular, mientras que a las 72 horas se observa una disminución respecto al control. El DMSO 10% se usó como control, considerando su efecto de disminución de la viabilidad a este porcentaje, según H. Lee & Park (2017)

**Figura 2**

*Ensayo de viabilidad celular PNT2*

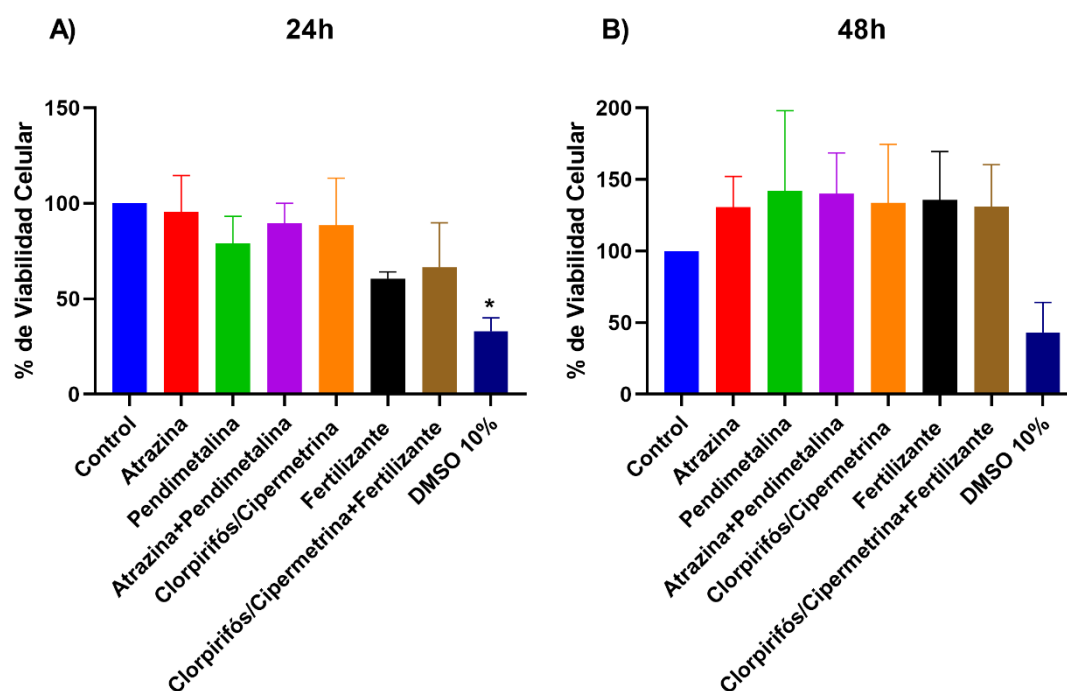


*Nota.* Las gráficas muestran la media y SEM de dos ensayos, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.001$ , \*\*\* =  $p < 0.0001$ , evaluado con ANOVA post test Tukey.

Los datos de viabilidad de las células PC3 tratadas con los diferentes plaguicidas durante periodos de exposición a 24 y 48 horas, no se observaron diferencias significativas respecto al control (**Figura 3**).

### Figura 3

Ensayo de viabilidad celular PC3

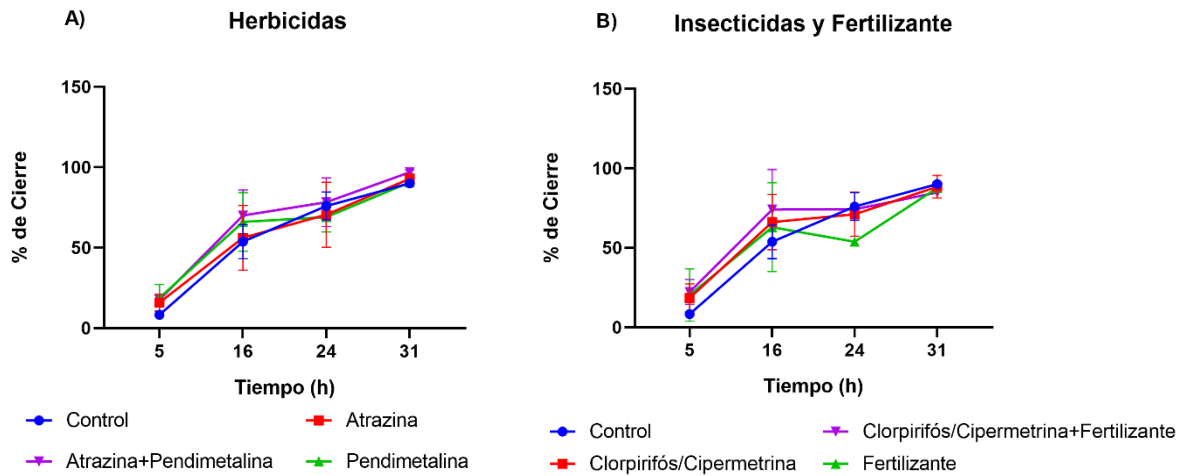


Nota. Las gráficas muestran la media y SEM de tres ensayos, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.001$ , \*\*\* =  $p < 0.0001$ , evaluado con ANOVA post test Tukey.

En lo que respecta al ensayo de cicatrización o cierre de herida, no se observaron diferencias significativas con respecto al control durante las horas de seguimiento, en la línea celular PNT2 (**Figura 4**) y PC3 (**Figura 5**).

**Figura 4**

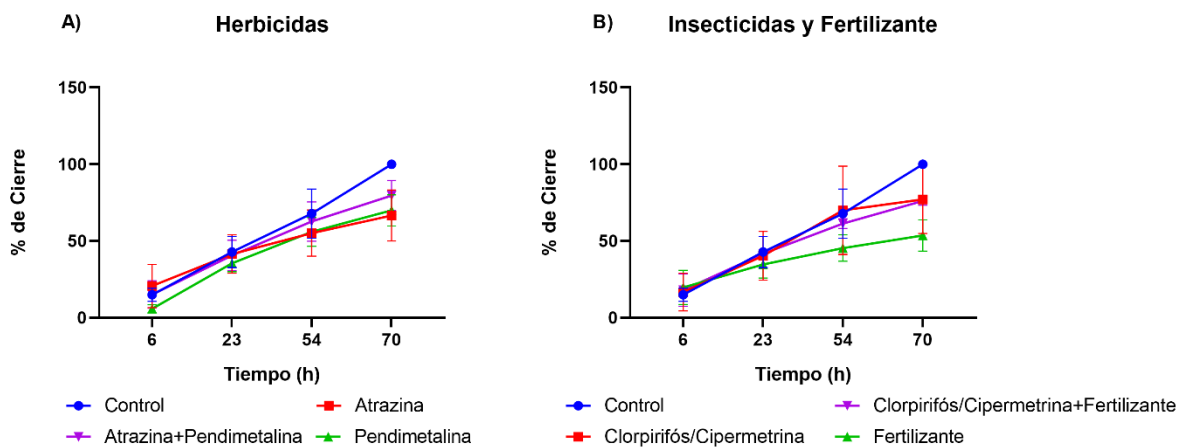
Gráficas del ensayo de cierre de herida línea celular PNT2



*Nota.* La gráfica muestra la medida  $\pm$  SEM de tres ensayos, evaluado con ANOVA post test Tukey en células PNT2. A) Herbicidas: atrazina y pendimetalina. B) Insecticidas: clorpirifós/cipermetrina y fertilizante.

**Figura 5**

Gráficas del ensayo de cierre de herida línea celular PC3

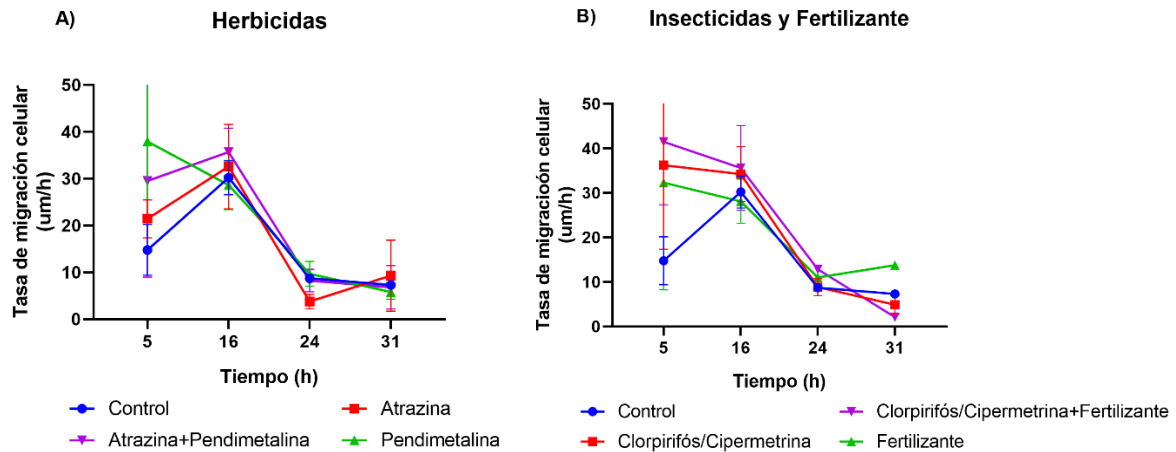


*Nota.* La gráfica muestra la medida  $\pm$  SEM de tres ensayos, evaluado con ANOVA post test Tukey en células PC3. A) Herbicidas: atrazina y pendimetalina. B) Insecticidas: clorpirifós/cipermetrina y fertilizante.

En los resultados obtenidos con respecto al ratio de migración celular, tampoco se observaron diferencias significativas de los diferentes tratamientos con respecto al control luego de la exposición durante el seguimiento, tanto para la línea celular PNT2 (**Figura 6**) como para PC3 (**Figura 7**).

**Figura 6**

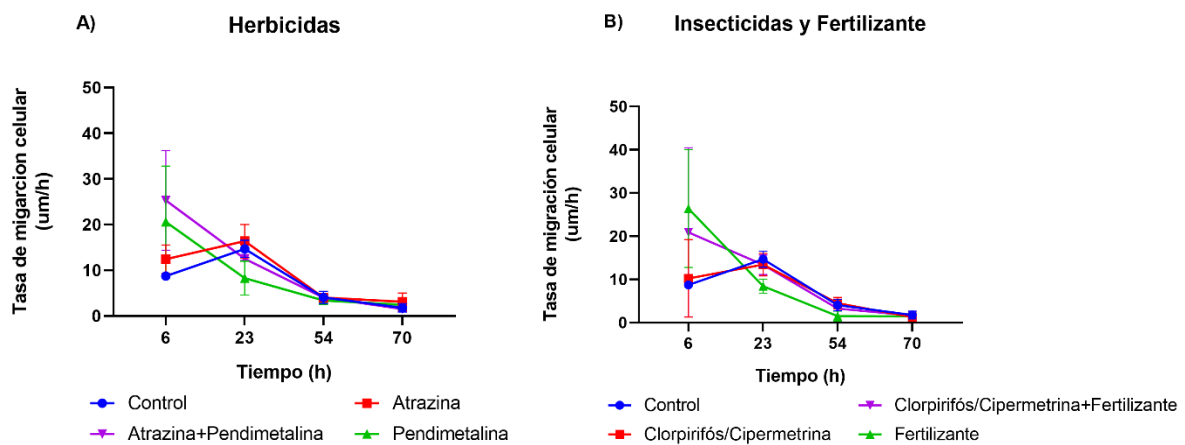
*Gráficas del radio de migración de la línea celular PNT2*



*Nota.* La gráfica muestra la medida  $\pm$  SEM de tres ensayos, evaluado con ANOVA post test Tukey en células PNT2. A) Herbicidas: atrazina y pendimetalina. B) Insecticidas: clorpirifós/cipermetrina y fertilizante.

**Figura 7**

*Gráficas del radio de migración de la línea celular PC3*



*Nota.* La gráfica muestra la medida  $\pm$  SEM de tres ensayos, evaluado con ANOVA post test Tukey en células PC3. A) Herbicidas: atrazina y pendimetalina. B) Insecticidas: clorpirifós/cipermetrina y fertilizante.

### 3.2 Discusión

La exposición a pesticidas es inevitable, las formas más comunes en que los humanos nos exponemos a estas sustancias químicas de gran uso en el sector agrícola son la inhalación, la ingestión y el contacto con la piel (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016). Durante varios años se ha observado un aumento significativo en el uso de pesticidas a nivel mundial, lo que ha provocado contaminación laboral y exposición de la población en general por alimentos, agua y suelos tratados. (Leveque et al., 2019).

A nivel celular, se conoce que los plaguicidas provocan toxicidad a través de respuestas mediadas por oxidantes, como la muerte celular por apoptosis o necrosis, la peroxidación lipídica, la perturbación metabólica, la desregulación de varias vías de señalización o la alteración de las uniones celulares, que mantienen la homeostasis y la polaridad en los tejidos. La pérdida de la función normal de las uniones estrechas es una señal de importancia en la progresión del cáncer, ya que se ve comprometida en la compartimentalización creada por los epitelios alterando el microambiente tumoral de algunos tejidos (Abdel-Halim & Osman, 2020). Procesos como la angiogénesis, las reacciones inflamatorias e invasión y metástasis del cáncer son algunos de los trastornos patológicos en los que la migración celular juega un papel crucial (Gebäck et al., 2009).

En este trabajo, la exposición de las líneas celulares PNT2 y PC3 a plaguicidas, se realizó a dosis subtóxicas, verificadas en el ensayo de viabilidad, donde se observó un incremento en la viabilidad celular a 48 horas en células PNT2, y no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de cierre de herida para ninguna de las líneas celulares bajo las condiciones analizadas. En concordancia con los resultados de este trabajo, Hu et al (2016) determina que la exposición a atrazina 0,01 y 0,1  $\mu$ M incrementa la viabilidad de

células RM1, promoviendo la proliferación celular, acelera el ciclo celular al ayudar a las células a pasar por los puntos de control G1-S y G2-M.

Son escasos los estudios de migración celular en células normales, ya que este fenómeno se ha asociado mayoritariamente a procesos como metástasis y cáncer (de la Fuente & López, 2020). En este sentido y en concordancia con lo encontrado en este trabajo, el estudio de Jesionokswi et al (2015), se reporta que los compuestos de atrazina y clorpirifós aplicados en células mamarias no cancerígenas MCF-10A a una concentración de 50 nM no mostraron diferencias respecto al control, evaluaron el porcentaje de herida en intervalos de 24, 48 y 72 horas sin observarse diferencias.

Por otro lado, el estudio realizado por Chen et al (2021) en el cual expusieron a células epiteliales de cáncer de ovario (Skov3 y A2780) a concentraciones de 0,1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  de atrazina y mediante el ensayo de cierre de herida se observó que la atrazina incrementó la capacidad de migración luego de 48 horas frente al grupo control. Identificándose también que la exposición a este plaguicida induce la expresión de oncogenes como *Stat3*, implicado en supervivencia, proliferación y metástasis en células cancerígenas. Los autores también identificaron que, aunque la exposición a atrazina podría inducir potencial proliferativo en células normales (MC3T3-E1), los mecanismos que rigen sus efectos en estas células podrían ser diferentes de los de las células cancerígenas. Similares resultados son reportados por Hu et al (2016), donde se sometió a las células de cáncer de próstata RM1 a concentraciones de 0,01  $\mu\text{M}$  y 0,1  $\mu\text{M}$  de atrazina por 48 horas, evidenciándose que la proliferación de células RM1 aumentó después del tratamiento con atrazina, concomitantemente con la activación de la señalización de *Stat3*.

Analizando el radio de migración en PNT2 se puede observar un incremento no significativo estadísticamente de las células tratadas con plaguicidas respecto al control, que es superior al incremento observado en las células PC3. Este incremento en la migración celular durante las primeras horas de exposición podría sugerir que es el momento crítico para evaluar los procesos de regulación de crecimiento, proliferación, supervivencia celular, así como los mecanismos de adaptación y protección frente a agentes tóxicos, tanto para

transformación en células normales, como para metástasis en células cancerígenas. Se han identificado cambios en la expresión génica y la metilación del ADN en células expuestas a plaguicidas, tal como alteración en los genes que codifican proteínas con capacidad de unión a ácidos nucleicos, los que codifican proteínas con funciones de quimiotaxis, canales iónicos y citocinas, transición celular varios de los cuales están potencialmente asociados con la aparición y el desarrollo del cáncer (Lasagna et al., 2020; Navarrete et al., 2023).

## Conclusiones

Las concentraciones de los productos plaguicidas evaluados no resultaron tóxicas para las líneas celulares PNT2 y PC3, y se observó un incremento en la viabilidad en la línea celular PNT2 a las 48 horas.

Los productos plaguicidas evaluados no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de cierre de herida en las líneas celulares PNT2 y PC3 bajo las condiciones analizadas en este ensayo.

Se identificó un radio de migración mayor durante las primeras 24 horas de seguimiento para las líneas celulares PNT2 y PC3, lo que podría sugerirse como tiempo crítico para ensayos y análisis posteriores de procesos celulares y vías moleculares de regulación.

### **Recomendaciones**

Se debe evaluar los efectos que los plaguicidas generan al ambiente y a la salud humana, y para ello resulta importante que, además de los ensayos *in vitro* se puedan analizar poblaciones expuestas y/o grupos de riesgo, en los que se analice daño al material genético, alteraciones celulares que permitan comprender los procesos patológicos, así como trabajar en posibles alternativas de prevención y manejo.

## Referencias

- Abdel-Halim, K. Y., & Osman, S. R. (2020). Cytotoxicity and Oxidative Stress Responses of Imidacloprid and Glyphosate in Human Prostate Epithelial WPM-Y.1 Cell Line. *Journal of Toxicology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4364650>.
- A. Arafa, M. Afify, y N. Samy, "Evaluation of Adverse Health Effects of Pesticides Exposure [Biochemical & Hormonal] among Egyptian Farmers", *J. Appl. Sci. Res*, vol. 9, n.o 7, pp. 4404-4409, 2013.
- Ceja Galvez, H., Salazar Flores, J., Torres Sanchez, E., Rojas Bravo, D., Reyna Villela, M., & Reyes Uribe, E. (2021). Genetic profile for the detection of susceptibility to poisoning by exposure to pesticides. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 28(2), 208–213. <https://doi.org/10.26444/AAEM/136362>
- Chen, J., Liu, J., Wu, S., Liu, W., Xia, Y., Zhao, J., Yang, Y., Wang, Y., Peng, Y., & Zhao, S. (2021). Atrazine Promoted Epithelial Ovarian Cancer Cells Proliferation and Metastasis by Inducing Low Dose Reactive Oxygen Species (ROS). *Iranian Journal of Biotechnology*, 19(2), e2623. <https://doi.org/10.30498/IJB.2021.2623>
- de la Fuente, I. M., & López, J. I. (2020). Cell Motility and Cancer. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 2177, 12(8), 2177. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12082177>
- D'Surney, S. J., & Smith, M. D. (2005). Chemicals of Environmental Concern. In F. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (2nd ed., pp. 526–530). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00206-4>
- De Ieso, M. L., & Pei, J. V. (2018). An accurate and cost-effective alternative method for measuring cell migration with the circular wound closure assay. *Bioscience Reports*, 38(5). <https://doi.org/10.1042/BSR20180698>
- Delgado, D. (2016). Cancer de prostata: Etiologia, Diagnóstico y tratamiento. Retrieved from <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/620/art53.pdf>
- E. Z. Violante, E. A. García, L. C. Ojinaga, y W. D. Heusser, "Daño genético y exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas del Valle de San Quintín, Baja California, México", p. 9

- Goldman a. (2014). Manual de Enfermería Oncológica. Buenos Aires: Instituto Nacional de Cáncer. 1ª ed. P. 10-20
- Hobbs, G., Zhou, B., Cox, A. D., & Campbell, S. L. (2014). Rho GTPases, oxidation, and cell redox control. *Small GTPases*, 5, e28579. <https://doi.org/10.4161/SGTP.28579>
- Holt, J. S. (2013). Herbicides. In *Encyclopedia of Biodiversity: Second Edition* (2nd ed., Vol.4, pp. 87–95). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00070-8>
- Hu, K., Tian, Y., Du, Y., Huang, L., Chen, J., Li, N., Liu, W., Liang, Z., & Zhao, L. (2016). Atrazine promotes RM1 prostate cancer cell proliferation by activating STAT3 signaling. *International Journal of Oncology*, 48(5), 2166–2174. <https://doi.org/10.3892/IJO.2016.3433/HTML>
- Jesionowski, A. M., Gabriel, S. M., Rich, J. D., & Schroeder, J. R. (2015). Failure of pesticides to alter migration of cancerous and non-cancerous breast cell lines in vitro. *Toxicology Research*, 4(1), 99–105. <https://doi.org/10.1039/C4TX00098F>
- Kaur, K., & Kaur, R. (2018). Occupational Pesticide Exposure, Impaired DNA Repair, and Diseases. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 22(2), 81. [https://doi.org/10.4103/IJOEM.IJOEM\\_45\\_18](https://doi.org/10.4103/IJOEM.IJOEM_45_18).
- K.Z. Guyton et al., “Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate”, vol. 16. *Lancet Oncol*, pp. 490-491, 2015, [En línea]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8).
- Lasagna, M., Hielpos, M., Ventura, C., Mardirosian, M., Martín, G., Miret, N., Randi, A., Núñez, M., & Cocca, C. (2020). Chlorpyrifos subthreshold exposure induces epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111312>
- Lasserre, J.-P., Fack, F., Revets, D., Planchon, S., Renaut, J., Hoffmann, L., Bohn, T., 2009. Effects of the endocrine disruptors atrazine and PCB 153 on the protein expression of MCF-7 human cells. *J. Proteome Res.* 8 (12), 5485–5496.

- Lee, H., & Park, J. B. (2017). Evaluation of the effects of dimethylsulphoxide on morphology, cellular viability, mRNA, and protein expression of stem cells culture in growth media. *Biomedical Reports*, 7(4), 291–296. <https://doi.org/10.3892/BR.2017.961>
- Leveque, X., Hochane, M., Geraldo, F., Dumont, S., Gratas, C., Oliver, L., Gaignier, C., Trichet, V., Layrolle, P., Heymann, D., Herault, O., Vallette, F. M., & Olivier, C. (2019). Low-Dose Pesticide Mixture Induces Accelerated Mesenchymal Stem Cell Aging In Vitro. *Stem Cells*, 37(8), 1083–1094. <https://doi.org/10.1002/STEM.3014>
- M. L. Castrejón Godínez, E. Sanchez Salinas, y L. Ortíz, “PLAGUICIDAS: GENERALIDADES, USOS E IMPACTOS SOBRE EL AMBIENTE Y LA SALUD”, Prim. Ed., vol. 1, p. 30, 2014.
- Muñoz, J.P., Araya-Osorio, R., Mera-Adasme, R., Calaf, G.M., 2023 Feb. Glyphosate mimics 17 $\beta$ -estradiol effects promoting estrogen receptor alpha activity in breast cancer cells. *Chemosphere* 313, 137201. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137201>.
- Navarrete, M., Salas, C., Juárez, M., Moreno, D., Gómez, F., Olaya, A., & Pérez, P. (2023). Exposure to Insecticides Modifies Gene Expression and DNA Methylation in Hematopoietic Tissues In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/ijms24076259>
- Norma Técnica Ecuatoriana: INEN 1108-4 (2011). Agua potable: Requisitos. Segunda edición. Recuperado de: <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1108.pdf>
- Pinto, B. I., Cruz, N. D., Lujan, O. R., Propper, C. R., & Kellar, R. S. (2019). In Vitro Scratch Assay to Demonstrate Effects of Arsenic on Skin Cell Migration. *Journal of Visualized Experiments*, 144. <https://doi.org/10.3791/58838>
- Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*. 2019 Apr;10(2):63-89. doi: 10.14740/wjon1191. Epub 2019 Apr 20. PMID: 31068988; PMCID: PMC6497009.
- Red de Acción en Plaguicidas del Reino Unido (PAN). Catálogo de listas de plaguicidas que identifican aquellos asociados con impactos particularmente dañinos para la salud o el medio ambiente 2021 citado 26 de febrero de 2024. Disponible en:

[https://www.rapam.org/wp-content/uploads/2021/08/LISTA-PAN\\_PAP-2021\\_ESP\\_F03082.pdf](https://www.rapam.org/wp-content/uploads/2021/08/LISTA-PAN_PAP-2021_ESP_F03082.pdf)

Red de acción en plaguicidas y sus alternativas en América latina. Cuba reduce el uso de plaguicidas químicos en 50 % [Internet]. Santiago de Chile: RAPAL; 2007. [actualizado 30 mayo 2007] [citado 23 de febrero 2024]. Disponible en: [http://www.rapal.org/index.php?seccion=8&f=news\\_view.php&id=207](http://www.rapal.org/index.php?seccion=8&f=news_view.php&id=207)

R. Valencia Quintana et al., “GENOTOXICIDAD DE PLAGUICIDAS EN SISTEMAS VEGETALES”, p. 26.

Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology: CB*, 24(10), R462. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2014.03.034>

S. M. Bréga et al., “Clinical, cytogenetic and toxicological studies in rural workers exposed to pesticides in Botucatu, São Paulo, Brazil”, *Cad. Saúde Pública*, vol. 14, n.o suppl 3, pp. S117-S123, 1998, doi: 10.1590/S0102-311X199800070001

SOLCA. [www.solcaquito.org.ec](http://www.solcaquito.org.ec). [Online].; 2013 [cited 2023 mayo 03. Available from: <http://www.solcaquito.org.ec/index.php/inicio/registro-nacional-detumores>.

Smith, J., & Johnson, L. (2024). Pesticide exposure and increased breast cancer risk in women population studies. *Science of The Total Environment*, 874, 172988 <https://doi.org/10.1016/j.sc>

Sociedad de Lucha Contra el Cáncer. <http://www.estadisticas.med.ec>. [Online].; 2014 [cited 2023 mayo 15. Available from: <http://www.estadisticas.med.ec/Publicaciones/PUBLICACION-QU-2006-2010.pdf>.

Suárez-Larios, K., Salazar-Martínez, A. M., & Montero-Montoya, R. (2017). Screening of Pesticides with the Potential of Inducing DSB and Successive Recombinational Repair. *Journal of Toxicology*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/3574840>

Stamm, A., Reimers, K., Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., & Pepelanova, I. (2016). In vitro wound healing assays – state of the art. *BioNanoMaterials*, 17(1-2), 79-87. <https://doi.org/10.1515/bnm-2016-0002>

- Trepap, X., Chen, Z., & Jacobson, K. (2012). Cell Migration. *Comprehensive Physiology*, 2(4), 2392. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C110012>
- Wang, T., Ma, M., Chen, C., Yang, X., & Qian, Y. (2021). Three widely used pesticides and their mixtures induced cytotoxicity and apoptosis through the ROS-related caspase pathway in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 152, 112162. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2021.112162>
- Calder Mr., J. (2015). *Lineamientos para la administración de los regímenes scales de las industrias extractivas*. International Monetary Fund. <https://bit.ly/2THIseU>
- Naranjo, L. A. y Palacios Neri, J. (22 de mayo de 2015). Nanotecnología: fuente de nuevos paradigmas. *Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 7(12), 1-49. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e12.49710>
- Vásquez, J. G. (2011). *El ruido de las cosas al caer*. Editorial Alfaguara.