

207
106



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias



Intercambios de Cromatidas Hermanas Inducidos por los Insecticidas Organofosforados Folimat y Metil Paration en Linfocitos Humanos In Vitro

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

María Dolores Juárez Rodríguez



México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODO	15
RESULTADOS	18
DISCUSION Y CONCLUSIONES	19
BIBLIOGRAFIA	28
TABLAS Y FIGURAS	39

RESUMEN

Se evaluó el efecto citogenético de los insecticidas organofosforados : Folimat y Metil Paratión por medio de un sistema de prueba que consiste en el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en cultivo de linfocitos de sangre periférica humana .

Los resultados mostraron que el Metil Paratión elevó de manera significativa la frecuencia de ICH con relación al testigo ($p < 0.001$) a partir de 4 a 10 ppm , mientras que el Folimat lo hizo de 20 a 100 ppm . No obstante , el Metil Paratión en ningún caso duplicó el efecto basal de ICH . En cambio , solo el Folimat por ser menos citotóxico que el compuesto anterior , lo triplicó en 30 ppm . Sin embargo , con dosis mayores a ésta se obtuvo disminución en la frecuencia de ICH .

INTRODUCCION

Recientemente el uso de grandes cantidades de pro ductos químicos tanto en la industria como en la agricultura , representan serios problemas de salud para el hombre . Los pesticidas constituyen una fuente de contaminación constante derivada principalmente de la actividad agrícola , ya que millones de toneladas de agentes químicos tóxicos son aplicados directamente para el control de organismos nocivos (Guthrie , 1980) ; se han registrado cerca de 33,600 de estas sustancias en la Environmental Protection Agency (Guthrie , 1980) . La posible naturaleza mutagénica , carcinogénica y teratogénica de algunos de los compuestos agrícolas ha sido sugerida por varios autores (Innes et al . , 1969 ; Dean , 1972 ; Axelson y Sandell , 1974 ; Fahrig , 1974 ; Bridges et al . , 1975 ; Wild , 1975 ; Shirashu et al . , 1976 ; Pool et al . , 1977 ; Hardell y Sandstrom , 1979) .

Sin embargo , en la actualidad el uso de los pesticidas es indispensable para la salud humana ya que ayu dan en la erradicación de enfermedades transmitidas por insectos tales como la malaria y además aseguran un mejor rendimiento agrícola , al eliminar plagas que ocasionan grandes pérdidas en la productividad de los cultivos .

Entre las ventajas que estas sustancias ofrecen a la agricultura se pueden citar las siguientes : son muy efectivas ya que pueden llegar a controlar a más del 90% de las poblaciones de insectos y malas hierbas , debido a que su acción es por lo general inmediata , mientras que los métodos naturales utilizados con esta finalidad tienen efectos retardados y la mayoría de las veces deben ser implantados bajo condiciones específicas del ambiente . Por otra parte , los insecticidas son manufacturados comercialmente , transportados , vendidos

y empleados sin requerir sistemas sofisticados . No obstante , el uso de estos productos químicos también ofrece grandes desventajas debidas a su elevada toxicidad en casi todos los seres vivos , por lo que la aplicación frecuente de los mismos ocasiona la desaparición de los enemigos naturales de los organismos que se están controlando y por lo tanto contribuye al resurgimiento de éstos últimos . Por otro lado , el desarrollo de tolerancia al pesticida ha sido una de las mayores contribuciones al aumento en el empleo de estos agentes en la agricultura . Otra desventaja que trae consigo la utilización repetida de estos compuestos , es su efecto destructivo sobre las especies benéficas tales como los insectos polinizadores , lo cual constituye un problema muy serio que resulta en la reducción de la producción del cultivo ; en algunos casos esta disminución es mayor que el daño causado por las plagas de insectos .

A pesar de esto , en los últimos treinta años el empleo de estas sustancias ha aumentado , además , se espera que en la actualidad la demanda de estos productos químicos por los países subdesarrollados aumente cinco veces las cantidades requeridas en el período 1970 - 1971 , sin que se alcance un decremento significativo en las pérdidas , las cuales se estima que son de 50% (Bradley , 1980) .

El uso de los pesticidas como los arseniatos es muy antiguo , después se empiezan a usar otros agentes de origen orgánico que son extraídos de plantas , como por ejemplo , la rotenona que es obtenida de Derris elliptica y de D.malacensis ; anteriormente este compuesto se usaba como veneno de peces y posteriormente se descubre su capacidad insecticida . El pyrethrum que

se produce a partir de las flores de Chrysanthemum cinerariaefolium desde el siglo pasado en el Este de Europa y en 1924 se demuestra que sus propiedades insecticidas son debidas a dos ésteres , el pyrethrin I y el II . La nicotina es utilizada como insecticida desde 1690 en Francia , más tarde en 1764 esta propiedad del tabaco es conocida en Inglaterra y en 1814 es aplicado en América (West et al . , 1952) .

Los pesticidas organoclorados aparecen en 1939 en Suecia donde es desarrollado el DDT (diclorodifeniltricloroetano) como un insecticida residual persistente . En 1949 , el BHC (benceno hexaclorado) es descrito como una sustancia simple y efectiva , el grado más puro del BHC gamma es señalado como lindano . En 1945 , en Estados Unidos se producen dos derivados del heptacloro , el aldrin y el dieldrin . Todos estos compuestos son neurotóxicos , sus residuos permanecen en el suelo por períodos largos y tiene efectos sobre especies que no son su blanco , por estas razones la mayoría de los insecticidas de hidrocarburos clorados han sido discontinuados y reemplazados por compuestos carbámicos y organofosforados . Estos últimos en la actualidad son usados ampliamente en la agricultura y aunque con esta medida han disminuido los problemas de toxicidad crónica , se han descrito más casos de toxicidad aguda (Guthrie , 1980) .

Los insecticidas organofosforados aparecen por primera vez en el año de 1945 , en Alemania . La mayor parte de éstos son ésteres del ácido fosfórico que incrementa su diversidad cuando se utilizan los diferentes derivados de este ácido (Fig. 1) .

En general , los fosfatos orgánicos utilizados como pesticidas tienen dos radicales orgánicos iguales , varian-

do únicamente el tercero (Fig. 2) , éste último le imparte características propias al derivado fosfórico .

La estructura común de los organofosforados es la siguiente: $\begin{array}{c} \text{P} \\ | \\ - \text{P} - \text{O} - \text{C} - \\ | \quad | \end{array}$ la presencia del fósforo y del carbono como sitios electrofílicos proporcionan la clave para entender las reacciones con nucleófilos al sufrir alquilación o fosforilación .

Estos agentes tienen gran solubilidad en agua debido a su polaridad y pueden ser hidrolizados eventualmente hasta fosfatos inorgánicos , por lo que éstos , además de no acumularse en los tejidos animales , son mucho menos persistentes en el medio y en los biosistemas que los compuestos clorados (Eto , 1974) .

Por otra parte , los insecticidas organofosforados actúan en los vertebrados interrumpiendo la transmisión del impulso nervioso en los sistemas nerviosos central y periférico por la inhibición de la acetilcolinesterasa , enzima que modula las cantidades del neurotransmisor acetilcolina (O' Brien 1967 , 1969 ; Karczmar et al. , 1970 ; Aldridge , 1971 ; Fukuto , 1971) , el cual al rebasar el máximo tolerado produce la muerte . Se ha descrito que el mecanismo por el que es inhibida la acetilcolinesterasa es una fosforilación del grupo hidroxil - serina en el sitio activo de la enzima (Fest y Sdmidt , 1973) .

La toxicidad de estas sustancias está relacionada con la constitución de los derivados fosfóricos , los cuales pueden presentarse de dos formas : " oxo " cuando existe el enlace $\text{P} = \text{O}$, y " tiono " cuando presentan el enlace $\text{P} = \text{S}$. En general la toxicidad de esta última es inferior a la de " oxo " (Fig. 3) . Otra diferencia establecida para los organofosforados es la que hay entre los derivados metil que son menos tóxicos que los etil cuando se

comparan compuestos de idéntica estructura (Barberá , 1976) .

Las rutas primarias del metabolismo de los organofosforados son la oxidación y la hidrólisis . Los procesos oxidantes se llevan a cabo en el hígado de mamíferos y en el cuerpo de insectos intoxicados , donde los tiofosfatos son convertidos a fosfatos , que son los compuestos activos para la acción de inhibición de la acetilcolinesterasa . La detoxificación de todos los fosfatos se lleva a cabo por medio de hidrólisis (Hutson y Hoadly , 1972) , la cual se produce por la acción de diversas fosfatasas que ejercen su acción sobre los compuestos originales y sus metabolitos , estas enzimas pueden dividirse en dos grupos : uno que ataca al éster metílico o etílico provocando desmetilación , mientras que el otro actúa sobre el tercer componente el cual varía en cada producto (Fig. 4) .

La primera hidrólisis tiene importancia en mamíferos donde el metabolito se encuentra en la orina (Barberá , 1976) .

Por otra parte se ha descrito que los insecticidas organofosforados son agentes alquilantes (Bedford y Robinson , 1972) , siendo estos compuestos el grupo de mutágenos más abundantes y tal vez el mejor estudiado (Verly , 1974 ; Malling y Wasson , 1977) . Los alquilantes funcionan como especies electrofílicas capaces de reaccionar con el DNA en los átomos de nitrógeno y de oxígeno de las bases adenina , guanina y citosina y con los grupos fosfato , teniendo preferencia por el N₇ de la guanina , aunque el O₆ de esta base , es el sitio alquilado más importante para la mutagénesis . La elevada reactividad de estas sustancias resulta de la formación de iones carbonio , los cuales son altamente electrofílicos (Verly y Brakier , 1970) .

Existen dos tipos diferentes de agentes alquilantes ,

de acuerdo con su funcionalidad , es decir , del número de contactos que pueden establecer con su blanco , lo que depende de la cantidad de grupos alquilantes que presentan (Brendel y Ruhland , 1984) .

Los agentes monofuncionales poseen un grupo alquil activo y producen DNA con bases metiladas , sitios apurínicos y rupturas monocatenarias del DNA , siendo este daño reparado en la mayoría de los casos (Strauss et al . , 1969 ; Lawley , 1974) , las bases alquiladas que escapan a los mecanismos de reparación del DNA se consideran sitios de mutación , debido a ésto , los agentes alquilantes son altamente mutagénicos (Strauss et al . , 1969) .

Los agentes bifuncionales actúan más a menudo como monofuncionales , pero a veces alquilan dos sitios simultáneamente , generalmente dos guaninas del DNA entre las cuales se establecen puentes intracatenarios o intercatenarios, éstos causan retraso en el ciclo celular y en muchos casos impiden la replicación del DNA ocasionando la muerte celular (Strauss , 1969 ; Verly y Brakier , 1970 ; Lawley , 1974 ; Chen et al . , 1981) . Estos compuestos no solo inducen mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas , sino que también son altamente tóxicos , carcinogénicos y teratogénicos (Koller , 1969) .

Los agentes alquilantes producen alteraciones cromatídicas independientemente del estado del ciclo celular en el que se encuentran las células (Kihlman et al . , 1978) , es decir que requieren de la síntesis del DNA para que se expresen como consecuencia de errores en la replicación y por lo tanto se les considera agentes S - dependientes (Evans , 1977) .

Entre los pesticidas organofosforados con posible actividad alquilante se encuentra el Folimat o Dimetoato

(éster del ácido 0,0 - dimetil S - 2 - (metilamino) - 2 oxoetil fosforoditioico o éster del ácido 0,0 - dimetil fosforoditioico (Fig. 5) , el cual se emplea como acaricida sistémico . Su peso molecular es de 229.28 ; tiene un punto de fusión entre 52°- 52.5°C y arde rápidamente al contacto con la flama , es ligeramente soluble en agua y soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos con excepción de hidrocarburos saturados . Es estable en solución acuosa , pero es hidrolizado por álcalis acuosos (Index Merck , 1976) .

La dosis letal media o LD₅₀ en ratas , conejos y gatos es de 50 mg/Kg y para gallinas de 125 mg/Kg (Bayer de México , 1980) .

En cuanto a la capacidad del Folimat para causar daño al DNA , se tiene poca información , la cual además es contradictoria . Se conoce la capacidad de este organofosfato para inducir mutaciones en E. coli (Mohn , 1973) , Fahrig (1974) describe que esta sustancia es mutagénica en diversos sistemas de prueba microbianos ; sin embargo , Shirashu et al . (1976) consideran a este agente químico como no mutagénico en los sistemas de prueba bacterianos que ellos emplean . No obstante , Moriya et al . (1983) lo describen como mutagénico al utilizar el sistema de prueba de reversión bacteriana .

Por otro lado , sobre células de mamíferos , este compuesto resulta genotóxico en células HeLa (Wild , 1975) y se ha informado que este insecticida produce aumento en el número de intercambios de cromátidas hermanas en células V₇₉ de criceto Chino (Chen et al . , 1982) .

Recientemente se ha descrito que esta sustancia induce intercambio de cromátidas hermanas en cromosomas de la raíz principal de Vicia faba (Cortés , 1985) .

Otro insecticida organofosforado es el Metil Paratión

o Folidol (éster del ácido 0,0 - dimetil - 0 (4 - nitrofenil) fosforotioico o éster del ácido 0,0 - dimetil 0 - p - nitrofenil fosforotioato (Fig. 6) , el cual es un insecticida usado ampliamente tanto en la agricultura como domésticamente ya sea puro o combinado con otros insecticidas organofosforados . Su peso molecular es de 263.23 , su punto de fusión es de 37°C a 38°C , es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos y en agua lo es solamente en 50 ppm (Index Merck , 1976) .

El Metil Paratión es absorbido a través de los tractos gastrointestinal y respiratorio y de la piel (NIOSH , 1976) . Posee una LD₅₀ en ratas de 14 a 24 mg/Kg oralmente y 67 mg/Kg por aplicación dérmica (Gaines , 1969) . Por otro lado , Thomson (1973) reporta una LD₅₀ de 9 mg/Kg de peso . En el hombre el envenenamiento por esta sustancia produce náuseas , calambres , diarreas , vómitos , salivación , pérdida de reflejos , convulsiones y en casos severos provoca la muerte (Thomson , 1973 ; Van Bao et al . , 1974 ; Diggory et al . , 1977) . Este agente químico y su principal metabolito el metil paraoxon tienen acción inhibitoria de la acetilcolinesterasa (Myers et al . , 1952) .

En ratas tratadas con este compuesto se produce la supresión del crecimiento fetal y de la osificación , así como una alta incidencia de paladar hendido y muerte fetal en ratones (Tanimura et al . , 1967) .

Con respecto a los efectos genéticos que causa el Metil Paratión , existen diversos resultados contradictorios: Mohn (1973) describe que esta sustancia es buena inductora de mutaciones resistentes al 5 - metiltriptofano en E. coli . Es débilmente positivo en varios sistemas de prueba (Fahrig , 1974 ; Hanna y Dyer , 1975) . Provoca rompimientos en el DNA del plásmido Co 1 E₁ de E. coli (Griffin

y Hill , 1978) , causan mutaciones en cebada y aberraciones cromosómicas en el meristemo de la raíz y en las células madres del polen de esta planta (Panda y Sharma , 1979) , es mutagénico en Salmonella (Waters et al . , 1980) y en S. cervisiae (Waters et al . , 1982) . Sin embargo , Simmon et al . (1975) lo reportan como no mutagénico en B. subtilis , E. coli y en Salmonella typhimurium , así como en la prueba letal dominante en el ratón . Kaur (1983) informa que este compuesto no afecta la frecuencia de letales dominantes ligados al sexo en Drosophila .

En linfocitos humanos cultivados , el Metil Paratión no eleva la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Huang , 1973) mientras que en la sangre periférica de personas agudamente intoxicadas si aumenta el número de aberraciones cromosómicas (Yoder et al . , 1973) . Por otro lado , Chen et al . (1981) describen incremento significativo de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en células de mamíferos expuestos a este pesticida donde también ha mostrado un fuerte retraso del ciclo celular . Sobti et al . (1982) por el contrario informan que no se obtiene incremento en el número de intercambios de cromátidas hermanas en cultivo de linfocitos . Aunque en Vicia faba se ha reportado que eleva significativamente la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (Cortés , 1985) e induce la formación de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón (Grover y Malhi , 1985) .

Con la finalidad de detectar los efectos genotóxicos inducidos por la gran variedad de mutágenos tanto químicos como físicos presentes en el medio y de evaluar ampliamente el riesgo que representan para la salud del hombre , se han desarrollado diversos sistemas biológicos de prueba que incluyen organismos como bacterias , hongos y plantas , hasta

animales superiores (Environmental Mutagen Society , 1975) . Entre los sistemas de prueba más convenientes para detectar este tipo de daño tanto in vivo como in vitro se encuentran los que emplean el cultivo de células humanas y dentro de éstos destaca el cultivo de linfocitos de sangre periférica ya que tiene ventajas tales como obtener poblaciones celulares numerosas (Evans y O' Riordan , 1975) , por medio de mitógenos como la fitohemaglutinina (Jasinska et al . , 1970) .

Por otra parte , el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) ha resultado ser una prueba rápida y sensible puesto que se inducen con concentraciones diez veces menores que aquellas que producen aberraciones cromosómicas (Wolff, 1977) y ofrece un método adecuado para la detección de mutágenos ambientales (Perry y Evans , 1975) .

El ICH , representa los intercambios entre los productos de replicación del DNA , dándose simétricamente en un locus entre cromátidas hermanas químicamente diferentes, sin alterar la polaridad ni la estructura de la doble hélice del DNA ni tampoco la morfología del cromosoma , pero aún no se conoce exactamente el mecanismo molecular por el que se lleva a cabo (Latt y Schreck , 1980) .

McClintock (1938) es quien por primera vez infiere la presencia de los ICH al observar cromosomas entrelazados y anillados dobles en Zea mays ; sin embargo , son Taylor et al . (1957) quienes al realizar estudios autorradiográficos con timidina tritiada en Vicia faba demuestran definitivamente la existencia de éstos .

Zakharov y Egolina (1972) sustituyen el empleo de timidina tritiada por la exposición de las células a 5-bromo desoxiuridina (BrdUr) por dos ciclos de generación celular , obteniéndose así en la segunda mitosis cromosomas con

una cromátida unifilarmente sustituida con BrdUr y su hermana bifilarmente sustituida (Fig. 7) .

Latt (1973) describe la técnica fluorescente usando el colorante Hoescht 33258 , el cual al interactuar con las cromátidas sustituidas unifilarmente fluoresce con mayor intensidad que las cromátidas hermanas sustituidas bifilarmente , sugiriendo que la disminución diferencial de la fluorescencia entre las cromátidas sustituidas T-B y B-B , se debe a la incorporación de BrdUr en el DNA . Otros colorantes fluorescentes tales como el naranja de acridina han sido empleados con el mismo fin (Kato , 1974 ; Perry y Wolff , 1974) .

Sin embargo , aunque esta técnica proporciona mayor grado de resolución para la detección de intercambios de cromátidas hermanas , aún existe el inconveniente de que la imagen obtenida se desvanece muy pronto debido a la corta vida media de la fluorescencia del colorante .

Perry y Wolff (1974) mejoran este sistema utilizando la tinción con Giemsa , descubren que la cromátida con el DNA sustituido bifilarmente con BrdUr está menos condensada y se tiñe más debilmente con Giemsa que la cromátida hermana sustituida unifilarmente . De esta forma obtienen preparaciones permanentes que pueden ser observadas en el microscopio de luz . En las cromátidas que incorporan BrdUr en ambas hebras de DNA la fluorescencia se apaga y se tiñe debilmente con Giemsa , mientras que las cromátidas que poseen BrdUr en una sola hebra del DNA fluorescen con mayor intensidad y se tiñen fuertemente con Giemsa (Fig. 8) .

Kato (1973) demuestra la inducción de ICH por agentes alquilantes y proflavina empleando originalmente la autoradiografía . Latt (1974) es el primero en utilizar la técnica de alta resolución para detectar la inducción de

ICH por agentes químicos cuyos efectos son sospechados y describe que los linfocitos humanos son extremadamente sensibles a la mitomicina C . Por otro lado, Solomon y Bobrow (1975) describen el incremento de ICH por agentes alquiliantes en concentraciones menores de las que producen aberraciones cromosómicas . Perry y Evans (1975) prueban 14 agentes químicos entre los que están mutágenos y carcinógenos conocidos y otras sustancias sospechosas de serlo , en la mayoría de los casos estos compuestos resultan ser inductores de ICH . Por lo que todo ésto ha sugerido que el análisis de ICH puede ser usado como una prueba para la detección de los efectos de este tipo de sustancias .

Sin embargo , existen algunos agentes mutagénicos que requieren de activación metabólica para inducir ICH , por lo que se han desarrollado dos caminos para que el sistema de prueba sea capaz de activar compuestos . Uno es la administración de las sustancias al animal experimental , con el fin de que estos productos químicos puedan pasar a través del hígado y otros tejidos que contienen las enzimas necesarias para la activación y cultivar la sangre en la presencia de BrdU para visualizar los ICH de los linfocitos (Stetka y Wolff , 1976) , o por las inyecciones seriadas a los animales con BrdU o en forma de tabletas que pueden ser implantadas subcutáneamente y después analizar los ICH en células de médula ósea (Allen y Latt , 1976 ; Vogel y Bauknecht , 1976) . El otro camino a seguir ha sido aplicar un sistema de activación microsómico extraído del hígado de mamíferos para el cultivo de células in vitro .

Actualmente el ICH es usado ampliamente como sistema de prueba por ser , como se mencionó anteriormente , muy sensible y rápido para la detección de los efectos carcinógenos y mutagénicos de varios compuestos químicos (Perry y Evans , 1975) .

Dada la importancia de los insecticidas organofosforados como contaminantes agrícolas y debido a sus propiedades alquilantes , es importante determinar el riesgo genético que representan para los individuos expuestos , por tal razón en este trabajo se pretende evaluar en el cultivo de linfocitos humanos , la capacidad de inducción de ICH del Folimat y Metil Paratión .

MATERIAL Y METODO

Se realizaron cultivos de sangre periférica de individuos sanos y se utilizó el mismo donador para cada experimento y sus repeticiones . Las concentraciones de Folimat y Metil Paratión para los tratamientos se determinaron por medio de experimentos preliminares basados en los estudios de Vicia faba . Las concentraciones elegidas fueron 5 , 10 , 20 , 30 , 40 , 60 , 80 , 100 y 120 ppm de Folimat y 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 , 4.0 , 6.0 , 9.0 , 10.0 y 13.0 ppm de Metil Paratión .

Las soluciones para cada insecticida se hicieron con agua destilada y luego se esterilizaron por filtración con membranas " Millipore " 0.45 μ m .

Método de cultivo y cosecha

Con jeringa heparinizada se extrajeron 5 ml de sangre periférica por punción venosa , se aplicaron ocho gotas en un frasco de cultivo conteniendo 3 ml de medio McCoy 's 5A (Microlab) , más 0.18 ml de fitohemaglutinina (Gibco) , se incubaron a 37°C por un lapso de 72 horas ; veinticuatro horas después de iniciado el cultivo se administraron 100 μ l de 5-Bromodesoxiuridina y se añadieron al mismo tiempo las concentraciones correspondientes de la sustancia a probar . Después de 70 horas del cultivo se agregaron 100 μ l de colchicina y se mantuvieron por dos horas más a 37°C para que completaran el tiempo de incubación .

Después se centrifugaron los cultivos a 1000 rpm durante 5 minutos , al término de éstos , se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 4 ml de KCl 0.075 M manteniéndose a 37°C por veinte minutos . A continuación , se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos , se extrajo el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con fijador

metanol - acético (3 : 1) durante 15 minutos a temperatura ambiente . Posteriormente se centrifugó y se lavó el botón con el fijador durante 10 minutos ; luego se volvió a centrifugar una vez más durante 5 minutos a 1000 rpm y se resuspendió en 0.5 ml de fijador , con esta última suspensión se realizaron las preparaciones por goteo y se dejaron secar al aire .

Tinción diferencial

La tinción diferencial se efectuó con Hoechst 33258 (5 µg / ml) durante 20 minutos en la oscuridad , las preparaciones se lavaron con agua corriente , luego se montaron en KCl 0.075 M y se irradiaron con luz ultravioleta y luz negra durante una hora . Después se colocaron en cajas de Koplín con 2xSSC (citrato salino de sodio) a 45°C durante una hora , se enjuagaron con agua corriente y se tiñeron con Giemsa (1 : 10) por 10 minutos .

Para cada concentración de los experimentos se realizaron dos repeticiones a las que se les aplicó la prueba " t " de Student (Anexo I) y se determinó que no hubo diferencia significativa entre ambas , por lo que fue posible promediarlas .

Se analizó un total de 50 metafases de segunda división para los ICH , registrándose los intercambios intersticiales como 2 eventos y los terminales como 1 .

Con la finalidad de evitar prejuicios en el registro de ICH , se asignó una clave a cada concentración del tratamiento , de tal forma que en el momento de hacer las preparaciones y observarlas no se tuvo conocimiento del lote al que pertenecía .

En el análisis de los datos , se consideró como cri-

terio principal para designar al compuesto como mutágeno eficiente en la inducción de ICH , su capacidad para producir por lo menos el doble de su nivel basal o mostrar una relación dosis - respuesta presentando un incremento progresivo sobre su frecuencia basal , con un valor de ICH de $p < 0.001$ (Latt et al ., 1981) .

RESULTADOS

La tabla I muestra la frecuencia de ICH inducida por Polimat , observándose con relación al testigo un aumento significativo ($p < 0.001$) de la concentración de 20 a 100 ppm . En 30 ppm se obtiene el pico de inducción de ICH , lográndose triplicar el nivel basal . Como puede apreciarse en la Fig. 9 , al incrementar la dosis del insecticida hasta 30 ppm , se eleva proporcionalmente el número de ICH , y con concentraciones mayores a ésta , disminuye la frecuencia de los mismos . Por otro lado , también el número de células observadas por preparación se reduce , notándose además fragmentos de tejido celular . Por esta razón , se hace necesario revisar en su totalidad las 4 preparaciones hechas por concentración para poder cuantificar así las 25 metafases de segunda división .

Con respecto al Metil Paratión , en la tabla II aparece la frecuencia de ICH provocada por este agente químico , donde se advierte que de la concentración de 4 a 10 ppm la cantidad de ICH es significativamente diferente del testigo ($p < 0.001$) . En la Fig. 10 puede observarse que la máxima inducción de ICH se obtiene en 4 ppm pero no hay una relación dosis respuesta . Además , en ningún caso se llega a alcanzar el doble de la frecuencia basal de ICH. Por otra parte , también con este pesticida se nota el deterioro del tejido en las concentraciones más altas probadas .

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este estudio se comprueba que el Folimat produce la elevación de la frecuencia de ICH proporcional al aumento de la concentración hasta 30 ppm (Tabla I) . Se requieren por lo tanto concentraciones moderadamente altas de esta sustancia para provocar ICH . Sin embargo , al aumentar a más de 30 ppm , disminuye la cantidad de ICH . Esto posiblemente sea debido a que las células con alta incorporación de insecticida presentan más daño , tanto citotóxico como citogenético y probablemente no se dividan . Es por eso que en dichas células no se puede observar la presencia de ICH, cuantificándose solo aquellos que se producen en células con daño aún compatible con la sobrevivencia y que presentan frecuencias de ICH menores .

El hecho de que se necesiten dosis elevadas de este compuesto para inducir ICH puede deberse a que el insecticida tal vez no atraviesa con facilidad la membrana celular de los linfocitos , pero una vez dentro de la célula , le es más difícil salir , por lo que no es desechado por las células del primer ciclo celular . Sin embargo , en esta etapa del cultivo , la incorporación de la sustancia quizá es pequeña y por ésto su acción mutagénica también lo es . No obstante , en las células del segundo ciclo celular que han acumulado más Folimat , el efecto mutagénico es mayor .

En cuanto a la toxicidad del Folimat , parece no ser alta , puesto que los linfocitos permanecen expuestos a este compuesto durante dos ciclos de replicación y solo se obtiene su muerte con dosis grandes del mismo . Esto concuerda con el informe de Gilot - Delhalle et al . (1983) que proponen que dicho organofosforado se encuentra entre los insecticidas medianamente tóxicos , lo cual también se co-

robora con el trabajo de Chen et al . (1981) quienes describen que tal pesticida aumenta la frecuencia de ICH en una línea celular linfóide humana con y sin activación metabólica .

Con respecto al Metil Paratión , éste eleva de manera significativa la frecuencia de ICH de 4 a 10 ppm (Tabla II) . Se puede esperar que esta sustancia actúe en la misma forma que el Paratión . Este insecticida también es organofosforado (Index Merck , 1976) y tiene la capacidad de alterar las membranas celulares , modificando y aumentando la permeabilidad de las mismas (Antunes-Madeira y Madeira, 1979) . Por lo que es probable que el Metil Paratión , desde bajas concentraciones sea capaz de interferir en las funciones de la membrana celular de los linfocitos . Al aumentar posteriormente la dosis , el insecticida posiblemente cambia la permeabilidad de la membrana celular , haciéndola menos selectiva y lográndose de esta manera que haya una mayor penetración del compuesto . Este una vez dentro , se va acumulando , ya que tal vez no es excretado con facilidad , lo que ocasiona su alta toxicidad y provoca la muerte celular antes de que pueda detectarse mayor daño genético . El deterioro del tejido se nota en las concentraciones más altas , lo cual concuerda con el informe de Thomsom (1973) quién considera que el Metil Paratión es más tóxico que el Folimat .

De esta forma , posiblemente el mayor efecto genotóxico del Metil Paratión se obtiene en las células del primer ciclo celular donde la citotoxicidad aún no es letal, mientras que si lo es en las células del segundo ciclo celular que lo han acumulado en mayor cantidad . Por lo tanto , el hecho de que no se obtenga mayor incremento en el número de ICH con relación al testigo , puede atribuirse a

la acción tóxica de esta sustancia , la cual provoca la muerte celular antes de que se produzca una mayor cantidad de lesiones al DNA y la manifestación de éstas por medio de la formación de ICH .

Al comparar el efecto de ambos compuestos sobre los linfocitos humanos (Tabla I y II) puede apreciarse que el Metil Paratión requiere de un rango menor que el Folimat para incrementar significativamente la frecuencia de ICH . Este hecho probablemente se debe a que el Metil Paratión penetra a la célula más rápidamente que el Folimat y causa daño desde el primer ciclo , sin embargo , también lo provoca en las células del segundo ciclo , pero debido a su toxicidad en estas últimas , no es posible evaluar su efecto genotóxico ya que las células mueren antes de que se detecte . Por otro lado , si el Folimat tiene mayor dificultad en atravesar la membrana celular de los linfocitos , necesita de dosis mucho más grandes que el Metil Paratión para introducirse a la célula . Así , al elevar la concentración probablemente , entra a la célula más cantidad de este compuesto , logrando acumularse en las del segundo ciclo y debido a que es menos citotóxico , induce hasta el triple del nivel basal de ICH.

Por otra parte , surge el hecho de la diferencia en la citotoxicidad de ambos insecticidas . Al comparar su constitución molecular (Figs. 5 y 6) se nota que únicamente difieren en el tercer radical orgánico , el cual le imparte las características a cada compuesto y que en el caso del Metil Paratión es el p-nitrofenol y en el Folimat es el 2 - (metilamino) - 2 - oxoetil , los cuales posiblemente constituyen la clave de su distinto comportamiento . Probablemente este radical del Metil Paratión es el que le confiere la capacidad para atravesar la membrana celular haciénd

dolo altamente tóxico , mientras que el radical del Folimat no produce el mismo efecto .

Para entender como estos insecticidas son capaces de inducir ICH , es necesario analizar primero el mecanismo mo lucular más acertado sobre su origen . Se sabe que los ICH requieren de la síntesis del DNA para producirse , fenómeno por lo tanto dependiente de la fase S (Wolff et al . , 1974) y que el DNA en interfase está dispuesto en subunidades estructurales superenrolladas denominadas replicones , los cuales a su vez forman conglomerados que controlan individual mente su replicación . Debido a esto , durante el periodo de síntesis , algunos conglomerados se replican tempranamente mientras que sus vecinos lo hacen más tarde . En cambio , los replicones pertenecientes al mismo conglomerado inician su replicación simultáneamente (Hand , 1978) .

Considerando lo anterior , Painter (1980) sugiere que en las regiones entre la eucromatina y la heterocromatina , es decir , en la unión entre un conglomerado replicado y otro aún sin replicar , tiene lugar la formación del ICH , los cuales se originan por los rompimientos de DNA de cadenas dobles , llevados a cabo por la enzima topoisomerasa II , la cual corta para liberar la tensión que produce la replicación sobre el DNA superenrollado . Esta enzima al cortar tiene la probabilidad de equivocarse (Liu et al . , 1980) y cuando esto ocurre se produce un ICH como consecuencia de la unión de las cadenas hijas de un conglomerado replicado con las cadenas progenitoras del conglomerado adyacente sin replicar (Fig . 11) . La formación del ICH se da cuando se terminan los procesos de ligamento normales . Además , la producción de ICH como función lineal de la dosis (Perry y Evans , 1975 ; Carrano et al . , 1978) concuerda con el rompimiento de la doble cadena en un solo evento que propone Painter (1982) .

Por otro lado , es importante mencionar que los mecanismos de reparación del DNA tienen un papel muy importante en la reducción del número de lesiones antes de la replicación del material genético y de esta forma pueden disminuir la frecuencia de ICH (Painter , 1980) , pero si el daño no es reparado y persiste a través de varios ciclos celulares , entonces sigue originando la formación de ICH . Con base en esto , Conner et al . (1984) propone un modelo de probabilidad para la inducción de ICH por agentes alquilantes que supone la existencia de un mecanismo desviado de la replicación del DNA para la inducción del ICH , tal que las lesiones del DNA no reparadas puedan darles origen durante la replicación en algún ciclo postratamiento ; recientemente se ha sugerido que la O_6 - metilguanina en el DNA , base alquilada que puede escapar a los mecanismos de reparación , está implicada en la formación de ICH (Wolff , 1978 ; Day et al . , 1980) .

El modelo considera que los ICH suceden de manera aditiva e independiente de los niveles basales y se hace predicciones de la frecuencia de ICH a partir de la probabilidad que tienen los sitios sencillos del DNA alquilado no reparado de producir ICH en cada ciclo mientras persistan . Es importante mencionar además que dicho modelo considera por otra parte la disminución significativa del número de ICHs debido a que con agentes alquilantes monofuncionales , los intercambios pueden ser inducidos en un mismo sitio en el cromosoma durante el primero y el segundo ciclos celulares y conducir así a la anulación del ICH en la segunda mitosis .

También se ha propuesto un modelo de replicación desviado para la inducción de ICH por sitios del DNA que presentan enlaces cruzados (Shafer , 1979) y para monoadductos en el DNA (Ishii y Bender , 1980 ; Painter , 1980) .

Uno de los daños más importantes que provocan los agentes alquilantes es la mutación y considerando que los pesticidas como el Folimat y el Metil Paratión son compuestos con propiedades similares a la de los agentes alquilantes monofuncionales entonces también debe esperarse que éstos sean mutagénicos (Fahrig , 1974 ; Chen et al . , 1981) y de hecho como se menciona anteriormente , la capacidad mutagénica de éstos ya la han descrito varios autores (Mohn , 1973 ; Fahrig , 1974 ; Griffin y Hill , 1978 ; Panda y Sharma , 1979 ; Waters et al . , 1980) .

Se ha propuesto que la mutación inducida por dichos compuestos se debe a que no todo el daño que causan al DNA es reparado , las O₆ - metilguaninas están correlacionadas fuertemente con la inducción de mutación en células de mamíferos (Newbold et al . , 1980 ; Nagata et al . , 1982) debido a que algunas de estas bases metiladas no se pierden espontáneamente por despurinación o a que los grupos metilos de las mismas pueden no ser reconocidos por los mecanismos enzimáticos de reparación (Strauss et al . , 1969) . Por otra parte , también la O₆ - metilguanina-DNA - metiltransferasa , que es la enzima que se encarga de reparar a la O₆ - metilguanina sin cortarla de la cadena de DNA , se inactiva al transferir el grupo metilo de la base alquilada a un residuo de cisteína en la enzima (Schendel y Robins , 1978 ; Robins y Cairns , 1979 ; Foote et al . , 1980 ; Pegg et al . , 1982) .

De esta forma , los sitios alquilados no reparados participan en la replicación del material genético (Green y Krieg , 1961) donde tiene lugar los errores en el apareamiento de bases ya que la O₆ - metilguanina es capaz no solo de formar pares con la citosina sino también de hacerlo erróneamente con la timina , lo cual resulta principalmente

en transiciones del par G-C al par A-T (Osborn et al . , 1967 ; Nagata et al . , 1982) , este efecto puede retardar la replicación del DNA y por lo tanto inducir ICH . También se ha sugerido que las mutaciones pueden deberse a errores en los procesos de reparación del daño causado por alquilación (Malling y Wasson , 1977) .

No obstante , los datos anteriores , varios autores describen resultados negativos en la inducción de mutación o cáncer con agentes alquilantes (Huang , 1973 ; Simmon et al . , 1975 ; Kaur , 1983) .

Tomando en cuenta que tanto el Metil Paratión como el Folimat son considerados agentes alquilantes monofuncionales, debe esperarse que ambas sustancias tengan un comportamiento genotóxico similar . Las dos poseen la capacidad de alquilar al DNA al presentar dos radicales metilo capaces de activarse al reaccionar con sitios altamente nucleofílicos del material genético y originar principalmente bases metiladas ; algunas de éstas , al no ser reparadas durante la replicación del DNA , seguramente constituyen factores que retrasan este evento . Además otros sitios alquilados y no reparados en el DNA y los errores en la reparación , son también posibles causas del retraso en la replicación del DNA y de la equivocación de la topoisomerasa II , induciendo de esta forma los ICH. Sin embargo , el efecto genotóxico observado para cada compuesto difiere entre sí , siendo menor el del Metil Paratión y mayor el del Folimat , hecho que puede atribuirse a la diferencia que hay entre su toxicidad y su capacidad para atravesar la membrana celular de los linfocitos .

De tal forma , el Metil Paratión resulta ser un débil inductor de ICH mientras que el Folimat , que muestra tener una citotoxicidad media , es efectivo para producir ICH .

Los estudios realizados in vitro son muy importantes

porque indican el efecto directo de estos agentes químicos sobre las células , sin embargo , in vivo no siempre se obtiene la misma respuesta ya que estos compuestos son metabolizados por el hígado . Se sabe que el metabolito de la hidrólisis del Paratión y del Metil Paratión es el p-nitrofenol , el cual es excretado en la orina , esta sustancia tiene una débil actividad genética en Saccharomyces cerevisiae (Fahrig , 1974) por lo que la probabilidad de su acción mutagénica in vivo no es muy alta , Esto puede explicar los resultados obtenidos por de Cassia Stocco et al . (1982) quienes describen que no hay incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas del cultivo de linfocitos de un grupo de trabajadores industriales expuestos crónicamente al Metil Paratión con relación a un grupo testigo ; sin embargo , en personas intoxicadas agudamente por esta misma sustancia , sí hay aumento en el número de aberraciones cromosómicas (van Bao et al . , 1974) .

Recientemente la Environmental Protection Agency ha establecido tiempos límite de reentrada a los campos tratados con algunos productos químicos agrícolas , entre los que está el Metil Paratión (Davies et al . ; 1975) , no obstante , estos límites han resultado inadecuados para la salud , ya que aún existen problemas para determinar los intervalos seguros (Spear , 1980) , y para ello , aunque se hayan obtenido datos negativos en muestras pequeñas de individuos expuestos , no existe la garantía de que no produzcan efectos genotóxicos para el hombre , puesto que los resultados obtenidos in vitro en varios informes han sido positivos .

Por lo tanto , aunque el riesgo genético que representan tales compuestos agrícolas tanto para el hombre como para los organismos expuestos que no son su blanco , en algunos de

los casos no se ha determinado satisfactoriamente por las razones antes expuestas , debe considerarse que teniendo estas sustancias la capacidad de alquilar al DNA como se ha comprobado en los estudios in vitro , su empleo tanto en la agricultura como domésticamente resulta peligroso , sobre todo el de los pesticidas como el Folimat que ha mostrado ser efectivo en la inducción de ICH y que por tener una citotoxicidad media puede ser un mutágeno eficaz , por lo que su uso debe ser controlado .

Por último es importante mencionar que la demanda mundial de estos productos químicos sigue siendo indispensable en la actualidad , debido a ésto , todas las personas involucradas en su manufactura , trasporte y aplicación deben considerar todas las medidas de seguridad existentes para su manejo , reduciéndose en esta forma el peligro que representan para salud .

BIBLIOGRAFIA

- Aldridge , W. N. (1971) . The nature of the reaction of organophosphorus compounds and carbamates with esterases . Bull. WHO 44 , 25
- Allen , J. W. y Latt , S. A. (1976) . Analysis of sister chromatid exchange formation in vivo in mouse spermatogonia as a new test for environmental mutagens . Nature (London) 260 , 449 - 451 .
- Antunes-Madeira , M. C. y Madeira , V. M. (1979) . Interaction of insecticides with lipid membranes . Biochem. Biophys. Acta 550 , 384 - 392 .
- Axelsson , O. y Sundell , L. (1974) . Herbicide exposure mortality and tumor incidence , An epidemiological investigation on Swedish railroad workers. Work Environ. Health 11 , 21 - 82 .
- Barberá , C. (1976) . Insecticidas fosfóricos . En : Pesticidas Agrícolas . 3ª Ed. Omega . Barcelona . pp 147-200 .
- Bayer de México , S. A. (1980) . Folimat . " Bay 45432 " . Ficha técnica .
- Bedford , C. T. y Robinson , J. (1972) . The alkylating properties of organophosphates . Xenobiotica 2 , 307-337 .
- Bradley , J. R. (1980) . Pesticide effects upon the agroecosystem . En : Introduction to environmental toxicology . Ed. Guthrie , F. E. y Perry , J. J. Blackwell Scientific Publications . Nueva York .
- Brendel , M. y Ruhland , A. (1984) . Relationships between functionality and genetic toxicology of selected DNA - damaging agents . Mutat. Res. 133 , 51 - 85 .

- Bridges , B. A. , Mottershead , R. P. , Green , M. H. y Gray , W. J. (1975) . Mutagenicity of dichlorvos and methylmethanesulphonate for Escherichia coli WP₂ and some derivatives deficient in DNA repair. Mutat. Res. 19 , 205 - 303 .
- Carrano , A. V. , Thompson , L. H. , Lindl , P. A. y Mikler , J. A. (1978) . Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis . Nature (London) 271 , 551 - 553 .
- Chen , H. H. , Hsueh , J. L. , Sirianni , S. R. y Huang , C. C. (1981) . Induction of sister chromatid exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cell treated with eight organophosphorus pesticides . Mutat. Res. 88 , 307 - 316 .
- Chen , H. H. , Sirianni , S. R. y Huang , C. C. (1982) . Sister chromatid exchanges and cell - cycle delay treated with nine organophosphorus compounds (8 pesticides and 1 defoliant) . Mutat. Res. 103 , 307 - 313 .
- Conner , M. K. , Cheng , M. y Biegel , J. A. (1984) . A path probability model for sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents . Mutat. Res. 126 , 35 - 46 .
- Cortés , E. J. (1985) . Intercambios de cromátidas hermanas inducidos por los insecticidas organofosforados Folimat y Metil Paratión en Vicia faba . Tesis Licenciatura , Facultad de Ciencias , U.N.A.M. , México .
- Davies , J. E. , Edmundson , W. F. y Raffonelli , A. (1975) . The role of house dust in human DDT pollution . Am. J. Public. Health 65 , 53 - 57 .
- Day , R. S. , Ziolkowski , C. H. , Scudiero , D. A. , Meyer , S. A. , Lubinleck , A. S. , Garardi , A. J. , Galloway ,

- S. M. y Bynum , G. D. (1980) . Defective repair of alkylated DNA by human tumor and SV 40 - transformed human cell strains . Nature (London) 288 , 724 - 727 .
- Dean , B. J. (1972) . The mutagenic effects of organophosphorus pesticides on microorganisms . Arch. Toxicol. 30 , 67 - 74 .
- de Cassia Stocco , R. , Becak , W. , Gaeta , R. y Rabello - Gay , M. N. (1982) . Cytogenetic study of workers exposed to methylparathion . Mutat. Res. 103 , 71 - 76 .
- Diggory , H. P. , Landrigan , P. J. , Latimer , K. P. , Ellington , A. C. , Kimbrough , R. D. , Liddle , J. A. , Cline , R. E. y Smrek , A. L. (1977) . Fatal parathion poisoning caused by contamination of flour international commerce . Am. J. Epidemiol. 106 , 145 - 153 .
- Environmental Mutagen Society (1975) . Environmental mutagenic hazards . Science 187 , 503 - 514 .
- Eto , M. (1974) . Organophosphorus pesticide . En : Organic and biological chemistry . C. R. C. Press , Cleveland , Ohio .
- Evans , H. J. (1977) . Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations . En : Progress in genetic toxicology . Eds. Scott , D. , Bridges , B. A. y Sobels , F. H. Elsevier , Amsterdam .
- Evans , H. J. y O' Riordan , M. L. (1975) . Human peripheral blood lymphocytes for analysis of chromosome aberrations in mutagen test . Mutat. Res. 31 , 135 - 148 .
- Fahrig , R. (1974) . Comparative mutagenicity studies with pesticides . En : Chemical carcinogenesis assays . International Agency for Research on Cancer , Scientific Publication 10 . pp 161 - 181 .

- Fest , C. y Schmidt , K. J. (1973) . The chemistry of organophosphorus pesticides . Springer . Berlin .
- Foote , R. S. , Mitra , S. y Pal , B. C. (1980) .
Demethylation of O₆ - methylguanine in a synthetic DNA polymer by an inducible activity in Escherichia coli . Biochem. Biophys. Res. Commun. 97 , 654 - 659 .
- Fukuto , T. R. (1971) . Relationships between the structure of organophosphorus compounds and their activity as acetylcholinesterase inhibitors . Bull WHO 44 , 31 .
- Gaines , T. B. (1969) . Acute toxicity of pesticides . Toxicol. Appl. Pharmacol . 14 , 515 - 534 .
- Gilot - Delhalle , J. , Colizzi , A. , Moutschen , J. y Moutschen-Dahmen , M. (1983) . Mutagenicity of some organophosphorus compounds at the ade 6 locus of Schizosaccharomyces pombe . Mutat. Res. 117 , 139 - 148 .
- Green , D. y Krieg , D. (1961) . The delayed origin of mutants induced by exposure of extracellular phage T4 to ethylmethanesulfonate . Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 47 , 64 - 72 .
- Griffin III , D. E. y Hill , W. E. (1978) . In vitro breakage of plasmid DNA by mutagens and pesticides . Mutat. Res. 52 , 161 - 169 .
- Grover , I. S. y Malhi , P. K. (1985) . Genotoxic effects of some organophosphorus pesticides . Mutat. Res. 155 , 131 - 134 .
- Guthrie , F. E. (1980) . Pesticides and humans . En : Introduction to environmental toxicology . Ed. Guthrie, F. E. y Perry , J. J. Blackwell Science Publication , Nueva York .
- Hand , R. (1978) . Eucaryotic DNA : organization of the genome replication . Cell 15 , 317 .

- Hanna , P. J. y Dyer , K. F. (1975) . Mutagenicity of organophosphate compounds in bacteria and Drosophila . Mutat. Res. 28 , 405 - 420 .
- Hardell , L. y Sandstrom , A. (1979) . Case control study , soft phenoxyacetic acids , or chlorophenols . Br. J. Cancer 39 , 711 - 719 .
- Huang , C. C. (1973) . Effect on growth but not on chromosomes of the mammalian cells after treatment with three organophosphorus insecticides . Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142 , 36 - 40 .
- Hutson , D. H. y Hoadley , E. C. (1972) . The metabolism of 14c- methylchlorvos in the rat and the mouse . Xenobiotica 2 , 107 - 116 .
- Index Merck . (1976) . 9 th edition . Merck & Co. U.S.A.
- Innes , J. R. , Ulland , B. M. , Valerio , M. G. , Petrucelli , L. , Fishbein , L. , Hart , E. R. y Pallotta , A. J. (1969) . Bioassay of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice : a preliminary note . J. Natl. Cancer Inst. 42 , 1101 - 1114 .
- Ishii , Y. y Bender , M. (1978) . Factors influencing the frequency of mitomycin C - induced sister chromatid exchanges in 5 - bromodesoxyuridine in culture . Mutat. Res. 51 , 411 - 418 .
- Jasinska , J. , Steffen , J. A. y Michalowski , A. (1970) . Studies in vitro lymphocyte proliferation in cultures synchronized by inhibition of DNA synthesis . II . Kinetics of the initiation of the proliferation response . Exp. Cell Res. 61 , 333 - 341 .
- Karczmar , A. G. , Nishi , S. , Blaber , L. C. (1970) . Investigations , particularly by means of anticholinesterase agents , of the multiple peripheral and of their behavioral implications . Acta Vitaminol. Enzimol. 24 , 131 .

- Kato , H. (1973) . Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine . Exp. Cell Res. 82 , 383 - 390 .
- Kato , H. (1974) . Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR - labelling method . Nature (London) 251 , 70 - 72 .
- Kaur , P. (1983) . Studies and mutagenicity of some organophosphorus pesticides . Ph. D. Thesis submitted to Guru Nanak Deu University , Amritsar , Punjab , India .
- Kihlman , B. A. , Natajara , A. T. y Andersson , H. C. (1978) . Use of the 5-bromodesoxyuridine - labelling technique for exploring mechanisms involved in the formation of chromosomal aberrations . Mutat. Res. 52 , 181 - 198 .
- Koller , P. C. (1969) . Mutagenic alkylating agents as growth inhibitors and carcinogens . Mutat. Res. 8 , 199 - 206 .
- Latt , S. A. (1973) . Microfluorometric detection of desoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes . Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 70 , 3395 - 3399 .
- Latt , S.A. (1974) . Sister chromatid exchanges , indices of human chromosome damage and repair detection by fluorescence and detection by mitomycin C . Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 71 , 3162 - 3166 .
- Latt , S. A. y Schreck , R. R. (1980) . Sister chromatid exchange analysis . Ann. J. Hum. Genet. 32 , 297 - 313 .
- Latt , S. A. ; Allen , J. , Bloom , S. E. ; Carrano , A. , Falke , E. , Kram , D. , Schneider , E. , Schreck , R. , Tice , R. , Whitfield , B. y Wolff , S. (1981) . Sister chromatid exchanges : a report of gene - tox program . Mutat. Res. 87 , 17 - 62 .

- Lawley , P. D. (1974) . Some chemical aspects of dose - response relationships in alkylation mutagenesis. *Mutat. Res.* 23 , 283 - 295 .
- Liu , L. F. , Liu , C. C. y Alberts , B. M. (1980) . Type II DNA polymerases : enzymes that can unknot a topologically knotted DNA . *Cell* 19 , 697 - 699 .
- Malling , H. V. y Wassom , J. S. (1977) . Action of mutagenicity agents . En : Handbook of teratology , Vol. 1. Ed. Wilson , J. G. y Fraser , F. C. , Nueva York pp. 99 - 152 .
- McClintock , B. (1938) . The production of homocygous deficient tissues with mutant characteristics by means of aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes . *Genetics* 23 , 315 - 397 .
- Mohn , G. (1973) . 5- Methyltryptophan resistance mutations in Escherichia coli K - 12 . Mutagenic activity of monofunctional insecticides . *Mutat. Res.* 20 , 7 - 15 .
- Moriya , M. , Ohta , T. , Watamabe , K. , Miyazawa , T. , Kato , K. y Shirasu , Y. (1983) . Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems . *Mutat. Res.* 116 , 185 - 216 .
- Myers , D. K. , Mendel , B. , German , H. R. y Ketellar , J. A. (1952) . Oxidation of thiophosphates insecticide in the rat . *Nature (London)* 170 , 805 - 807 .
- Nagata , Ch. , Takeda , E. y Aida , M. (1982) . Why O₆ - alkylguanine is specifically promutagenic? Ab initio molecular orbital consideration . *Mutat. Res.* 105 , 1 - 8 .
- Newbold , R. F. , Warren , W. ; Medcalf , C. S. y Amos , J. (1980) . Mutagenicity of carcinogenic methylating agents is associated with specific DNA modification. *Nature (London)* 283 , 596 - 599 .

- NIOSH (1976) . Occupational exposure to methyl-parathion .
U.S. Department of Health , Education and Welfare .
DWEW (NIOSH) Publ. 77 , p. 106 .
- O' Brien , R. D. (1967) . Insecticides . Academic Press .
Nueva York .
- O' Brien , R. D. (1969) . Phosphorylation and carbamylation
of cholinesterase . Ann. NY. Acad. Sci. 160 , 204 .
- Osborn , M. , Stanley , P. , Phillips , S. y Funk , F. (1967) .
A determination of mutagen specificity in bacteria
using nonsense mutants of bacteriophage T4 . J. Mol.
Biol. 26 , 437 - 449 .
- Painter , R. B. (1980) . A replication model for sister
chromatid exchange . Mutat. Res. 70 , 337 - 341 .
- Painter , R. B. (1982) . Replication model for sister sister
chromatid exchange . En : Sister Chromatid Exchange .
Alan R. Liss , Nueva York , 115 - 121 .
- Panda , B. B. y Sharma , C. B. (1979) . Organophosphate
induced chlorophyll mutations in Hordeum vulgare . Theor.
Appl. Genet. 55 , 253 - 255 .
- Pegg , A. E. , Robertfroid , M. , von Barth , C. , Foote , R.
S. , Mitra , S. , Bresil , H. , Likhachev , A. y Montesano,
R. (1982) . Removal of O₆ - methylguanine from DNA by
human liver fractions . Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)
79 , 5162 - 5165 .
- Perry , P. y Evans , H. J. (1975) . Cytological detection of
mutagencarcinogen exposure by chromatid exchange . Nature
258 , 121 - 124 .
- Perry , P. y Wolff , S. (1974) . New giemsa method for the
differential staining of sister chromatids . Nature 251
156 - 158 .
- Pool , D. C. , Simmon , V. F. y Newell , G. W. (1977) . In
vitro mutagenic activity of fourteen pesticides . Toxicol.
Appl. Pharmacol. 41 , 196 .

- Robins , P. y Cairns , J. (1979) . Quantitation of the adaptive to alkylating agent . Nature (London) 280 , 74 - 76 .
- Schendel , P. F. y Robins , P. E. (1978) . Repair of O₆-methylguanine in adapted Escherichia coli . Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 75 , 6017 - 6020 .
- Shafer , D. (1979) . Replication bypass and model for sister chromatid exchanges and implications for Bloom 's syndrome Fanconi 's anemia . Hum. Genet. 39 , 177 - 190 .
- Shirashu , Y. , Moriya , M. , Kato , K. , Furuhashi , A. y Kada , T. (1976) . Mutagenicity screening of pesticides in microbial system . Mutat. Res. 40 , 19 - 30 .
- Simmon , K. F. , Mitchell , A. D. , Jorgenson , T. A. y Newell , G. M. (1975) . Summary report on methylation , in vitro and in vivo studies of selected pesticides to evaluate their potential as chemical mutagens . Unpublished report submitted to NIOSH by Stanford Research Institute , Menlo Park , C.A. p. 6 .
- Sobti , R. C. , Krishon , A. y Pfaffenberger , C. D. (1982) . Cytokinetic and cutogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cell in vitro : organophosphates. Mutat. Res. 102 , 89 - 102 .
- Solomon , E. y Brobrow , M. (1975) . Sister chromatid exchanges, a sensitive assay of agents damaging human chromosomes. Mutat. Res. 30 , 273 - 278 .
- Spear , R. C. (1980) . Technical problems in determining safe reentry intervals . J. Environ. Path. Tox. 4 , 293 - 304 .
- Stetka , D. G. y Wolff , S. (1976) . Sister chromatid exchange as assay for genetic damage induced by mutagens-carcinogens II in vitro test for compounds requiring metabolic activation . Mutat. Res. 41 , 343 - 350 .

- Strauss , B. , Coyle , M. y Robbins , M. (1969) . Consequences of alkylation for the behavior of DNA . Ann. N.Y. Acad. Sci. 163 , 765 - 787 .
- Tanimura , T. , Katsuya , T. y Nishimura , H. (1967) . Embryotoxicity of acute exposure to methyl-paration. Arch. Environ. Health 15 , 609 - 613 .
- Taylor , J. H. , Woods , P. S. y Hughes , W. L. (1957) . The organization and duplication of chromosomes as revealed by autorradiographic studies using tritium-labeled thymidine. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 43 , 122 - 128 .
- Thomson , W. T. (1973) . Agricultural chemicals , Book I . Insecticides , acaricides and ovicides . Thomson Publications , Indiana . pp. 205 - 206 .
- van Bao , T. , Szabo , I. , Ruzicka , P. y Czeizel , A. (1974) . Chromosome aberrations in patients suffering acute organic phosphate insecticide intoxication . Human Genetik 24 , 33 - 57 .
- Verly , W. G. (1974) . Commentary : Monofunctional alkylating agents and apurinic sites in DNA . Biochem . Pharmacol. 23 , 3 - 8 .
- Verly , W. G. y Brakier , L. (1970) . Mecanisme moleculaire de L' action toxique des agents alkylants . Rev. Europ. Etudes Clin. Et. Biol. XV , 483 - 488 .
- Vogel , W. y Bauknecht , T. (1976) . Differential chromatid staining by in vivo treatment as a mutagenicity test system . Nature 260 , 448 - 449 .
- Waters , M. D. , Simmon , V. F. , Mitchell , A. D. , Jorgenson , T. A. y Valencia , R. (1980) . An overview of short term test for the mutagenic and carcinogenic potential of pesticides . J. Environ. Sci. Health 15 , 867 - 906 .
- Waters , M. D. , Sandhu , S. S. , Simmon , V. F. , Mortelmans , K. E. , Mitchell , A. D. , Jorgenson , T. A. , Jones ,

- D. C. , Valencia , R. y Garrentt , N. E. (1982) .
Study of pesticides genotoxic in ; Toxicology : An
agricultural perspective . Plenum , Nueva York , pp.
275 - 326 .
- West , T. F. , Hardy , J. E. y Ford , J. H. (1952) . Chemical
control of insects. Wiley , Gran Bretaña .
- Wild , D. (1975) . Mutagenicity studies on organophosphorus
insecticides . Mutat. Res. 32 , 133 - 150 .
- Wolff , S. (1977) . Sister chromatid exchange : the most
sensitive mammalian system for determining the affects
of mutagenic carcinogens . Expert conference . Oslo ,
Noruega . Mayo . pp. 11 - 13 .
- Wolff , S. (1978) . Chromosomal effects of mutagenic carcinogens
and the nature of the lesions leading to sister chromatid
exchange . En : Mutagen induced chromosome damage in man.
Ed. Evans , H. J. y Lloyd , D. C. , Edinburgh University
Press , Edinburgh. pp. 208 - 215 .
- Wolff , S. , Bodycote , J. y Painter , R. B. (1974) . Sister
chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by
UV irradiation at different stages of cell cycle : the
necessity of cell to pass through S. Mutat. Res. 25 ,
73 - 81 .
- Yoder , J. , Watson , H. y Benson , W. W. (1973) . Lymphocyte
chromosome analysis of agricultural workers during
extensive occupational exposure to pesticides . Mutat.
Res. 21 , 335 - 340 .
- Zakharov , A. F. y Egolina , N. A. (1972) . Differential
spiralization along mammalian mitotic chromosomes : I
BUdR - revealed differentiates in Chinese hamster
chromosomes . Chromosoma 38 , 341 - 355 .

TABLA I

FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR FOLIMAT EN
 LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

CONCENTRACION (ppm)	I C H		VALOR DE " t "
	\bar{X}	E.E.	
0	5.84	± 0.28	
5	6.58	± 0.37	1.13 N.S.
10	7.54	± 0.33	2.78 N.S.
20	12.08	± 0.33	10.22 *
30	18.28	± 0.48	16.36 *
40	12.00	± 0.40	9.05 *
60	9.90	± 0.39	5.99 *
80	11.94	± 0.47	8.11 *
100	11.48	± 0.56	6.67 *
120	Muerte celular		

N.S. No significativo

* p < 0.001

n = 50 metafases en dos tratamientos , utilizando el mismo donador en ambos .

TABLA II

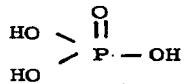
FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR METIL PARATION
EN LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

CONCENTRACION (ppm)	\bar{X}	I C H E. E.		VALOR DE " t "
0.0	6.04	±	0.39	
0.5	6.37	±	0.29	0.48 N.S.
1.0	8.16	±	0.36	2.80 N.S.
2.0	8.68	±	0.40	3.31 N.S.
3.0	8.08	±	0.40	2.55 N.S.
4.0	10.30	±	0.48	4.89 *
6.0	9.40	±	0.29	4.87 *
9.0	9.08	±	0.47	3.53 *
10.0	9.42	±	0.38	4.37 *
N.S. No significativo	13.0	Muerte celular		

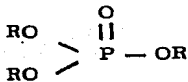
*

p < 0.001

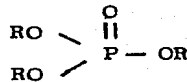
n = 50 metafases en dos tratamientos , utilizándose el mismo donador en ambos .



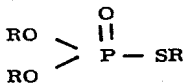
Acido Fosfórico



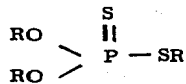
Fosfato



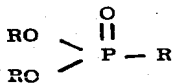
Tionofosfato



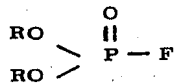
Tiolfosfato



Tionotiolfosfato



Fosfonato



Fluorofosfoídato

Fig. 1 . Acido fosfórico y ésteres de este ácido , los cuales son derivados del mismo

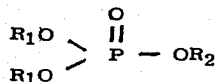
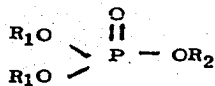
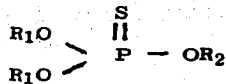


Fig. 2. El fosfato utilizado como insecticida presenta dos radicales iguales (R₁) y solo el tercero es diferente (R₂)



" OXO "



" TIONO "

Fig. 3 . La forma " oxo " corresponde al enlace P = O y la forma " tiono " al enlace P = S

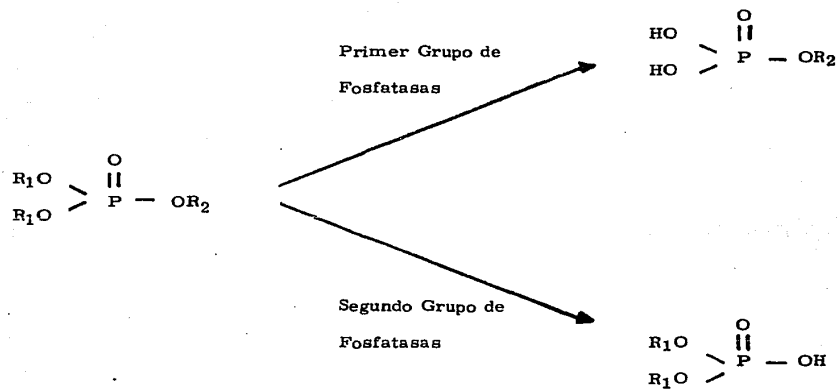


Fig. 4 . Hidrólisis del éster fosfórico por medio de enzimas fosfatasa que pueden dividirse en dos grupos , el primero que se encarga de la desmetilación del éster metil o etil , mientras que el segundo lleva a cabo la hidrólisis del tercer componente que es diferente

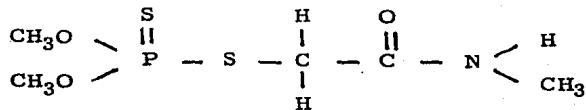


Fig. 5 . F6rmula desarrollada del Folimat o Dimetoato (6ster del 6cido 0,0 - dimetil S - 2- (metilamino) - 2 oxoetil o 6ster del 6cido 0,0 - dimetil fosforeditioico)

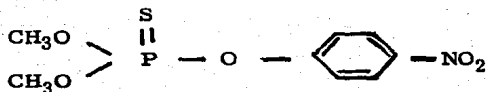


Fig. 6 . F6rmula desarrollada del Metil Parati6n o Folidol (6ster del 6cido 0,0 - dimetil - 0 (4 - nitrofenil) fosforotioico o 6ster del 6cido 0,0 - dimetil 0 - p - nitrofenil fosforotioato)

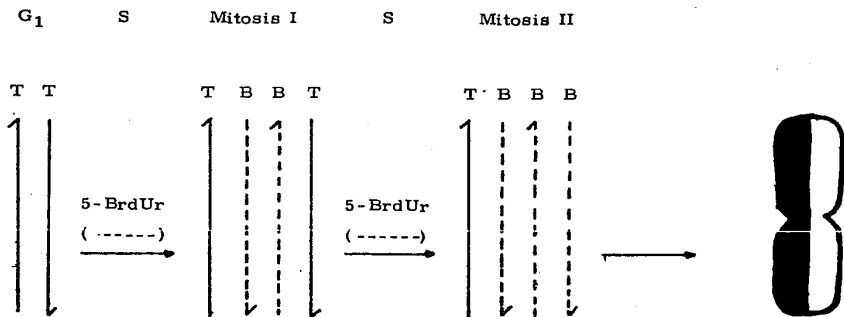


Fig. 7 . Tinción diferencial de cromátidas hermanas por medio de la incorporación de 5-Bromodesoxiuridina durante dos ciclos de replicación

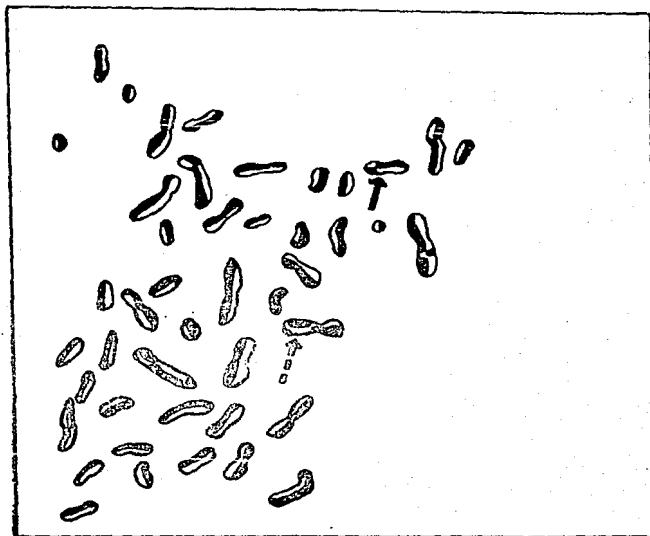


Fig. 8 . Metafase con intercambios de cromátidas hermanas

—————> Intercambios terminales

■—■> Intercambios intersticiales

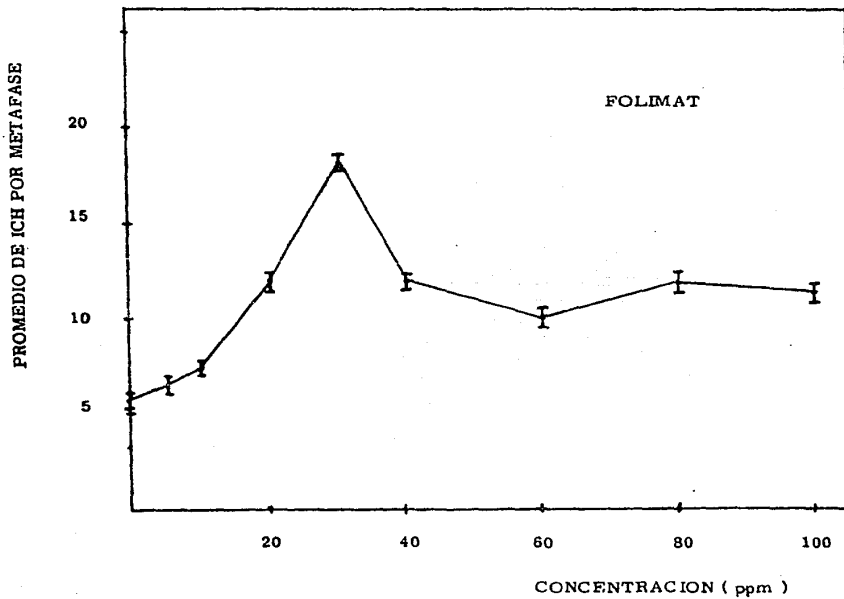


Fig. 9 . Intercambios de cromátidas hermanas inducidos por Folimat en linfocitos humanos in vitro

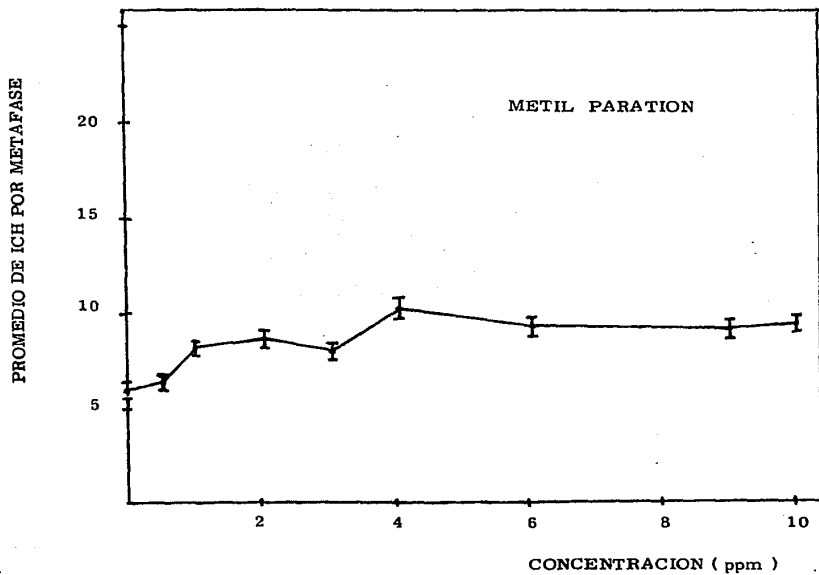


Fig. 10 . Intercambios de cromátidas hermanas inducidos por Metil Paratión en linfocitos humanos in vitro

Replicación del DNA

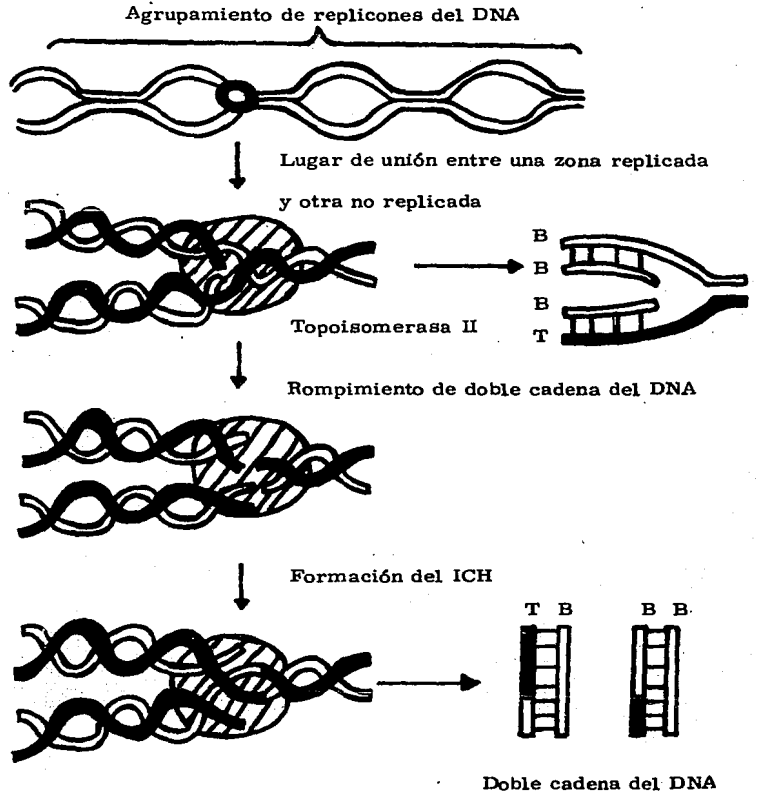


Fig. 11 . Modelo de Painter (1980) para la inducción de intercambios de cromátidas hermanas

ANEXO 1

PRUEBA ESTADISTICA EMPLEADA PARA INTERPRETAR LOS DATOS

PRUEBA DE " t " DE STUDENT

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(S_1)^2}{n_1} + \frac{(S_2)^2}{n_2}}}$$

DONDE :

\bar{X}_1 = media poblacional entre los tratamientos

\bar{X}_2 = media poblacional entre los testigos

(S_1) = varianza entre los tratamientos

(S_2) = varianza entre los testigos

n_1 = total de metafases analizadas en los tratamientos

n_2 = total de metafases analizadas en los testigos