

158  
205.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INTERCAMBIO DE CROMATIDAS  
HERMANAS INDUCIDOS POR  
HERBICIDAS EN CULTIVOS DE  
LINFOCITOS HUMANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
ARMANDO RAMIREZ DOMINGUEZ



## **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.

## CONTENIDO

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODO	13
RESULTADOS	16
DISCUSION Y CONCLUSIONES	17
REFERENCIAS	23
TABLAS Y FIGURAS	32

## RESUMEN

Se verificó el efecto citogenético de los herbicidas uréicos Linurón y Diurón con la inducción de intercambios de cromátidas hermanas (ICH).

Los resultados mostraron que ninguno de estos compuestos elevó significativamente la frecuencia de ICH con relación al testigo. El Linurón presenta la mayor toxicidad ya que 50 ppm produjeron la muerte celular mientras que con 300 ppm de Diurón todavía no se indujo.

Los registros de células en primera, segunda y tercera divisiones no mostraron alteraciones en la duración del ciclo celular por estos herbicidas.

## INTRODUCCION

México es un país con alto crecimiento demográfico. En el período comprendido del año de 1900 al 1950 la población casi se duplicó, repitiéndose el fenómeno en solo 20 años, de 1950 a 1970; sin embargo, de acuerdo con los datos del X Censo General de Poblaciones, este fenómeno se repetirá en 30 años, de 1970 al año 2000 (CONAPO, 1985). Este crecimiento explosivo, exige mayor demanda de granos alimenticios para satisfacer las necesidades de la población. Por ello, el Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT) ha implementado nuevas estrategias agrícolas, como la llamada "cero labranza", la cual consiste en la siembra de maíz sin labores previas en la preparación del suelo, el cual permanece sin ser removido, se siembra sobre la maleza y sobre los restos del cultivo del ciclo anterior. Este sistema requiere de algo más, herbicidas y otros agentes agroquímicos. El uso de estas sustancias ha permitido reemplazar en su totalidad la preparación mecánica del suelo, transformándose en una verdadera habilitación química de la cada vez más agotada y estéril superficie cultivable del territorio nacional (Coll-Hurtado, 1985).

La industria química, destinada a incrementar la productividad del agro mexicano, ha mostrado en su desarrollo variaciones importantes, fundamentalmente se divide en dos grandes grupos: fertilizantes y plaguicidas. Los primeros, contienen fósforo, nitrógeno y potasio principalmente, su función es la de constituirse en nutrientes para los vegetales. Los segundos, son aquellas mezclas de productos químicos que se destinan a destruir, contro-

lar, prevenir o repeler la acción de cualquier forma de vida animal o vegetal perjudicial para el hombre, tales como los insecticidas, herbicidas, fungicidas, desecantes y desfoliadores (Cremlyn, 1979; McEwen y Stephenson, 1979; ANIQ, 1985).

En México, existen 23 empresas que fabrican 38 tipos diferentes de sustancias activas que son: insecticidas, halogenados y fosforados; herbicidas ácidos, ésteres, aminas, triazínicos y ureas sustituidas; fungicidas orgánicos e inorgánicos, así como antibióticos; nematicidas y desfoliadores. Durante los años de 1964 a 1984 la producción nacional fue de 211,991 toneladas de sustancia activa, las cuales fueron utilizadas para elaborar los plaguicidas ya terminados (ANIQ, 1973, 1974, 1975, 1985). Tan solo en 1985, la empresa paraestatal Fertilizantes Mexicanos (FERTIMEX), fabrica 5,161 toneladas de Toxafeno, Paratión, DDT y BCH, de los cuales 2,925 toneladas son de Paratión y 427 de DDT, prohibidos ambos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) según resolución 37137, aprobada por todos los países miembros en diciembre de 1982 (aparecido en el periódico La Jornada No. 537, 1986). En 1986, la misma empresa paraestatal, registró ventas por 4'259,000 toneladas de fertilizantes y plaguicidas, lo que representa un total de casi 160,000 millones de pesos (aparecido en el periódico el Diario de Co lima No. 10685, 1987). Aunado a esto, el mercado nacional esta inundado por acaricidas, avicidas, bactericidas, rodenticidas, etc., prohibidos o por lo menos, restringido su uso en los países de origen, principalmente los Estados Unidos de Norteamérica. Así por ejemplo, la Asociación Internacional de Asociaciones de Consumidores (IOCU), estima que solamente de este país

se exportan anualmente productos vedados con un valor de 200 millones de dólares (La Jornada No. 537, 1986).

Los fracasos en la racionalización tecnológica de los plaguicidas (Achard et al., 1990) han creado un peligro potencial para el hombre en la biósfera (Fishbein, 1973), debido a las grandes cantidades que se ingieren mediante los alimentos (Duggan y Weatherwax, 1967), o bien, durante la fabricación y/o aplicación de estos compuestos químicos (Bower y Fiona, 1980; Brogan et al., 1980; Dickson, 1979) y sus efectos se presentan a nivel citológico (Grant, 1973; Styles, 1973; Jagoda, 1980; Badr y Elkington, 1982; Gómez-Arroyo, et al., 1985), en la actividad mutagénica (Styles, 1973; Marshall et al., 1976; Seiler, 1973; Morgun, 1982a, 1982b; Comai et al., 1983; Moriya et al., 1983; Vaishampayan, 1984), en la acción carcinogénica (Moriya et al., 1983; Hoar et al., 1985), en la inducción de aberraciones cromosómicas (Badr y Elkington, 1982; Grant, 1973; Styles, 1973; Jagoda, 1980; Morgun, 1982b; Georgian et al., 1983), en el incremento de frecuencias de intercambio de cromátidas hermanas (Turkula y Jalal, 1985) y en sus efectos teratogénicos (Brogan et al., 1980; Bower y Fiona, 1980). Además, especialistas agroquímicos, sostienen que a nivel mundial cada año se registran 500 mil envenenamientos por plaguicidas y 10 mil personas mueren por la misma causa (La Jornada No. 537, 1986).

En México, se desconoce cuales son las consecuencias del uso de estos productos químicos a corto y largo plazo. No se han considerado los

graves problemas de contaminación de los mantos freáticos que puedan producir no solo los insecticidas y fertilizantes, sino además, los herbicidas. Por lo que se hace necesario realizar una evaluación acerca del impacto climático, genético y económico que tienen estos compuestos en la población mexicana.

Dentro de los plaguicidas, se incluyen los herbicidas, compuestos químicos que se aplican contra las malas hierbas, ya sea de un modo general o selectivo (dejando desprotegido el cultivo y destruyendo todas o buena parte de las hierbas adventicias) (Barberá, 1976). A los herbicidas, se les ha relacionado con el cáncer del colon (Hoar et al., 1985), se les señala como responsables de la producción de malformaciones, principalmente del corazón (Dickson, 1979) y del labio y/o paladar (Bower y Fiona, 1980; Brogan et al., 1980); causantes de tumores (Axelson et al., 1980) y de sarcomas del tejido blando en el hombre (Hardell y Mikael, 1981); inhibidores de la síntesis de almidón en los vegetales (Pool, 1977), del huso mitótico y de la citocinesis de las células meristemáticas de la raíz de Allium cepa (Jagoda, 1980); reductores de la actividad mitótica y de efectos citológicos radiomiméticos como por ejemplo, puentes anafásicos (Jagoda, 1980); causantes de mutaciones en Salmonella typhimurium (Andersen et al., 1972; Styles, 1973; Comai et al., 1983; Moriya et al., 1983), en el alga verde azul Nostoc muscorum (Vaishampayan, 1984) y en plantas de Mafz (Morgun, 1982a); inductores de aberraciones cromosómicas estructurales en Drosophila melanogaster (Woodruff et al., 1983), Allium cepa (Jagoda, 1980), numéricas



en Allium cepa (Jagoda, 1980) y de viscosidad cromosómica (Grant, 1973); provocadores de conversión de los genes mitóticos del locus *ade2* y *trp5* de Saccharomyces cerevisiae (Siebert y Lemperle, 1974); elevadores de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (Linnainmaa y Vainio, 1983; Turkula y Jalal, 1985); y que dañan la síntesis del ADN en la línea de células VA-4 de fibroblastos humanos (Ahmed et al., 1977).

Los herbicidas, se clasifican de acuerdo con su composición química (Asthon y Alden, 1973; Thomson, 1975), destacándose el grupo de las ureas. El primer herbicida uréico introducido al mercado, fue el Dicloralurea o DCU en 1951; recomendado como un compuesto tóxico para las malezas, pre emergente y selectivo para ciertas plantas (Asthon y Alden, 1973; Metcalf, 1971).

Los herbicidas uréicos, son considerados como derivados de la urea  $H_2NC(=O)NH_2$  (Barberá, 1976; Metcalf, 1971). Todos son cristalinos con baja solubilidad en agua. Su solubilidad en agua y lipoides, depende de la sus titución de los hidrógenos en los grupos nitrógenados. Las fenilureas son los herbicidas más importantes y el monurón fue descrito por primera vez en 1951 por Bucha y Todd (Metcalf, 1971).

La actividad herbicida parece ser una propiedad general de la estructura fenil-N, N-dimetilurea y la toxicidad por contacto decrece con el cre cimiento del tamaño del sustituyente N-alquil del metil, etil, o por remo ción de los grupos alquil. Los núcleos fenil pueden estar sus tituidos con clo

ro o grupos nitro y la actividad aumenta con una sustitución orto o para (Metcalf, 1971).

La destoxicación de los plaguicidas involucra uno o más de los siguientes procesos: metabolismo inicial a una molécula menos tóxica o a una molécula más polar, conjugación del metabolito inicial con una molécula en dógena para producir solubilidad en el agua o inactivación biológica y excre ción del plaguicida original o sus metabolitos (conjugados o no conjugados) fuera del organismo. El metabolito inicial de un plaguicida es la fase más importante. Las reacciones desintoxicantes típicas son: las oxidaciones, hi drólisis, descloraciones y reducciones. Cada una de estas es catalizada por una enzima específica o por un grupo de enzimas (Khan et al., 1976).

La desmetilación parece ser el mecanismo primario para la desintoxicación de algunos herbicidas uréicos (Tweedy et al., 1970), por tanto, la remoción de un grupo metilo reduce su fitotoxicidad y a la salida de un se gundo grupo metilo, el compuesto se transforma esencialmente en una molécula no fitotóxica. Por otro lado, la desmetoxilación de los herbicidas uréicos que presentan un grupo metoxi, no ha sido extensamente estudiada como la desmetilación; sin embargo, se sugiere que puede ser una reacción de dos fa ses, que incluye una hidroxilación con la remoción de un grupo metilo y una subsecuente deshidroxilación, no obstante, hidroxilamina intermedia no ha sido detectada (Tweedy et al., 1970; Asthon y Alden, 1973).

Siguiendo la desalquilación y/o la desalcoxilación de los herbicidas

uréicos, los derivados resultantes de las ureas sustituidas ( $R-NH-CO-NH_2$ ) son sujetos a fuertes procesos de degradación por las plantas superiores. Estos derivados, experimentan hidrólisis la cual involucra desaminación y descarboxilación, produciendo la anilina correspondiente ( $R-NH_2$ ) (Asthon y Alden, 1973; Barberá, 1976); sin embargo, los derivados de la anilina no siempre se encuentran y cuando están presentes, las concentraciones son relativamente bajas (Tweedy et al., 1970; Asthon y Alden, 1973).

La conjugación de los herbicidas uréicos con los constituyentes de celulosa normales ha sido sugerida inicialmente por Fang et al. (1955), en sus estudios sobre el metabolismo del monurón. Ellos describen que este compuesto parece conjugarse con una proteína o péptido de bajo peso molecular. No obstante, alguno de estos conjugados puede incluir productos degradados de los herbicidas más que de la molécula intacta. El camino metabólico, propuesto para la degradación de los herbicidas uréicos por las plantas superiores se muestra en la figura 1.

Las ureas sustituidas son fácilmente absorbidas por las raíces de las plantas y translocadas a las hojas en donde se acumulan dañando el parénquima. Sin embargo, no penetran rápidamente a través de las hojas, en donde inhiben la fotosíntesis (Metcalf, 1971).

La fotosíntesis de las plantas comprende dos reacciones luminosas, el fotosistema I y el II. Algunas de las investigaciones indican que el sitio más sensible a la acción de los herbicidas uréicos sobre la fotosíntesis es el

sistema luminoso II, que incluye el intercambio de oxígeno. Pero varios estudios muestran que el fotosistema I es también inhibido por el monurón, requiriéndose concentraciones mucho mayores para la inhibición del fotosistema II. El sitio primario de acción de los herbicidas uréicos parece estar localizado en el fotosistema II, en o junto a la fase que involucra al oxígeno (Ashai y Jagendorf, 1963; Asthon y Alden, 1973).

Dentro de los herbicidas uréicos se encuentran los herbicidas 3-(3,4-Diclorofenil)-1-metoxi-1-metilurea o Linurón y el 3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetilurea o Diurón.

El Linurón, conocido en el mercado como Lorox, Afalon, Prefalon o Sarclex, tiene una fórmula estructural como la que se muestra en la figura 2, es una urea sustituida, utilizada como herbicida selectivo, se aplica en condiciones pre y postemergencia en cultivos de papa, cereales, sorgo, algodón, apio, etc., además, de que con altas concentraciones es utilizado como esterilizador de suelos. Fue introducido al mercado en 1960 por la E.I. DuPont de Nemours & Company, and Farbwerke Hoechst A.G. Presenta una  $LD_{50}$  de 1500 mg/Kg e irrita los ojos, nariz y piel en ratones; la formulación comercial es de WP50% de grupo activo y algunas de sus propiedades fisicoquímicas son: sustancia cristalina blanca con  $pf=93-94^{\circ}C$ , solubilidad en agua de 75 ppm, además que es soluble en acetonas, dioxanos, etanol, xileno, etc., y presión de evaporación de  $1.5 \times 10^{-5} / 24^{\circ}C$  (Thomson, 1975; Barberá, 1976).

La absorción y traslocación del Linurón en los vegetales, parece variar considerablemente en las especies, aún cuando el patrón de distribución sugiere un movimiento primariamente apoplástico (Aston y Alden, 1973).

El Linurón ha sido descrito como un compuesto que produce daño citológico a nivel de la formación de la pared celular (Grant, 1973) en plantas de maíz, ha mostrado ser inductor de mutaciones clorofílicas (Morgan, 1982a), tiene gran actividad sobre la inhibición de la síntesis del ADN testicular describiéndose como un compuesto de gran actividad mutagénica (Seiler, 1978), provoca agrupamiento de los cromosomas (Grant, 1973). Sin embargo, en sistemas de prueba microbianos, utilizando Salmonella typhimurium, el Linurón no produce mutaciones puntuales (Andersen et al., 1972; Marshall et al., 1976; Moriya et al., 1983) y tampoco induce micronúcleos (Seiler, 1978).

El Diurón es conocido en el mercado como Karmex, Marmer, DCMU, Di-On, Karmex-DL y Sup' rfilo, su fórmula se muestra en la figura 3. El Diurón, es un compuesto de ureas sustituidas, utilizado como herbicida que se aplica en condiciones pre y postemergencia, en cultivos de algodón, manzana, papaya, pera, alfalfa, plátano, piña, etc. Fue introducido al mercado en 1955 por E. I. DuPont de Nemours Chemical Company. La LD<sub>50</sub> es de 3400 mg/Kg en ratones y puede causar irritación de los ojos y de la piel en estos animales; la formulación comercial es de WP80% y 28% líquido. Sus propiedades fisicoquímicas son: punto de fusión 158-159°C, solubilidad en

agua 42 ppm a 25°C, en acetona 5%, presión de evaporación  $3.1 \times 10^{-6}$  / 50°C, (Thomson, 1975; Barberá, 1976).

La absorción y traslocación del Diurón en hojas y raíces de algunas especies vegetales sigue un patrón de movimientos primariamente apoplástica (Aston y Alden, 1973).

El Diurón administrado a ratones deficientes en protefnas, produce problemas respiratorios, depresión del sistema nervioso central, daño metabólico y renal, irritaciones gastrointestinales, inflamación de órganos, y congestión del cuerpo, "stress", cambios degenerativos en riñones, hígado y páncreas (Boyd y Krupa, 1970; Boyd, 1972), además, se ha descrito que inhibe la síntesis de almidón en las hojas de los vegetales (Pool, 1977). El Diurón no provoca conversión génica mitótica en Saccharomyces cerevisiae (Siebert y Lemperle, 1974); sin embargo, se ha reportado una mutación del gene psbA de Anacystis nidulans resistente al Diurón (Golden y Haselkorn, 1985). En pruebas de inhibición de la síntesis de ADN testicular, el Diurón produce efectos mutagénicos; además causa mutaciones puntuales en microorganismos, no induce micronúcleos en ratones (Seiler, 1978). Moriya et al., (1983) describen que en sistemas microbianos, como Salmonella typhimurium, el Diurón no presenta actividad mutagénica ni carcinogénica.

En vista de que no es posible realizar la experimentación directa sobre el hombre, por razones de ética, se han implementado una serie de sistemas de prueba, para evaluar el daño genético provocado por diversos agen

tes químicos. Uno de ellos es el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en células eucariontes, ya que proporciona una excelente herramienta para la detección del daño citogenético provocado por compuestos mutagénicos y/o carcinogénicos (Perry y Evans, 1975). La sensibilidad de esta prueba es tal, que las dosis que se necesitan para producir incremento en la frecuencia de ICH, generalmente son bajas con respecto a las requeridas para incrementar la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Kato y Shimada, 1975; Solomon y Bobrow, 1975).

Dada la gran importancia que tienen en la agricultura los herbicidas uréicos y debido a los escasos estudios que se han realizado sobre su acción mutagénica, en este trabajo se pretende evaluar el efecto citogenético del Linurón y del Diurón, mediante el análisis de intercambios de cromátidas hermanas en cultivo de linfocitos humanos.

## MATERIAL Y METODO

Se hicieron cultivos de sangre periférica de un donador sano que no fume ni beba, y que no ha estado sujeto a tratamientos quimioterapéuticos en los dos últimos meses. Se utilizó el mismo donador para cada uno de los experimentos y su repetición. Las concentraciones del Linurón y Diurón usadas en los tratamientos, se determinaron considerando la toxicidad y solubilidad. Se realizó un experimento preliminar con el Diurón, probando las siguientes concentraciones: 1, 5, y 10 ppm (Tabla I) y con base en los resultados obtenidos, se decidió incrementar las concentraciones a 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 y 300 ppm (Tabla II) con respecto a los resultados obtenidos con el Diurón, se eligieron las concentraciones de: 10, 50, 100, y 300 ppm para el Linurón (Tabla III).

Las soluciones para cada herbicida se hicieron en medio McCoy's 5A (Microlab) y fitohemaglutinina (Microlab), se pusieron en agitación constante durante 35 minutos, y posteriormente se esterilizaron con membranas "Millipore" de 0.45  $\mu$ m de diámetro.

### Método de cultivo y cosecha

Con una jeringa heparinizada, se extrajeron 7 ml de sangre periférica por punción venosa; se aplicaron ocho gotas en un frasco de cultivo que contenía 3 ml de medio McCoy's 5A (Microlab) y 0.18 ml de fitohemaglutinina (Microlab), así como el herbicida en cuestión; se pusieron los cultivos en



incubación a 37°C durante 24 h, se agregaron 100 ul de 5-BrdUrd esterilizada por filtración con membrana "Millipore" de 0.45  $\mu\text{m}$ ., a las 70 horas de iniciado el cultivo se agregaron 100 ul de colchicina.

Se permitió que los cultivos terminaran el período de incubación por espacio de dos horas más, bajo las mismas condiciones de temperatura.

Al término del período de incubación, se procedió a centrifugar los cultivos a 1000 rpm durante 5 minutos; se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 4 ml de KCl 0.075 M calentado a 37°C, se dejaron reposar durante 20 minutos en el interior de una estufa a 37°C; inmediatamente después se centrifugaron nuevamente a 1000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió rápidamente con el primer fijador de metanol-acético (3:1), se dejaron reposar 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron 5 minutos más, a 1000 rpm, separando el sobrenadante y lavando el botón con el segundo fijador; se dieron 10 minutos de reposo a temperatura ambiente. Nuevamente se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió con 0.5 ml de fijador. Se hicieron las preparaciones por goteo, realizándose 4 laminillas por frasco de cultivo, se dejaron secar al aire y a temperatura ambiente.

#### Tinción diferencial

Las preparaciones se pusieron en Hoechst 33258 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante

20 minutos en la obscuridad, posteriormente se lavaron con agua corriente, se dejaron secar al aire y se colocaron en KCl 0.075 M para someterlas a irradiaciones de luz ultravioleta y luz negra, durante 60 minutos. Al cabo de ese tiempo, se lavaron nuevamente con agua corriente, se dejaron secar a temperatura ambiente e inmediatamente se colocaron en una caja de Koplín con 2xSSC (citrato salino de sodio) a 40 °C durante una hora, se enjuagaron con agua corriente y se tñeron con Giemsa y agua destilada (1:10) durante 10 minutos.

Por cada concentración probada, se realizó una repetición. Ambos experimentos, tanto preliminares como repeticiones, fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de "t" de Student (Anexo I), con la cual se determinó que no existieron diferencias significativas entre el experimento y su repetición, por lo que se procedió a promediarlos.

Se cuantificaron los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) de 50 metafases completas de segunda división, contabilizándose los intercambios intersticiales como dos eventos y los terminales como uno.

Con la finalidad de evitar prejuicios en el registro de los ICH, se reetiquetaron todas las preparaciones de tal manera que el observador no tuvo conocimiento de cual concentración estaba analizando.

La capacidad de doblar, al menos, la frecuencia basal de ICH o bien, de describir una curva dosis-respuesta presentando un incremento progresivo sobre su frecuencia basal, fueron los criterios utilizados para designar al

herbicida como mutágeno (Latt et al., 1981).

## RESULTADOS

La tabla I muestra la frecuencia de ICH, obtenidos en un experimento preliminar, ensayando concentraciones que van de 1 a 10 ppm de Diurón, observándose que no existen diferencias significativas con respecto al testigo. Incrementando las concentraciones a valores muy superiores al punto de solubilidad en agua del herbicida (50 ppm) la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas obtenidas no difieren significativamente de la frecuencia del testigo (Tabla II).

Con el Linurón se probaron concentraciones que van de 10 a 300 ppm, cantidad que cuadruplica el punto de solubilidad del herbicida (Tabla III). Con 10 ppm, el valor de ICH no difiere significativamente de la frecuencia basal y de 50 a 300 ppm, el Linurón causa la muerte celular.

Las proporciones de metafases en primera, segunda y tercera divisiones muestran que tanto el Diurón como el Linurón no tienen efectos sobre la duración del ciclo celular; sin embargo, el Linurón, inhibe el ciclo, causando la muerte de las células a partir de 50 ppm (Tabla IV).

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Al probarse varias concentraciones de Diurón (desde 20 hasta 300 ppm), las frecuencias de intercambios de cromátidas hermanas no difieren estadísticamente de aquellas que muestran los grupos testigos (Tabla II), lo cual implica que independientemente de la cantidad de herbicida aplicada, la respuesta es la misma por lo que su capacidad de daño citogenético es nula. Estos resultados concuerdan con los datos reportados por Siebert y Lemperle (1974), quienes prueban que concentraciones de 1000 ppm de este compuesto, no producen la conversión génica mitótica en dos loci *ade2* y *trp5* en Saccharomyces cerevisiae, con los de Andersen et al. (1972) que no encuentran efectos en la inducción de mutantes *rII* del bacteriofago  $T_4$  en Salmonella typhimurium y con los de Moriya et al. (1983) que tampoco describen resultados mutagénicos positivos en Salmonella typhimurium y Escherichia coli. Sin embargo, Seiler (1978) muestra una ligera inhibición en la incorporación de timidina marcada en el ADN testicular de ratones, bajo la influencia de esta sustancia y en Salmonella typhimurium en presencia de microsomas nota efectos mutagénicos.

En cuanto a los resultados obtenidos con el Linurón, probando cantidades de 10 hasta 300 ppm (Tabla III), se observa que en concentraciones bajas, este compuesto no eleva la frecuencia de ICH, y por tanto, no difiere de la frecuencia basal, hecho que concuerda con los resultados obtenidos en Salmonella typhimurium por Andersen et al. (1972), Marshall et al. (1976),

Seiler (1978), Moriya et al. (1983), y con los datos negativos en la inducción de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratones (Seiler, 1978), contrastando con los resultados de Wu y Grant (1966) quienes describen propiedades mutagénicas en Hordeum vulgare, utilizando concentraciones de 1000 ppm y por Seiler (1978) quien demuestra una ligera inhibición en la incorporación de timidina marcada en el ADN testicular de ratones.

Algunos otros herbicidas uréicos, como por ejemplo el isoproturón, producen aberraciones cromosómicas y alteraciones en el índice mitótico en las células de Allium cepa y Hordeum vulgare con dosis que van de 1000 a 1500 ppm (Badr y Elkington, 1982).

Por otro lado, el hecho de que el Diurón tenga en su fórmula dos radicales metilo le confieren características similares al de los agentes alquilantes, de hecho cuando este se desmetila, pierde su capacidad herbicida (Asthon y Alden, 1973), en tanto que el Linurón posee un metilo y un grupo metoxi, que lo hacen químicamente diferente, ya que además de tener una posible acción alquilante, es muy soluble en lípidos (Metcalf, 1971) y por esta razón probablemente su toxicidad es elevada, ya que tal vez tuvo más capacidad de penetrar a través de la membrana celular de los linfocitos y causar mayor efecto, al alquilar proteínas del citoplasma, provocando la muerte celular antes que el daño genético se exprese como ICH.

En el caso del Diurón, la toxicidad no fue tan alta; sin embargo, se debe considerar que a partir de 75 ppm se rebasa el límite de solubilidad,

pero en vista de que las frecuencias de ICH en esta concentración no difieren significativamente del testigo, se decidió aumentar la cantidad de herbicida, bajo el criterio de que durante la agitación de la mezcla medio McCoy's- herbicida, la suspensión se aclaraba, hecho que hace pensar, que quizá los ingredientes del medio permiten que concentraciones mayores se disuelvan. A pesar de ello, tampoco con cantidades elevadas se encuentra efecto significativo, probablemente debido a que por la baja solubilidad que tiene no penetra a la célula y es por ello que no expresa ni su toxicidad ni su acción citogenética.

Para una mejor discusión sobre el efecto que tienen estos dos compuestos sobre el ADN, es necesario analizar con mayor detalle el fenómeno de intercambio de cromátidas hermanas. Los ICH representan intercambios entre los productos de la replicación del ADN sin que se altere ni la polaridad ni la estructura de la doble hélice del ADN; estos cambios, presumiblemente involucran un rompimiento y reunión de las hebras del ADN; sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de los mecanismos moleculares de la formación de ICH (Latt et al., 1980).

En los últimos años se han realizado grandes esfuerzos en la investigación de los mecanismos moleculares implicados en el fenómeno de intercambio de cromátidas hermanas. Como resultado de ello, se han descrito algunos modelos. Kato (1974) se basa en la concepción de sistemas de reparación post-replicación. Anteriormente, Taylor et al. (1957) proponen modelos que han

sido desechados con el avance de las nuevas técnicas de tinción. El hecho de que el intercambio de cromátidas hermanas sea un evento S-dependiente (Wolff et al., 1974) y que los sistemas de reparación por escisión ocurren en todo lo largo del ciclo celular, hacen pensar que en el ICH no está involucrado ningún mecanismo de reparación; además, De Weer-Kastelein et al. (1977) al comparar la frecuencia de ICH en células normales y en células deficientes en los mecanismos de reparación por escisión (de pacientes con xeroderma pigmentosa), no se encuentra correlación alguna entre la capacidad de realizar reparación por escisión y la producción de ICH, por lo que se demuestra plenamente que el ICH no es una manifestación citogenética de un mecanismo de reparación y con esto se desecha el modelo de Kato (1974).

Painter (1980) retoma las aportaciones de Cook y Brazell (1975) de que el cromosoma, en última instancia, está formado de subunidades estructurales superenrolladas en un orden de  $10^9$  daltons y sugiere, que esas subunidades conforman conglomerados de replicones responsables de controlar la replicación del ADN y al iniciarse la replicación en un replicón, otros lo hacen al mismo tiempo. Además propone que el ICH solo ocurre en las regiones del cromosoma donde estas subunidades se unen.

Basado en estudios anteriores, se muestra que algunos agentes pueden inhibir la síntesis del ADN, principalmente bloqueando la elongación de la cadena de ADN y sus efectos se reflejan en los conglomerados de replicones, los cuales se encuentran en diferentes fases de terminación de la repli-

cación. Esto se traduce en retardos mayores en aquellos que están replicando incompletamente, de este modo se alarga el tiempo en los conglomerados replicados (Figura 4). Por lo tanto, cuando ocurre esa unión, la molécula de ADN permanece un tiempo anormalmente largo con un segmento replicado próximo a un segmento no replicado (como normalmente ocurre en la unión de la eucromatina y heterocromatina durante la fase de S del ciclo celular). Painter (1980) propone que la doble hebra del ADN se rompe en estos sitios de unión en una forma espontánea, quizá por la acción catalítica de la topoisomerasa II, eliminándose la tensión que produce el superenrollamiento sobre el ADN en replicación. En ocasiones en lugar de un enrollamiento normal, la ruptura es sellada por la unión de una hebra hija de la molécula replicada con una hebra paterna no replicada, completándose de esta forma un ICH (Figura 4).

Este modelo predice que los agentes que dañan al ADN retardando o bloqueando la elongación de la cadena serán buenos inductores de ICH por ejemplo, los agentes alquilantes. En contraste, los agentes que inhiben la síntesis de ADN bloqueando previamente el inicio de la replicación en los conglomerados, son malos inductores de ICH por ejemplo las radiaciones ionizantes. Además, este modelo es consistente con el hecho de que la producción de ICH es una función lineal con la dosis (Perry y Evans, 1975; Carrano *et al.*, 1973), lo cual significa que en un solo evento se rompe la doble hebra de ADN (Painter, 1982).

Si los plaguicidas utilizados en este estudio, tuvieran el mismo com



portamiento que los agentes alquilantes, elevarían significativamente la frecuencia de ICH; sin embargo, los resultados obtenidos indican que debido a la poca solubilidad en lípidos y a las bajas concentraciones utilizadas no existió la interacción directa entre los herbicidas y el ADN, por lo que no hubo ruptura-reunión en las hebras y por ello no se incrementa la frecuencia de ICH.

De cualquier manera, aunque en este estudio los resultados son negativos y tomando en cuenta que las concentraciones utilizadas, fueron menores que las recomendadas comercialmente para el control efectivo de las plagas (de 0.5 a 2.0 K/h y 0.6 a 2.5 K/h de Linurón y Diurón respectivamente), debe considerarse que, teniendo estos herbicidas la capacidad de alquilar el ADN, representan un riesgo potencial para el hombre, razón por la cual debe controlarse su uso.

REFERENCIAS

- Achard, P., Chauvenet, A., Lage, E., Lentin, F., Néve, P., y Vignaux, G. 1980. Discurso biológico y orden social. Nueva Imagen, México. p.p. 257-268.
- Ahmed, E.F., Ronald, W.H., y Lewis, J.M. 1977. Pesticide induced DNA damage and its repair in cultured human cells. *Mutation Res.* 42: 161-174.
- Andersen, J.K., Leighty, G.E. y Takahashi, T.M. 1972. Evaluation of herbicides for possible mutagenic properties. *J. Agr. Food Chem.* 20: 649-656.
- A.N.I.Q. (Asociación Nacional de la Industria Química). 1973. Anuario de la industria química mexicana. México. p.p. 103-107.
- A.N.I.Q. (Asociación Nacional de la Industria Química). 1974. Memorias del VII foro nacional de la industria química. México. p.p. 83-96.
- A.N.I.Q. (Asociación Nacional de la Industria Química). 1975. Memorias del VIII foro nacional de la industria química. México. p.p. 113-116.
- A.N.I.Q. (Asociación Nacional de la Industria Química). 1985. Anuario de la industria química mexicana en 1984. México. p.p. 359-383.
- Ashai, T. y Jagendorf, A.T. 1963. A spinach enzyme functioning to reverse the inhibition of cyclic electron flow by p-chlorophenyl-1,1-dimethyl

- urea at high concentrations. Arch. Biochem. Biophys. 100: 531-541.
- Asthon, F.M. y Alden, S.C. 1973. Mode of action of herbicide. Wiley. Nueva York. p.p. 10-24, 367-393.
- Axelsson, O., Sundell, L., Andersson, K., Edling, C., Hogstedt, C. y Kling, H. 1980. Herbicide exposure and tumor mortality. Scand. J. Work Environ. Health 6: 73-79.
- Badr, A. y Elkington, T.T. 1982. Antimitotic and chromotoxic activities of isoproturon en Allium cepa and Hordeum vulgare. Environ. Exp. Bot. 22: 265-270.
- Narberá, C. 1976. Pesticidas agrícolas. Omega, Barcelona, pp. 399-412.
- Bower, C. y Fiona, J.S. 1980. Herbicides and cleft lip and palate. Lancet 2: 1247.
- Boyd, E.M., y Krupa, V. 1970. Protein deficient diet and diuron toxicity. J. Agr. Food Chem. 18: 1104-1107.
- Boyd, E.M. 1972. Protein deficiency and pesticide toxicity. Thomas, Illinois. p.p. 339-346.
- Brogan, W.F., Brogan, C.E. y Dadd, J.T. 1980. Herbicides and cleft lip and palate. Lancet 2: 597.
- Carrano, A.V., Thomson, P.A., Lindl, P.A. y Minkler, J.L. 1978. Sister

- chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271: 551-553.
- Cook, P.R. y Brazell, T.A. 1975. Supercoils in human DNA. *J. Cell. Sci.* 19: 261-279.
- Coll-Hurtado, A. 1985. ¿Es México un país agrícola?. Un análisis geográfico; Siglo XX, México. p.p. 65-63.
- Comai, L., Louvminia, C.S. y Stalker, M.D. 1983. An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. *Science* 221: 370-371.
- C.O.N.A.P.O. (Consejo Nacional de Población). 1985. México demográfico: breviario 1980-81. México. pp. 8-20.
- Cremlyn, R. 1979. Pesticides. Wiley, Nueva York. pp. 1-11, 140-172.
- De Weerd-Kastelein, E.A., Keijzer, W., Rainaldi, G. y Bootsma, D. 1977. Induction of sister chromatid exchanges in xeroderma pigmentosum cells after exposure to ultraviolet light. *Mutation Res.* 45: 253-261.
- Diario de Colima. 1987. Fertimex ha realizado ventas por 160 mil millones. Colima, Mexico. No. 10685, p. 1 y 8.
- Dickson, D. 1979. Herbicides claimed responsible for birth defects. *Nature* 282: 220.

- Duggan, R.E. y Weatherwax, J.R. 1967. Dietary intake of pesticide chemicals. Science 157: 1006-1010.
- Fang, S.C., Freed, V.H., Johnson, N.H. y Coffe, D.R. 1955. Absortion, translocation and metabolism of radioactive 3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea (CMU) by bean plants. J. Agr. Food Chem. 3: 400-402.
- Fishbein, L. 1973. Mutagens and potential mutagens in the biosphere. Mutation Res. 21: 220.
- Georgian, L., Moraru, I., Draghicescu, T., Dinu, I. y Ghizelea, G. 1983. Cytogenetic effects of alachlor and mancozeb. Mutation Res. 116: 341-348.
- Golden, S.S. y Haselkorn, R. 1985. Mutation to herbicide resistance maps within the psbA gene of Anacystis nidulans R<sub>2</sub>. Science 229: 1104-1107.
- Gómez-Arroyo, S., Baiza, A.M., Lopez, G. y Villalobos-Pietrini, R. 1985. A comparative study of the cytogenetic effects of the insecticides heptachlor, malathion, and methyl paration in Vicia faba. Contam. Ambient. 1: 7-16.
- Grant, W.F. 1973. Citological effects of environmental mutagens pesticides. Mutation Res. 21: 221-222.
- Hardell, L. y Mikael, E. 1981. Soft-tissue sarcomas, fenoxi herbicides, and clorinated phenols. Lancet 2: 250.

- Hoar, S.K., Blair, A., Holms, F.F., Boysen, C. t Robel, R. 1985. Her-  
bicides and colon cancer. Lancet 1: 1277-1278.
- Jagoda, M. 1980. Cytological disturbances in *Allium cepa* L. root-meristems  
induced by herbicides. Acta Biol. Craco. Ser. Bot. 22: 189-211.
- Kato, H. 1974. Induction of SCE by chemical mutagens and its posible rele-  
vance to DNA repair. Exp. Cell. Res. 85: 239-249.
- Kato, H. y Shimada, H. 1975. Sister chromatid exchanges induced by mito-  
mycin C: a new method of detecting DNA damage at chromosomal le  
vel. Mutation Res. 28: 459-464.
- Khan, M., Gassman, M. y Haque, R. 1976. Biodegradation of pesticides.  
Chemtech. 6: 62-69.
- La jornada. 1986. Fabrica Fertimex productos insalubres: Ivan Restrepo.  
México, No. 537 pp. 6.
- 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 genetox program. Mu  
tation Res. 87: 17-62.
- Latt, A.S., Schreck, R.R., Loveday, S.K., Dougherty, P.CH. y Shuler, F.  
CH. 1980. Sister chromatid exchanges. In: Progress in human gene-  
tics, symposium. Nueva York pp. 287-331.

- Lainpää, K. y Vainio, H. 1983. SCEs among herbicide sprayers exposed to 2,4-D y MCPA. Mutation Res. 113: 276-277.
- Marshall, C.T., Wyman, D.H. y Earle, S.H. 1976. Screening of pesticides for mutagenic potential using Salmonella typhimurium. J.Agr. Food Chem. 24: 560-563.
- McEwen, F.L. y Stephenson, G.R. 1979. The use and significance of pesticides in the environment. Wiley, Nueva York, pp.1-45, 91-54.
- Metcalfe, L.R. 1971. The chemistry and biology of pesticides. En: Pesticides in the environment. Vol. 1 part. 1. Marcel Dekker, Nueva York, pp. 49-51.
- Moriya, M., Otha, T., Watanabe, K., Miyazawa, T., Kato, K. y Shirasu, Y. 1983. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay-systems. Mutation Res. 116: 185-216.
- Morgun, V.V. 1982a. A study of mutagenic pesticides activity in higher plants. Tsitol. Genet. 16: 63-72.
- Morgun, V.V. 1982b. Cytogenetic and genetic activity of herbicides: atrazin, simazin, prometryn and linuron. Tsitol. Genet. 16: 33-41.
- Painter, B.R. 1980. A replication model for sister-chromatid exchange. Mutation Res. 70: 337-341.

- Painter, B.R. 1982. Replication model for sister-chromatid exchanges. In: Sister chromatid exchanges, Alan R. Liss, Nueva York. pp. 115-121.
- Parker, E.R. 1976. Estadística para biólogos. Omega, Barcelona pp. 20-24.
- Perry, P. y Evans, H.J. 1975. Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature 258: 121-125.
- Pool, F.A.R. 1977. A rapid bioassay for pesticide phytotoxicity. J. Agr. Food Chem. 25: 1216-1218.
- Seiler, J.P. 1978. Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens I. Mutagenicity tests with some urea herbicide. Mutation Res. 58: 353-359.
- Siebert, D. y Lemperle, E. 1974. Genetic effects of herbicides: induction of mitotic gene conversion in Saccharomyces cerevisiae. Mutation Res. 22: 111-120.
- Solomon, E. y Bobrow, M. 1975. Sister chromatid exchanges- a sensitive assay of agents damaging human chromosomes. Mutation Res. 30: 273-278.
- Styles, J.A. 1973. Citotoxic effects of varios pesticides in vivo and in vitro. Mutation Res. 21: 50-51.
- Taylor, J.H., Woods, S.P. y Hughes, W.L. 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies



using tritium-labelled thymidine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 43: 122-128.

Thomson, W. T. 1975. Agricultural chemicals boock II, herbicides. Thomson Ed. Nueva York pp. 157-190.

Turkula, T.C. y Jalal, S.M. 1985. Increased rates of sister chromatid exchanges induced by the herbicides 2, 4-D. J. Heredity 76: 213-214.

Tweedy, G.B., Carol, L. y Ross, A.J. 1970. Metabolism of 3-(p-bromophenyl)-1-metoxy-1-methylurea (metobromuron) by selected soil microorganisms. J. Agr. Food Chem. 18: 851-853.

Vaishampayan, A. 1984. Strong mutagenic action of a bipyridylum herbicide in a N<sub>2</sub>-fixing blue-green alga. *Experientia* 40: 1016-1019.

Wolf, S., Bodycote, J. y Painter, R.B. 1974. Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. *Mutation Res.* 25: 73-81.

Woodruff, C.R., Phillips, J.R. y Irwin, D. 1983. Pesticides induced complete and partial chromosome loss in screens with repair-defective females of Drosophila melanogaster. *Environ. Mutagenesis* 5: 835-846.

Wuu, K.D. y Grant, W.F. 1966. Morphological and somatic chromosomal

aberrations induces by pesticides in barley (Hordeum vulgare). Can.  
J. Genet. Cytol. 8: 481-501.

TABLA I

FRECUENCIAS DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS OBTENIDOS EN LOS TRATAMIENTOS CON DIURON EN LINFOCITOS HUMANOS in vitro.

CONCENTRACION (ppm)	ICH/METAFASE (a)		VALOR DE	
	$\bar{X}$	E.E.	"t"	
Testigo	4.56	± 0.44		
1	4.96	± 0.11	0.73	N.S.
5	5.82	± 0.61	1.19	N.S.
10	4.80	± 0.40	0.28	N.S.

(a) Promedio de 25 metafases en un solo experimento, utilizando el mismo donador.

N.S. no significativo.

TABLA II

INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS OBTENIDOS EN LOS TRATAMIENTOS CON DIURON EN LINFOCITOS HUMANOS in vitro.

CONCENTRACION (ppm)	ICH/METAFASE (a)		E. E.	VALOR DE "t"	
	$\bar{X}$	$\pm$			
Testigo	5.56	$\pm$	0.27		
20	5.96	$\pm$	0.31	0.69	N.S.
40	7.10	$\pm$	0.43	2.19	N.S.
50	7.78	$\pm$	0.43	3.15	N.S.
75	7.48	$\pm$	0.38	2.93	N.S.
100	5.64	$\pm$	0.27	0.16	N.S.
150	6.24	$\pm$	0.39	1.02	N.S.
300	6.30	$\pm$	0.20	1.52	N.S.

(a) Promedio de 50 metafases en dos experimentos, utilizando el mismo donador.

N.S. no significativo.

TABLA III

INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS OBTENIDOS EN LOS TRATAMIENTOS CON LINURON EN LINFOCITOS HUMANOS in vitro.

CONCENTRACION (ppm)	ICH/METAFASE			VALOR DE "t"	
	$\frac{(a)}{X}$	$\pm$	E. E.		
Testigo	6.76	$\pm$	0.34		
10	6.88	$\pm$	0.31	0.19	N.S.
50	Muerte		Celular	-	-
100	Muerte		Celular	-	-
300	Muerte		Celular	-	-

(a) Promedio de 50 metafases en dos experimentos, utilizando el mismo donador.

N. S. no significativo.

TABLA IV.

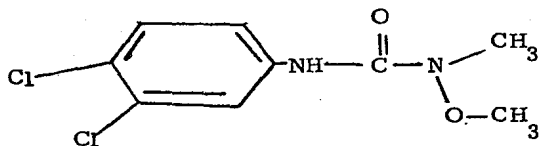
EFFECTO DE LOS HERBICIDAS DIURON Y LINURON SOBRE EL CICLO CELULAR DE LINFOCITOS HUMANOS.

CONCENTRACION (ppm)	$M_1$			$M_2$			$M_3$		
	$\bar{X}$ (a)	$\pm$	E.E.	$\bar{X}$ (a)	$\pm$	E.E.	$\bar{X}$ (a)	$\pm$	E.E.
D I U R O N									
TESTIGO	13.5	$\pm$	0.45	61.5	$\pm$	1.35	25.0	$\pm$	0.85
20	14.5	$\pm$	0.25	54.5	$\pm$	1.05	31.0	$\pm$	0.79
40	23.0	$\pm$	1.20	59.0	$\pm$	0.50	18.0	$\pm$	1.69
50	25.0	$\pm$	0.99	54.0	$\pm$	0.50	21.0	$\pm$	1.49
75	26.0	$\pm$	0.00	71.0	$\pm$	0.00	3.0	$\pm$	0.00
100	23.0	$\pm$	0.10	74.0	$\pm$	0.00	3.0	$\pm$	0.10
150	22.5	$\pm$	0.55	68.0	$\pm$	1.20	9.5	$\pm$	0.64
300	24.0	$\pm$	1.20	63.5	$\pm$	0.14	12.5	$\pm$	1.04
L I N U R O N									
TESTIGO	25.5	$\pm$	1.40	65.5	$\pm$	0.55	9.0	$\pm$	0.80
10	24.5	$\pm$	0.45	69.5	$\pm$	0.45	6.0	$\pm$	0.00
50	Muerte Celular			Muerte Celular			Muerte Celular		
100	Muerte Celular			Muerte Celular			Muerte Celular		
300	Muerte Celular			Muerte Celular			Muerte Celular		

(a) Promedio de 200 metafases en dos experimentos, utilizando el mismo donador.

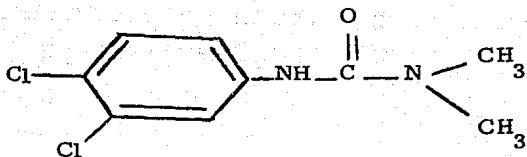
$M_1$  Metafase de primer ciclo  
 $M_2$  " " segundo ciclo  
 $M_3$  " " tercer ciclo





3-(3,4-diclorofenil)-1-metoxi-1-metilurea

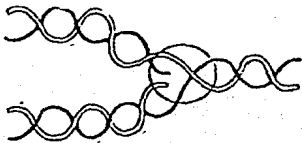
Figura 2. Fórmula estructural del Linurón.



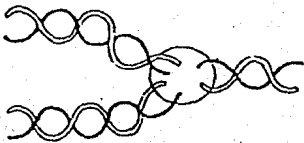
3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea

Figura 3. Fórmula estructural del Diurón.

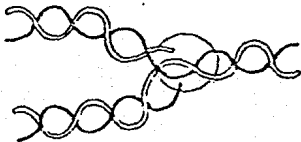




Zona de unión entre una re  
gión replicada y otra no replicada.



Ruptura de la doble hebra del  
ADN justo en el sitio de unión en  
tre las zonas replicadas y no repli  
cadas.



Unión de una hebra hija de ADN  
(recien replicada) con una hebra pro  
genitora (no replicada), completándo  
se ún ICH.

Figura 4. Modelo propuesto para explicar la formación de intercambios de cromátidas hermanas (Painter, 1980, 1982).

APENDICE I. Prueba estadística de "t" de Student.\*

$$t = \frac{\bar{X}_0 - \bar{X}_1}{\frac{E.E._0 - E.E._1}{2}} \quad \text{donde} \quad E.E. = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

$\bar{X}_0$  = media del grupo testigo.

$\bar{X}_1$  = media del grupo tratado.

$E.E._0$  = Error estándar del grupo testigo.

$E.E._1$  = Error estándar del grupo tratado.

\*

Tomado de Parker, E. R. 1976. Estadística para biólogos. Omega, Barcelona. pp, 20-24.