

03466



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDO POR PROPOXUR EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS PREVIA ACTIVACION METABOLICA POR Vicia faba

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR) PRESENTA: MARIA ELENA CALDERON SEGURA

REALIZADA BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. SANDRA GOMEZ ARROYO EN EL LABORATORIO DE CITOGENETICA Y MUTAGENESIS AMBIENTALES DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMOSFERA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Páginas

R e s u m e n	1
I. Introducción.....	3
II. Materiales y Métodos.....	28
1.0. Propiedades físicoquímicas del propoxur.....	28
1.1. Preparación de la solución de propoxur para..... tratamientos directos.....	28
1.2. Tratamiento y preparación de los extractos.... de raíces de V. faba.....	29
2.0. Cultivo y tratamiento de linfocitos.....	30
3.0. Cosecha de linfocitos.....	30
4.0. Tinción diferencial de cromátidas hermanas.....	32
5.0. Análisis estadístico.....	33
6.0. Determinación de la concentración de..... proteína total de la fracción S10 de V. faba.....	33
7.0. Evaluación de lectina de la fracción S10.....	34
III. Resultados.....	36
1.0. Tratamientos directos con propoxur.....	36
1.1. Aplicación de extractos de raíces tratadas..... con diferentes concentraciones de propoxur.....	36
1.2. Aplicación de etanol (0.1 M) directo y extractos de raíces tratadas..... con etanol a 0.1 M.....	37
1.3. Índice de replicación.....	37
1.4. Determinación de proteína total de..... la fracción S10.....	38
4.5. Evaluación de lectina de la fracción S10.....	38
IV. Discusión.....	39
V. Conclusiones	48

Páginas

VI. Referencias.....	49
VII. Tablas.....	69
VIII. Figuras.....	73

R E S U M E N

El propoxur es un insecticida carbámico ampliamente utilizado en la agricultura, en la industria y en el hogar como agente controlador de insectos.

Se ha comprobado que numerosos insecticidas y herbicidas requieren del metabolismo vegetal para ejercer efecto mutagénico en diferentes ensayos. En este estudio se utilizó como sistema de activación metabólica a las raíces de *Vicia faba* y como prueba de evaluación de daño citogenético provocado por el propoxur al intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos de sangre periférica de humanos *in vitro*.

Los resultados mostraron que concentraciones de 50, 100 y 250 ppm de propoxur aplicadas directamente al cultivo de linfocitos no produjeron ICH, a 500 ppm el insecticida fue muy tóxico, produciendo la muerte celular. Las frecuencias de ICH se incrementaron de manera significativa cuando fueron agregados los extractos de raíces tratadas con 250, 500, 1000 y 1500 ppm de propoxur. A 2000 ppm fue sumamente citotóxico ya que produjo necrosis celular en *Vicia*, pero sus extractos no indujeron ICH en los linfocitos. Como testigo positivo fue empleado el etanol, que ha sido descrito como promutágeno activado por plantas. En este caso al aplicarlo directamente sobre el cultivo de linfocitos la respuesta fue negativa, mientras que los extractos de las raíces tratadas con este alcohol provocaron aumentos de ICH de más del doble de los testigos negativos y cuando se agregó directamente. Estos datos demostraron que las raíces de *V. faba* poseen sistemas

enzimáticos (fracción S10) capaces de metabolizar y activar al propoxur y al etanol.

El análisis estadístico de la cinética de las células en primera, segunda y tercera divisiones, permitió considerar que la progresión del ciclo de generación no fue alterado en los tratamientos directos ni en los de extractos con las diferentes concentraciones de propoxur y etanol (0.1 M).

Los datos del testigo al cual se le aplicó el extracto que contuvo la fracción S10 demostraron que no afectó la cinética celular de los linfocitos así como tampoco el valor normal de ICH. Esto apoya la conveniencia de la prueba de ICH en células humanas para el estudio del papel del metabolismo vegetal sobre la transformación de promutágenos a mutágenos.

I. INTRODUCCION

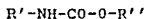
La extensa utilización de pesticidas y otros agentes químicos en la agricultura moderna ha incrementado la cantidad de contaminantes en el aire, el suelo y el agua, lo cual representa un problema serio y de gran riesgo potencial para la salud humana.

Pesticidas tales como los nematocidas, fungicidas, insecticidas, bactericidas, herbicidas etc., se han empleado desde la antigüedad para fines diversos, principalmente en beneficio del hombre, para combatir plagas, para la prevención y tratamiento de organismos patógenos de los cultivos, etc., que ocasionan anualmente grandes pérdidas económicas en el mundo y en México.

Sin embargo, varias investigaciones *in vivo* e *in vitro* que se han realizado con estos agentes demuestran la producción de numerosos efectos citotóxicos y patológicos en varias especies animales incluyendo al hombre, dentro de las cuales se consideran las alteraciones al material genético, alergias, afecciones de las vías respiratorias, intoxicaciones severas que en algunos casos conlleva a la muerte (Barberá 1975, Ecobichon y Joy 1984).

Entre los pesticidas más empleados, tanto en la agricultura como en el hogar se encuentran los carbámicos, de los cuales existen 3 clases: insecticidas (o nematocidas), fungicidas y herbicidas (Proctor y Casida 1975).

Los carbámicos son ésteres N-sustituídos del ácido carbámico y corresponden a la fórmula general siguiente:



(N, alquilcarbamatos)

donde: R' = radical alquilo (butilo, etilo, isopropilo, metilo, etc.)

R'' = radical arilo (fenilo, naftilo, heterocíclicos, etc.)

El componente básico de estos compuestos es el ácido carbámico del dióxido de carbono, molécula altamente inestable que se descompone rápidamente en dióxido de carbono y amoníaco. El reemplazamiento de uno de los protones, asociados con el nitrógeno, por un grupo metilo resulta en la formación de ácidos monoacetil carbámicos (Ecobichon y Joy 1984).

Los insecticidas carbámicos se distinguen por el carácter de selectividad de sus grupos substituyentes que alteran considerablemente las propiedades fisicoquímicas y biológicas del insecticida (Ecobichon y Joy 1984), de tal manera que la actividad óptima se encuentra en N-metilo, N-N dimetilo y N-fenilo carbamatos y otras substituciones que son menos tóxicas (Metcalf 1975).

Su toxicidad en mamíferos es debida a la inhibición de la acetilcolinesterasa en el sistema nervioso central mediante la carbamilación de la enzima (unión covalente de

los grupos electrofílicos carbamoil a sitios estéricos de las enzimas). Los carbamatos transfieren un grupo ácido a este sitio formando un complejo enzimático acetilado (Moutschen-Dahmen et al. 1984).

Se ha demostrado que ciertos plaguicidas carbámicos (carbaril, aldicarb, metomil, landril, propoxur, etc.) tienen actividad toxicológica y mutagénica en microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis* y acción carcinogénica y teratogénica en ratones, ratas, cricetos, perros y pollos (Blevins et al. 1977a, b, Epstein y Mantel 1972, Eto et al. 1980).

Ishidate y Odashima (1977) mencionan que el carbaril induce rompimientos e intercambios del ADN en fibroblastos de criceto dorado *in vitro*. Ahmed et al. 1977 observan la desincronización en la síntesis de ADN en cult'vo de fibroblastos tratados con dicho compuesto.

Eto et al. (1980) describen que el carbaril produce efectos teratogénicos en embriones de pollo y de pato, con malformaciones en las vértebras y una alta incidencia de reabsorciones fetales.

González-Cid et al. (1988) observan incrementos significativos de rompimientos cromatídicos y cromosómicos con aldicarb en linfocitos periféricos humanos *in vitro* y aumento de intercambios de cromátidas hermanas y retardo en el ciclo celular del mismo sistema de ensayo con NO-propoxur.

Pintér et al. (1990) no encuentran efectos en médula ósea de ratones hembras y machos tratados con 1000 mg/Kg de vernolate, pero a 1500 mg/Kg se inducen efectos mielotóxicos

en ambos sexos y marcada toxicidad en los machos. A 2000 mg/kg se nota alta incidencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos en médula ósea en ambos organismos, 48 horas después del tratamiento. También describen que el molinate a 250 mg/kg tiene efecto clastogénico y causa incremento significativo de micronúcleos en eritrocitos policromáticos 48 horas después de la administración en ambos sexos. Con 350 mg/kg se produce daño cromosómico muy severo y toxicidad moderada en los mielocitos y a 700 mg/kg es tóxico.

P R O P O X U R

El propoxur (PPX-Baygón), 2-isopropoxifenil-N-metilcarbamato, pertenece a este grupo de insecticidas carbámicos, cuya fórmula desarrollada se muestra en la figura 1.

Metabolismo en animales

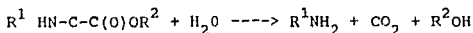
Los estudios realizados sobre la vía metabólica del propoxur son limitados pero en general los procesos son similares a los de los insecticidas N-metilcarbamatos, grupo al cual pertenece. Se ha descrito que la cinética y la degradación son equivalentes en plantas, insectos y mamíferos. Generalmente los metabolitos son menos tóxicos salvo en ciertos casos donde resultan ser más dañinos que los compuestos originales (Fukuto 1972)

Estos pesticidas son metabólicamente transformados por

los animales mediante una variedad de reacciones en moléculas muy solubles en agua y con polaridad incrementada. El paso inicial natural es una reacción oxidante, la cual introduce un grupo hidroxilo funcional que actúa como sitio para las reacciones de conjugación secundaria cuyos productos son excretados vía urinaria y/o heces fecales. Dichos plaguicidas pueden penetrar por piel, membranas mucosas y tractos respiratorio y gastrointestinal; no se acumulan en el cuerpo de tal forma que sus metabolitos son rápidamente excretados por la orina (Oonithan y Casida 1966, WHO 1986).

La principal ruta del metabolismo es la oxidante, asociada generalmente con enzimas oxidasas de función múltiple (MFO), presentes en varios tejidos animales y vegetales. Ejemplos de los sitios de ataque oxidante sobre un metil carbamato hipotético se muestran en la figura 2 y dependiendo de los grupos funcionales en la molécula diversas reacciones son catalizadas por estas enzimas (Fig.2). La reacción típica oxidante incluye: (a) la hidroxilación de los anillos aromáticos o epoxidación, (b) la O-desalquilación, (c) la hidroxilación de los N-metil, (d) N-desalquilación, (e) la hidroxilación y la subsecuente oxidación de las cadenas alifáticas y (f) la tioéter oxidación a sulfóxidos y sulfonas (Aldridge y Magos 1978, WHO 1986).

Los carbamatos son hidrolizados espontáneamente o por esterazas (Aldridge y Reiner 1972), dando como productos finales una amina, dióxido de carbono y un alcohol o fenol:



En general, la tasa de hidrólisis de estas sustancias

por las esterasas es más rápida en mamíferos que en plantas e insectos aunque existen excepciones. Las diferencias en la tasa enzimática depende de la estructura del carbamato y del tipo de esterasa (Fukuto 1972).

La hidrólisis de estos compuestos es catalizada por un grupo de enzimas conocidas como A-esterasas o arilesterasas, lo cual ocurre tanto in vitro como in vivo, pero aún no se ha determinado si la hidrólisis in vivo contribuye a la desintoxicación (Oonithan y Casida 1966, Fukuto 1972).

Los productos hidroxilados pueden formar conjugados reacción importante, ya que lleva a la formación de compuestos solubles en agua tales como N-glucurónidos, O-glucurónidos, sulfatos y ácido mercaptúrico, los cuales pueden ser eliminados por vía urinaria o por las heces. Algunos de estos metabolitos han mostrado ser sumamente tóxicos en mamíferos (Oonithan y Casida 1968, WHO 1986).

Dawson et al. (1964) investigan el metabolismo y la excreción del propoxur entre 8 y 10 horas después de administrada una dosis de 50 mg, la presencia en la orina del metabolito 2-isopropoxifenol indica que este insecticida es rápidamente absorbido e hidrolizado.

Otros estudios han identificado un metabolito oxigenado el 5-hidroxi-propoxur, que tiene actividad de anticolinesterasa y es muy dañino, lo que contribuye a la severa toxicidad del insecticida (Fig.3) (Oonithan y Casida 1968. Fukuto 1972).

Casida (1968) detecta la producción de acetona mediante la reacción de despropilación del propoxur al incubarlo con

la fracción microsómica de mosca y NADPH_2 , en aproximadamente 11 especies de insectos adultos y larvas (Tsukamoto 1967, Tsukamoto y Casida 1967).

Como aparentemente la principal ruta de degradación del propoxur es la hidroxilación del anillo isopropoxifenil (Shrivastava et al. 1964) se ha evaluado in vitro ésta reacción en homogeneizados de hígado de ratas y únicamente se obtiene el metabolito 2-hidrofenilmetilcarbamato en tanto que los productos hidroxilados se encuentran en ratas vivas (Schlagbauer y Schlagbauer 1972).

En moscas in vivo, se han generado compuestos conjugados como el 5-hidroxi-2-isopropoxi-fenilmetilcarbamato, el cual in vitro ha mostrado ser un potente inhibidor de la acetilcolinesterasa (Tsukamoto 1967, Tsukamoto y Casida 1967b). En plantas, parece ser que la principal vía metabólica es la despropilación, por ejemplo en el frijol se han originado pequeñas cantidades de compuestos del tipo 4-hidroxil (Kuhr y Casida 1967, Schlagbauer y Schlagbauer 1972).

La despropilación del anillo del propoxur parece que se realiza por hidroxilación del segundo átomo de carbono el cual lleva dos oxígenos funcionales, el enlace llega a ser inestable y se origina el 2-hidroxifenil-N-metilcarbamato. En plantas éste producto no se ha detectado (Krishna y Casida 1966, Soják 1971).

Tanto en los seres humanos como en las ratas la hidrólisis es una reacción muy importante y aparentemente la sustancia excretada es el fenol (Dawson et al. 1964, Krishna y Casida 1966).

Metabolismo de los N-Metil Carbámicos en vegetales

Generalmente el metabolismo de los carbamatos por los vegetales sigue otra ruta de desintoxicación. Los carbamatos hidroxilados que se producen ya sea por hidroxilación del anillo o en el grupo N-metilo, pueden ser conjugados con aminoácidos (por ejemplo, la cisteína) o como glucósidos o fosfatos, los cuales son almacenados como metabolitos finales (Still y Rusness 1977, Aldridge y Maqes 1978).

Los insecticidas ésteres metilcarbámicos son vulnerables al rompimiento hidrolítico durante el proceso de desintoxicación; las reacciones de hidrólisis en las plantas son menos frecuentes que las de oxidación, no obstante la división hidrolítica de la porción éster de la molécula es un mecanismo importante de desintoxicación (Fukuto 1972) (Fig. 4).

Parece que la reacción metabólica predominante en las plantas es la hidroxilación del anillo aromático; existen evidencias experimentales que sugieren que ésta varía en los diversos vegetales. Aunque se ha sugerido que la ruta metabólica de algunos insecticidas del grupo metilcarbamatos es idéntica en plantas. Es decir, después de entrar a la planta son biotransformados en metabolitos hidroxilados primarios los cuales pueden ser similares a los del metabolismo animal. Estos metabolitos hidroxilados son conjugados por las plantas y originan glucósidos solubles en agua o pueden ser oxidados a sulfóxidos o ligeramente transformados a sulfonas (Kuhr 1968, Fukuto 1972).

Gronberg (1970) (citado por WHO 1986) confirma que la hidroxilación es la principal vía de transformación del propoxur en plantas, las reacciones de degradación en maíz producen dos metabolitos predominantes: o-hidroxifenil-N-hidroxiometilcarbamato en 17% y o-isopropoxifenil-N-hidrometilcarbamato en 3.2% .

Estudios recientes han demostrado que los carbamatos en presencia de nitritos pueden ser convertidos a derivados N-nitrosos bajo condiciones ácidas *in vitro* e *in vivo* (en el estómago o saliva y en ciertos vegetales), los cuales pueden ser (parcialmente) responsables de su actividad carcinogénica. La mayoría de los derivados nitrosos han mostrado ser potentes mutágenos y/o carcinógenos en diferentes sistemas de prueba (Tannerbaum et al. 1974, Eisenbrand et al. 1974, 1975a, b, Regan et al. 1975, Uchiyama 1975, Blevins et al. 1977a, b, González-Cid 1988) como el nitrosopropoxur en *Salmonella typhimurium* (Seiler 1977), en *Escherichia coli* (Lijinsky y Elespuru 1976), en *Saccharomyces cerevisiae*, (Siebert y Eisenbrand 1974), en linfocitos humanos induce ICH *in vitro* (González-Cid et al. 1990). Gichner et al. (1990) describen que el propoxur forma el nitrosopropoxur (NO-PPX) en una reacción con nitrito bajo condiciones ácidas, el cual es altamente mutagénico en *Arabidopsis thaliana*, asimismo, en presencia de los ácidos húmicos, para-aminobenzoico y ascórbico inhibe la producción del NO-PPX y de esta manera reduce su actividad mutagénica en dicha planta.

Aplicaciones en la Agricultura

El propoxur es uno de los pocos plaguicidas carbámicos

efectivos en la agricultura, en la horticultura y en el campo forestal, ya que ejerce una potente acción como insecticida y acaricida. Generalmente se presenta en forma de concentrados emulsificables, talcos, polvos, gránulos, aceites, aerosoles, humos, etc., para el control de plagas de insectos tales como: áfidos, pulgones, chinches, ácaros, moscas, mosquitos, y otros perjudiciales, que son los que más pérdidas económicas ocasionan en diferentes cultivos, granos, flores de ornato y árboles forestales de México. Se utiliza también para combatir hormigas, áfidos, mosquitos, moscas y cucarachas, de los hospitales, fábricas, invernaderos y hogares (WHO/FAO 1976).

Toxicidad

Se han publicado algunos estudios sobre los efectos toxicológicos, patológicos, teratogénicos y carcinogénicos del propoxur (WHO/FAO 1976, WHO 1986).

Cuando se administran por vía oral dosis diarias de 5 mg/kg a ratas machos durante 30 días no tiene efecto. Mientras que 10 y 20 mg/kg a partir de los 4 a 5 días del tratamiento producen fasciculaciones y al rebasar el 50. día, las ratas toleran éstas dosis y no se les notan signos de fatiga (WHO/FAO 1976).

Al ser expuestas ratas y ratones hembras durante una hora a propoxur en aerosoles (cuyo tamaño de las partículas es de 1 a 3 μm), a una concentración de 210 mg/kg, la mitad de las ratas mueren, pero ninguno de los ratones. A 168 mg/kg, tres de las diez ratas murieron. Ambos organismos

muestran signos colinérgicos después de 10 a 15 minutos de estar en contacto con el propoxur (WHO/FAO 1976).

Al incluir concentraciones de 250, 500, 1000 y 2000 ppm en la dieta de ratas hembras y machos por 16 semanas se produce disminución en el peso corporal de las primeras, no así en los segundos. La actividad de la colinesterasa fue reducida en la sangre en 500, 1000 y 2000 ppm. En estas dos últimas la actividad se redujo en el plasma, en la sangre y en el cerebro, las cuales causan necrosis y proliferación de los conductos biliares en el hígado de ambos organismos (WHO/FAO 1976).

Ratas hembras y machos expuestos durante 12 semanas a aerosoles de 0, 5.7, 10.7 y 31.7 mg/m³ presentan disminución de la actividad de la colinesterasa eritrocítica (Kimmerle e Iyatomi 1976).

Al inyectar propoxur subcutáneamente a 30 ratones a partir del nacimiento hasta las 38 semanas de edad, aplicando una dosis total de 9.6 mg/organismo, se observa que la incidencia de tumores es de 6.7%, lo cual confirma que no tiene actividad carcinogénica en el ratón (WHO 1986).

Roszkowski (1982) analiza la acción del propoxur sobre el desarrollo intrauterino y el estado de osificación en fetos de ratas, se encuentran efectos embriogénicos con dosis del 20% de la LD₅₀, administradas en los días 7 a 19 del período de gestación, presentándose 11.9% de anomalías en los fetos de los animales tratados comparados con el 6.3% en los testigos; con reducción en el peso corporal y alteraciones en los procesos de osificación, así como

disminución en los niveles de calcio y magnesio en el suero de madres cuyos fetos muestran anomalías en los huesos.

En 1977, Tyrkiel describe que dosis de propoxur de 50 mg/kg de peso corporal, aumentan las muertes tempranas en embriones de ratas durante las dos primeras semanas después del tratamiento y dosis de 8.5, 25 y 50 mg/kg en los días 6, 8 y 11 del período de gestación no tienen efecto mutagénico o teratogénico, afectando únicamente el peso corporal de los fetos.

En personas en contacto con el propoxur se han descrito síntomas de toxicidad tales como náuseas, diarreas, vómitos, debilidad, dolores de cabeza y sudoraciones. Algunas reacciones similares se han mencionado en individuos expuestos a aerosoles en el hogar. En voluntarios, la administración oral de 0.75 mg/kg ó 1.0 mg/kg a intervalos de media hora por 2.5 horas provoca la reducción de cerca del 60% de la acción normal de la colinesterasa eritrocítica y retornan a sus niveles estables después de 3 horas de suspendido el tratamiento. En una sola aplicación de 1.5 mg/kg disminuye 27% la actividad de la colinesterasa en los eritrocitos, con manifestación de vómitos, sudoraciones y pérdida de la visión, los cuales desaparecen después de una hora (WHO/FAO 1976).

Con respecto a su acción a nivel citogenético en células meristemáticas de las puntas de la raíz de *Vicia faba* diferentes concentraciones de propoxur inducen fragmentos y puentes cromosómicos, cromosomas con el centrómero inactivado, isocromosomas, anafases multipolares y micronúcleos (Salomón 1987).

Intercambios de cromátidas hermanas

Con el fin de detectar los efectos genotóxicos provocados por la gran variedad de mutágenos tanto físicos como químicos presentes en el ambiente y de evaluar el riesgo que representan para la salud del hombre se han desarrollado diversos sistemas de prueba que incluyen bacterias, hongos, plantas y animales (EMS 1975). Uno de los más útiles para determinar el efecto tanto *in vivo* como *in vitro* es el cultivo de células humanas y de ellos, el de linfocitos de sangre periférica que tiene ventajas tales como la obtención de poblaciones celulares numerosas (Evans y O'Riordan 1975) por medio de mitógenos como la fitohemaglutinina (Jasinka et al. 1977). Asimismo el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) ha resultado ser una prueba rápida y sensible, puesto que se induce con concentraciones hasta diez veces menores que las requeridas para producir alteraciones cromosómicas (Wolff 1974) y ofrece un método adecuado para la detección de mutágenos ambientales (Perry y Evans 1975, Zhurkov y Yakovenko 1976).

El intercambio de cromátidas hermanas (ICH) desde el punto de vista molecular es un fenómeno que implica transposiciones simétricas de DNA de doble cadena equivalentes entre las dos cromátidas de un mismo cromosoma. Algunos estudios han evidenciado que el proceso de ICH requiere que la célula pase por la etapa de síntesis (S) del DNA (Wolff 1974) y se ha sugerido que es durante o inmediatamente después de que se ha formado la horquilla de replicación cuando se lleva a cabo el intercambio de doble banda entre las cadenas de DNA (Kato 1980).

Resultados experimentales apoyan el hecho de que es durante la fase S el momento en que se lleva a cabo el intercambio de cromátidas, el mecanismo molecular por el cual parece haber diversas causas que desencadenan el proceso, es decir, que el ICH pueda ser inducido por circunstancias múltiples como daño al DNA (Perry y Evans 1975, Abe y Sasaki 1977, Nakanishi y Schneider 1979) inhibición del proceso de síntesis de DNA (Ishii y Bender 1980, Rainaldi y Mariani 1982) supresión de las enzimas involucradas en dicho proceso (Ishii y Bender 1980) inhibición de enzimas involucradas en la reparación (Oikawa et al. 1980, Morgan y Cleaver 1982) o por un agente promotor de cáncer, no involucrado en la producción de lesiones sobre el DNA (Kinsella y Radman 1978, Schwarts et al. 1982).

Existen varios modelos propuestos para explicar la formación de los ICH, algunos de ellos son:

- a) Modelo de Holliday (propuesto por Kato 1977).
- b) Desviación duplicadora (Ishii y Bender 1980).
- c) Desvío de la replicación ("Replication bypass model") (Shafer 1982).
- d) Modelo de replicación (Painter 1982).

Cada modelo se basa en evidencias experimentales específicas y algunas veces limitadas y ninguno de ellos ha sido totalmente confirmado (Tice y Hollaender 1984). Bender et al. (1974) y Latt (1974), son los primeros en proponer que los ICH pueden ser el resultado de un proceso de reparación de lesiones en el DNA, sin embargo, las respuestas observadas con algunos agentes cuyo tratamiento se prolonga mucho tiempo

causan incremento de las frecuencias de ICH, por lo que se descarta esta posibilidad (Ishii y Bender 1978).

Entre los modelos que inicialmente fueron propuestos destaca el de Holliday que se basa en los eventos de recombinación meiótica de eucariontes inferiores y sugiere un posible papel para la formación de los ICH mediante un evento de doble hebra (Kato 1974). Este modelo involucra un intercambio de polinucleótidos entre moléculas dúplex de DNA, seguido por dos intercambios de polinucleótidos alternativos y únicamente uno de ellos produce un intercambio completo del dúplex de DNA que podría ser posteriormente evidente como un ICH. Si el primer intercambio es inducido por daño, éste guiaría a un rompimiento de una cromátida, tales rompimientos podrían ser asociados con los ICH aproximadamente a la mitad del tiempo y propone que el intercambio del DNA durante la formación de los ICH podría estar de acuerdo con el modelo de recombinación. Este proceso involucra el intercambio de hebras de polinucleótidos de DNA, que contiene segmentos cortos de DNA y se dirigen a una región del heterodúplex que posee segmentos complementarios de cada dúplex original (Fig. 5) (Holliday 1964). Sin embargo este modelo es inconsistente ya que al no existir reparación en las regiones del DNA donde existen rompimientos, recombinaciones o durante la formación de la estructura de Holliday, permite que las lesiones persistan. Por otro lado, los heterodúplex son unidades de intercambio muy pequeñas y no visibles, mientras que los ICH son entidades del DNA discretas, separadas y visibles en microscopía de luz por lo que no hay una estrecha relación entre la formación de los heterodúplex y los ICH (Stetka 1982, Painter 1982).

Ishii y Bender (1978) proponen en su modelo que los ICH pueden originarse en forma espontánea o por daño al DNA. En el primer caso sugieren que son el resultado de una ruptura al azar de las bandas progenitoras a nivel de la horquilla de replicación del DNA durante la síntesis y su reasociación con las bandas hijas de polaridad similar, en el segundo los ICH son debidos a que el daño sobre una de las hebras progenitoras ocasiona que se rompa a nivel de la bifurcación del DNA durante la síntesis, teniendo la posibilidad de unirse covalentemente con la banda hija recién sintetizada y de la misma polaridad, posteriormente la banda progenitora no alterada puede romperse cerca del extremo terminal de la banda hija complementaria a la banda progenitora que presenta el daño y continuarse con ella, complementándose con la lesionada (Fig. 6). Este modelo está basado en observaciones experimentales con agentes como hidroxiaurea, afidicolina y 1,B-D arabinofuranosilcitosina que inhiben la síntesis de DNA, específicamente la elongación de la cadena e inducen espontáneamente un incremento de los ICH que indica además que la horquilla de replicación puede ser el sitio de su formación. Aunque tiene algunas evidencias que tratan de explicar el mecanismo para la generación de los ICH, este modelo tiene críticas al no explicar el origen de las "mellas" en el DNA que precede a la formación del ICH, sino que especulan que las enzimas que desespiralizan el DNA tales como las girasas y los inhibidores de estas enzimas están involucrados en el origen de "mellas" y como puede ser probable que esto suceda es uno de los modelos más aceptable.

Shafer (1982) propone varias posibilidades para la formación de los ICH considerando que existen diversos mecanismos de reparación del DNA, de tal manera que las enzimas involucradas en dicho proceso pueden provenir de las

existentes para la duplicación y la reparación del material genético, sugiere que muchos agentes son capaces de inducir dichos sucesos, que son el resultado de una serie de eventos secuenciales, los cuales se presentan como una replicación bidireccional relacionada con un enlace cruzado. Es decir, la cadena conductora del DNA naciente avanza hacia uno de los sitios del enlace cruzado lo cual crea una fuerza distorsionante cercana a éste, dando como resultado un rompimiento o escisión de la hebra progenitora, por lo que las hebras nacientes conductoras aprovecharían el enlace a lo largo de las hebras progenitoras opuestas y los dos rompimientos o escisiones deberían ocurrir contralateralmente a las hebras progenitoras opuestas cerca y por abajo del enlace debido al proceso de desenrollamiento convergente, los extremos libres producidos en el primer estado pueden llegar a estar alineados en sus extremos independientemente de su polaridad opuesta. La terminación de un ICH debería acompañarse de dos procesos de reunión y sellado de los extremos libres vía piezas de Okazaki nacientes o por complementación del heterodúplex, por superlapiamiento de los extremos libres (Figs. 7 y 8). El mecanismo de desvío permitiría que continúe la replicación sin ser reparado el enlace cruzado (dejándolo intacto) y ocasiona una interrupción de las hebras progenitoras y una interacción incompleta con las hebras nacientes cerca y por debajo del sitio de enlace cruzado, produciendo un intercambio de las cromátidas hermanas. Este modelo tiene correlaciones negativas al considerar los eventos de recombinación del DNA y los sitios de enlace cruzado como las regiones adecuadas para la formación de los ICH, lo cual es inconsistente con los datos experimentales obtenidos con numerosos agentes que no son inductores de enlaces cruzados pero sí de ICH, por lo tanto no son el resultado de estos eventos. Además considera que

no existe reparación en los sitios de enlace cruzado con lo cual sería fatal si se inducen en la fase G_1 . Por otro lado, descarta la posibilidad de observar ICH dobles al no haber reparación del daño inicial en el segundo ciclo de replicación y el hecho de que existan agentes cuyo mecanismo sobre el DNA no es por enlaces cruzados y sean inductores efectivos de ICH, descarta la operabilidad de dicho modelo.

La mayoría de modelos propuestos para la formación de los ICH, son inconsistentes con las observaciones experimentales, el más aceptado es el esquema de Painter, el cual es consistente con bases teóricas (estructura y replicación del DNA) y experimentales. Este se basa en la idea de que los rompimientos de doble hebra, o sea de cada hebra progenitora, ocurren frecuentemente en las conjunciones de grupos de replicones adyacentes durante su replicación. Es decir que los ICH se originan en el punto de coincidencia de un replicón completamente duplicado y otro parcialmente duplicado donde se provoca la lesión generándose así un ICH.

Este modelo se apoya en experimentos con agentes que inhiben la síntesis de DNA y bloquean la elongación de la cadena tales como la mitomicina C, la luz ultravioleta y el benzo(a)pireno y predice que estos agentes que dañan el DNA, en esta forma son potentes inductores de ICH.

La hipótesis considera que existe reducción en la velocidad de desplazamiento de la horquilla de replicación del DNA, el cual genera 4 extremos libres (dos nacientes y dos progenitores de un racimo de replicones completamente duplicados y opuestos a los extremos libres progenitores) del replicón adyacente que se encuentra parcialmente duplicado. Esto conduce a la conexión entre los grupos de replicones en

los cuales un segmento duplicado se encuentra al lado de un segmento no duplicado (Fig. 9) (como es normal durante el periodo S, en las uniones de la eucromatina y la heterocromatina), lo que sugiere que los rompimientos de la molécula de DNA de doble banda en éstas conexiones, son formados y reunidos de manera espontánea y el sellado quizás es catalizado por una topoisomerasa II, la cual ha sido localizada en diferentes eucariontes. Ocasionalmente en lugar de que ocurra una reunión normal, el rompimiento se sella por unión de las hebras hijas de una molécula replicada a la molécula no replicada. Una vez que esto ocurre, el ICH es iniciado cuando las hebras hijas nacientes de un grupo se combinan con las hebras progenitoras de un grupo parcialmente replicado y solo cuando estos terminan de duplicarse se genera totalmente el ICH. Este intercambio requiere de un solo evento, el rompimiento es de hebra doble, el cual es consistente con los datos que muestran que los ICH son producidos en función lineal a la dosis del agente (Fig. 10) (Painter 1982).

Está claro que este es el mejor modelo propuesto para la formación de los ICH, sin embargo tampoco existen evidencias directas, no obstante es de gran valor y buenas expectativas desde el punto de vista molecular de dichos eventos.

Significado Biológico de los ICH

Aunque todavía no se conoce el significado biológico de los ICH, el hecho de que se hayan observado en las células de todos los organismos estudiados, sugiere que estos son un fenómeno común y fundamental en las células (Tice y

Hollaender 1984). Por otro lado, es posible que el fenómeno de los ICH sea la consecuencia de un proceso que permite a la célula dividirse, aún en presencia de lesiones en su DNA; de ser así puede existir alguna correlación entre el fenómeno y la mutación (Carrano y Thompson 1982), dado que las lesiones persistentes aumentarían la probabilidad de esta última en el DNA. Lo anterior tiene importancia con respecto a la formación de las células cancerosas, debido a que hay pruebas que asocian la persistencia de lesiones en el DNA con la inducción de células malignas (Margison y Kleihues 1975).

A pesar de que los experimentos de autorradiografía de Kato (1974) indican que los mutágenos inducen ICH, no es sino hasta la introducción de la técnica dependiente de la 5-bromodesoxiuridina (5-BdrU) de Latt (1973), cuando los ICH son considerados como indicadores del potencial mutagénico y carcinogénico. De hecho, los ICH representan un método de gran sensibilidad para la detección de muchos mutágenos químicos en comparación con las aberraciones cromosómicas y de acuerdo con Latt (1974), la sensibilidad de la prueba de ICH es aproximadamente de 10 veces mayor que el método estándar de aberraciones cromosómicas aunque parecen no estar relacionadas entre sí y llevarse a cabo mediante mecanismos diferentes (Wolff 1982). Esta utilización de los ICH como una alternativa de ensayo de genotoxicidad es iniciada con el extenso estudio de Perry y Evans (1975). Actualmente existen evidencias de que para muchos agentes químicos, el análisis de los ICH proporciona el índice más sensible para detectar el daño genético, debido a que se ha encontrado correlación entre la frecuencia de ICH y la concentración del mutágeno (Perry y Evans 1975, Takehisa y Wolff 1977, Takehisa et al. 1982). Por esto el Comité de

Genética Toxicológica de EUA lo ha incluido como sistema de prueba (Latt et al. 1981).

Por otro lado, se ha descrito que algunos mutágenos actúan directamente sobre el DNA y otros requieren del metabolismo realizado por la fracción microsómica de las células hepáticas de mamíferos para activarse y provocar el daño (Ames et al. 1975, Takehisa y Wolff 1977 1978). Durante algún tiempo se consideró que las plantas carecían de los sistemas enzimáticos capaces de realizar dicho metabolismo. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la activación de compuestos químicos por las plantas, los cuales tienen acción mutagénica en varios organismos indicadores de daño genético (Plewa y Gentile 1982, Gentile et al. 1986). A los agentes químicos que por sí mismos no son mutágenos sino que requieren de la activación metabólica para ejercer dicho efecto son denominados promutágenos (Plewa et al. 1988).

El término "activación vegetal" denota el proceso mediante el cual un agente químico no mutagénico es transformado por la acción biológica de una planta en mutágeno (Plewa et al. 1988).

Ochthers (1943) (citado por Velemínsky et al. 1977) es el primero en sugerir la existencia de promutágenos, cuando observa que el etiluretano causa una alta frecuencia de translocaciones cromosómicas en células vegetales de *Oenothera* e infiere que ésta planta posee un mecanismo de activación mutagénica.

Ames et al. (1975) desarrollan un método de activación metabólica de mamíferos para detectar la capacidad mutagénica de promutágenos en *Salmonella typhimurium* y posteriormente se

utiliza la activación metabólica de vegetales con el mismo microorganismo indicador para evaluar la mutagenicidad de numerosos pesticidas promutagénicos (Plewa y Gentile 1982, Plewa et al. 1984).

Los experimentos de activación vegetal se pueden realizar *in vivo* o *in vitro*, en el primero la sustancia que se prueba es administrada en una planta viva intacta que semeja las condiciones encontradas en los campos agrícolas y en el segundo el agente es coincubado en un homogeneizado vegetal o en un cultivo de células del tejido de la planta (Stafford 1971a, Plewa y Gentile 1982).

En ambos métodos un extracto vegetal se prueba con un microorganismo indicador (tal como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc.) o en células de mamífero, para determinar su actividad genética, evaluando así las propiedades genotóxicas de los agentes químicos (Takehisa y Wolff 1977, 1978, Plewa et al. 1984).

En estos estudios de metabolismo vegetal tanto *in vivo* como *in vitro*, se han utilizado diversas especies de plantas debido a que no todas pueden transformar al mismo promutágeno ya que la presencia y la actividad de los sistemas enzimáticos varían en los tejidos de las diferentes especies vegetales así como también en los distintos estados de su desarrollo (Stafford 1971b, Callen 1982, Veleminsky y Gichner 1988). Tales investigaciones han demostrado que ciertos herbicidas, fungicidas e insecticidas requieren de una biotransformación vegetal para ejercer acción mutagénica dentro de los cuales se pueden citar S-triazinas, cianazina procianacina, araclor, popraclor, 1,2-dibromoetano, hidrazida

málica, benzo-a-pireno, 2-acetilaminofluoreno, dimetilnitrosamida, 2-aminofluoreno, medazol, pentaclorofenol, 0-fenilenediamina, 4-nitro-0-fenilenediamina (NOP-X), benzidina, etiluretano, etc. (Stafford 1971a, Plewa et al. 1988), para lo cual se han utilizado ya sea extractos y/o homogeneizados de semillas de soya, maíz, cebada, etc., de raíces de haba, sorgo, cebolla, etc., de bulbos de tulipán, de gladiola, etc., de hojas de maíz, de tabaco, etc., como metabolizadores (Dulieu y Dalebroux 1977, Scott et al. 1978, Constantin y Nilan 1982, Takehisa et al. 1982, Higashi et al. 1983, Takehisa y Kanaya 1983).

Meehan y Cooscia (1973) describen datos sobre una fracción microsómica en semillas de *Vinca rosea* capaces de metabolizar a los herbicidas genariol y nerol. Usando la fracción S9 de bulbos de tulipán (la cual contiene cit P-450) se activa el benzo(a)pireno y es convertido en derivados B(a)P-fenoles, B(a)P-quinonas o formas conjugadas, derivados B(a)P-diol del benceno y su último producto metabólico es el 7,8-diol-9,10 epóxido (Higashi et al. 1981, 1982, Karasaki et al. 1983). Otra fracción microsómica vegetal importante en estudios de activación de promutágenos es la S10, descrita por Higashi et al. (1981) como el extracto celular obtenido por ultracentrifugación a 10000 xg.

Al emplear a *Vicia faba* como activador metabólico tanto en extractos celulares de raíz, tallo y hojas, como en los de raíces tratadas, se han ensayado diferentes compuestos, estableciendo como indicador de daño citogenético a la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en células de ovario de criceto chino (CHO) (Takehisa et al. 1982, Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa 1986).

Takehisa et al. (1988) prueban in vitro e in vivo a Vicia faba como activador para benzo(a)pireno, 2-aminofluoreno, anilina, ciclofosfamida, hidrazida málica y etanol. En el primer caso se obtiene la fracción S10 de extractos de puntas de raíz, hoja y tallo, la cual se expone al mutágeno junto con las células CHO, en tanto que en el segundo las raíces se someten directamente al agente químico durante 3 horas a 20°C y el extracto se agrega posteriormente al cultivo de CHO. Ciclofosfamida y alcohol etílico son activados tanto por la fracción S10 como por los extractos y provocan el incremento de ICH. Benzo(a)pireno, 2 aminofluoreno, hidrazida málica y anilina no son activados para la inducción de ICH, aunque la última inhibe la mitosis (Takehisa et al. 1988)

Por otra parte, la información sobre los mecanismos o sistemas enzimáticos involucrados en la transformación por vegetales de mutágenos a partir de promutágenos o de mutágenos a productos inocuos es aún escasa y ha sido obtenida de estudios bioquímicos concernientes al modo de acción de los pesticidas y al origen, caracterización y actividad de sus residuos (Dohn y Krieger 1981, Lamoureux y Rusness 1981, Shimabukuro et al. 1982, Cole 1983, Mumma y Davidonis 1983, Vonk 1983).

El hecho de que las plantas realicen transformaciones enzimáticas, hace necesario profundizar los estudios a este respecto, ya que los pesticidas son tomados por el hombre no solo directamente, al ser aplicados sobre vegetales, sino también a través de sus metabolitos, los cuales se almacenan en diversas estructuras y tal vez puedan resultar más peligrosos.

En vista de que muchos agentes químicos pueden ser activados por las plantas y actuar como mutágenos en sistemas animales y vegetales y en el hombre mismo y teniendo como antecedente que los insectidas carbámicos son ampliamente utilizados en la agricultura mexicana, así como también de gran uso doméstico y considerando que cuando se aplica el propoxur directamente a las raíces de Vicia faba se inducen intercambios de cromátidas hermanas (Gómez-Arroyo datos no publicados), mientras que sobre el cultivo de linfocitos no provoca respuesta (González-Quirasco 1991), hace suponer que en la planta está involucrado algún proceso metabólico por lo que en este trabajo se pretende evaluar la capacidad de activación metabólica que sobre el insecticida carbámico propoxur tiene Vicia faba, al hacer los tratamientos directos sobre la raíz y analizar la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) que se producen cuando se aplican los extractos a linfocitos de sangre periférica humana en cultivo, asimismo se determina la concentración de proteína total y presencia de lectinas en la fracción enzimática S10 de esta planta obtenida al ser ultracentrifugada a 10000 xg.

II. MATERIALES Y METODOS

1.0. Propiedades Fisicoquímicas del Propoxur (PPX-Baygón)

El propoxur tiene un peso molecular de 124.56, es un polvo blanco cristalino; sin olor; con un punto de fusión de 86-95.5°C; soluble en agua (0.2%) a 20 °C, en disolventes orgánicos polares y ligeramente soluble en disolventes orgánicos no polares; es altamente inestable en medios alcalinos; con una vida media de 40 minutos a pH 10 a 20°C (WHO/FAO 1976).

1.1. Preparación de la Solución de Propoxur para los Tratamientos Directos

Se preparó una solución madre de propoxur (PPX o Baygón, 92% de pureza, proporcionado por Bayer) con agua desionizada estéril de la cual se efectuaron diluciones con el objeto de obtener concentraciones finales de 50, 100, 250, y 500 ppm para cada cultivo de los tratamientos directos.

1.2. Tratamiento y Preparación de los Extractos de Vicia faba

Las semillas de Vicia faba (var. mayor) se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave, cuando las raíces alcanzaron una longitud entre 4 y 6 cm se introdujeron en 50, 100, 250, 1000 y 1500 ppm de propoxur durante 4 horas a 37 °C y con base en estos estudios preliminares se seleccionaron 250, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm para los análisis subsecuentes. Las raíces del testigo positivo se sumergieron en etanol (EtOH) 98% de pureza (Sigma) a 0.1 M durante 4 horas a 37 °C. El grupo testigo negativo estuvo bajo las mismas condiciones experimentales pero en agua desionizada estéril.

Después de los tratamientos las raíces se lavaron con agua desionizada estéril y se cortaron 2 cm de la raíz principal, se homogeneizaron por separado en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4 y a temperatura entre 0-4 °C en un homogeneizador Elvehjem-Potter de 1.5 a 2.5 min a 1300 rpm. La cantidad de puntas de raíces por tratamiento fue de 42 para totalizar un peso fresco de 2.0-2.5 g. La relación de volumen de la solución amortiguadora (ml) a peso fresco de los cortes de la raíz (g) fue de 1:1.

El homogeneizado fue ultracentrifugado por 15 min a 10000 xg a 0°C. El sobrenadante en el cual se encontraban los metabolitos de la transformación del propoxur aplicado a diversas concentraciones, así como del etanol fue esterilizado por filtración miliporo (0.45 µm) e inmediatamente fue usado para el tratamiento de los linfocitos cultivados y se

agregaron 100 μ l de extracto por cultivo en donde permanecieron 48 horas a 37°C.

2. Cultivo y Tratamiento de Linfocitos Humanos

1. En 3 ml de medio McCoy's 5A (Microlab) se colocaron 8 gotas de sangre de un donador sano más 0.4 ml de fitohemaglutinina, se incubó por 24 horas a 37 °C y se agregaron 100 μ l de 5-bromodesoxiuridina más 100 μ l del extracto de la raíz de Vicia faba y se prosiguió con el cultivo. A las 70 horas de iniciado se aplicaron 100 μ l de colchicina y se realizó la tinción diferencial con fluorescencia más Giemsa (Perry y Wolff 1974).

Se probaron 50, 100, 250 y 500 ppm de propoxur adicionadas directamente a los linfocitos en cultivo y se hicieron los siguientes testigos: uno con solamente medio de cultivo y otro con el extracto de Vicia faba sin tratamiento; el positivo con el extracto de Vicia + etanol y otro únicamente con etanol (Takehisa et al. 1982).

3. Cosecha

1. Cada cultivo se transfirió a un tubo y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

2. Se eliminó el sobrenadante e inmediatamente se resuspendió el botón suavemente con KCl (Merck) 0.075 M a 37°C, se dejaron reposar durante 20 minutos en la incubadora.
3. De nuevo se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min.
4. Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió rápidamente con el fijador metanol-ácido acético (Sigma) 3:1 dejándolos reposar durante 20 min.
5. Se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min.
6. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el botón con el fijador y se les permitió reposar durante 10 min a temperatura ambiente.
7. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 0.5 ml de fijador, después se hicieron las preparaciones.
8. Cada preparación se hizo por goteo a 1.0-1.5 metros de altura, realizándose como mínimo 4.
9. Se dejaron secar al aire.
10. Se observaron al microscopio de contraste de fases con los objetivos de 16X y 40X para seleccionar las que tenían mayor cantidad y mejores metafases.
11. Las preparaciones con mejores metafases fueron teñidas.

4. Tinción Diferencial de Cromátidas Hermanas

1. Las preparaciones con metafases se pusieron en el colorante fluorocromado Hoechst 33258-agua destilada (1:9), las cuales fueron mantenidas en obscuridad durante 40 minutos en cajas Koplín.
2. Se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire, verticalmente.
3. Posteriormente fueron colocadas en cajas de Petri con KCl 0.075 M y se irradiaron con luz ultravioleta durante 30 minutos.
4. Se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire en forma vertical.
5. Después fueron colocadas en cajas Koplín con 2xSSC (citrato de sodio salino) a 40 °C durante 60 minutos.
6. Se lavaron con agua de la llave y se dejaron secar verticalmente al aire.
7. Se tiñeron con el colorante Giemsa (Merck)-agua destilada (1:10) durante 4 a 6 minutos.
8. Se lavaron con agua corriente y se dejaron secar verticalmente al aire.
9. Se reetiquetaron y se analizaron la frecuencia y los tipos de intercambios de cromátidas hermanas (ICH).

5. Análisis Estadístico

Con el objeto de cuantificar la frecuencia del ICH se registraron 25 metafases de segunda división para cada caso. Se realizaron tres experimentos, los promedios de los cuales se compararon entre sí, en grupos de dos, por medio de la "t" de Student (Tabla I). Esta prueba también se usó para el contraste de los promedios de testigos y tratados (Tabla II). El índice de replicación se determinó, examinando de 100 células las que estuvieron en primera, segunda y tercera divisiones, de acuerdo a la fórmula propuesta por Krishna et al. (1985).

Con el fin de lograr objetividad en las observaciones, las laminillas se reetiquetaron, de tal manera que no se tuvo conocimiento del grupo al cual pertenecían hasta que finalizó el experimento y se descifró la clave.

6. Determinación de la Concentración de Proteína Total de la Fracción S10 de Vicia faba

La fracción S10 de V. faba fue obtenida en las mismas condiciones que se indican en el punto 1.2., pero sin tratamiento con el insecticida. Esta fue filtrada por miliporo (0.45 μm) en el momento de ser utilizada para la determinación de proteína total por el método de Lowry et al. (1951) (por duplicado).

Se prepararon las soluciones A y B.

A. Tartrato de sodio al 2%.	0.1 ml
Sulfato de cobre al 1%	0.1 ml
Carbonato de sodio al 2%	
en NaOH 0.1 N	10.0 ml
B. Reactivo de Folin	1.0 ml
Agua destilada	1.0 ml

En tubos de ensaye se adicionaron 0.1 ml de varias diluciones de la muestra del extracto de las raíces de *V. faba*, se agregaron 2 ml de la solución A y se homogeneizaron invirtiendo varias veces los tubos, se dejaron a 20 °C durante 10 min después se añadieron 0.2 ml de la solución B y se incubaron durante 30 min a 20°C y se leyeron en un espectrofotómetro (Coleman Jr) a 750 nm, fue llevado a cero en D. O. con el blanco de SSB y las soluciones A y B.

Para obtener las concentraciones de proteína, se extrapolaron las lecturas en la curva tipo obtenida con albúmina sérica bovina (Sigma).

7. Evaluación de Lectina de la Fracción S10

Se ha descrito que en el interior de plantas y semillas de ciertas leguminosas (como el frijol, lenteja, haba, etc.)

se presentan lectinas que muestran actividad específica a los grupos sanguíneos y pueden aglutinar eritrocitos animales y humanos. En *V. faba* se ha detectado un tipo específico de estas proteínas denominadas VFA (aglutinina *V. faba*) que altera la proliferación de ciertas células sanguíneas humanas o que son mitogénicas en linfocitos periféricos humanos (Allen et al. 1976, Goldstein y Hayes 1978, Hemperly et al. 1979). Con el fin de verificar posibles efectos de los extractos de *V. faba*, sobre el ciclo celular de los linfocitos humanos *in vitro*, se evaluó en la fracción S10 la presencia de lectinas, por medio de la prueba de hemaglutinación.

En tubos de ensaye se realizaron varias diluciones de los extractos de *V. faba* desde 1.5 mg/ml a 2.97 mg/ml, después se le adicionaron tres tipos de eritrocitos al 1% a) tripsinizados, b) eritrocitos tratados con pronasa y c) eritrocitos no tratados. Los eritrocitos humanos fueron de los grupos O Rh⁺ y A Rh⁺. Las suspensiones fueron incubadas durante 30 min a temperatura ambiente y 18 horas a 4°C y se les determinó la actividad aglutinante (Calderón y Córdoba 1976).

III. RESULTADOS

1.0. TRATAMIENTOS DIRECTOS CON PROPOXUR

Las concentraciones de 50, 100 Y 250 ppm de propoxur aplicadas directamente a los cultivos de linfocitos *in vitro* no incrementaron el valor normal de ICH comparado con el del testigo que contenía únicamente el medio. En 500 ppm fue tan tóxica que produjo la muerte celular (Tablas I y II, Figs. 12 y 13).

1.1. APLICACION DE EXTRACTOS DE RAICES TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROPOXUR

En los valores de los tres experimentos que se muestran en la tabla I no se obtuvieron diferencias significativas mediante la prueba de "t" de Student al compararse en grupos de dos, por tal razón se promediaron agrupando los datos de las 75 observaciones (excepto en 500 y 2000 ppm) y dichos promedios se presentan en la tabla II.

Los resultados de los estudios preliminares indicaron que no se incrementaron los valores de ICH en los linfocitos a los cuales se les agregaron los extractos de las raíces tratadas con 50 y 100 ppm de propoxur respecto al testigo con solamente el medio de cultivo y al que se le adicionó el

extracto sin propoxur. Sin embargo con extracto de raíces de Vicia faba tratadas con 250, 500, 1000, y 1500 ppm de propoxur aumentaron significativamente las frecuencias de ICH, comparadas con los dos testigos. A 2000 ppm el propoxur fue altamente tóxico produciendo necrosis de las raíces de V. faba, la frecuencia de ICH no se alteró, con respecto al valor de los testigos (Tabla II, Fig. 13).

1.2. APLICACION DE EXTRACTOS DE RAICES TRATADAS CON ETANOL A 0.1 M

En las tablas I y II y en las Figuras 1 y 2, se observó el incremento de las frecuencias de ICH con los extractos de raíces tratadas con etanol 0.1 M, de más del doble de los testigos pero sin activación metabólica los niveles de respuesta del etanol fueron similares a los testigos con y sin la fracción S10.

1.3. INDICE DE REPLICACION

Se determinó la cinética celular de la siguiente forma:

$$IR = \frac{1M1 + 2M2 + 3M3}{100}$$

donde: M1, M2 y M3 representaron los porcentajes de metafases de 1a, 2a y 3a divisiones celulares. Se consideran en M1 aquellas células cuyo DNA se replicó una sola vez después de

la adición de 5-BrdU, en M2 a las células cuyo DNA se duplicó dos veces en presencia de la 5-BrdU y cuyas cromátidas están unifilar y bifilarmente sustituidas por la 5-BrdU y en M3 aquellas que presentan mayor número de cromátidas bifilarmente incorporadas, ya que estuvieron tres ciclos con 5-BrdU (Fig. 11) (Krishna et al. 1985).

El índice de replicación mostró una cinética celular normal de los linfocitos tratados directamente con 50, 100 y 250 ppm de propoxur, con etanol a 0.1 M (sin activación metabólica) y con extractos de raíces tratadas con 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm de propoxur (con activación metabólica), con extractos de raíces tratadas con etanol 0.1 M (testigo positivo) y con la fracción S10 (testigo negativo) (Tabla III).

1.4. DETERMINACION DE PROTEINA DE LA FRACCION S10 DE Vicia faba

La evaluación de proteína total en la fracción S10 por medio del método de Lowry reveló una concentración promedio de 11.9 mg/ml.

1.5. EVALUACION DE LECTINA DE LA FRACCION S10

Los resultados de la prueba de hemaglutinación para una lectina de la fracción S10 fueron negativos.

V. D I S C U S I O N

En México se aplica un amplio espectro de pesticidas en los cultivos agrícolas para el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por microorganismos patógenos, que ocasionan pérdidas económicas a los agricultores. El propoxur es un insecticida carbámico ampliamente usado como agente controlador de insectos no solamente en la agricultura sino también en la industria y en el hogar. Sin embargo, se han estimado miles de accidentes de personas expuestas a estos agroquímicos y muchos de ellos están implicados en la inducción de cáncer, esterilidad y muerte por intoxicación (WHO 1986, Rasquinha et al. 1988).

Numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, han confirmado que varios insecticidas, fungicidas, herbicidas, etc., requieren del metabolismo animal o vegetal para ejercer efecto mutagénico y/o carcinogénico en diferentes organismos (Shirasu et al. 1982, Gentile et al. 1986, Plewa et al. 1988). Tomando en cuenta el riesgo que representa para la salud humana y animal ya sea directa o indirectamente (Sandermann 1988), en este trabajo se investigó el papel del metabolismo vegetal de *Vicia faba*, para biotransformar al propoxur, utilizando como sistema de activación *in vivo* a sus raíces, a las cuales se les expuso a diferentes concentraciones del insecticida y cuyos extractos fueron aplicados a cultivos de linfocitos humanos para evaluar su capacidad mutagénica a través del intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

En todos los tratamientos se realizan tres experimentos, excepto en 500 y 2000 ppm en los que se hicieron solamente

dos. Los valores de ICH obtenidos se muestran en la tabla I, en donde se nota que las diferencias son insignificantes al contrastarlas mediante la prueba de t de Student y por esta razón se promedian. El uso de esta prueba paramétrica se basa en el hecho de que la distribución de ICH en poblaciones humanas es del tipo normal (Gómez-Arroyo et al. 1992). Por otro lado, la obtención de frecuencias tan similares de un experimento a otro implica que la prueba de ICH es confiable y objetiva (Tabla I y Fig. 12).

Se ha descrito que el propoxur no provoca mutaciones en las bacterias, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* sin la activación metabólica de hígado de mamífero (Shirasu et al. 1976, Brusick et al. 1980) y *Salmonella typhimurium* con y sin dicha fracción (Blevins et al. 1977a, De Lorenzo et al. 1978, Shirasu et al. 1982), así como en el ensayo de conversión génica mitótica en *Saccharomyces cerevisiae* (Siebert y Eisenbrand 1974, Siebert y Lemperle 1974). También es inefectivo en la inducción de micronúcleos y de mutaciones letales dominantes en ratones (Seiler 1977, Tyrkiel 1977).

Al aplicar el propoxur directamente sobre los linfocitos en cultivo no se observa respuesta positiva en la inducción de ICH y la concentración mayor les provoca la muerte (Tabla II), estos resultados coinciden con los encontrados por González Quirasco (1991) con el mismo sistema de prueba, pero son opuestos a los obtenidos por González-Cid et al. (1990).

Cuando se tratan directamente las raíces de *Vicia faba* con esta sustancia se inducen alteraciones cromosómicas (Salomón 1987) y al hacer los tratamientos sobre los linfocitos humanos en cultivo con los extractos de *V. faba*, previamente expuestos a propoxur durante 4 horas (activación

vegetal in vivo), se logran diferencias significativas en la inducción de ICH con respecto al testigo en todos los casos, excepto en 2000 ppm, notándose una clara respuesta de concentración-efecto; en 1600 y 1500 ppm las frecuencias de ICH rebasan el doble del testigo (Tabla II). Estas evidencias permiten concluir con seguridad la participación del metabolismo de *V. faba* (fracción S10) en la transformación del propoxur de promutágeno a mutágeno, la cual fue evaluada mediante el evento citogenético mencionado. El propoxur a 2000 ppm provoca necrosis de la raíz lo cual implica que al morir las células del haba no se lleva a cabo la biotransformación del insecticida, se corrobora de esta manera que es el metabolismo el que participa y no solo la presencia de las células.

Los resultados negativos encontrados tanto en este trabajo, al aplicar el propoxur directamente sobre los linfocitos, como en los descritos por otros autores con y sin la fracción S9 de hígado de mamíferos (definida por Higashi et al. (1981) como los extractos celulares obtenidos por ultracentrifugación a 9000 xg), así como en animales completos y el hecho de provocar efecto positivo en *V. faba* o al agregar extractos que contienen sus metabolitos (Tabla II), sugiere que se trata de un mutágeno indirecto activado únicamente por el metabolismo de las plantas.

El comportamiento del propoxur concuerda con el de los herbicidas atrazina (Plewa y Gentile 1976), cianazina, simazina (Matijesevic et al. 1980, Plewa et al. 1984, Means et al. 1988) alacloro y propacloro (Gentile et al. 1977, Plewa et al. 1984; y los insecticidas heptacloro y clordano (Gentile et al. 1982) que son activados por el metabolismo vegetal.

Tanto en plantas como en animales, muchas de las enzimas que intervienen en el metabolismo de los xenobióticos se localizan en el retículo endoplásmico (Velemínsky y Gichner 1988). Sin embargo, en los vegetales varias enzimas que participan en la activación mutagénica no solo se han detectado en éste organelo sino también en el citoplasma y en la región de la pared celular (Sandermann 1988). Además de las reacciones enzimáticas que aparecen en los animales, los vegetales incluyen las denominadas enzimas de conjugación secundaria, las cuales forman metabolitos insolubles en agua y que por lo general son biológicamente inactivos y pueden depositarse en compartimientos específicos de la célula vegetal o incorporarse dentro de alguna estructura celular (Shimabukuro et al. 1982).

Las reacciones del metabolismo oxidante son catalizadas por oxigenasas de función múltiple (MFO), cuya actividad es insertar un átomo de oxígeno a partir de O_2 para producir agua. Las MFO tienen citocromo P-450 (cit P-450) con actividad de oxidasa terminal, estas han sido detectadas en microsomas de más de 30 especies vegetales (Higashi et al. 1983, Higashi 1985) consideradas como análogas al cit P-450 de la fracción S9 de hígado de rata (Rich y Bendall 1975, Higashi 1985, 1988). El citocromo P-450 de plantas superiores tiene una alta especificidad a sustratos y es menos heterogéneo que el de mamíferos. Esta enzima ha sido involucrada en la inducción de metabolitos secundarios que son mutagénicos a partir de varios promutágenos como benzo(a)pireno y 2-aminofluoreno. La nicotinamida dinucleótido fosforilada reducida (NADPH) es la mejor fuente de electrones para la reducción del cit P-450, tanto en vegetales como en animales (Frear et al. 1969, Higashi et al. 1981).

Hay evidencias experimentales que indican que tanto las fracciones enzimáticas como las enzimas aisladas de plantas están involucradas en la peroxidación lo que conduce al aumento de la mutagenicidad de algunos agentes químicos, las oxidaciones se consideran entre las reacciones más importantes en el metabolismo de los xenobióticos (Donh y Krieger 1981) y varias enzimas de plantas pueden jugar un papel importante en la transformación oxidante (Lamoureux y Frear 1979). Las peroxidasas son las enzimas más sobresalientes (Yamasaki 1974). Las peroxidasas de plantas catalizan dos categorías generales de reacciones la peroxidasa clásica que utiliza H_2O_2 y otra que emplea oxígeno molecular (Lamoureux y Frear 1979, Plewa et al. 1991), provocando la formación de oxígenos activos que producen daño al DNA (Sandermann 1988). Una evidencia indirecta indica que las peroxidasas podrían estar involucradas en la activación del herbicida hidrazida málica que es un clastógeno en *Vicia faba* (Heindorff y Rieger 1984).

Aunque las reacciones reductoras son mucho menos importantes que las oxidantes, varias de ellas participan en el metabolismo de los xenobióticos en los vegetales e incluyen la arilnitrorreducción dependiente del flavín adenina dinucleótido (FAD) y del nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) o la reducción del grupo NO_2 (Shimabukuro et al. 1982).

La hidrólisis es catalizada por varias hidrolasas, esterasas, amidasas, O-alquilhidrolasas, etc., que representa un mecanismo usual de degradación de xenobióticos vegetales (Menn 1978, Shimabukuro et al. 1982). La hidrólisis es el paso determinante en la tolerancia selectiva de varias especies de plantas contra algunos herbicidas.

La conjugación representa la reacción de sustratos endógenos con los productos del metabolismo de los xenobióticos (Lamoureux y Rusnes 1986). En las plantas los productos finales de esta reacción son los glucósidos (conjugación con la glucosa), los conjugados de glutatión y los conjugados de aminoácidos, esta vía enzimática también activa promutágenos vegetales, un ejemplo de ello es la formación de la azidoalanina en semillas de cebada, que es un producto mutagénico de la azida de sodio (Stafford 1971a, Shimabukuro et al. 1982, Owais et al. 1983).

La reacción más importante de desintoxicación en las plantas es la conjugación con glutatión reducido (GSH), catalizada por las GSH transferasas. El glutatión forma conjugados con muchos tipos de plaguicidas y tiene papel primordial en su toxicidad selectiva (Lamoureux y Frear 1979, Lamoureux y Rusnes 1981, Velemínsky y Gichner 1988).

Específicamente con respecto al propoxur las reacciones enzimáticas de *Vicia faba* para la generación de productos mutagénicos implicados en la inducción de ICH, es posible que se realicen mediante reacciones de tipo hidroxilación, N-desalquilación, oxidación o nitrosación, etc., que originan derivados o formas activas que ocasionan daño al DNA. En la Fig. 14 se muestra la vía metabólica de este compuesto carbámico por diferentes organismos.

En ciertas plantas se han desarrollado *in vitro* estas reacciones con algunos compuestos, así después de tratar a un vegetal con aldicard se producen elevadas cantidades de sulfóxidos y sulfonas de las cuales se ha descrito su oxidación en extractos de raíces de varias especies vegetales. Con otros compuestos se ha mostrado que las

enzimas vegetales oxidan el enlace tioéter para originar sulfóxidos, pero la enzima que interviene en dicha reacción es desconocida (Frear et al. 1969, Krueger 1975).

Sin embargo, se conoce que en los vegetales, así como en sus distintas partes (tallos, hojas, raíces, etc.) existe heterogeneidad en la capacidad para metabolizar agentes químicos, así como en la formación de sus productos metabólicos y en su actividad biológica (o blanco de acción) en diferentes sistemas de prueba (Plewa et al. 1988).

Con el fin de verificar la metodología utilizada en este trabajo se emplea un testigo al cual se le agrega únicamente el extracto de las raíces sin tratamiento, se obtiene un promedio de ICH que no difiere del testigo que contiene solamente el medio de cultivo (Tabla II), esto permite concluir que los extractos de la raíz de *Vicia* no tienen efecto por sí mismos sobre los linfocitos.

Por otro lado, para tener la certeza de la capacidad metabólica de *V. faba*, se emplea como testigo positivo a los extractos de las raíces tratadas con etanol 0.1 M; los datos obtenidos demuestran la activación de dicho compuesto por la planta, debido a que el ICH aumenta a más del doble que cuando se aplica este alcohol directamente sobre los linfocitos (Tabla II), dicho comportamiento es similar al encontrado por Takehisa et al. (1982, 1988) y Takehisa y Kanaya (1983), quienes describen al etanol como un potente inductor de ICH en el cultivo de células de criceto chino con el mismo sistema de activación vegetal.

Se ha comprobado que el etanol es metabolizado por las raíces de *V. faba* in vivo, principalmente a acetaldehído por

la enzima citosólica alcohol deshidrogenasa (ADH) la cual requiere de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) como cofactor y a ácido acético por la aldehído deshidrogenasa (ALDH) dependiente de NAD, reacción que ocurre principalmente en las mitocondrias y en parte del citoplasma (Obe y Ristow 1977, Obe et al. 1979). El acetaldehído es el principal agente inductor de ICH en linfocitos humanos in vitro en presencia de la enzima ADH y del cofactor NAD (Obe et al. 1986)

Los resultados de ICH que se logran con etanol activado (Tabla II) comprueban notablemente la eficiencia de las condiciones experimentales en la obtención de homogeneizados vegetales activos, en la elección de las horas de tratamiento y en la cantidad de extractos de las raíces con un "contenido" adecuado de productos metabólicos conocidos, aunque desconocidos en el caso del propoxur, capaces de inducir ICH en las células humanas.

Un parámetro de importancia en las investigaciones de activación vegetal es el contenido de proteína en los homogeneizados extraídos de la parte vegetal utilizada, ya que se ha sugerido que podría compararse con la actividad de las enzimas involucradas en la activación de varios promutágenos (Stafford 1971b, Callen 1982). Considerando este parámetro, en esta investigación se determinó la concentración de proteína de la fracción microsómica S10, la cual fue similar a la descrita por Takehisa et al. 1988.

Con el objeto de estimar las acciones del etanol y del propoxur sobre el ciclo celular se llevó a cabo el registro de células en primera, segunda y tercera divisiones (Tabla III) y el análisis estadístico de la cinética celular

demuestra que no hay efecto en ninguno de los tratamientos de propoxur y etanol, con y sin activación metabólica así como tampoco con el extracto solo, al compararlos con el testigo que únicamente contiene el medio de cultivo. Por lo tanto se puede concluir que no se presenta inhibición de la progresión del ciclo celular. Los resultados con etanol activado concuerdan con los de Takehisa et al. (1988).

El comportamiento posterior de los metabolitos mutagénicos generados por los mecanismos de activación vegetal es diverso, pueden ser conjugados y almacenados en la planta hasta su liberación al ser consumidos por el hombre o los animales producen efectos mutagénicos y/o carcinogénicos o bien unirse al DNA de las células vegetales, les ocasiona daño o fragmentación (Nakanishi y Schneider 1979, Wildeman y Nazar 1982, Higashi 1988, Sandermann 1988).

Tomando en cuenta lo anterior este estudio tiene importancia desde el punto de vista de la salud humana, ya que los resultados han mostrado el papel del metabolismo vegetal sobre la mutagénesis ambiental y como muchos cultivos son tratados con plaguicidas antes de ser consumidos, pueden ser metabolizados y almacenados en las diferentes partes de la planta, incluyendo la raíz, la cual ha sido descrita con mayor actividad metabólica que las hojas y el tallo (Takehisa et al. 1988); de tal manera que el tejido vegetal en el momento de ser ingerido ya sea por el hombre o por los animales introduce metabolitos en la cadena alimenticia y probablemente ocasiona efectos adversos, ya que se desconocen sus mecanismos de acción o las propiedades toxicológicas de los conjugados vegetales en los mamíferos y en otros organismos.

VII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos de esta investigación se puede concluir lo siguiente:

- El propoxur requiere de la activación enzimática de V. faba para provocar efecto mutagénico en células sanguíneas in vitro.
- Los extractos de raíces de V. faba expuestas a propoxur son capaces de inducir in vitro intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos periféricos humanos.
- No se encontró actividad mutagénica de la fracción S10 en el mismo sistema de prueba.
- La eficiencia de la metodología en la preparación y la extracción de la fracción S10 y de los metabolitos activos del propoxur y del etanol se refleja en el incremento estadísticamente significativo de ICH.
- La capacidad del sistema enzimático de las raíces de V. faba para activar al propoxur se comprueba con un testigo positivo ya empleado.
- La utilización de la prueba de ICH para evaluar el efecto citogénético de un compuesto químico en linfocitos periféricos humanos in vitro con activación vegetal es confiable y objetiva.

V. R E F E R E N C I A S

Abe S. y Sasaki M. 1977. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 1635-1641.

Ahmed F., Hart R. y Lewis N. 1977. Pesticide induced DNA damage and its repair in cultured human cells. *Mutat. Res.* 42, 161-174.

Aldridge W. N. y Magos L. 1978. Carbamates, thiocarbamates, and dithiocarbamates. Commission of the European Communities, Luxembourg, 454 p.

Aldridge W. N. y Reiner E. 1972. Enzyme inhibitors as substrates. Interaction of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 328 p.

Allen H. J., Desai M. N. y Neuberger A. 1976. The purification of the glycoprotein lectin from the broad bean (*Vicia faba*) and comparison of its properties with lectins of similar specificity. *Biochem. J.* 155, 127-135.

Ames B. N., McCann J. y Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian mutagenicity test. *Mutat. Res.* 3, 347-363.

Barberá C. 1975. *Pesticidas Agrícolas*. Omega, Barcelona, España.

- Bender M. A., Griggs H. G. y Bedford J. S. 1974. Recombinational DNA repair and sister-chromatid exchanges. *Mutat. Res.* 24, 117-123.
- Blevins R., Lee M. y Regan J. 1977a. Mutagenicity screening of five methyl carbamate insecticides and their nitroso derivatives using mutants of *Salmonella typhimurium* LT2. *Mutat. Res.* 56, 1-6.
- Blevins R. D., Lijinsky W. y Regan J. D. 1977b. Nitrosated methylcarbamate insecticides: effect on the DNA of human cells. *Mutat. Res.* 44, 1-7.
- Brusick D., Simmon V., Rosenkranz H., Ray V. y Stafford R. 1980. An evaluation of the *Escherichia coli* WP2 and WP2 urv A reverse mutation assay. *Mutat. Res.* 76, 169-190.
- Callen D. F. 1982. Metabolism of chemicals to mutagens by higher plants and fungi. En: Klekowski E. J. Jr. (Ed.). *Environmental mutagenesis, carcinogenesis, and plant biology*. Praeger Scientific. Nueva York, Vol. 1, pp. 33-65.
- Calderón A. R. y Córdoba F. 1976. Immunosuppressive activity of *Phaseolus vulgaris* extracts in mice. *Eur. J. Immunol.* 6, 522-525.
- Carrano A. V., y Thompson L. H. 1982. Sister chromatid exchange and single gen mutation. En: *Sister chromatid exchange*. Wiley, Nueva York, pp. 59-86.
- Casida J. E. 1968. Mode of action of carbamates. *Ann. Rev. Entomol.* 8, 39-44.

- Cole D. 1983. Oxidation of xenobiotics in plants. En: Hutson D. H. y Roberts T. R. (Eds.). Progress in pesticide biochemistry and toxicology. Vol. 3, pp. 199-254.
- Constantin M.J. y Nilan R.A. 1982. Arylamine N-oxidation by microsomal fraction of germinating pea seedlings (*Pisum sativum*). J. Agric. Food Chem. 31, 1276-1282.
- Dawson J.A., Heath D.F., Rose J.A., Thain E.M. y Ward J.B. 1964. The excretion by humans of the phenol derived in vivo from 2-isopropoxyphenyl-N-methylcarbamate. Bull. World. Health Org. 30, 127-134.
- De Lorenzo F., Staiano N., Silengo L. y Cortese R. 1978. Mutagenicity of diallate, sulfallate and triallate and relationship between structure and mutagenic effects of carbamate used widely in agriculture. Cancer Res. 38, 13-15.
- Dohn D. R. y Krieger R. I. 1981. Oxidative metabolism of foreign compounds by higher plants. Drug Metabol. Rev. 12, 119-158.
- Dulieu H.L. y Dalebroux M.A. 1977. Spontaneous and induced reversion rates in a double heterozygous mutant of *Nicotiana tabacum* var. Xanthin c: dose response relationship. Mutat. Res. 30, 63-70.
- Eisenbrand G., Ungerer O. y Preussmann R. 1974. Formation of N-nitroso compounds from agricultural chemicals and nitrite. En: Bogoosky Py Walker (Eds.). N-nitroso compounds in environmental. International Agency for Research on Cancer. Scientific Publication No. 9, Lyon, pp. 71-74.

- Eisenbrand G., Ivankovic S., Preussmann R., Schmahl D. y Wiessler M. 1975a. Some recent results on the chemistry, formation and biological activity of N-nitroso compounds Gaun. Monogr. Cancer Res. 17, 133-134.
- Eisenbrand G., Ungerer O. y Preussmann R. 1975b. The reaction of nitrite with pesticides II. Formation, chemical, properties, and carcinogenic activity of the N-nitroso derivative of N-methyl-1-naphthylcarbamate (carbaryl). Food Cosmet. Toxicol. 13, 365-367.
- Ecobichon D.F. y Joy R. 1984. Pesticides and neurological diseases. C.R.C. Press Boca Raton, Florida.
- EMS (Environmental Mutagen Society) 1975. Environmental mutagenic hazards. Science 187, 503-514.
- Epstein S. S. y Mantel N. 1972. Detection of chemical mutagens by the dominant lethal assay in the mouse. Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 288-325.
- Eto M., Seifert J., Engel J. y Casida J. 1980. Organophosphorus and methyl carbamate teratogens: structural requirements for inducing embryonic abnormalities in chickens and kynurenine formamidase inhibition in mouse liver Toxicol. Appl. Pharmacol. 54, 20-30.
- Evans J. H. y O'Riordan M. L. 1975. Human peripheral blood lymphocytes for analysis of chromosome aberrations in mutagen test. Mutat. Res. 31, 135-148.
- Frear D. S., Swanson L. y Tanaku F. S. 1969. N-demethylation substituted 3-(phenyl)-1-methylureas: isolation and cha-

- racterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochem.* 8, 2157-2169.
- Fukuto T.R. 1972. Metabolism of carbamate insecticides. *Drug. Metab. Rev.* 1, 117-150.
- Gentile J. M., Wagner E. D. y Plewa M. J. 1977. The detection of weak recombinogenic activities in the herbicides alachlor and propachlor using a plant-activation bioassay. *Mutat. Res.* 48, 113-116.
- Gentile, J. M., Gentile G. J., Bultman J., Sechriest R., Wagner E. D. y Plewa M. J. 1982. An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* 101, 19-29.
- Gentile J. M., Gentile G. J. y Plewa M. J. 1986. In vitro activation of chemical by plant: a comparison of techniques. *Mutat. Res.* 154, 53-58.
- Gichner T., Badaev S. A., Pospisil F. y Velemínsky J. 1990. Effects of humic acids, para-aminobenzoic acid and ascorbic acid and on the mutagenicity of nitrosopropoxur. *Mutat. Res.* 178, 125-134.
- Goldstein I. J. y Hayes C. E. 1978. The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35, 127-340.
- Gómez-Arroyo S., Noriega-Aldana N., Osorio A., Galicia F., Ling S. y Villalobos-Pietrini R. 1992. Sister-chromatid exchanges analysis in a rural population of Mexico exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 281, 173-179.

- González-Cid M., Loria D. y Matos E. 1988. Nitroso-aldicarb induces sister-chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* 204, 665-668.
- González-Cid M., Loria D. y Matos E. 1990. Genotoxicity of the pesticide propoxur and its derivative, NO-propoxur, on human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* 232, 45-48.
- González-Quirasco I. 1991. Efecto citogenético del insecticida Baygón (propoxur) sobre cultivo de linfocitos humanos. Tesis Profesional, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Jalapa, Ver. México.
- Heindorff K. y Rieger R. 1984. Exogenous factors affecting yield and intrachromosomal distribution of maleic hydrazide-induced chromatid aberrations in *Vicia faba*. *Biol. Zbl.* 103, 9-23.
- Hemperly J. J., Hopp T. P., Becker J. W. y Cunningham B. A. 1979. The chemical characterization of fava lectin isolated from *Vicia faba*. *J. Biol. Chem.* 254, 6803-6810.
- Higashi K., Nakashima K., Karasaki Y., Fukunaga M. y Mizuguchi H. 1981. Activation of benzo[a]pyrene by microsomes of plant tissues and their mutagenicity. *Biochem. Int.* 2, 373-380.
- Higashi K., Ikeuchi K. y Karasaki Y. 1982. Use of metabolic activation systems of tulip bulbs in the Ames test for environmental mutagens. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 505-510.

- Higashi K., Ikeuchi K., Karasaki Y. y Obara M. 1983. Isolation of immunochemically distinct form of cytochrome P-450 from microsomes of tulips bulbs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 46-52.
- Higashi K. 1985. Microsomal cytochrome P-450 in higher plants. En: Tagashira Y. y Omura T. (Eds.). P-450 and chemical carcinogenesis. *Gaun Monogr. on Cancer Res. Vol.* 30, pp. 49-66.
- Higashi K. 1988. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* 197, 273-288.
- Holliday R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5, 282-304.
- Ishii Y. y Bender M. A. 1978. Factors influencing the frequency of mytomycin C-induced sister chromatid exchanges in 5-bromodeoxiuridine substituted lymphocytes in culture. *Mutat. Res.* 51, 411.
- Ishii Y. y Bender M.A. 1980. Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 79, 19-32.
- Ishidate M. y Odashima G. 1977. Chromosome test with 134 compounds in Chinese hamster cells in vitro. A screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.* 48, 337-354.
- Jasinska J., Steffen J. A. y Michalowski A. 1977. 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.
- Karasaki Y., Ikeuchi K. e Higashi K. 1983. Highly variable distributions of trans-cinnamate 4-monooxygenase in a variety of plant tissues. *J. Univ. Occup. Environ. Health* 5, 329-335.
- Kato H. 1974. Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BrdU-labelling method. *Nature* 251, 70-72.
- Kato H. 1980. Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2, 69-77
- Kimmerle G. e Iyatomi A. 1976. Toxicity of propoxur to rats by subacute inhalation. *Jpn. J. Ind. Health* 18, 375-382.
- Kinsella A. R. y Radman M. 1978. Tumor promotor induces sister chromatid exchanges: relevance to mechanism of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75, 6149-6153.
- Krishna J. A. y Casida J. E. 1966. Fate in rats of the radiocarbon from ten variously labelled methyl- and dimethyl carbamate-C¹⁴ insecticide chemicals and their hydrolysis products. *J. Agr. Food Chem.* 14, 98-116.
- Krishna G., Xu J., Nath J., Petersen M. y Ong T. 1985. In vivo cytogenetic studies on mice exposed to ethylene dibromide. *Mutat. Res.* 158, 81-87.

- Krueger H.R. 1975. Phorate sulfoxidation by plant root extracts. *Pesticide Biochem. Physiol.* 5, 396-401.
- Krueger H.R. 1977. Aldicarb sulfoxidation by plant root extracts. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7, 154-160.
- Kuhr R. L. y Casida J. E. 1967. Persistent glycosides of metabolites of methylcarbamate insecticide chemicals formed by hidroxylation in bean plants. *J. Agr. Food Chem.* 15, 814.
- Kuhr R. L. 1968. Metabolism of methylcarbamate insecticide chemicals in plants. *J. Sci. Food Agric.* 44 (Suppl.), 43-49.
- Lamoureux G. L. y Frear D. S. 1979. Pesticide metabolism in higher plants: *in vitro* enzyme studies. En: Paulson G. D. Frear D. S. y Marks E. P. (Eds.). ACS Symp. Series, Washington, Vol. 97, pp. 77-128.
- Lamoureux G. L. y Rusness D. G. 1981. Catabolism of glutathione conjugates of pesticides in higher plants. En: Rosen J. D., Magee P. S. y Casida J. E. (Eds.). Sulfur in pesticide action and metabolism. American Chemical Society, Washington, pp. 133-164.
- Lamoureux G. L. y Rusness D. G. 1986. Xenobiotic conjugation in higher plants. En: Paulson G. D., Caldwell J., Hudson D. H. y Menn J. J. (Eds.). Xenobiotic conjugation chemistry. ACS Symp. Series, Vol. 299, pp. 62-107.
- Latt S. A. 1973. Microfluorometric detection of DNA replication in human metaphase chromosome. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 70, 3395-3399.

Latt S. A. 1974. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin-C. Proc. Nat. Acad. Sci.(USA) 71, 3162-3166.

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 in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. Science 205, 1273-1275.

Lijinsky W. y Elespuru R. 1976. Mutagenicity and carcinogenicity of N-nitroso derivatives of carbamate insecticides. En: Walker E. A., Bogowski P. y Griciute L. (Eds.). Environmental N-nitroso compounds: analysis and formation. Sci. Publ. No. 4 International Agency for Research on Cancer, Sci. Publ. No. 14 Lyon, pp. 425-428.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Parr A. L. y Randall R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Margison G. P. y Kleihues P. 1975. Chemical carcinogenesis in the nervous system: preferential accumulation of O₆-methylguanine in rat brain DNA during repetitive administration of N-methyl nitrosurea. Biochem. J. 148, 521-525.

Matijesevic Z., Erceg Z., Denic R., Bacun V. y Alacevic M. 1980. Mutagenicity of herbicide cyanazine: plant activation bioassay. Mutat. Res. 74, 212. (Abstr.).

- Means J. C., Plewa M. J. y Gentile J. M. (1988). Assessment of the mutagenicity of fractions from s-triazine-treated Zea mays. *Mutat. Res.* 196, 325-336.
- Meehan T. D. y Cooscia C. J. 1973. Hidroxylation of genariol and nerol by monooxygenase from *Vinca rosea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 1043-1048
- Menn J. J. 1978. Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. *Environ. Health Perspect.* 27, 113-124
- Metcalf R.L. 1975. Organic insecticides, their chemistry and mode of the action. Intersci. Publish., Londres.
- Morgan W. F. y Cleaver J. E. 1982. 3-amine benzamide synergistically increases sister chromatid exchanges in cells exposed to methane sulfonate but no to ultraviolet light. *Mutat. Res.* 104, 361-366.
- Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen H. y Degraeve N. 1984. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of insecticides. En: Kirsch-Volders M. (Ed.). *Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of industrial Pollutants*. Cap.3. Plenum, Nueva York. pp. 127-203.
- Mumma R. O. y Davidonis G. H. 1983. Plant tissue culture and pesticide metabolism. En: Hutson D. H. y Roberts T. R. (Ed.). *Progress in pesticide biochemistry and toxicology*. Academic Press, Nueva York, Vol. 3, pp. 255-278.
- Nakanishi Y. y Schneider E. L. 1979. In vivo sister chromatid exchanges: a sensitive measure of DNA damage. *Mutat. Res.* 60, 329-337.

- Obe G. y Ristow H. 1977. Acetaldehyde, but no ethanol, induces chromatids exchanges in Chinese hamster cells in vitro. *Mutat. Res.* 56, 211-213.
- Obe G., Natarajan T., Meyers A. y Den Hertog A. 1979. Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood in vitro, and of SCEs in bone-marrow cells of mice in vivo by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutat. Res.* 68, 291-294.
- Obe G., Jonas R. y Schmidt S. 1986. Metabolism of ethanol in vitro produces a compound wich induces sister-chromatid exchange in human peripheral lymphocytes in vitro: Acetaldehyde not ethanol is mutagenic. *Mutat. Res.* 174, 47-51.
- Oikawa A., Thoda H., Kanai M., Miwa M. y Sugimura T. 1980. Inhibitors of poli, (adenosine diphosphate ribose), polymerase induce sister chromatid exchanges. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 97, 1311-1316.
- Oonithan R. S. y Casida J. E. 1966. Metabolites of methyl- and dimethylcarbamate insecticide chemicals as formed by rat liver microsomes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1, 59-64.
- Oonithan R. S. y Casida J. E. 1968. Oxidation of methyl- and dimethylcarbamate insecticide chemicals by microsomal enzymes and anticholinesterase activity of metabolites. *J. Agr. Food Chem.* 16, 29-34.
- Owais W. M., Rosichan J. L., Ronald R. C. y Kleinhofs A. 1983. A mutagenic metabolite synthesized by *Salmonella*

typhimurium grown in the presence of azide is azidoalanine. Mutat. Res. 118, 229-239.

Painter R. B. 1982. A replication model for sister chromatid exchange. En: Sandberg A. A. (Ed.). Progress and topics in cytogenetics sister chromatid exchange. Alan Liss, Nueva York, Vol. 2, pp. 67-97.

Perry P. y Wolff S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature (London) 251, 156-158.

Perry P. y Evans H. J. 1975. Cytological detection of mutagen, carcinogen exposure by chromatid exchange. Nature 258, 121-124.

Pintér A., Csík M., Török A., Surján A., Kelécsenyi Zs. y Kocsis Zs. 1990. Cytogenetic effect of the thiocarbamate herbicides, butylate, molinate and vernolate in the mouse bone marrow micronucleus test. Mutat. Res. 242, 279-283.

Plewa M. J. y Gentile M. J. 1976. Mutagenicity of atrazine: a maize-microbe bioassays. Mutat. Res. 38, 287-292.

Plewa M. J. y Gentile J. M. 1982. The activation of chemicals into mutagens by green plants. En: de Serres F. J. y Hollaender A. (Eds.). Chemical mutagens: principles and methods for their detection, Plenum, Nueva York, Vol. 7, pp. 401-420.

Plewa M. J., Wagner E. D., Gentile M. J. y Gentile J. M. 1984. An evaluation of the genotoxic properties of herbicides

following plant and animal activation. *Mutat. Res.* 136, 233-245.

Plewa M. J., Wagner E. D. y Gentile J. M. 1988. The plant cell microbe assay for the analysis of plant-activated promutagens. *Mutat. Res.* 197, 207-209.

Plewa M. J., Smith R. S. y Wagner E. D. 1991. Diethyldithiocarbamate supresses the plant activation of aromatic amines by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutat. Res.* 247, 57-64.

Proctor N.H. y Casida J.E. 1975. Organophosphorus and methyl carbamate insecticide teratogenesis: diminished NAD in chicken embryos. *Science* 190, 580-582.

Rainaldi R. y Mariani T. 1982. The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool for identifying agents directly interacting with DNA. *Mutat. Res.* 103, 333-337.

Rasquinha I.A., Wildeman A.G. y Nassar R.N. 1988. Studies on the use of plant extracts in assessing the effects of the plants metabolism on the mutagenicity and the toxicity of pesticides. *Mutat. Res.* 197, 261-272.

Regan J.D., Setlow R.B., Blevins R. D. y Lijinsky W. 1975. The effect nitrosocarbaryl and nitrosocarbaryl-like compounds on the DNA of human cells. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 16, 85-92.

Rich P. R. y Bendall D. S. 1975. Cytochrome components of plant microsomes. *Eur. J. Biochem.* 55, 333-341.

- Roszkowski P. 1982. Effect of the preparation propoxur on intrauterine development and on the state of bone formation in the progeny of the rat. *Ginek. Pol.* 53, 201-207.
- Salomón A.M. 1987. Determinación del efecto citogenético del insecticida propoxur (Baygon) en células meristemáticas de *Vicia faba*. Tesis Profesional, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Jalapa, Ver., México.
- Sandermann H. 1988. Mutagenic activation of xenobiotic by plant enzymes. *Mutat. Res.* 197,183-194.
- Schlagbauer B. G. L. y Schlagbauer A. W. L. (1972). The metabolism of carbamate pesticides. A literature analysis *Residue Rev.* 42, 10-85.
- Schwartz J. L. Banda M. J. y Wolff S. 1982. 12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) induces sister chromatid exchanges and delays in cell progression in Chinese hamster ovary and human cell lines. *Mutat. Res.* 92, 393-397.
- Scott B. R., Sparrow A. H., Schwemmer S. S. y Schairer L. A. 1978. Plant metabolic activation of 1,2-dibromoethane (EDB) to a mutagen of greater potency. *Mutat. Res.* 49, 203-212.
- Seiler J. P. 1977. Nitrosation in vitro and in vivo by sodium nitrite, and mutagenicity of nitrogenous pesticides. *Mutat. Res.* 48, 225-236.
- Shafer D. A. 1982. Alternative replication bypass mechanisms for sister chromatid exchange. En: Sandberg A. A. (Ed.).

Progress and topics in cytogenetics sister chromatid exchange. Alan Liss, Nueva York, Vol. 2. pp. 67-97.

Shimabukuro R. H., Lamoureux G. L. y Frear F. S. 1982. Pesticide metabolism in plants reactions and mechanisms. En: Matsumura F. y Murti C. R. K. (Ed.). Biodegration of pesticides. Plenum, Nueva York, pp. 21-66.

Shirasu Y., Moriya M., Kato K., Furumashi A. y Kada T. 1976. Mutagenicity screening of pesticides in microbial system. Mutat. Res. 40, 19-30.

Shirasu Y., Moriya M., Tezuka H., Teramoto S., Ohta T. e Inoue T. 1982. Mutagenicity screening studies on pesticides. En: Sugimura T., Kondo S. y Takabe H. (Eds.). Enviromental mutagens and carcinogens. Alan Liss, Nueva York, pp. 331-335.

Shrivastava S. P., Tsukamoto M. y Casida J. E. 1964. Oxidative metabolism of C¹⁴-labeled Baygon by living flies house and by house fly enzyme preparation. J. Econ. Entomol. 62, 483-507.

Siebert D. y Eisenbrand G. 1974. Induction of mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae* by N-nitrosated pesticides. Mutat. Res. 22, 121-126.

Siebert D. y Lemperle E. 1974. Genetic effects of herbicides: induction of mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res. 22, 111-120.

Soják S. 1977. The effect of 2-isopropoxiphenyl-N-methyl-N-nitrosocarbamate on barley. Gen. Slecht. 13, 223-230.

- Stafford H. A. 1971a. The metabolism of aromatic compounds. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25, 459-486.
- Stafford H. A. 1971b. Mutagenic activation of pesticides by plant enzymes. *Mutat. Res.* 167, 193-213.
- Stetka D. G. 1982. Operative and non-operative mechanisms of sister chromatid exchange. En: Sandberg A. A. (Ed.). *Progress and topics in cytogenetics sister chromatid exchange.* Alan Liss, Nueva York, Vol. 2, pp. 67-97.
- Still G. G. y Rusnes D. G. (1977). S-cysteinyl-hydroxychloropham: formation of the S-cysteinyl conjugate of isopropyl-3'-chloro-4-hidroxicarbamilate in oat (*Avena sativa* L). *Pestic. Biochem. Physiol.* 7, 210-219.
- Takehisa S. y Wolff S. 1977. Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by carcinogenic mutagens requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* 45, 263-270.
- Takehisa S. y Wolff S. 1978. Sister chromatid exchanges induced in lymphocytes by 2-aminofluorene and 2-acetylaminofluorene after *in vitro* and *in vivo* metabolic activation. *Mutat. Res.* 45, 263-270.
- Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. 1982. Induction of SCEs in CHO cells by extracts from *Vicia faba* roots exposed to ethanol. *Mutat. Res.* 105, 169-174.
- Takehisa S. y Kanaya N. 1983. A comparison of *Vicia faba* root S10 and rat liver S9 activation of ethanol, maleic hidrazide and cyclophosphamide as measured by sister-

chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 197, 195-205.

Takehisa S. 1986. Pro-mutagen activation by *Vicia faba* measurement with SCE induction in CHO cells. *Bil. Zbl.* 105, 37-40.

Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. 1988. Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on the induction of sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 197, 195-207.

Tannenbaum S.R., Inskey A.J., Weiran M. y Bishop W. 1974. Nitrite in human. Its possible relationship to nitrosamine formation. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 79-84.

Tice R. R. y Hollaender A. (Eds.). 1984. Sister chromatid exchanges: 25 years of experimental research. Part A: The nature of SCEs. Plenum Press, Nueva York.

Tyrkiel E. 1977. Mutagenic action of isopropoxyenyl-N-methyl carbamate (propoxur) on mouse gametes. *Roez. Pzh.* 23, 601-613.

Tsukamoto M. 1967. Metabolism of methylcarbamate insecticides by the NADPH₂-requiring enzyme system from house flies. *Nature* 213, 49-55.

Tsukamoto M. y Casida J.E. 1967. Albumin enhancement of oxidative metabolism of methylcarbamate insecticide chemicals by the house fly microsome-NADPH₂ system. *J. Econ. Entomol.* 60, 617-622.

Uchiyama M., Takeda M., Suzuki T. y Yoshikawa K. 1975. Mutagenicity of nitroso derivatives of N-methylcarbamate insecticides in microbiological method. Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 14, 384-394.

Veleminsky J., Gichner T. y Pokorny V. 1977. Induction of DNA single-strand breaks in barley by sodium azide applied at pH 3. Mutat. Res. 42, 65-70.

Veleminsky J. y Gichner T. 1988. Mutagenic activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. Mutat. Res. 197, 221-242.

Vonk J. W. 1983. Metabolism of fungicides in plants. En: Hutson D. H. y Roberts T. R. (Eds.). Progress in pesticides biochemistry and toxicology. Wiley, Nueva York, Vol.3 pp. 111-162.

Wildeman A. G. y Nazar R. N. 1982. Significance of plant metabolism in the mutagenicity and toxicity of pesticides. Can. J. Genet. Cytol. 24, 437-449.

Wolff S. 1974. Sister chromatid exchanges: the most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic, carcinogenic. Expert. Conference Oslo, Noruega pp. 11-13.

Wolff S. 1982. Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and lesions that produce them. En: Sister chromatid exchange. Wiley, Nueva York, pp. 43-86.

WHO/FAO (World Health Organization/Food and Agriculture Organization) 1976. Data sheets on pesticides: Propoxur No. 25, pp. 1-11.

WHO (World Health Organization) 1986. Carbamate pesticides: A general introduction. Environ. Health Crit. No. 64, pp. 11-17.

Yamasaki I. 1974. Peroxidase. En: Molecular mechanisms of oxygen activation. Hayaish D. A. (Ed.). Academic Press. Nueva York pp. 5335-5558.

Zhurkov V.S. y Yakovenko K.N. 1976. The culture of human lymphocytes as a test subject for evaluation of mutagenic activity of chemicals. Mutat. Res. 41, 107-112.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

T A B L A S

TABLA I. INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR PROPOXUR EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS PREVIA ACTIVACION METABOLICA POR Vicia faba EN TRES EXPERIMENTOS

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3		
	$\bar{X} \pm E.E.$	$\bar{X} \pm E.E.$	$\bar{X} \pm E.E.$	Valor de "t"	
Testigo	4.82 \pm 0.33	4.60 \pm 0.15	4.96 \pm 0.18	1.09	N.S
Cultivo de linfocitos tratamientos directos con propoxur (ppm)					
50	5.13 \pm 0.34	5.32 \pm 0.19	5.12 \pm 0.15	0.59	N.S
100	5.20 \pm 0.18	5.54 \pm 0.16	5.10 \pm 0.17	0.86	N.S
250	5.54 \pm 0.18	6.04 \pm 0.19	6.41 \pm 0.19	0.97	N.S
500	M u e r t e		C e l u l a r		
Etanol (0.1 M) Directo					
	4.84 \pm 0.32	4.40 \pm 0.22	5.88 \pm 0.14	0.33	N.S
Testigo Negativo cultivo de linfocitos + extractos de raíces de V. faba sin tratamiento					
	4.44 \pm 0.28	4.60 \pm 0.15	4.96 \pm 0.18	1.09	N.S
Testigo Positivo cultivo de linfocitos + extractos de raíces de V. faba tratadas con etanol (0.1 M)					
	10.48 \pm 0.24	10.76 \pm 0.14	10.52 \pm 0.10	1.00	N.S
Cultivo de linfocitos + extractos de raíces V. faba tratadas con propoxur (ppm)					
250	7.84 \pm 0.27	7.28 \pm 0.13	7.00 \pm 0.08	1.27	N.S
500	8.72 \pm 0.18	8.64 \pm 0.14		0.25	N.S
1000	10.52 \pm 0.27	10.80 \pm 0.14	10.96 \pm 0.16	0.30	N.S
1500	11.84 \pm 0.24	12.41 \pm 0.10	12.28 \pm 0.86	0.88	N.S
2000 ^a	5.00 \pm 0.16	5.28 \pm 0.18		0.90	N.S

N.S. No significativo (al contrastar en grupos de dos los promedios de cada experimento)

^a Raíces necrosadas

Tabla. II. PROMEDIO DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR PROPOXUR EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS PREVIA ACTIVACION METABOLICA POR Vicia faba^a

	\bar{X}	±	E.E	Valor de "t"
Testigo	4.52	±	0.12	
Cultivo de linfocitos tratamientos directos con Propoxur (ppm)				
50	4.88	±	0.15	1.33 N.S.
100	5.29	±	0.14	2.96 N.S.
250	5.32	±	0.14	3.07 N.S.
500	M u e r t e C e l u l a r			
Etanol(0.1 M) directo	4.88	±	0.14	1.38 N.S.
Testigo Negativo cultivo de linfocitos + extractos de raices de V. faba sin tratamiento	4.49	±	0.11	0.13 N.S
Testigo Positivo cultivo de linfocitos + extractos de raices de V. faba tratadas con etanol (0.1 M)	10.93	±	0.10	29.14*
Cultivo de linfocitos + extractos de raices de V. faba tratadas con propoxur (ppm)				
250	7.24	±	0.18	9.06*
500	8.04	±	0.15	12.06*
1000	11.26	±	0.11	28.86*
1500	12.51	±	0.13	31.96*
2000 ^b	5.16	±	0.14	1.38 N.S.

* P<0.001

^a promedio experimento 1, 2 y 3 (excepto en 500 y 2000 ppm)

^b Raíces necrosadas

TABLA. III. FRECUENCIA DE CELULAS EN PRIMERA, SEGUNDA y TERCERA DIVISIONES EN CULTIVO DE LINFOCITOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PROPOXUR CON Y SIN ACTIVACION METABOLICA POR Vicia faba^a

	M1	M2	M3	IR ^b	Valor de "t"
Testigo	33.3	31.0	34.6	2.0	
Cultivo de linfocitos tratamientos directos con propoxur (ppm)					
50	35.0	33.0	34.6	2.0	1.2 N.S.
100	33.0	31.0	41.0	2.2	1.0 N.S.
250	39.0	31.0	36.0	2.0	0.0 N.S.
500	Muerte Celular				
Etanol(0.1 M) directo	30.0	39.0	36.0	2.2	0.3 N.S.
Testigo Negativo cultivo de linfocitos + extractos de raíces de V. faba sin tratamiento					
	30.6	31.3	35.3	2.0	
Testigo Positivo cultivo de linfocitos + extractos de raíces de V. faba tratadas con etanol (0.1 M)					
	31.1	36.6	32.2	2.0	
Cultivo de linfocitos + extractos de raíces de V. faba tratadas con propoxur (ppm)					
250	32.6	32.3	35.6	2.0	0.0 N.S.
500	39.5	25.0	35.5	2.0	0.0 N.S.
1000	34.0	35.0	30.5	2.0	0.0 N.S.
1500	36.0	28.3	30.5	1.8	0.3 N.S.
2000 ^c	35.0	52.5	2.0	1.4	0.0 N.S.

N.S. No significativo.

^aPromedio experimento 1, 2 y 3 (excepto con 500 y 2000 ppm)

^bIndice de Replicación

^cRaíces necrosadas

FIGURAS

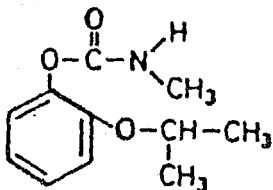


Fig. 1. Fórmula desarrollada del insectida propoxur (PPX-Baygón) (2-isopropoxifenil N-metilcarbamato) (WHO 1986).

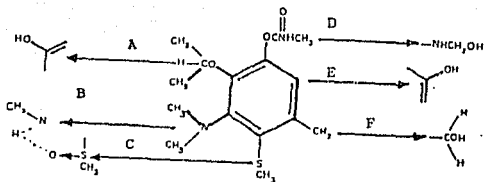


Fig. 2. Sitios de oxidación de un insecticida metil-carbamato hipotético (Aldridge y Magos 1978).

A= O-desalquilación

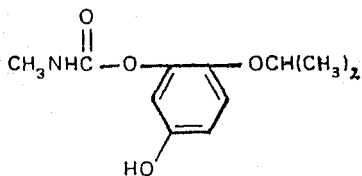
B= N-desalquilación

C= Sulfoxidación

D= Hidroxilación del N-metil

E= Hidroxilación del anillo aromático

F= Hidroxilación del alquilo en el anillo



5-Hidroxi propoxur

Fig. 3. Metabolito tóxico del insecticida propoxur
(Fukuto 1972).

O-desalquilación

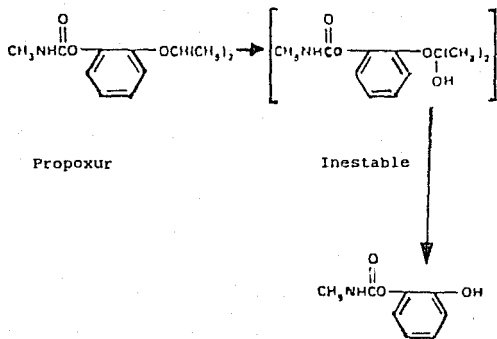


Fig. 4. Reacción de un mecanismo de desintoxicación del propoxur (Fukuto 1972).

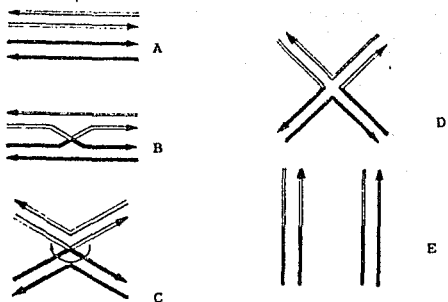


Fig. 5. Modelo de recombinación genética de Holliday propuesto por Kato (1974) para la formación de los ICH (Holliday 1964).

- A. Cadenas apareadas con las bandas homólogas
- B. Intercambio de banda sencilla entre bandas del mismo sentido.
- C. Plegamiento y rotación de las dos cadenas en la zona de recombinación.
- D. Formación de la estructura de Holliday equivalente a la estructura CHI observada recientemente al microscopio electrónico.
- E. Separación de las cadenas después de la recombinación de doble banda.

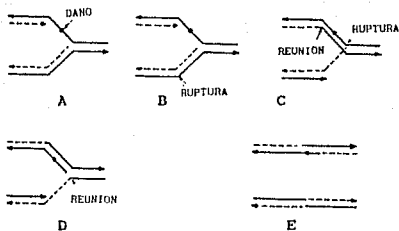


Fig. 6. Modelo de desviación duplicadora.

A. Horquilla de replicación del DNA a nivel de una región. **B.** Rompimiento de la banda progenitora no dañada después de ser copiada a nivel del sitio del daño. **C.** Reasociación de la banda progenitora que no tiene el daño, originando un intercambio de banda y ruptura de la banda progenitora. **D.** Reasociación de la banda con el daño con la banda equivalente recién sintetizada y **E.** Separación de las cadenas después del intercambio de doble banda (Ishii y Bender 1980).

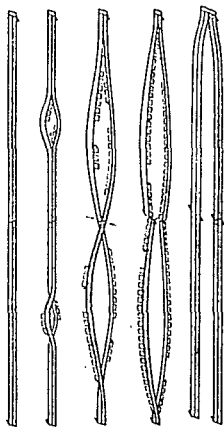


Fig. 7. Mecanismo de desviación de la replicación para la formación de un ICH inducido por un entrecruzamiento, vía formación de piezas de Okasaki (Shafer 1982).

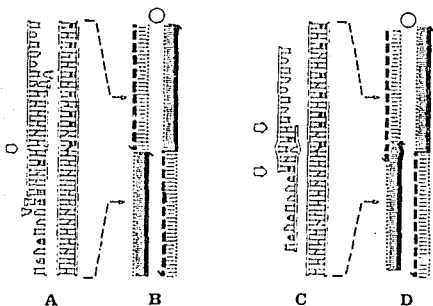
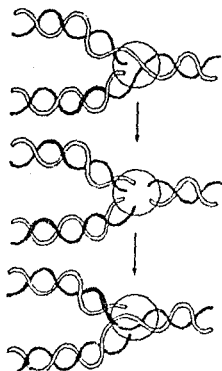


Fig. 8. Proceso alternativo de reunión.

La reunión podría ocurrir por unión terminal (A, B), o por complementación del heterodúplex (C, D) en el cual los extremos libres "pegajosos" se sobrelapan. El proceso posterior podría ocurrir más fácilmente en las regiones de DNA repetido, resultando un mal apareamiento de bases o pérdida de ellas, en una célula hija en la siguiente generación (Shafer 1982).



Unidad discreta de replicación
del DNA (replicón)

Discontinuidad de las cadenas
de DNA que puede ser inducida
por agentes

Intercambio entre una cadena
de DNA recién sintetizada y
una cadena original aún sin
replicarse

Fig. 9. Modelo de replicación de doble hebra en la unión entre los grupos de replicones para el intercambio de cromátidas hermanas (Painter 1982).

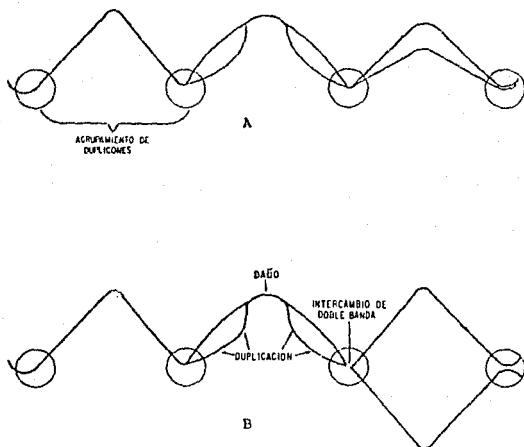


Fig. 10. Modelo de los posibles efectos de los agentes que dañan el DNA sobre la replicación y la segregación de un grupo de replicones.

A. Progresión de la duplicación del DNA entre los grupos de replicones que separan replicones subsecuentes y B. Retardo de la duplicación debido a daño e incremento de la posibilidad de intercambio (Painter 1982).

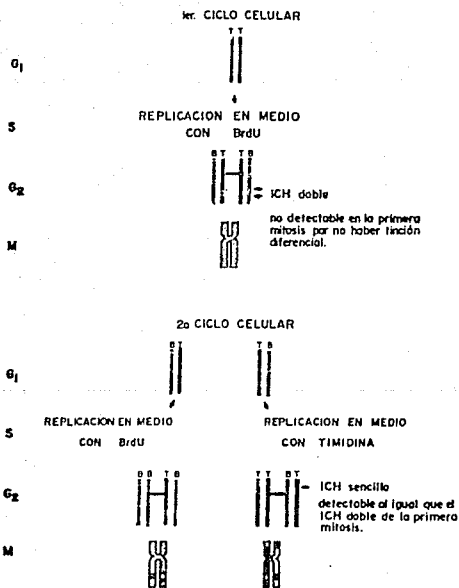


Fig. 11. Diagrama de tinción diferencial.

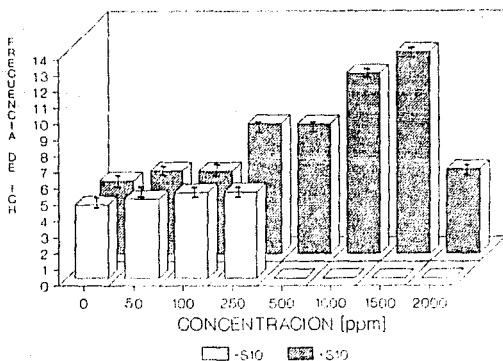


Fig. 12. Intercambio de cromátidas hermanas inducido por propoxur en cultivo de linfocitos humanos previa activación metabólica por *Vicia faba* (promedio experimento 1, 2 y 3 excepto 500 y 2000 ppm).

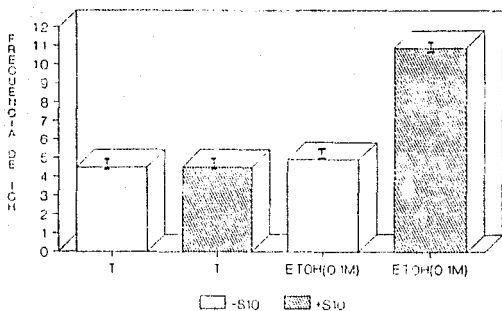


Fig. 13. Intercambio de cromátidas hermanas inducido por etanol en cultivo de linfocitos humanos con y sin activación metabólica por *Vicia faba* (promedio experimento 1, 2 y 3 excepto 500 y 2000 ppm).

