

00361⁷02



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION DEL DAÑO MUTAGENICO PROVOCADO POR
LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS FOXIM Y METIL
AZINFOS EN *Salmonella typhimurium* A TRAVES DEL
METABOLISMO VEGETAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(B I O L O G I A)
P R E S E N T A :
JOSEFINA CORTES ESLAVA

TESIS CON MEXICO, D.F.
FALLA DE ORIGEN

1993



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.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	
1.0 Antecedentes	3
1.1 Activación metabólica en plantas	4
1.2 Metabolismo vegetal de agentes xenobióticos	7
1.3 Ensayo de Ames	10
1.4 NOP (4-nitro-o-fenilendiamina)	13
1.5 Plaguicidas	14
1.5.1 Antecedentes históricos	14
1.5.2 Insecticidas organofosforados	15
1.6 Activación de pesticidas por plantas	16
1.7 Foxim (volatón)	18
1.8 Metil azinfos (gusatión)	19
II. OBJETIVOS	20
III. MATERIALES Y METODOS	
1.0 Preparación de las células vegetales	21
1.1 Preparación de las bacterias y medios para tratamiento	22
1.2 Agentes químicos y disolventes	24
1.3 Ensayo de cocultivo	24
1.4 Análisis estadístico	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	
1.0 Testigo positivo	28
1.1 Testigos negativos	29
1.2 Foxim (volatón)	30
1.3 Metil azinfos (gusatión)	33
V. CONCLUSIONES	36
VI. REFERENCIAS	37
VII. TABLAS	54
VIII. FIGURAS	58

RESUMEN

La activación metabólica es un proceso que permite, en algunos casos, la expresión de la mutagenicidad de los plaguicidas. El ensayo conocido como cocultivo de células vegetales/microorganismos es una prueba sensible y versátil utilizada para evidenciar la presencia de mutágenos (mediados por plantas) que supera las deficiencias de los métodos que usan plantas completas, homogeneizados de diversos tejidos o cultivos de células vegetales. Dichas desventajas consisten principalmente en la desnaturalización de las enzimas de los homogeneizados y en la contaminación microbiana del material vegetal cuando se usan plantas completas.

En este estudio se emplearon células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) de la línea TX1 para la transformación de los insecticidas organofosforados foxim o volatón y metil azinfos o gusación y como criterio para la evaluación del daño genético la tasa de mutación revertante de las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* utilizando el procedimiento del cocultivo.

Como testigos negativos se emplearon amortiguador de fosfatos (pH 7.4) y medio de cultivo líquido (MX) y como positivo a 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP), que es una anilina cuya actividad mutagénica aumenta por acción del metabolismo vegetal. Tanto este último como las diversas concentraciones de foxim (2500, 5000 y 7500 µg/tubo de reacción) y de metil azinfos (1000, 1500 y 2000 µg/tubo de reacción) se agregaron a las bacterias con y sin la participación de las células de *Nicotiana* para conocer sus efectos directo e indirecto sobre el ADN. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de θ diseñada para experimentos de mutagénesis en microorganismos.

La NOP, a concentraciones de 10 y 100 µg de NOP produce diferencias significativas en la frecuencia de reversión de la cepa TA 98, observándose una relación concentración-efecto. Al añadir células de tabaco, se incrementa notablemente este efecto

mutagénico. En cambio en la cepa TA100 sólo la concentración mayor (100 µg) presenta diferencia significativa que también aumenta al añadir las células vegetales. Con el objeto de demostrar que es el metabolismo el que eleva la actividad mutagénica y no la presencia de las células TX1, éstas murieron por calor y se expusieron a la concentración mayor de NOP (100 µg) en cocultivo con las bacterias, notándose que las frecuencias de reversión halladas son similares que al aplicarla en forma directa.

Los tratamientos con foxim o volatón incrementan significativamente la tasa de mutación revertante a las concentraciones probadas tanto en TA98 como en TA100, mientras que en cocultivo no hay efecto, es decir que a estas concentraciones no hay evidencia de que el foxim sea un promutágeno vegetal por lo que se infiere que se trata de un mutágeno directo el cual provoca mutaciones que involucran mecanismos tanto de corrimiento del marco de lectura como de sustitución de pares de bases.

Al agregar metil azinfos o gusatión se inhibe el crecimiento de ambas cepas de bacterias debido a efectos tóxicos. Sin embargo, al cocultivarse con *Nicotiana tabacum* se incrementa significativamente la frecuencia de reversión espontánea lo cual denota el comportamiento promutagénico de este compuesto, es decir que en presencia de células TX1 y a las concentraciones probadas el metil azinfos se comporta como mutágeno indirecto.

Aunque se logra una buena reproducibilidad en los tres experimentos que se llevaron a cabo, la expresión de concentración-respuesta para ambos pesticidas no tiene una relación lineal.

Los resultados muestran la elevada eficiencia de las células TX1 para activar metabólicamente y reafirman la utilidad del método de cocultivo para el estudio de la transformación de promutágenos a mutágenos a través del metabolismo vegetal.

I. INTRODUCCION

1.0 Antecedentes

El establecimiento del riesgo asociado a los agentes químicos que forman parte del ambiente es una tarea que no puede emprenderse sin el conocimiento adecuado de su comportamiento (Gow 1988). Uno de los problemas actuales más serios lo constituye la presencia de enormes y variadas cantidades de productos químicos sintéticos que son arrojados al medio y que representan un peligro potencial para la salud humana (Litterst y Lichtenstein 1971).

La descarga de sustancias que son dispersadas en el planeta, por vía aérea o acuática (Sandermann 1988) y que se depositan en agua, suelo o aire afectan seriamente al medio (Higashi 1988). Muchas plantas comestibles son expuestas deliberadamente a pesticidas y a otros agentes químicos usados en la agricultura (Sandermann 1988). Estas plantas son el soporte de gran número de organismos gracias a la biosíntesis de compuestos orgánicos que suministran oxígeno (Higashi 1988).

Es por lo tanto, importante evaluar los efectos de agentes químicos ambientales sobre las propias plantas y examinar especialmente la acumulación de los mismos en aquellas que son comestibles y que están involucradas en la red trófica. Para proteger tanto el ambiente como la salud humana, es relevante considerar además la biotransformación por plantas superiores de dichas sustancias en mutágenos activos (Higashi 1988).

Las plantas se encuentran al principio de las cadenas alimenticias. Este hecho y la enorme biomasa vegetal que constituye en el planeta de alrededor de 1.8×10^{12} toneladas en peso seco, enfatiza la importancia de su metabolismo y de la bioacumulación de productos químicos ambientales (Sandermann 1988).

1.1 Activación metabólica en plantas

Aunque las plantas han sido ampliamente usadas en la investigación de los efectos genéticos de agentes químicos y físicos (Nilan 1978), el hecho de que transformen sustancias inocuas en mutágenos es un tema relativamente nuevo. Durante algún tiempo se consideró que solo el hígado de mamíferos era capaz de llevar a cabo estos procesos metabólicos, sin embargo ya en 1976 Plewa y Gentile aportaron evidencias directas de la activación por medio de los vegetales.

La demostración de que las plantas pueden activar agentes ambientales e introducir mutágenos en la cadena alimenticia constituye un motivo de interés y preocupación sobre todo si se considera el amplio espectro de agentes químicos y la magnitud de su uso en la agricultura moderna, proceso a través del cual pueden incorporarse mutágenos en la dieta humana (Gentile et al. 1986, Plewa et al. 1984b). Este cambio de promutágenos a mutágenos es un evento crítico en la mutagénesis ambiental y los sistemas de prueba frecuentemente incluyen una fracción metabólicamente activa (semejante a los microsomas del hígado de rata) que sirve para ello (Rasquinha et al. 1988).

Un mutágeno ambiental es un agente físico o químico liberado al ambiente, que puede alterar el genoma o sus propiedades funcionales. Un promutágeno es un agente químico que sin ser mutagénico en sí, puede ser biotransformado a un mutágeno (Plewa y Gentile 1982). Así el término "activación vegetal" denota el proceso por el cual una sustancia no mutagénica es convertida por la acción biológica de una planta en mutágeno (Plewa y Gentile 1982).

La capacidad de los vegetales de metabolizar pesticidas u otros agentes químicos extraños ha sido demostrada tanto en el campo como en el invernadero. Sin embargo, es difícil establecer diferencias entre las reacciones catalizadas por los

microorganismos, por los constituyentes del suelo o por la luz, de las reacciones verdaderas de la planta. Sólo mediante estudios más recientes usando callos vegetales en condiciones estériles o cultivos celulares en suspensión se ha demostrado claramente la capacidad metabólica de las plantas (Sandermann 1982).

Plewa y Gentile (1982) mencionan que únicamente cuando se separan ambos procesos, el de activación y el del indicador genético usado para probar la mutagenicidad se obtiene la evidencia directa de que el agente ha sido activado por los sistemas enzimáticos vegetales o animales. El ensayo clásico de mutagenicidad de Salmonella/microsomas de mamífero ideado por Ames et al. (1975b) satisface por completo este punto así como el desarrollado en plantas por Plewa y Gentile (1975)

Los estudios sobre activación vegetal pueden realizarse in vivo e in vitro. En el primer caso, el agente que se estudia se aplica a una planta intacta, mientras que en el segundo es introducido en un homogeneizado vegetal estéril o cocultivado con células indicadoras. En ambos métodos un extracto vegetal se prueba subsecuentemente junto con un microorganismo indicador de sus propiedades genotóxicas (Plewa y Gentile 1982).

Las primeras investigaciones sobre este campo se llevaron a cabo mediante un protocolo in vivo (Gentile y Plewa 1975, Plewa y Gentile 1975, 1976, Gentile et al. 1977). La principal ventaja del método in vivo es que el uso de plantas intactas semeja más las condiciones encontradas en los campos agrícolas. Sin embargo hay algunas desventajas como son, la contaminación microbiana del material vegetal, los artefactos introducidos en los ensayos con microorganismos por los nutrientes presentes en las muestras, los problemas de dosimetría inherentes al tratamiento de plantas intactas y la posible modificación de los metabolitos o la inducción de reacciones químicas durante la homogeneización, la extracción y la concentración de las muestras (Plewa y Gentile 1982).

Son cuatro los métodos de activación vegetal in vitro actualmente desarrollados. En todos ellos se exponen cultivos de células vegetales u homogeneizados celulares al agente químico y se evalúa la mutagenicidad en microorganismos indicadores o en cultivo celulares o de tejidos de mamíferos (Plewa y Gentile 1982).

En el caso de los ensayos in vitro con homogeneizados existen algunos inconvenientes ya que la pared que presentan todos los vegetales dificulta la ruptura lo cual implica problemas en la preparación de fracciones subcelulares (Gentile y Plewa 1988). Las técnicas convencionales de rompimiento usualmente provocan también la ruptura de organelos (Price 1978) mientras que los fragmentos de membrana que contaminan las fracciones no son fáciles de medir debido a la carencia de marcadores enzimáticos específicos. Otro aspecto importante es el hecho de que los vegetales no contienen tantas proteínas por unidad de masa como los animales (Virtanen 1962) lo cual dificulta su determinación en los homogeneizados de fracciones subcelulares. Por otro lado, los fenoles y las quinonas existentes en los tejidos vegetales que frecuentemente se liberan durante la homogeneización (Virtanen 1962), reaccionan al igual que las proteasas con las proteínas, todo ello en detrimento de la actividad enzimática (Van Der Valk 1984).

El ensayo de cocultivo de célula vegetal/microorganismo, desarrollado para analizar la activación de promutágenos por sistemas vegetales, supera el serio problema de la desnaturalización de enzimas vegetales con estrategias de activación involucrando homogeneizados vegetales. Se basa en el uso de células vegetales vivas como sistema activador con algún microorganismo que indique el efecto genético (Plewa et al. 1983). Las células microbianas y vegetales se incuban en un medio adecuado junto con un promutágeno. La activación del compuesto se detecta por el crecimiento del microorganismo en un medio selectivo, mientras que la viabilidad de ambos tipos celulares puede ser monitoreada en otra parte del ensayo (Plewa et al. 1988).

La activación mutagénica de los agentes químicos xenobioticos es estudiada generalmente a dos niveles diferentes:

- i) El metabolito vegetal xenobiótico que causa daño mutagénico en la planta misma.
- ii) El metabolito mutagénico que es conjugado y almacenado hasta que se libera y permanece activo al ser consumido por los animales o el hombre. Esta situación, en particular, puede ocurrir después de la aplicación de pesticidas a especies comestibles (Fig. 1) (Sandermann 1988).

Además de las cepas de Salmonella del sistema de Ames, se han empleado otras cepas bacterianas (Hansen et al. 1985), así como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Wagner et al. 1989)

1.2 Metabolismo vegetal de agentes xenobióticos

Las plantas superiores metabolizan compuestos extraños por medio de numerosos mecanismos que incluyen oxidación, hidrólisis, conjugación y ocasionalmente reducción. Tanto en animales como en vegetales, el paso final de la biotransformación de la molécula xenobiótica es la conjugación (Fig.2) (Higashi 1988).

Los agentes xenobióticos transformados por sistemas vegetales adquieren grupos reactivos tipo -OH, -SH, -COOH ó -NH₂ que sirven a su vez como sitios funcionales para su posterior conjugación. Las especies conjugadas primariamente son fácilmente excretadas en animales mientras que en las plantas, los conjugados formados así, son posteriormente polimerizados para ser incorporados a los componentes estructurales de la planta como alternativa para su excreción (Higashi, 1988). Los productos finales de estas reacciones son los glucósidos (por conjugarse con la glucosa), tal como la conjugación del glutatión que representa la reacción más importante para la desintoxicación en plantas al formarse el glutatión reducido (GSH) por catálisis de las GSH transferasas, que forman conjugados con diferentes tipos de pesticidas, jugando un papel importante en la toxicidad selectiva (Lamoureux y Frear

1979, Lamoureux y Rusness 1981).

Markham et al. (1972) describen la presencia de pigmentos parecidos al citocromo P-450 en los microsomas de los cotiledones de *Phaseolus vulgaris* (frijol), de *Zea mays* (maíz) y de las plántulas de *Pisum sativum* (chicharo). Las propiedades ópticas y magnéticas del citocromo P-450 microsómico de diferentes plantas superiores son análogas a las de los microsomas de mamíferos (Rich y Bendall 1975).

Los citocromos P-450 de hígado de ratas y de conejos se han estudiado con inductores de las enzimas que metabolizan drogas como fenobarbital y metilcolantreno y se considera que su papel fisiológico consiste en la desintoxicación de numerosos agentes xenobióticos, lo cual explica su baja especificidad en animales (Higashi 1988).

También se ha investigado el papel fisiológico del citocromo P-450 en plantas superiores sin embargo son pocos los estudios realizados acerca del metabolismo de compuestos extraños. En general se ha visto que el citocromo P-450 de las plantas superiores tiene especificidad limitada por su sustrato (Higashi 1988).

Hasta hace poco tiempo no se sabía casi nada acerca de los inductores del citocromo P-450 vegetal. Reichart et al. (1979) reportan que metales como el manganeso y el hierro, el etanol, varios herbicidas y aún el fenobarbital aumentan de manera importante el contenido de citocromo P-450 previamente inducido por heridas en el tejido de alcachofa de Jerusalem.

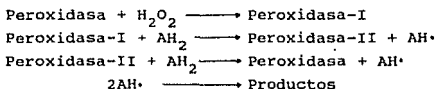
La principal fuente de electrones para la reducción del citocromo P-450, tanto en plantas como en animales, es el fosfato de nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido, NADPH (Higashi 1988).

Recientemente se ha descrito la transformación de productos agroquímicos por plantas superiores así como el papel fisiológico

del citocromo P-450 en el metabolismo secundario, sin embargo también hay enzimas extra microsómicas que pueden transformar metabólicamente agentes promutágenos a una forma activa (Higashi 1988).

Existen varias enzimas vegetales con papel importante en el metabolismo de los compuestos xenobióticos (Lamoureux y Frear 1979), pero las más sobresalientes son las peroxidasas que catalizan en general dos tipos de reacciones de oxidación: la clásica peroxidación que requiere peróxido de hidrógeno y la oxidación que utiliza oxígeno molecular. Pueden catalizar N- ó C-hidroxilación, N-sulfoxidación, N-acetilación, halogenación, deshalogenación o descarboxilación (Sandermann 1982).

La peroxidación normal procede como sigue:



Donde se designa como peroxidasa I al Fe O^{3+} , como peroxidasa II al Fe O^{2+} , el $\text{H}_2 \text{O}_2$ es el sustrato astringente para la peroxidasa y A H_2 es un sustrato inespecífico que funciona como donador de hidrógeno (Higashi 1988).

Numerosos investigadores han propuesto las posibles funciones de las peroxidasas en el metabolismo de pesticidas. Tanto la oxidación de paratión a paraoxór, y la hidrólisis de ambos compuestos puede ser catalizada por la peroxidasa de rábano (Knaak et al. 1962). La reacción ocurre en condiciones de oxidación y de peroxidación.

Las especies de citocromo P-450 en los microsomas de células vegetales son mucho menos heterogéneas en comparación con las que existen en el hígado de mamíferos (Higashi et al. 1982). Algunas características del citocromo microsómico P-450 de plantas superiores representan un problema para su estudio como son: baja

concentración de la fracción S9, inestabilidad, menor heterogeneidad y limitada especificidad por su sustrato.

Muchas de las enzimas que toman parte en el metabolismo de los agentes xenobióticos se localizan tanto en animales como en vegetales en el retículo endoplásmico (Menn y Still 1978). Sin embargo, en los vegetales se han detectado varias que participan en la activación mutagénica tanto en el citoplasma como en la pared celular (Shimabukuro et al. 1982, Lamoureaux y Rusness 1986).

1.3 Ensayo de Ames

En esta técnica se usan varias cepas de *Salmonella typhimurium* que contienen diferentes tipos de mutación dentro del operón de histidina. Aparte, presentan otras características que incrementan su capacidad para detectar efecto genotóxico. La mutación rfa causa pérdida parcial de la barrera de polisacáridos que cubre la superficie de la bacteria e incrementa la permeabilidad a moléculas grandes que no penetran en la pared celular normal (Ames et al. 1973a). Algunas cepas contienen además un plásmido pKM 101 que lleva el llamado factor-R de resistencia a ampicilina y los genes muc que aumentan la frecuencia de mutagénesis tanto espontánea como inducida al mejorar el sistema de reparación "error-prone" que está presente normalmente en estos organismos. La cepa TA100 responde a agentes que causan sustitución de pares de bases mientras que la TA98 lo hace a los que provocan corrimiento del marco de lectura (Maron y Ames 1983).

Los mutágenos cuyo mecanismo molecular consiste en el corrimiento del marco de lectura pueden estabilizar el apareamiento cambiado que ocurre frecuentemente en secuencias repetidas o sitios sensibles del ADN, resultando en una mutación de corrimiento del mensaje la cual restaura la lectura correcta para la síntesis de la histidina (Maron y Ames 1983).

La reversión espontánea de las cepas de prueba con dependencia de histidina se mide rutinariamente en experimentos de mutagenicidad y se expresa como el número de revertantes espontáneos por caja de medio mínimo. Las colonias revertantes que han recuperado la síntesis son claramente visibles sobre un fondo uniforme de bacterias auxotróficas.

Cada cepa revierte espontáneamente a una frecuencia característica. Maron y Ames (1983) mencionan que la tasa de revertantes espontáneos por caja en un margen de 10^5 a 10^8 células, es completamente independiente del número de células bacterianas sembradas (Green y Muriel 1976).

La cantidad de células auxotrofas (fondo de bacterias) no se cuenta pero se supone que su número no cambia ya que la concentración basal de histidina es constante. Sin embargo, hay cierta variabilidad de un experimento a otro y de una caja a otra por lo que es aconsejable incluir por lo menos 3 cajas por cepa en cada estudio de mutagenicidad. Esto es particularmente importante cuando los compuestos de prueba son mutágenos débiles (Maron y Ames 1983).

Cuando se encuentra una frecuencia de reversión que queda claramente fuera del rango establecido es necesario revisar las características genéticas de la cepa (o el medio de crecimiento). Una frecuencia de reversión espontánea anormalmente alta puede indicar contaminación o acumulación de retro mutaciones debidas a repetidos subcultivos. En este caso la cepa debe eliminarse y efectuar el reaislamiento a partir de un patrón congelado a 80° C. Una disminución en la frecuencia de reversión espontánea de las cepas con factor-R, acompañada de sensibilidad a ampicilina e insensibilidad correspondiente a los mutágenos de diagnóstico apropiados indican la pérdida del factor-R (Maron y Ames 1983).

Esta técnica se ha usado para determinar la actividad mutagénica de mezclas complejas. Una cantidad importante de mutágenos

fueron encontrados con ella y posteriormente han mostrado ser carcinogénicos en animales (Maron y Ames 1983).

La prueba de Salmonella fue validada en un análisis de 300 agentes químicos, muchos de los cuales eran carcinogénicos (McCann et al. 1975, McCann y Ames 1976, 1977). Cerca del 90 % de estos fueron además mutagénicos. Recientemente Rinkus y Legator (1979, 1981) concluyen que la correlación entre carcinogenicidad y mutagenicidad es menor que la evaluada al principio y más adelante Ames y McCann (1981) estiman una correlación de 83 %.

El ensayo de Salmonella de Ames ha sido cuestionado por varios autores debido a la carencia en las bacterias de los sistemas metabólicos que efectuen biotransformaciones, sin embargo este problema se ha resuelto agrupando las fracciones microsómicas del hígado de mamíferos (Maron y Ames 1983) o bien las de las plantas (Plewa et al. 1984b).

El hecho de que las plantas realicen la transformación metabólica de agentes xenobióticos, 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, que tal vez puedan resultar más peligrosos. Así, debe ser investigado más ampliamente el metabolismo y el destino de tales pesticidas para saber la naturaleza y la cantidad de metabolitos que están presentes en la porción comestible de las cosechas. Esto es necesario para aumentar la seguridad en el uso de los pesticidas comerciales.

Con base en este planteamiento se han propuesto experimentos empleando a Salmonella typhimurium para evaluar el daño mutagénico junto con homogeneizados celulares de diversas plantas o bien la fracción enzimática que posee la actividad requerida para el metabolismo (Higashi et al. 1981, 1982). Los extractos más utilizados han sido los de trigo (Lai et al. 1978), maíz (Plewa 1978), Tradescantia (Scott et al. 1978), alcachofa de

Jerusalem (Higashi et al. 1981), bulbos de tulipán (Higashi et al. 1982, 1983), alfalfa, coliflor y frijol (Wildeman y Nazar 1982), Vicia faba (Takehisa y Kanaya 1982, Takehisa et al. 1988), tubérculos de papa (Loprieno y Adler 1980), tabaco (Gentile et al. 1987), *Pisum sativum* (Shane y Looney 1989) y también cultivos de células intactas de plantas como algodón, tabaco y zanahoria (Gentile et al. 1987, Gentile y Plewa 1988; Wagner et al. 1989) y *Tradescantia* (Anderson et al. 1988) en lugar de los extractos.

Así, es posible medir diversos puntos genéticos terminales incluyendo mutaciones hacia adelante y hacia atrás, conversión génica y entrecruzamiento somático. La condición del ensayo es que el agente que se prueba sea capaz de penetrar a la célula vegetal y el producto activado difundirse a través del medio para entrar al organismo microbiano indicador del daño genético (Plewa et al. 1988).

1.4 NOP (4-nitro-o-fenilendiamina)

NOP (4-nitro-o-fenilendiamina) es un mutágeno de acción directa en gran cantidad de ensayos genéticos (Ames et al. 1975b, Benedict 1976, Blijleven 1977, Perry y Searle 1977, Mayer y Goin 1980, Yu-Sun et al. 1981) y se le usa rutinariamente como testigo positivo directo para la cepa TA98 de *Salmonella* (Zeiger et al. 1981). La NOP además provoca un incremento notable en la reversión espontánea de *Salmonella* en presencia de S9 de tabaco y de chícharo, no así con S9 de hígado de rata (Gentile et al. 1985).

Esta anilina se usa como testigo positivo y modelo de la transformación metabólica por la similitud estructural con los metabolitos de diferentes herbicidas (Lamoureaux y Frear 1979). Se utiliza en la industria como intermediario en la producción de colorantes para piel y en tintes y formulaciones permanentes y semipermanentes para pintar el cabello (EPA 1980). Algunos

estudios han mostrado que es mutagénica en *Salmonella* (Gentile et al. 1986), induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila* y recombinación mitótica en levaduras (Natarajan y Obe 1986). En cambio Searle et al. (1975) y Natarajan y Obe (1986) reportan respectivamente que no induce aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos, ni micronúcleos en médula ósea de ratones, sin embargo observan respuesta positiva en la prueba de micronúcleos en hígado de ratones (Natarajan y Obe 1986).

1.5 Plaguicidas

1.5.1 Antecedentes históricos

El uso de sustancias para el control de plagas parásitas es ya muy antiguo. Los primeros fueron los arseniatos y mas tarde se utilizan otros agentes de origen orgánico extraídos de plantas como la rotenona que se obtiene de *Derris eliptica* y *D. melacensis*, el piretrum que se produce a partir de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* o la nicotina que se emplea en Francia desde 1690 y que más tarde, en 1764 se aplica esta propiedad insecticida del tabaco en Inglaterra y hasta 1814 en América (West et al. 1952).

La primera ocasión en que se describe la reducción de la fertilidad como consecuencia de aberraciones cromosómicas en plantas tratadas con pesticidas data de 1930 cuando Kostoff observa el efecto en plantas de tabaco previamente fumigadas con sulfato de nicotina (citado por Grant 1970). A partir de entonces numerosos investigadores hicieron análisis similares. La sensibilidad de los organismos al tratamiento con pesticidas varía considerablemente de acuerdo a factores como el nivel de ploidía, la forma de vida, o los volúmenes nuclear y cromosómico interfásico (Grant 1973).

En 1939, con el desarrollo del DDT como insecticida residual persistente, aparecen en Suecia los pesticidas organoclorados. Después surgen otros como el lindano, el heptacloro, el aldrin, el dieldrin, etc. Todos son neurotóxicos y dejan residuos que permanecen en el suelo por períodos largos, causando efectos sobre especies que no constituyen el blanco original. Por estas razones se ha descontinuado el uso de la mayoría de ellos reemplazándolos por compuestos carbámicos y organofosforados. Estos últimos son muy empleados en la actualidad y aunque han disminuido los problemas de toxicidad crónica, se han descrito casos de toxicidad aguda (Guthrie 1980).

1.5.2 Insecticidas organofosforados

Los insecticidas organofosforados comienzan a producirse en Alemania en 1945. La mayor parte son ésteres del ácido fosfórico, y debido a su polaridad son muy solubles. Son considerados cuatro veces más tóxicos que los organoclorados, aunque menos persistentes (National Academy of Sciences 1980).

En los vertebrados, interrumpen el impulso nervioso en los sistemas nerviosos central y periférico, al inhibir a la acetilcolinesterasa, enzima que modula la cantidad de acetilcolina neurotransmisora (O'Brien 1967, 1969, Karczmar et al. 1970, Aldridge 1971, Fukuto 1971). El mecanismo de este bloqueo consiste en la fosforilación del grupo hidroxil serina en el sitio activo de la enzima (Fest y Schmidt 1973)

Otra característica importante de este tipo de compuestos es su propiedad alquilante (Preussman et al. 1969, Bedford y Robinson 1972, Wooder y Wright 1981). La estructura elemental de los insecticidas organofosforados es:



La presencia del fósforo y del carbono como sitios electrofílicos proporciona la clave para entender las reacciones

con los nucleófilos. Un nucleófilo puede actuar preferencialmente sobre el átomo de fósforo con la subsecuente ruptura del enlace P-O y fosforilarse o atacar al átomo de carbono con la posterior ruptura del enlace C-O y sufrir alquilación (metilación o etilación) . El ADN de una célula viva contiene muchos y muy diferentes sitios nucleofílicos susceptibles de experimentar ese tipo de ataque. La reacción de los organofosfatos con el agua como nucleófilo, es decir la hidrólisis, conduce a la formación de diésteres del ácido fosfórico y alcoholes, tioles o fenoles. Los diésteres pueden ser hidrolizados a monoésteres y eventualmente a fósforo inorgánico (Wild 1975).

El fenómeno de alquilación consiste en el ataque de un grupo alquilo pequeño como $-CH_3$ ó C_2H_5 , a un átomo de N en una de las bases nitrogenadas del ADN, es uno de los mecanismos más comunes que conducen a la mutación. También puede ocurrir O-alquilación debido al ataque de un metilo u otro grupo alquilo al átomo de oxígeno de la guanina (Fig. 3).

Las principales rutas primarias del metabolismo de los organofosfatos son la oxidación y la hidrólisis (Fest y Schmidt 1973). Tanto el hígado de mamíferos como los insectos convierten por oxidación a los tiofosfatos en fosfatos, transformación que aumenta la actividad fosforilante de los compuestos correspondientes. Por otro lado, la hidrólisis enzimática es una desintoxicación debida a varias enzimas presentes en el hígado y en otros órganos de los mamíferos (Blair et al. 1975).

1.6 Activación de pesticidas por plantas

La atrazina fue el primer herbicida en el que se comprobó que su actividad mutagénica en microorganismos se debía a la activación por las plantas (Plewa y Gentile 1976). Otros herbicidas también transformados por vegetales son la cianazina, la zimazina, la procirozina (Matijesevic et al. 1980, Plewa et al. 1984a, Means et al. 1988), el alaclor y el propaclor (Gentile et

al. 1982) al igual que otros compuestos como: el 2-aminofluoreno, la 4-nitro-fenilendiamina (Wagner et al. 1989) y el benzo(a)pireno (Higashi 1988), etc.

Puesto que las vías metabólicas de los vegetales son muy diferentes a las de los animales (Menn 1978), los productos del metabolismo pueden también cambiar. El fungicida tioabendazol por ejemplo, es convertido a 5-hidroxitioabendazol en animales mientras que en las plantas lo es a benzimidazol o benzimidazol-2-carboxamida (citado por Sandermann 1988).

La mayor parte de la información disponible acerca del metabolismo de los agentes xenobióticos en plantas tiene su origen en estudios sobre el modo de acción de los pesticidas, su procedencia y la caracterización de sus residuos y la selectividad de su acción (Dohn y Krieger 1981, Lamoreaux y Rusness 1981, Shimabukuro et al. 1982, Mumma y Davidonis 1983, Vonk 1983). Los estudios bioquímicos de promutágenos o formación de mutágenos a partir de agentes químicos inocuos en plantas son escasos (Crosby 1982, Gentile et al. 1982, Plewa y Gentile 1982, Owais et al. 1983, Plewa et al. 1984a, Higashi et al. 1985).

Para poder evaluar la genotoxicidad de los pesticidas se requiere elucidar diferentes aspectos como: (1) acumulación o degradación química o biológica en el ambiente, (2) metabolismo en los seres humanos y (3) reactividad genética con macromoléculas celulares como el ADN causando mutaciones puntuales y/o aberraciones cromosómicas; además de muchos otros factores que modifican las capacidades tóxicas de las sustancias (Shirasu et al. 1976).

En años recientes la aparición de los herbicidas selectivos ha contribuido a resolver parcialmente los problemas que con la mecanización han venido padeciendo las prácticas agrícolas en cuanto a la necesidad de "deshierbe". Estos agentes químicos, junto con insecticidas, fungicidas, reguladores del crecimiento vegetal y demás productos, han revolucionado la agricultura, sin embargo la pérdida de cosechas continúa (Somerville 1988). Pimentel

(1981) estima que las plagas mundiales destruyen el 35 % del potencial de todos los cultivos alimenticios antes de su cosecha. Estas disminuciones son principalmente debidas a insectos, enfermedades de las plantas y malas hierbas; además de que durante su almacenamiento los insectos, los microorganismos, los roedores y las aves eliminan del 10 al 20 % (Somerville 1988).

La inclusión de los pesticidas en la agricultura moderna hace muy importante la determinación de que esos agentes sean compatibles con la salud pública y el ambiente (Gentile et al. 1982). Entre los efectos potencialmente riesgosos que pueden provocar está la carcinogénesis. Por este motivo la acción mutagénica y genotóxica de numerosos pesticidas han sido objeto de vasta investigación (Klopman et al. 1985); estas actividades tienen valor predictivo en el potencial de los pesticidas para causar cáncer (Ames et al. 1975a, Moriya et al. 1983, Rosenkranz et al. 1984).

1.7 Foxim (volatón)

El foxim cuya fórmula molecular es $C_{12}H_{15}N_2O_3P$ es un insecticida organofosforado ampliamente usado en México principalmente durante el almacenamiento de granos. Su nombre químico es gloxil-nitrilo fenil oxima, 0,0-diethyl fosforotioato (Fig. 5). Es venenoso cuando se ingiere y experimentalmente ha probado ser teratogéno. Al calentarlo se descompone emitiendo humos muy tóxicos de CN^- , NO_x , PO_x y SO_x (Lewis 1991).

Hay pocos estudios realizados acerca de sus efectos genéticos. Es negativo en la inducción de reversiones en bacterias (Moriya et al. 1983), incrementa débilmente las frecuencias de ICH en cultivos de linfocitos humanos (Gómez-Arroyo et al. 1987). En cambio en *Vicia faba* la respuesta es positiva (Gómez-Arroyo et al. 1988) (Tabla 2).

1.8 Metil azinfos (gusati3n)

Otro de los miembros m1s activos del importante y vers1til grupo de insecticidas organofosforados, en este caso obtenido por condensaci3n del 1lcali o la sal de amonio 1cido 0, 0-dimetil fosforoditioico con un compuesto heteroc1clico clorometilo, es el gusati3n o metil azinfos, obtenido de la N-clorometil benzasimida (Fig. 6).

El gusati3n descubierto por Bayer en 1953 es un insecticida de gran toxicidad para mam1feros, tanto al contacto como por ingest3n y con mayor actividad residual que la mayor1a de los insecticidas organofosforados. La LD₅₀ es de 15 mg/Kg. Los insectos metabolizan el metil azinfos a su an1logo fosforilado m1s t3xico, etil azinfos, que tambi3n se usa como insecticida (Cremlin 1978). Su nombre qu1mico es 0, 0-dimetil S (4-oxo-1,2,3-benzotriazina-3(4H)-ylmetil) fosforoditioato (Finlayson y MacCarthy 1973). Su f3rmula molecular es C₁₀ H₁₂ N₃ O₃ PS₂ es ligeramente soluble en agua y muy soluble en disolventes org1nicos. Posee cerca de 35 sin3nimos. Se le describe como veneno por inhalaci3n, e ingest3n, por contacto con la piel, por v1a intravenosa, e intraperitoneal y por otras posibles rutas.

A nivel experimental se mencionan efectos teratog3nicos y sobre la reproducci3n, pero su acci3n carcinog3nica es todav1a cuestionable. Cuando se calienta, se descompone y emite humos muy t3xicos de PO_x, SO_x, y NO_x (Lewis 1991). Los estudios de genotoxicidad muestran resultados negativos en *Saccharomyces cerevisiae* (Ricci3 et al. 1981), en rat3n (Jorgenson et al. 1976), en c3lulas de criceto chino (Chen et al. 1982), en el pez *Umbra limi* (Vigfusson et al. 1983) y en el cultivo de linfocitos humanos (G3mez-Arroyo et al. 1987). En tanto que en plantas provoca efecto c-mit3tico (Grant 1973), incrementa la recombinaci3n mit3tica en *S. cerevisiae* (Simmon et al. 1976) y eleva significativamente la frecuencia de ICH en *Vicia faba* (G3mez-Arroyo et al. 1988) (Tabla 3).

Este insecticida es ampliamente usado en México en cultivos de tomate, jitomate, vid, manzano, cítricos, durazno, nogal, chile etc.

Debido a que trabajos recientes han demostrado que los vegetales poseen sistemas enzimáticos complejos capaces de transformar sustancias no mutagénicas en mutagénicas (Gentile et al. 1987, Plewa et al. 1988) y dado que en nuestro país se emplean indiscriminadamente grandes cantidades de pesticidas sobre los cultivos en donde muchos de ellos permanecen de manera residual por mucho tiempo, pudiendo además ser metabolizados y convertidos en productos peligrosos para el hombre, es importante contar con modelos biológicos que permitan detectar todos estos fenómenos. uno de ellos lo constituye el cocultivo de células vegetales con la bacteria *Salmonella typhimurium*, en donde las células de tabaco representan en este caso, el sistema metabolizador y las bacterias el criterio de evaluación del daño mutagénico.

1.9 Objetivos

Al aplicar los insecticidas organofosforados gusatión y volatón, en el sistema de cultivo de linfocitos humanos, Gómez-Arroyo et al. (1987) observan una respuesta negativa o débilmente positiva, mientras que al probar estos mismos compuestos en *Vicia faba* encuentran un aumento significativo de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (Gómez-Arroyo et al. 1988). Lo anterior sugiere la existencia de algún mecanismo del metabolismo vegetal que activa a los insecticidas provocando el efecto, pero del cual carecen los linfocitos. Por ello y con el antecedente ya mencionado, en este trabajo se intenta mostrar el potencial mutagénico de los metabolitos de estos insecticidas utilizando como criterio de evaluación del daño genético la tasa de mutación revertante de las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, que son mutantes auxotróficas para el operón de histidina y al cultivo de células de *Nicotiana tabacum* de la línea TX1 para la transformación de los insecticidas

mediante el cocultivo de acuerdo con el método propuesto por Gentile et al.(1987) y Plewa et al.(1988). Con esto se pretende contar con un sistema que permita conocer un aspecto importante como es el metabolismo de las plantas, que hasta hace poco tiempo se consideraban carentes de funciones de activación similares a las efectuada por la fracción S-9 del hígado de mamíferos. También se intenta establecer si los plaguicidas mencionados: volatón y gusatión al ser transformados en otros productos más o menos tóxicos puedan además tener acción mutagénica. Esto permitirá ofrecer elementos de juicio para que se tomen las medidas pertinentes con relación a su venta y uso a fin de disminuir el riesgo genético que impliquen.

II. MATERIALES Y METODOS

Para la técnica de cocultivo se emplean las células de tabaco *Nicotiana tabacum* de la línea TX1 y por otro lado las cepas auxótrofas para histidina TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, comúnmente usadas para detectar mutágenos. Tanto las bacterias como las células vegetales fueron proporcionadas por el Dr. William F. Grant y la Dra. Priscilla Castillo (Universidad de McGill, Montreal, Canadá). Se siguieron los métodos descritos por Maron y Ames (1983) en el caso de bacterias y por Murashige y Skoog (1962) para células vegetales.

1.0 Preparación de las células vegetales

Para el mantenimiento de los cultivos vegetales se utilizó una modificación del medio descrito por Murashige y Skoog (1962) el cual carece de hormona vegetal de crecimiento y se prepara en forma sólida agregando agar bacteriológico (medio MX) (Plewa et al. 1988).

A partir de callos de *Nicotiana tabacum* de la línea TX1 en medio sólido (MX), conservados a 28^o C y resguardados de la luz,

se aíslan algunas células y se colocan en medio de cultivo líquido (MX) para que empiecen a proliferar en suspensión, manteniendo los matraces protegidos de la luz y en agitación rotatoria constante (150 rpm) a 28° C durante 7 días. De estos cultivos líquidos se inoculan 3 g (peso fresco) en 100 ml de medio MX y se dejan crecer en las mismas condiciones otros siete días.

Antes de iniciar el cocultivo se dejan de agitar las células en suspensión para que se precipiten y se decanta el sobrenadante. Se vacían las células en tubos de centrifuga estériles y con tapa y se agrega medio MX⁻ [que no contiene ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)]. Este compuesto es mutagénico en Salmonella, por lo cual debe eliminarse del cultivo. Se realiza una primera centrifugación a 140 X g por 3 min a 0° C, se tira el sobrenadante, se resuspende suavemente para lavar el botón celular con MX⁻ y se tapan los tubos. Se efectúa una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones, se quita el sobrenadante y se agrega suficiente medio MX⁻ para obtener una concentración de 100 mg de células TX1 por ml de medio MX⁻, se tapan, se agitan suavemente y se colocan en hielo hasta su utilización (<30 min). Todos los cambios deben realizarse en un campo estéril para evitar la contaminación.

1.1 Preparación de las bacterias y medios para tratamiento

Las cepas de prueba se mantienen a -80°C y de ahí se siembran en caldo nutritivo Luria (LB), de ese cultivo de toda la noche se aíslan para sembrarse en cajas de Petri con medio que contiene histidina/biotina para obtener las placas patrón que se conservan en refrigeración y deben resembrarse por lo menos cada mes (Maron y Ames 1983).

A partir de dichas placas patrón se realiza la siembra en 100 ml de caldo líquido Luria (LB) para su proliferación, tomando con el asa una porción de colonia y colocando en agitación constante y en oscuridad a 37°C durante toda la noche.

Debido a la necesidad de concentrar las células bacterianas, estas se cosechan por centrifugación para lo cual en un frasco de centrifuga estéril de 250 ml se vacía el medio con las bacterias cerrándolo inmediatamente en un campo estéril; se someten a centrifugación a 4000 X g durante 5 min a 0°C. Se elimina el sobrenadante y el botón se resuspende y se lava con amortiguador de fosfatos a una concentración 100 µM y a pH=7.4, se tapa y se agita en vórtex para disolver el botón.

Se centrifuga nuevamente durante 5 min, se decanta el sobrenadante y se añaden 10 ml de amortiguador de fosfatos, se coloca en el vórtex hasta que se disgregue el botón y se mantienen en hielo.

Con el objeto de verificar la densidad de bacterias se hacen lecturas en el espectrofotómetro, para lo cual se vierten 5 ml de amortiguador en dos tubos, uno se usa como blanco y al otro se le agregan 50 µl de las bacterias, se agita y se lee a 660 nm de longitud de onda y se ajusta a 1×10^{10} células/ml como óptimo para llevar a cabo los experimentos.

El fenotipo de las cepas es confirmado en cada experimento por lo que de manera paralela se verifica la presencia de los marcadores genéticos. Para la mutación rfa se utiliza la prueba de violeta cristal en la forma siguiente: se agrega 0.1 ml de un cultivo líquido fresco de toda la noche a un tubo que contiene 2 ml de agar de superficie fundido a 45°C. Se agita en vórtex por 3 segundos a velocidad baja y se vacía en una caja de Petri con agar nutritivo (Difco bacto nutrient broth) en el centro se coloca un disco de papel filtro estéril con ayuda de pinzas estériles y en él se pipetea 10 µl de una solución 0.1 % de violeta cristal, se deja solidificar el agar, se invierte la caja y se incuba a 37°C. Después de 48 horas aparece una zona clara de inhibición alrededor del disco hasta donde difundió el colorante, indicando la presencia de la mutación rfa, al permitir que moléculas grandes como las del violeta cristal atraviesen la pared celular de la bacteria y la maten.

Para el factor-R de resistencia a la ampicilina se prepara medio nutritivo que contiene histidina 2 g/400 ml y biotina 0.5 mM, así como ampicilina 8 mg/ml en cajas de Petri en las cuales con un hisopo estéril o con el asa de siembra se hace un rayado con el cultivo líquido de toda la noche. Después de 24 horas incubándose a 37° C en oscuridad se puede ver el crecimiento a lo largo de las estrias hechas con las cepas que poseen este factor.

1.2 Agentes químicos y disolventes

La 4-nitro-o-fenilendiamina cristalina (NOP, CAS, No. 9504), lote # 25 F-3559 fue obtenida de Sigma Chemical Co. y los insecticidas foxim o volatón y metil azinfos o gusación de Bayer de México S.A. Tanto la anilina como los insecticidas se disolvieron en agua bidestilada.

1.3 Ensayo de cocultivo célula vegetal/microorganismo

En frascos para cocultivo de 40 ml, estériles, se adicionan 4.5 ml de la suspensión de células vegetales, 0.5 ml de bacterias y finalmente el insecticida, se dejan incubar por 1.5 h a 28°C en agitación rotatoria constante en oscuridad a 170 rpm.

En tubos de ensayo con tapa que contienen 2 ml de agar de superficie estéril fundido a 45°C se aplican 500 µl de cada frasco de cocultivo, se agita en vértex, se vacía y se distribuye homogéneamente en toda la superficie de una caja de medio mínimo y se colocan sobre una área plana, esto se realiza por triplicado, cuando el agar solidifica se invierten las cajas y se incuban a 37°C durante 48 horas, para proceder a cuantificar el número de colonias revertantes.

También se usa un testigo en el cual antes de llevar a cabo el cocultivo, las células vegetales se matan por calor y se prueba

la concentración mayor de NOP (100 μg /frasco de cocultivo), con la finalidad de excluir la posibilidad de que sea algún producto de las células vivas lo que causa la transformación y no el metabolismo.

Para los testigos negativos se utiliza amortiguador de fosfatos 100 μM pH=7.4 y medio MX líquido (sin 2,4-D) y para el positivo se emplea NOP (Gentile et al. 1985) que es un promutágeno activado por plantas. Como este compuesto se inactiva con la luz, a partir del cocultivo toda la manipulación se realiza en la oscuridad, las concentraciones usadas se establecieron después de varios experimentos preliminares, siendo de 1, 10 y 100 μg /frasco de cocultivo.

El insecticida organofosforado volatón se aplica a 2500, 5000 y 7500 μg /frasco de cocultivo mientras que para gusación que es demasiado tóxico, después de numerosos experimentos preliminares, se establecieron las cantidades de 1000, 1500 y 2000 μg /frasco de cocultivo. Los insecticidas se filtran a través de membranas miliporo 0.45 μm y se aplican directamente a los frascos de cocultivo.

Los ensayos se efectúan con las cepas TA98 y TA100 y se hacen 3 repeticiones de cada uno de los tratamientos para tener mayor confiabilidad en los resultados. El registro se realiza sin que el observador conozca que tratamientos tiene cada caja para evitar prejuicios.

En el caso del NOP y de los insecticidas se hacen ensayos con y sin las células de tabaco, en cuyo caso, se agrega únicamente el medio MX.

1.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cada tratamiento fueron evaluados usando tres criterios:

- El doblaje de la frecuencia de reversión espontánea sobre los testigos.
- La prueba de θ descrita por Katz (1979) y recomendada por de Serres y Shelby (1979), diseñada para experimentos de mutagénesis que involucran microorganismos, en la que se hacen comparaciones entre la media de eventos por caja obtenidos en las cajas testigo y las cajas experimentales. Se elige un nivel de significatividad de $0.05=1.65$ para considerar una muestra como mutagénica.
- Una respuesta de concentración-efecto.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

En la actualidad, una de las principales fuentes de contaminación ambiental la constituyen los pesticidas los cuales son dispersados indiscriminadamente en el medio. Entre los efectos potencialmente riesgosos de los agentes agroquímicos estan la carcinogénesis, la mutagénesis y la teratogénesis.

El estudio de las propiedades mutagénicas de los pesticidas es ampliado por procedimientos de activación metabólica. La primera descripción de un mutágeno activado metabólicamente es hecha por Malling (1966). Posteriormente la biotransformación in vitro se realiza como práctica de uso común en los ensayos de mutagénesis en microorganismos (Malling 1971, Ames et al. 1973b, 1975, Maron y Ames 1983). El empleo de diversos tipos de plaguicidas que son dispersados en miles de millones de hectáreas de tierra cultivable en el mundo requiere una variedad de sistemas de transformación metabólica que permitan determinar las propiedades mutagénicas de estos agentes.

Plewa y Gentile (1982) han evaluado las propiedades genotóxicas tanto de insecticidas como de herbicidas a través del metabolismo vegetal. Diferentes sustancias han mostrado ser mutágenos después del tratamiento con sistemas de activación vegetal. Se ha sugerido que algunos agentes pueden ser activados en plantas por sistemas enzimáticos semejantes a los de animales (Higashi 1988).

El método de cocultivo de célula vegetal/microorganismo es un análisis útil desarrollado para estudiar la activación de promutágenos por vegetales (Plewa et al. 1988). Puesto que el sistema de activación consiste de células vegetales en cultivo en suspensión hace que la prueba sea precisa ya que se puede definir cuantitativamente cada componente del tubo de reacción. Puede ser utilizado en el análisis rápido de compuestos químicos o mezclas ambientales complejas, en conjunto con ensayos de activación microsómica de mamíferos usando a *Salmonella* o con otros sistemas de prueba a corto plazo. El organismo indicador biológico puede ser cualquier sistema microbiano bien definido que pueda sobrevivir en el medio de cocultivo (Plewa et al. 1988).

En este trabajo se ha investigado la acción mutagénica provocada por los insecticidas organofosforados foxim y metil azinfos en *Salmonella typhimurium* a través del metabolismo vegetal. Se generan las curvas de dosis-respuesta para ambos pesticidas en presencia y ausencia de activación metabólica por células TX1 de tabaco; en cada caso se observan efectos reproducibles del metabolismo vegetal no obstante que sólo el metil azinfos muestra un claro comportamiento pro-mutagénico a las concentraciones probadas (Tabla 1 y Figs. 9, 10, 11 y 12).

Las células de tabaco de la línea TX1 en cultivo son muy eficientes para transformar promutágenos en mutágenos. Gentile et al. (1987) y Plewa et al. (1988) prueban la mutagenicidad de varias fenilendiaminas en *Salmonella* después de su activación con células de *Nicotiana* y encuentran resultados positivos. Asimismo describen que la capacidad de activación del 2-aminofluoreno es

superior en las células de tabaco que en las del algodón y éstas que en la zanahoria mientras que las células de maíz no lo hacen (Plewa et al. 1988). También señalan que las células TX1 activan a la m-fenilendiamina en mayor grado que la S9 de hígado de mamífero. La S9 de chicharo y tabaco aumentan la mutagenicidad de la NOP, no así la S9 de hígado de mamífero (Gentile et al. 1985).

1.0 Testigo positivo (NOP)

Las células TX1 en este trabajo mostraron una eficiencia óptima para activar metabólicamente al NOP, usado como testigo positivo. La concentración utilizada para el cocultivo fue de 50 mg/ml. Tomando como referencia que Anderson et al. (1988) establecen 125 mg/ml para células de *Tradescantia* como la mejor, se puede inferir que *Nicotiana* tiene una capacidad mayor para la activación bajo las condiciones del presente estudio.

En la tabla 1 y Figs. 7 y 8 se muestran los resultados del efecto producido por diferentes concentraciones de la NOP (testigo positivo) con y sin activación metabólica. La NOP ha sido tomada como modelo por ser componente de numerosos herbicidas y tener gran similitud estructural con los metabolitos de diversos pesticidas (Lamoureaux y Frear 1979). Se observa que en el caso de la cepa TA98 al agregar directamente este compuesto se producen diferencias significativas en 10 y 100 μ g con una relación de concentración-efecto y al añadir las células de tabaco es notable el enorme incremento del efecto mutagénico. Estos resultados concuerdan con los descritos por Gentile et al. (1985) en los que dicha sustancia es mutagénica para *Salmonella* en ausencia de sistemas de activación animal o vegetal y que las plantas la transforman en un mutágeno muy potente. El primer paso en la activación de las aminas aromáticas por mamíferos es una N-hidroxilación que depende del sistema enzimático P-450 (Plewa et al. 1991). Un derivado N-hidroxi-2-aminofluoreno forma productos de adición e induce predominantemente mutaciones por corrimiento de bases (Ames 1972)

Se ha sugerido que los derivados de la anilina son biológicamente menos activos cuando los grupos amino están en la posición para que cuando están en la posición orto (Sontang 1982). Esta observación es corroborada por Milman y Peterson (1984) en su revisión de la carcinogenicidad de 23 diferentes fenilendiaminas, y con ellos concuerdan los datos obtenidos en este experimento ya que la fenilendiamina tiene los sustituyentes en la posición orto, que es biológicamente la más activa lográndose incrementos de la frecuencia de reversión hasta de 600 veces por encima del valor de los testigos en la cepa TA98 (Fig. 7) y del triple de los testigos para TA100 (Fig. 8). La activación vegetal de la NOP involucra una peroxidación (Gentile et al. 1985).

Al agregar NOP directamente a la cepa TA100, se presentan diferencias significativas con relación a los testigos negativos sólo con la concentración mayor y al añadir las células vegetales únicamente se observa aumento importante en esa misma dosis (Tabla 1 y Fig. 8); estos valores coinciden con los descritos por Gentile et al. (1987) quienes observan mayor sensibilidad a la NOP en la cepa TA98 que en la TA100; asimismo mencionan un incremento de la mutagenicidad en las dos cepas en presencia de células TX1 en cocultivo.

3.1 Testigos negativos

Los datos anteriormente descritos demuestran por un lado, que la tasa de mutación revertante en ambas cepas de Salmonella está de acuerdo con las mencionadas por Gentile et al. (1985). Las frecuencias de los testigos coinciden con los intervalos basados en los valores descritos por Maron y Ames (1983) de 30 a 50 revertantes por caja para TA98 y de 120 a 200 revertantes por caja para TA100.

Al colocar en el cocultivo células TX1 muertas por calor junto con Salmonella y NOP se observa que las frecuencias en los dos casos (TA98 y TA100) son similares a cuando se aplica NOP

directamente lo que indica que esta sustancia es activada por el metabolismo y no por la sola presencia de las células (Tabla 1 y Figs. 7 y 8).

La concentración óptima de NOP que produce aumento en la frecuencia de mutaciones revertantes en *Salmonella* con células TX1 es de 100 µg/frasco de cocultivo para TA98 y TA100

3.2 Foxim (volatón)

En la Tabla 1 y Figs. 9 y 10 se muestra la acción del insecticida foxim cuando se adiciona directamente a las cepas TA98 y TA100, evidenciándose que las tasas de mutación revertante se incrementan significativamente. En ambos casos el aumento mayor es en 5000 µg/frasco de cocultivo y posteriormente disminuye en la concentración mas alta, probablemente debido a una acción tóxica del insecticida, evidenciado esto por la disminución y casi desaparición del fondo de bacterias auxotróficas, el efecto se produce al parecer por ambos mecanismos moleculares, la sustitución de bases y corrimiento del mensaje puesto que tiene acción tanto en la cepa TA98 como TA 100. Al realizar el cocultivo se observa que se nulifica el efecto y las frecuencias de mutación revertante se colocan dentro de los valores de los testigos (Tabla 1 y Figs. 9 y 10). Otros estudios en que también se utiliza este insecticida en *Salmonella* con activación metabólica animal, describen resultados negativos en la inducción de mutaciones revertantes (Moriya et al. 1983).

La acción directa del volatón sobre el ADN resulta interesante, ya que desde el punto de vista de la mutagénesis, los insecticidas organofosforados constituyen un grupo importante, puesto que casi todos ellos son derivados del ácido fosfórico en cuya estructura general se presentan dos radicales que son generalmente grupos alquilo (especialmente metilo o etilo), que atacan preferencialmente al átomo de carbono del ADN mediante la alquilación, en algunos casos ocurre en los sitios electrofílicos

(Moutschen-Dahmen et al.1984). Posiblemente la forma de actuar de este insecticida sobre el ADN es mediante mecanismos de alquilación provocando tanto sustitución de pares de bases como pérdida o adición de bases que causan corrimiento del mensaje.

La inhibición de la acción mutagénica del volatón al agregar células vegetales es clara y puede deberse a algún mecanismo de desactivación presente en las células TX1. El metabolismo de muchos de estos compuestos que contienen grupos alquilo unidos a átomos de O, N ó S se realiza con el reemplazo de los grupos alquilo por H. Estas reacciones se llevan a cabo por sistemas enzimáticos oxidantes de función mixta (MFO). Ejemplos de este tipo de reacciones son: la O-desalquilación de los insecticidas metoxiclorados, la N-desalquilación del insecticida carbarilo y la S-desalquilación del dimetil mercaptano (Caldwell 1989), (Fig.4). Tomando en cuenta que el volatón es un insecticida que posee grupos activos capaces de alquilar al ADN es probable que la inactivación del mismo suceda en ese sentido. Se ha descrito que las células TX1 poseen enzimas peroxidadas que catalizan reacciones de N-desalquilación entre muchas otras (Lamoureaux y Frear 1979).

Benigni et al.(1979) encuentran que el diclorvos no es mutagénico para *Aspergillus nidulans* después de ser metabolizado por células de *Nicotiana glauca* y postulan que los metabolitos potencialmente mutagénicos de este compuesto fueron degradados por los tejidos vegetales. Rasquinha et al. (1988) prueban el herbicida triallato co-incubado con la fracción S9 de mamífero y con la fracción vegetal S14 de trigo, demostrando que el efecto del herbicida (que normalmente sólo se obtiene en presencia de la fracción S9 de mamífero) es reducido con los extractos vegetales de trigo. Los autores atribuyen este resultado a la inactivación del triallato por el metabolismo vegetal.

Sakai et al. (1990) han descrito que ciertas estructuras vegetales y extractos de plantas contienen una variedad de sustancias antimutagénicas, tales como el beta caroteno, alfa

tocopherol, ácido ascórbico y selenio (Wattenberg 1979, Minakata et al. 1983, Ong et al. 1986, Bala y Grover 1989, Renner 1990 citado por Gentile y Gentile (1991). También mencionan que a pesar de que algunos productos vegetales exhiben su efecto antimutagénico al interferir con los sistemas metabólicos, se cree que la clorofilina, que es un agente oxidante funciona como antimutágeno al interactuar con los grupos activos de los mutágenos Plewa et al. (1991).

Gentile y Gentile (1991) ensayan la relación entre mutagenicidad y antimutagenicidad utilizando 4-nitro-0-fenilendiamina activada con productos vegetales que contienen clorofila la cual junto con la clorofilina que es la sal de sodio y de cobre, han sido identificadas como antimutágenos particularmente efectivos (Ong et al. 1986, 1989, Whong et al. 1988, Negishi et al. 1989). En el estudio de Gentile y Gentile (1991) se observa que tanto la clorofila a y b como la clorofilina son antimutagénicas contra la NOP y sus productos activados por vegetales. Sin embargo, también informan que los que contienen clorofila son muy eficientes para activar a la NOP como mutágeno potente y concluyen que la concentración de clorofila o clorofilina que se requiere para que la capacidad antimutagénica se manifieste puede variar en ocasiones para diferentes mutágenos, eventos genéticos y condiciones de prueba. Debido a esto, los autores sugieren que las investigaciones sobre la antimutagenicidad de los vegetales se acompañen con estudios paralelos sobre la mutagenicidad de dichos productos de plantas y con el potencial de activación de promutágenos de los mismos para establecer la relación riesgo beneficio asociado a diferentes productos alimenticios de origen vegetal que forman parte de la dieta humana (Gentile y Gentile 1991).

A nivel molecular, Plewa et al. (1991) demuestran en células TX1 de tabaco que el dietil ditiocarbamato suprime la activación vegetal de aminas aromáticas a mutágenos, al inhibir a las peroxidasas.

En este trabajo se demuestra que el volatón tiene comportamiento mutagénico dentro de un amplio intervalo, no obstante al aplicar la concentración mayor, es decir 7500 µg/frasco de cocultivo disminuye considerablemente el efecto lo cual puede deberse a una reducción en la viabilidad de la células bacterianas debido a la toxicidad de la concentración alta (Figs. 9 y 10). Al comparar este resultado con el obtenido por Gómez-Arroyo et al. (1987) quienes, por un lado obtienen una respuesta muy débil de ICH inducidos por este compuesto en linfocitos humanos y por el otro, una clara manifestación en la producción de ICH en Vicia faba (Gómez-Arroyo et al. 1988) se puede inferir que quizás en linfocitos la toxicidad del insecticida causa la muerte celular antes de que se logre expresar algún efecto mutagénico. Moriya et al. (1983) también describen datos negativos en *Salmonella typhimurium* usando activación metabólica del hígado de mamíferos (Tabla 2).

3.3 Metil azinfos (gusación)

El metil azinfos (Tabla 1 y Figs. 11 y 12), cuando se aplica directamente inhibe por completo el crecimiento de las colonias de TA98 y de TA100, es notable la desaparición del fondo de bacterias auxotróficas, sin embargo al realizar el cocultivo con *Nicotiana* las tasas de mutación revertante se incrementan significativamente con relación a los testigos en las tres concentraciones para TA98 (Tabla 1 y Fig. 11) y en las dos más altas para TA100 (Tabla 1 y Fig. 12), en ambos casos el valor superior se produce en 1500 µg/frasco de cocultivo, descendiendo después. Esta respuesta puede deberse a diversos factores como: reducción en la supervivencia de las células TA98 y TA100 por el incremento en la concentración del insecticida, la disminución en la viabilidad de las células TX1 y una consecuente reducción de la tasa de activación del gusación, la saturación del sistema enzimático de transformación dentro de las células TX1 por el incremento en la concentración del promutágeno o por todo lo anterior, como se menciona en el

trabajo de Plewa et al. (1988).

Las frecuencias tan elevadas obtenidas cuando se agregan las células de *Nicotiana* implican que probablemente se trata de un mutágeno indirecto activado preferentemente por el metabolismo de las plantas, ya que se han descrito resultados negativos en *S. typhimurium* (Carere et al. 1978), en *Saccharomyces cerevisiae* (Riccio et al. 1981), en células de criceto chino (Chen et al. 1982) y en cultivo de linfocitos humanos (Gómez-Arroyo et al. 1987), en todos estos casos los ensayos han sido sin activación metabólica. En ratón (Jorgenson et al. 1979) y en el pez *Umbra limi* (Vigfusson et al. 1983), en los cuales también existen complejos microsómicos, los resultados logrados son también negativos, lo mismo que en *S. typhimurium* con fracción microsómica de hígado de mamíferos (Simmon et al. 1976), mientras que en plantas induce efecto c-mitótico (Grant 1973) y provoca incremento en la frecuencia de ICH en *Vicia faba* (Gómez-Arroyo et al. 1988). En células CHO K1 Alam et al. (1974) observan rompimientos e intercambios cromosómicos lo mismo que en células WI-38 de humanos (Alam y Kasatiya 1974). Simmon et al. (1976) encuentran recombinación mitótica en *S. cerevisiae*. Como puede notarse los datos descritos por otros autores con y sin activación microsómica de hígado de mamíferos o en animales completos ha sido contradictoria, mientras que con plantas completas o con sistemas metabólicos vegetales son positivos (Tabla 3). La respuesta obtenida sugiere que el insecticida metil azinfos (gusatió) es un promutágeno activado preferentemente por las fracciones microsómicas de las plantas. Plewa y Gentile (1982) anotan que a pesar de que numerosos agentes químicos son transformados tanto por plantas como por animales, algunos parecen ser metabolizados exclusivamente por plantas, tal es el caso de la atrazina, la cianazina, el propanol, el alaclor, el heptacloro y el clordano (Plewa et al. 1984b).

Como ya anteriormente se dijo, hay evidencias experimentales que indican que tanto la fracción S9 como las enzimas aisladas de vegetales están involucradas en la peroxidación lo que conduce al

aumento de la mutagenicidad de la NOP. Las plantas tienen numerosas vías a través de las cuales los agentes xenobióticos pueden metabolizarse. Las oxidaciones se consideran entre las reacciones más importantes (Dohn y Krieger 1981) y varias enzimas de plantas juegan un papel importante en la transformación oxidante (Lamoureux y Frear 1979), especialmente las peroxidasas (Saunders et al. 1964, Yamasaki 1974). Estas enzimas catalizan dos categorías generales de reacciones oxidantes: la peroxidación clásica que utiliza H_2O_2 como donador de oxígeno y la otra que emplea oxígeno molecular (Lamoureux y Frear 1979, Plewa et al. 1991). Muchos tipos de reacciones suelen llevarse a cabo en plantas por peroxidasas, incluyendo la oxidación de grupos metilo y aromáticos, descarboxilaciones e hidroxilaciones de anillos y condensación oxidante de fenoles y aminas aromáticas (Yamasaki 1974, Lamoureux y Frear 1979). Probablemente al metil azinfos o gusatión lo metabolizaron las células vegetales a través de un mecanismo de oxidación de los grupos metilo, ya que Plewa et al. (1991) sugieren que el mecanismo primario en la modificación realizada por células TX1 es a través de una ruta oxidada en la cual el promutágeno sirve como donador de hidrógeno. Será necesario explorar un rango de concentraciones más bajas (no tóxicas) para poder observar si el gusatión por sí mismo no es mutagénico y puede clasificarse como pro-mutagénico o si por el contrario el metabolismo únicamente está disminuyendo su toxicidad y haciendo que se evidencie su efecto.

La sensibilidad diferencial detectada en este estudio entre ambas cepas bacterianas en el sentido de que la TA98 (Figs. 7, 8 y 11) responde más la TA100 (Figs. 8, 10 y 12) es consistente con los datos obtenidos por otros investigadores. Gentile et al. (1987) comprueban que la NOP es un mutágeno potente que actúa directamente en las cepas TA98 y TA100, no obstante la primera es más sensible que la segunda. La mutagenicidad de la NOP fue reducida en el trabajo mencionado en ambas cepas al agregar la fracción S9 de hígado de mamíferos, mientras que con S9 vegetal en el ensayo de cocultivo NOP aumenta significativamente su mutagenicidad en presencia de células TX1 esto último coincide con los

resultados obtenidos en el presente estudio.

IV. CONCLUSIONES

En esta investigación se demuestra que la sensibilidad del método de cocultivo es tal que permite detectar fácilmente el efecto de concentraciones que van de 1 a 7500 $\mu\text{g}/\text{frasco}$ de cocultivo como se ha mencionado previamente en la literatura.

Se confirma que la línea TX1 de *Nicotiana tabacum* es capaz de activar eficientemente al promutágeno 4-nitro-o-fenilendiamina empleado como testigo positivo a un compuesto que es mutagénico en *S. typhimurium* cepas TA98 y TA100 y que las condiciones para dicha activación son óptimas en vegetales de 7 días de crecimiento, cuando están a una concentración de 100 mg/ml.

Al comparar el comportamiento de los dos insecticidas evaluados se puede concluir que, por un lado el volatón actúa como mutágeno directo a las concentraciones probadas, mientras que el gusatión lo hace como promutágeno que es activado por las células TX1. Además, aplicado directamente resulta sumamente tóxico.

Los resultados obtenidos en esta investigación establecen por una parte, cuales son los parámetros óptimos de tratamiento para realizar la técnica de cocultivo en las condiciones de este laboratorio y por, otra muestran el potencial mutagénico de ambos insecticidas.

Debido a que los estudios acerca de los efectos mutagénicos que proceden al almacenamiento y a la bioactivación de pesticidas en plantas son escasos y en vista del papel relevante de las plantas en la red trófica y por lo tanto en la dieta humana, habrá necesidad de una investigación mayor y más sistemática para reunir los elementos de juicio que permitan sugerir la regulación de su venta y uso para disminuir el riesgo genético que puedan implicar

V. REFERENCIAS

- Alam M. y Kasatiya S. (1974). Chromosomal aberrations induced by an organic phosphate pesticide. *Can. J. Genet. Cytol.* 16, 701.
- Alam M., Corbell M., Chagnon A. y Kasatiya S. (1974). Chromosomal anomalies induced by the organic phosphate pesticide Guthion in Chinese hamster cells. *Chromosoma* 49, 77-86.
- Aldridge W.N. (1971). The nature of the reaction of organophosphorus compounds and carbamates with esterases. *Bull. WHO* 44, 25.
- Ames B.N. (1972). A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens. En: Sutton H.E. y Harris M.I. (Eds.). *Mutagenic effects of environmental contaminants*. Academic Press, Nueva York, pp. 57-66.
- Ames B.N., Lee F.D. y Durston W.E. (1973a). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 70, 782-786.
- Ames B.N., Durston W. E., Yamasaki E. y Lee F.D. (1973b). Carcinogens are mutagens : a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 70, 2281-2285.
- Ames B.N., McCann J. y Yamasaki E. (1975a). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364.
- Ames B.N., Kammen H.O. y Yamasaki E. (1975b). Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72, 2423-2427.

- Ames B.N. y McCann J. (1981). Validation of the Salmonella test: a reply to Rinkus and Legator. *Cancer Res.* 41, 4192-4196.
- Anderson V.A., Plewa M.J. y Gentile J.M. (1988). The plant activation of m-phenylenediamine by *Tradescantia* clone 03 and clone 4430 cells in liquid suspension culture. *Mutat. Res.* 197, 303-312.
- Arnold D. (1971). Mutagenic study with Guthion in albino male mice. *Industr. Biol. Test Lab. Inc.*
- Bala S. y Grover I.S. (1989). Antimutagenicity of some citrus fruits in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res* 222, 141-148.
- Bedford C.T. y Robinson J. (1972). The alkylating properties of organophosphorus. *Xenobiotica* 2, 307-337.
- Benedict W.F. (1976). Morphological transformation and chromosome aberrations produced by two hair components. *Nature* 260, 368-369.
- Benigni R., Bignami M., Camoni I., Carere A., Conti G., Iachetta R., Morpurgo G. y Ortali V.A. (1979). A new in vitro method for testing plant metabolism in mutagenicity studies. *J. Toxicol. Environ. Health* 5, 809-819.
- Blair D., Hoadley E.C. y Hutson D.H. (1975). The distribution of dichlorvos in the tissues of mammals after its inhalation or intravenous administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31, 243-253.
- Blijleven W.G.H. (1977). Mutagenicity of four hair dyes in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 48, 181-186.
- Brusick D., Simmon V., Rosenkranz H., Ray V. y Stafford R. (1980). An evaluation of the *Escherichia coli* WP2 y WP2 uvr A reverse mutation assay. *Mutat. Res.* 76, 169-190.

- Caldwell J. (1989) Xenobiotic metabolism: an introduction. En: Hutson D.H. Caldwell J. y Paulson G.D. (Eds.). Intermediary xenobiotic metabolism in animals: methodology, mechanisms and significance. Londres, pp. 3-12.
- Carere A., Ortali V., Cardamone G. y Morpurgo G. (1978). Mutagenicity of dichlorvos and other structurally related pesticides in Salmonella and Streptomyces. Chem. Biol. Interact.. 22, 297-308.
- Chen H.H., Sirianni S.R. y Huang C.C. (1982). Sister-chromatid exchanges and cell-cycle delay in Chinese hamster V79 cells treated with 9 organophosphorus compounds (8 pesticides and 1 defoliant). Mutat. Res. 103, 307-313.
- Cremlyn R. (1978) Pesticides preparation and mode of action. Wiley, Nueva York, pp. 75-76.
- Crosby D.G. (1982). Pesticides as environmental mutagens. En: Flenk R. A. y Hollaender A. (Eds.). Genetic toxicology: an agricultural perspective. Plenum Press, Nueva York, pp. 201-218.
- de Serres F.J. y Shelby M.D. (1979). Recommendations on data production and analysis using the Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutat. Res. 64, 159-165.
- Dohn D.R. y Krieger R.I. (1981). Oxidative metabolism of foreign compounds by higher plants. Drug Metab. Rev. 12, 119-158.
- EPA (Environmental Protection Agency) (1980). Sixth report of the Interagency Testing Committee to the Administrator, Receipt of the report and request for comments regarding priority list of chemicals, Federal Register 45 (104), 35897-35910.
- Fest C. y Schmidt K.J. (1973). The chemistry of organophosphorus pesticides. Springer, Berlin.

- Finlayson D.G. y MacCarthy H.R. (1973). Pesticide residues in plants. En: Edwards C.A. (Ed.). Environmental pollution by pesticides. Plenum Press, Nueva York, p. 80.
- Fukuto T.R. (1971). Relationships between the structure of organophosphorus compounds and their activity as acetylcholinesterase inhibitors. Bull. WHO 44, 31.
- Gentile J.M. y Plewa M. J.(1975). Bioassay for screening host mediated proximal mutagens in agriculture. Mutat. Res. 31, p.317.
- 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., Dunlap J., Sechrist 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., Townsend S. y Plewa M.J. (1985). In vitro enhancement of the mutagenicity of 4-nitro-0-phenilene-diamine by plant S9. Environ. Mutagen. 7, 73-85.
- Gentile J.M., Gentile G.J. y Plewa M.J.(1986). In vitro activation of chemicals by plants: a comparison of techniques. Mutat. Res. 164, 53-58.
- Gentile J.M., Gentile G.J. y Plewa M.J. (1987). Mutagenicity of selected aniline derivatives to Salmonella following plant activation and mammalian hepatic activation. Mutat. Res. 188, 185-196.
- Gentile J.M. y Plewa M.J. (1988). The use of cell-free systems in plant activation studies. Mutat. Res. 197, 173-182.

Gentile J.M. y Gentile G.J. (1991). The metabolic activation of 4-nitro-o-phenylenediamine by chlorophyll-containing extracts. The relationship between mutagenicity and antimutagenicity. *Mutat. Res.* 250, 79-86.

Gómez-Arroyo S., Noriega-Aldana N., Juárez-Rodríguez D. y Villalobos-Pietrini R. (1987). Sister chromatid exchanges induced by the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, phoxim and methyl azinfos in cultured human lymphocytes. *Contam. Ambient.* 3, 63-70.

Gómez-Arroyo S., Castillo-Ruiz P., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini R. (1988). Vicia faba-sister chromatid exchanges of the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, oxidemeton methyl, azinphos methyl and phoxim. *Cytologia* 53, 627-634.

Gow J.S. (1988). Introduction. En: Richardson M. L. (Ed.). Risk assessment of chemicals in the environment Royal Society of Chemistry, Burlington House, Londres. p.3.

Grant W.F. 1970. Pesticides and heredity. *Macdonald J.* 31, 211-214.

Grant W.F. (1973). Cytological effects of environmental mutagen-pesticides. *Mutat. Res.* 21, 221-222.

Green M.H.L. y Muriel W. J. (1976). Mutagen testing using Trp⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 38, 3-32.

Guthrie F.E. (1980). Pesticides and humans. En: Guthrie F.E. y Perry J.J. (Eds.). Introduction to environmental toxicology. Blackwell Science Pub., Nueva York. pp.

Hansen C.L., Plewa M.J., Blair L.C. y Gentile. J.M. (1985) Activation of 2-aminofluorene by cultured plant cells using

the forward mutation assay *Salmonella typhimurium* SV50.
Environ. Mutagen. 7, Suppl. 3, 42.

Higashi K., Nakashima K., Karasaki Y., Kukunaga M. y Mizuguchi Y.
(1981). Activation of benzo(a)pyrene by microsomes of higher
plant tissues and their mutagenicity. Biochem. Interact. 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 tulip bulbs. Biochem. Biophys. Res. Commun.
115, 46-52.

Higashi K., Ikeuchi K., Obara M., Karasaki Y., Hirano H., Gooth S.
y Koga Y. (1985) Purification of a single major form of
microsomal cytochrome P-450 from tulip bulbs (*Tulipa*
gesneriana L.) Agric. Biol. Chem. 49, 2399-2405.

Higashi K. (1988). Metabolic activation of environmental chemicals
by microsomal enzymes of higher plants. Mutat. Res. 197,
273-288.

Jorgenson T.A., Rushbrook C.J. y Newel G.W. (1976). In vitro
mutagenesis investigations of ten commercial pesticides.
Toxicol. Pharmacol. 37, 109 (Abstr.).

Karczmar A. G., Nishi S. y Blaber L.C. (1970). Investigations
particularly by means of anticholinesterase agents of the
multiple peripheral and central cholinergic mechanisms and of
their behavioral implications. Acta Vitaminol. Enzymol. 24,
p. 131.

- Katz A.J. (1979). Design and analysis of experiments on mutagenicity. II. Assays involving microorganisms. *Mutat. Res.* 64, 61-77.
- Klopman G., Contreras R., Rosenkranz H.S. y Waters M. D. (1985). Structure genotoxic activity relationship of pesticides: a comparison of the results of several short-term assays. *Mutat. Res.* 147, 343-356.
- Knaak J. B., Stahman M.A. y Casida J.E. (1962). Peroxidase and ethylenediamine tetracetic acid-ferrous iron-catalyzed oxidation and hidrolisis of parathion. *J. Agric. Food Chem.* 10, 154-158.
- Lai C., Dabney B.J. y Shaw C. R. (1978). Inhibition of in vitro metabolic activation of carcinogens by wheat sprout extracts. *Nutr. Cancer* 1, 27-30.
- Lamoureux G.L. y Frear D.S. (1979). Pesticide metabolism in higher plants: in vitro enzyme studies. En: *Xenobiotic metabolism: in vitro methods*. American Chemical Society, Washington, D.C. 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 chemistry and biochemistry in relation to pesticide metabolism and action*. American Chemical Society, Washington D. C. Vol.158, pp.153-164.
- Lamoureux G.L. y Rusness D.G. (1986). Xenobiotic conjugation in higher plants. En: Paulson G.D., Caldwell J., Hutson D.H., Menn J.J. (Eds.). *Xenobiotic conjugation chemistry*. ACS Symp. Ser. 229, American Chemical Society, Washington D C, pp. 62-105.

- Lewis R.J. Sr. (1991). Hazardous chemicals desk reference. 2nd. Ed., Van Nostrand Reinhold, Nueva York, p. 100, 101, 110.
- Litterst Ch. L. y Lichtenstein E.P. (1971). Effects and interactions of environmental chemicals on human cells in tissue culture. Arch. Environ. Health 22, 454-459.
- Loprieno N. y Adler I.D. (1980). Cooperative programme of the European Economic Community on short-term assays for mutagenicity. En: Montesano R., Bartsh H. y Tomatis L. (Eds.). Molecular and cellular aspects of carcinogen screening tests. Lyon, Francia Int. Agency Res. Cancer Sci. Publ. No. 27, pp. 331-341.
- Malling H.V. (1966). Mutagenicity of two potent carcinogens, dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine in *Neurospora crassa*. Mutat. Res. 3, 537-540.
- Malling H.V. (1971). Dimethylnitrosamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. Mutat. Res. 13, 425-429.
- Manahan S.E. (1992). Toxicological chemistry 2a. Ed. Lewis, Boca Ratón, p. 108, 222, 223, 409, 411 y 412.
- Markham A., Hartman G.C. y Parke D. V. (1972). Spectral evidence for the presence of cytochrome P-450 in microsomal fractions obtained from some higher plants. Biochem. J. 130, p. 90.
- Maron D.M. y Ames B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 113, 137-215.
- Matijesevic Z., Erceg Z., Denic R., Bacun V. y Alacevic M. (1980). Mutagenicity of herbicide cyanazine: plant activation bioassay. Mutat. Res. 197, 325-336.

- Mayer V. W., y Goin C. J. (1980). Induction of mitotic recombination by certain hair-dye chemicals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 78, 243-252.
- McCann J., Choi E., Yamasaki E. y Ames B.N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72, 5135-5139.
- McCann J. y Ames B.N. (1976). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 73, 950-954.
- McCann J. y Ames B.N. (1977). The *Salmonella*/microsome mutagenicity test: predictive value for animal carcinogenicity. En: Hiatt H. H., Watson J.D. y Winsten J.A. (Eds.). *Origins of human cancer*. Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 1431-1450.
- 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.* 197, 325-336.
- Menn J.J. y Still G.G. (1977). Metabolism of insecticides and herbicides in higher plants. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 5, 1-21.
- Menn J.J. (1978). Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. *Environ. Health Perspect.* 27, 113-124.
- Milman H.A. y Peterson C. (1984). Apparent correlation between structure and carcinogenicity of phenylenediamines and related compounds. *Environ. Health Perspect.* 56, 261-273.
- Minakata H., Komura H., Nakanishi K. y Kada T. (1983). Proto anomonium, an antimutagen isolated from plants. *Mutat. Res.* 116, 317-322.

- Moriya M., Ohta T., Watnabe K., Miyasawa T., Kato T. y Shirasu Y. (1983). Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. *Mutat. Res.* 116, 185-216.
- Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen M. y Degraeve N. (1984). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of insecticides. En: Kirsch-Volders M. (Ed.). *Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of industrial pollutants*. Plenum Press, 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. (Eds.). *Progress in pesticide biochemistry and toxicology*, Vol. 3 pp. 127-203.
- Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- Natarajan A.T. y Obe G. (1986). How do in vivo mammalian assays compare to in vitro assays in their ability to detect mutagens. *Mutat. Res.* 167, 189-201.
- National Academy of Sciences USA (1980). Control de plagas y animales. Manejo y control de plagas de insectos. Limusa, México, Vol. III pp. 379-459.
- Negishi T., Arimoto S., Nishizaki C. y Hayatsu H. (1989). Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5-h-pirido [4-3-b] indole (Trp-p-2). *Carcinogenesis* 10, 145-149.
- Nilan R. A. (1978). Potential of plant genetic systems for monitoring and screening mutagens. *Environ. Health Perspect.* 27, 181-196.

- O'Brien R.D. (1967). Insecticides. Academic Press, Nueva York
- O'Brien R.D. (1969). Phosphorylation and carbamylation of cholinesterase. Ann. N. Y. Acad. Sci. 160, p. 204.
- Ong T.M., Whong W. Z., Stewart J. y Brockman H.E. (1986). Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. Mutat. Res. 173, 111-115.
- Ong T.M., Whong W.Z. y Stewart H.E. (1989). Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in Salmonella typhimurium strain TA98. Mutat. Res. 222, 19-25.
- Owais W.M., Rosichan R.C., Ronald A., Kleinhofs A. y Nilan R.A. (1983). A mutagenic metabolite synthesized by Salmonella typhimurium grown in the presence of azide is azidoalanine. Mutat. Res. 118, 229-239.
- Owais W.M. y Kleinhofs A. (1988). Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems. Mutat. Res. 197, 313-323.
- Perry P. y Searle C. (1977). Induction of sister-chromatid exchange in Chinese hamster cells by the hair dye constituents 2-nitro-p-phenylenediamine and 4-nitro-o-phenylenediamine. Mutat. Res. 56, 207-210.
- Pimentel D. (Ed.) (1981). CRC Handbook of pest management in agriculture. CRC Press, Boca Raton, FL, Vol. I p.3.
- Plewa M.J. y Gentile J.M. (1975). A maize-microbe bioassay for detection of proximal mutagenicity of agricultural chemicals. Maize Genet. Corp. News Lett. 49,40-43.
- Plewa M.J. y Gentile J.M. (1976). Mutagenicity of atrazine: a maize microbe bioassay. Mutat. Res. 38, 287-292.

- Plewa M.J. (1978). Activation of chemicals into mutagens by green plants: a preliminary discussion. Environ. Health Perspect. 27, 45-50.
- 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 Press, Nueva York, Vol. 7, pp. 401- 420.
- Plewa M.J., Weaver D.L., Blair L.C. y Gentile J.M. (1983). The activation of 2-aminofluorene by cultured plant cells. Science 219, 1427-1429.
- Plewa M.J., Dowd P.A. y Wagner E.D. (1984a). Calibration of the maize y g2 assay using gamma radiation and ethyl methane-sulfonate. Environ. Mutagen. 6, 781-795.
- Plewa M.J., Wagner E.D., Gentile G.J. y Gentile J.M. (1984b). 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 coinubation assay for the analysis of plant-activated promutagens. Mutat. Res. 197, 207-219.
- Plewa M.J., Smith S.R. y Wagner E. D. (1991). Diethylditiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibition tobacco cell peroxidase. Mutat. Res. 247, 57-64.
- Preussman R., Schneider H. y Epple F. (1969). Untersuchungen zur wachweis Alkyllierender Agentien. Arzneimittel Forschung 19, 1059-1073.
- Price C.A. (1978). Plant cell fractionation. En: Fleischer S. y Packer L. (Eds.) Methods in enzymology. Academic Press, Nueva

York, Vol. XXXI, pp. 544-552.

- Rasquinha I.A., Wildeman A.G. y Nazar R.N. (1988). Studies on the use of plant extracts in assessing the effects of plant metabolism on the mutagenicity and toxicity of pesticides. *Mutat. Res.* 197, 261-272.
- Reichart D., Salaun J.P. Benveniste I. Y Durst F. (1979). Induction by manganese, ethanol, phenobarbital and herbicides of microsomal cythochrome P-450 in higher plant tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 301-303.
- Renner H.W. (1990). In vivo effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen induced chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 244, 185-188.
- Riccio E., Sheperd G., Pomeroy A., Mortelmans K. y Waters M. D. (1981). Comparative studies between the *S. cerevisiae* D3 and D7 assay of eleven pesticides. 12th Ann. Meeting Environ. Mutagen. Soc. p. 28.
- Rich P.R. y Bendall D.S. (1975). Cytochrome components of plant microsomes. *Eur. J. Biochem.* 55, 333-341.
- Rinkus S.J. y Legator M.S. (1979). Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. *Cancer Res.* 39, 3289-3318.
- Rinkus S.J. y Legator M.S. (1981). *Salmonella* revisited: a reply to Ames and McCann. *Cancer Res.* 41, 4196-4203.
- Rosenkranz H.S., Klopman G., Chankong V., Pet J. y Haines F. (1984). Prediction of environmental carcinogenesis: a strategy for the mid 1980'S. *Environ. Mutagen.* 6, 231-258.

- Sakai Y., Nagase H., Ose T., Kito H., Sato T., Kawai M. y Mizuno M. (1990). Inhibitory action of peony root extract on the mutagenicity of benzo(a)pyrene. *Mutat. Res.* 244, 129-134.
- Sandermann H. Jr. (1982). Metabolism of environmental chemicals: a comparison of plant and liver enzyme systems. En: Klekowsky E.J.Jr.(Ed.). *Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology*. PRAEGER, Nueva York, Vol. I pp. 3-32.
- Sandermann H. Jr. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.* 197, 183-194.
- Saunders B.C., Homes-Siedle A.G. y Stark B.P. (1964). *Peroxidase*. Butterworth Washington, 213 pp.
- Scott B. R., Sparrow A.H., Scwemmer S.S. y Schairer L.A. (1976). Plant activation of 1,2-dibromoethane (EDB) to a mutagen of greater potency. *Mutat. Res.* 49, 203-212.
- Searle C.D., Harnden D. y Venitt S. (1975) Carcinogenicity and mutagenicity tests of some hair colourants and constituents. *Nature (Londres)* 255, 505-507.
- Shane B.S. y Looney A.L. (1989). Activation of two environmental mixtures by plant S9. *Mutat. Res.* 222, 9-18.
- Shimabukuro R.H., Lamoureux G.L. y Frear D.S.(1982). Pesticide metabolism in plant reactions and mechanisms. En: Matsumuta F. y Krishna Murti C.R.(Eds). *Biodegradation of pesticides*. Plenum Press, Nueva York, pp. 21-66.
- Shirasu Y., Moriya M., Kato K., Furuhasi A. y Kada T. (1976). Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutat. Res.* 40, 19-30.

Simmon V.F., Poole D.C. y Newel G.W. (1976). In vitro mutagenic studies of twenty pesticides. Toxicol. Appl. Pharmacol. 37, 109 (abstr.).

Somerville S. (1988). Studies on the fate of chemicals in the environment with particular reference to pesticides. En:Richardson M.L. (Ed.). Risk assessment of chemicals in the environment. Royal Society of Chemistry, Burlington House, Londres, pp. 451-454.

Sontang J.M. (1982). Carcinogenicity of substituted benzendiamines (phenylenediamines) in rats and mice. J. Natl. Cancer Inst. 66, 591-602.

Takehisa S. y Kanaya N. (1982). SCE induction in human lymphocytes by combined with aniline and norharman. Mutat. Res. 101, 165-172.

Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. (1988). Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. Mutat. Res. 197, 195-205.

Van Der Valk H.C.P.M. (1984). Determination of proteases in isolated washed protoplasts: inactivation of proteases in cell wall-degrading enzyme mixtures used in protoplast isolation. Plant Sci. Lett. 36, 201-204.

Vigfusson N.V., Vyse E.R., Pernsteiner C.A. y Dawson R.J. (1983). In vitro induction of sister-chromatid exchanges in *Umbra limi* by the insecticides endrin, chlordane, diazinon and guthion. Mutat. Res. 118, 61-68.

Virtnanen A.K. (1962). On enzymatic and chemical reactions in crushed plants. Arch. Biochem. Biophys. 1, 200-208.

- Vonk J.W. (1983). Metabolism of fungicides in plants. En: Hutson D.H. y Roberts T.R. (Eds.). Progress in pesticide biochemistry and toxicology. Wiley, Chichester, Vol. 3, pp. 11-162.
- Wagner E.D., Gentile J.M. y Plewa M.J. (1989). Effects of specific monooxygenase and oxidase inhibitors on the activation of 2-aminofluorene by plant cells. Mutat. Res. 216, 163-178.
- Wattenberg L. W. (1979). Naturally occurring inhibitors of chemical carcinogenesis. En: Miller E.C., Miller J.A., Hirano I., Sugumura T. y Takayama M. (Eds.). Naturally occurring carcinogens-mutagens and modulators of carcinogenesis. Japan Sci. Soc. Press. Tokyo Univ. Park Press. Baltimore pp. 315-329.
- West T.F., Hardy J.E. y Ford J.H. (1952). Chemical control of insect. Wiley, Gran Bretaña.
- Whong W.Z., Stewart J., Brokman H.E. y Ong T.M. (1988). Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B1-induced reversion in Salmonella typhimurium. Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 8, 215-224.
- Wild D. (1975). Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. Mutat. Res. 32, 133-150.
- 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.
- Wooder M.F. y Wright A.S. (1981). Alkylation of DNA by organophosphorus pesticides. Acta Pharmacol. Toxicol. 48 (supl.), 51-55.

Yamasaki I. (1974). Peroxidase. En: Hayaish O. (Ed.). Molecular mechanisms of oxygen activation. Academic Press, Nueva York, pp. 535-558.

Yu-Sun C.C., Carter L.A., Sandoval L. y Thompson A. (1981). Mutagenicity of 4-nitroquinoleine 1-oxide and three hair dye components in *Sordaria brevicollis*. *Neurospora Newslett.*, 28, 22.

Zeiger E., Pagano D.A. y Robertson I.G.C. (1981). A rapid and simple scheme for confirmation of *Salmonella* tester strain phenotype. *Environ. Mutagen.* 3, 205-209.

TABLAS

Tabla 1. MUTACION REVERTANTE INDUCIDA POR LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS FOXIM (VOLATON) Y METIL AZINFOS (GUSATION) EN Salmonella typhimurium CON Y SIN ACTIVACION METABOLICA POR Nicotiana tabacum

	Copa TA98 ^a revertantes/caja	Valor de D ^b	Copa TA100 ^a revertantes/caja	Valor de O ^b
TESTIGOS NEGATIVOS				
Amortiguador de fosfatou	30.16 ± 0.35		113.58 ± 0.36	
Medio MX	23.50 ± 0.30	0.11	113.48 ± 0.28	0.06
Nicotiana (muertas por calor)+ NOP^c				
100	132.20 ± 4.05	18.97*	120.00 ± 1.88	0.35
TESTIGOS POSITIVOS				
Medio MX + NOP^c				
1	54.00 ± 0.96	1.62	102.70 ± 2.36	0.67
10	93.50 ± 2.16	1.94*	104.10 ± 1.15	0.55
100	166.00 ± 1.16	6.08*	128.75 ± 2.22	4.10*
Nicotiana + NOP^c				
1	53.50 ± 1.10	0.05	102.00 ± 2.10	0.20
10	193.25 ± 0.32	10.40*	93.50 ± 0.33	1.28
100	1888.50 ± 0.87	38.00*	377.00 ± 0.94	6.65*
Medio MX + foxim				
2500	616.50 ± 3.42	19.27*	849.00 ± 13.03	15.10*
5000	3839.45 ± 3.10	44.21*	2270.00 ± 8.65	44.34*
7500	160.00 ± 2.20	6.03*	357.05 ± 3.51	12.65*
Nicotiana + foxim				
2500	35.25 ± 1.10	0.13	95.50 ± 0.61	1.18
5000	25.25 ± 0.08	1.31	107.25 ± 0.29	0.35
7500	21.75 ± 0.26	1.48	93.50 ± 0.10	1.32
Medio MX + metil azifos				
1000	0		0	
1500	0		0	
2000	0		0	
Nicotiana + metil azifos				
1000	80.25 ± 0.77	3.50*	101.50 ± 1.01	0.76
1500	594.00 ± 6.75	8.56*	285.75 ± 0.36	8.66*
2000	270.50 ± 0.21	4.00*	141.60 ± 1.83	1.71*

Todas las concentraciones fueron hechas en µg/g frasco de cocultivo

^aPromedio de tres experimentos ± E.E.

^bLos valores de 0 fueron calculados de acuerdo con el método de Katz (1979).

La significatividad fue establecida en el nivel 0.05 = 1.65

^cNOP 4-nitro-o-fenilenediamina

*Resultados Significativos (P<0.05)

Tabla 2. EFECTOS GENÉTICOS PRODUCIDOS POR FOXIM (VOLATON)

Organismo indicador	Prueba	Activación metabólica	Efecto	Referencias
<i>Salmonella typhimurium</i>	Mutación revertante	^a Con	Negativo	Horiya et al. 1983
Cultivo de linfocitos humanos	ICH	Sin	Débilmente positivo	Gómez-Arroyo et al. 1987
Vicia faba	ICH	in vivo	Positivo	Gómez-Arroyo et al. 1988
<i>Salmonella typhimurium</i>	Mutación revertante	Sin	Positivo	Este trabajo
<i>Salmonella typhimurium</i>	Mutación revertante	^b Con	Negativo	Este trabajo
+				
<i>Nicotiana tabacum</i>				
^a higado de mamíferos				
^b plantas				

Tabla 3. EFECTOS GENETICOS PRODUCIDOS POR METIL ASIMPOS (GUSATION)

Organismo indicador	Prueba	Activación metabólica	Efecto	Referencias
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Mutaciones	Sin	Negativo	Carere et al. 1973
<i>Salmonella typhimurium</i>	Mutación revertante	Sin	Negativo	Carere et al. 1977,
<i>Salmonella typhimurium</i>	Mutación revertante	^a Sin	Negativo	Simmon et al. 1976
<i>Escherichia coli</i>	WP2 urvA	Sin	Negativo	Brusick et al. 1980
<i>Salmonella typhimurium</i>	Recombinación mitótica	^a Sin	Negativo	Simmon et al. 1976
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Recombinación mitótica	^a Sin	Positivo	Simmon et al. 1976
CHO K1	Rompimiento e intercambios cromosómicos	Sin	Positivo	Alam et al. 1974
CHO V79	ICH	Sin	Negativo	Chen et al. 1982
Cultivo de WI-38 humanos	Rompimiento e intercambios cromosómicos	Sin	Positivo	Alam y Kasatiya 1974
Cultivo de lisocitos humanos	ICH	Sin	Negativo	Gómez-Arroyo et al. 1987
Ratones	Mutación letal dominante	in vivo	Negativo	Arnold 1971 Jorgenson et al. 1976
Umbra limi	ICH	in vivo	Negativo	Vigfusson et al. 1983
Plantas	C-mitosis	in vivo	Positivo	Grant 1973
Vicia faba	ICH	in vivo	Positivo	Gómez-Arroyo et al. 1988
<i>Salmonella typhimurium</i>	Mutación revertante	^b Con	Positivo	Este trabajo
+				
<i>Nicotiana tabacum</i>				

^ahígado de mamíferos

^bplantas

FIGURAS

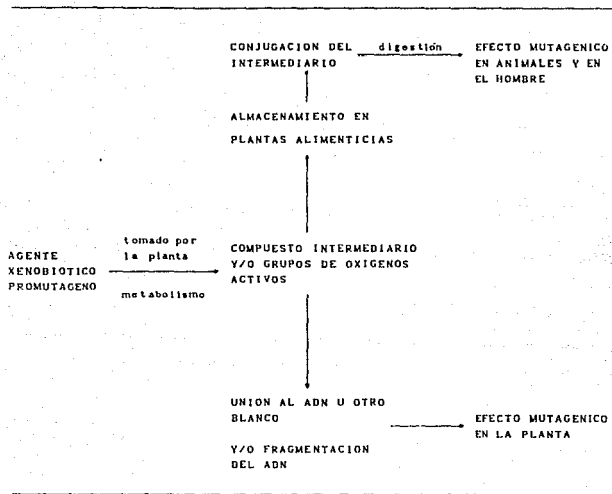


Fig. 1 Vías metabólicas de agentes xenobióticos en plantas, animales y el hombre (Sandermann 1988).

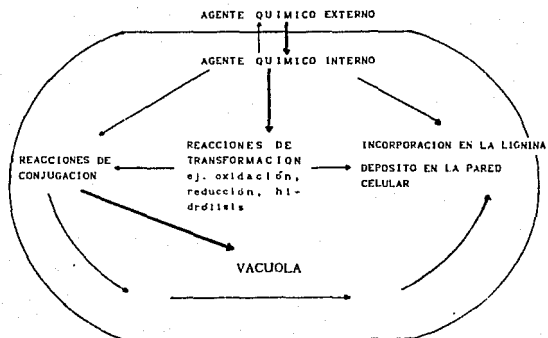


Fig. 2 Esquema propuesto para el metabolismo y "excreción local" de agentes químicos ambientales en las células vegetales (Higashi 1988).

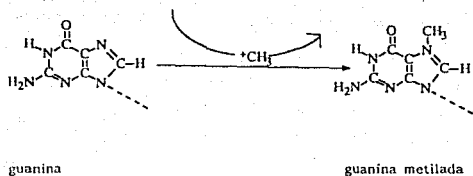


Fig. 3 Alquilación de la guanina en el ADN

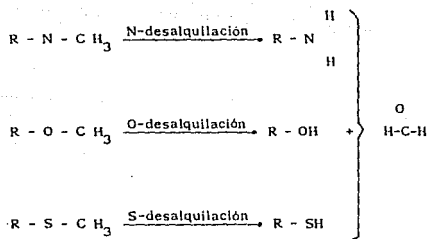


Fig. 4 Reacciones de desalquilación por salida de CH_3 de los átomos de N, O y S en compuestos orgánicos (Manahan 1992).

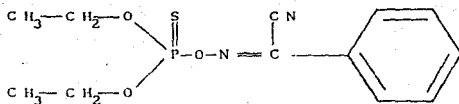


Fig. 5 FOXIM O VOLATON

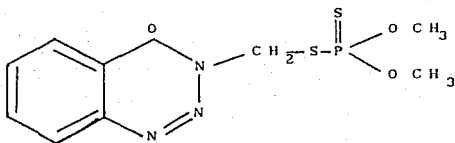


Fig. 6 METIL AZINFOS O GUSTATION

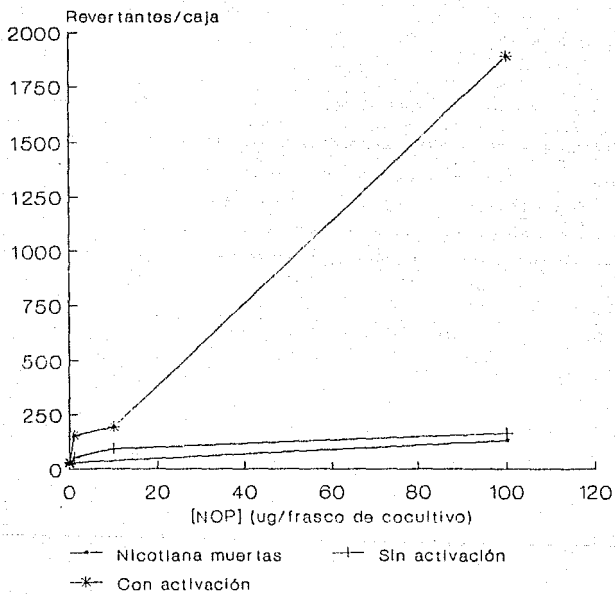


Fig. 7. Mutaciones revertantes inducidas por NOP en *S. typhimurium* TA98 con y sin activación metabólica

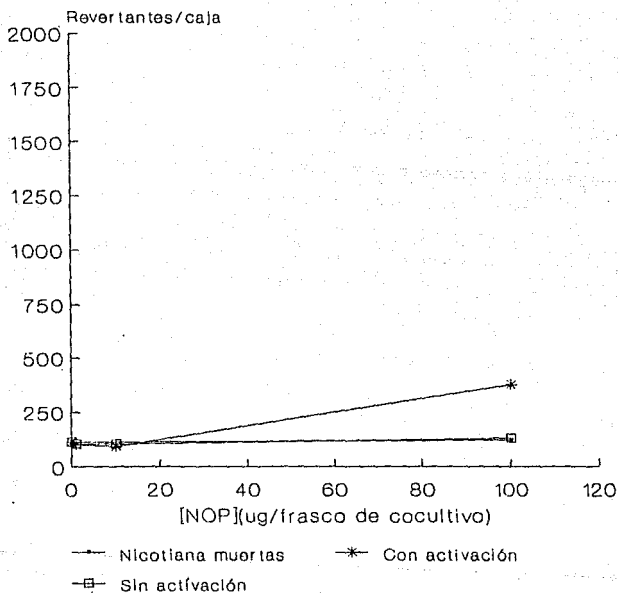


Fig. 8. Mutaciones revertantes Inducidas por NOP en *S. typhimurium* TA100 con y sin activación metabólica

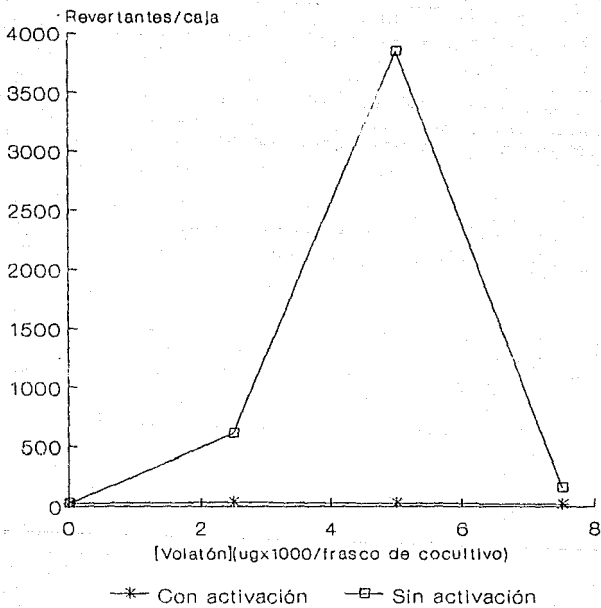


Fig. 9. mutaciones revertantes Inducidas por Volatón en *S. typhimurium* TA98 con y sin activación metabólica

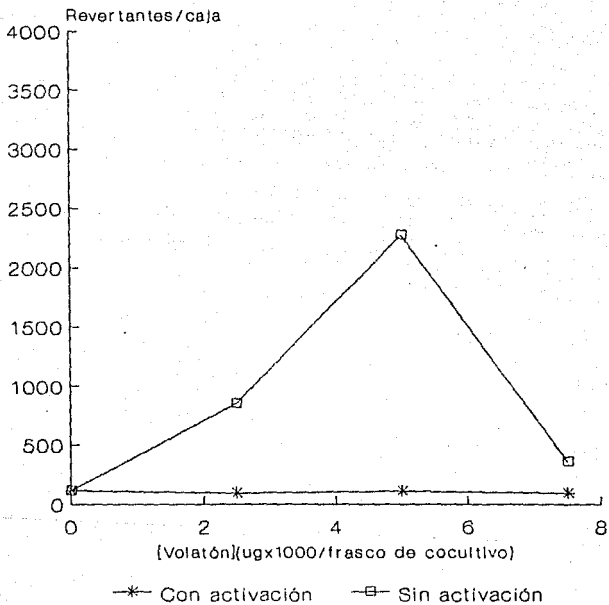


Fig.10. Mutaciones revertantes inducidas por volatón en *S. typhimurium* TA100 con y sin activación metabólica

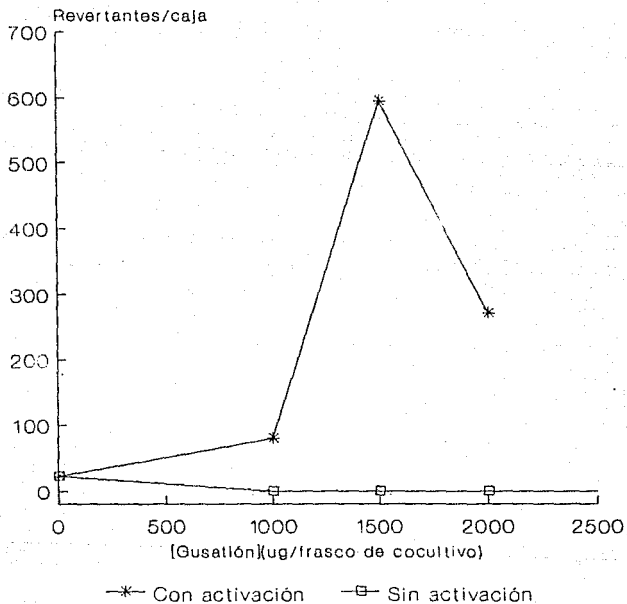


Fig. 11 Mutaciones revertantes inducidas por Gusatón en *S. typhimurium* TA98 con y sin activación metabólica.

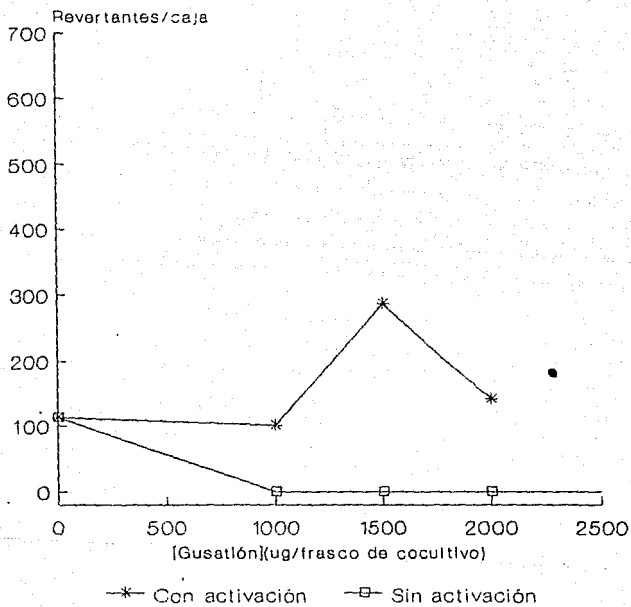


Fig.12 Mutaciones revertantes Inducidas por Gusatlón en *S. typhimurium* cepa TA100 con y sin activación metabólica