



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN**

**"EVALUACION DEL EFECTO GENOTOXICO DEL
FIPRONIL UTILIZANDO LA PRUEBA DE MUTACION Y
RECOMBINACION SOMATICAS (SMART), EN LAS ALAS DE
LA MOSCA *Drosophila melanogaster*"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :**

JORGE ADRIAN JORDAN RAMIREZ

**ASESORES: MVZ PABLO MARTINEZ LABAT
M en C ALFREDO DELGADO RODRIGUEZ**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Evaluación del efecto genotóxico del fipronil utilizando la prueba
de mutación y recombinación somáticas (SMART), en las alas de la
mosca Drosophila melanogaster".

que presenta el pasante: Jorge Adrián Jordán Ramírez
con número de cuenta: 8857887-5 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 23 de Octubre de 1997

PRESIDENTE Dr. Miguel Angel Carmona Medero
VOCAL M.C. Benito López Baños
SECRETARIO M.V.Z. J. Pablo Martínez Labat
PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Jorge Luis Rico Pérez
SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Oswelia Serna Huesca

Señor:

Tú siempre has estado a mi lado respondiendo a todas mis necesidades de forma mucho más excelente de lo que te pido o entiendo; y he podido confirmar que para los que te aman todas las cosas son siempre para bien.

Ahora, Señor, sólo una palabra te quiero decir de lo profundo de mi corazón.

Gracias

"Mas el Dios de toda gracia que nos llamó a su gloria eterna nos perfeccione y afirme, fortalezca y establezca.

A El, sea la gloria, el imperio y todo el poder, por lo siglos de los siglos Amen".

DEDICATORIAS

A mi Papá (+):

Rubén Jordán

Aunque ya no estas conmigo, quiero coronar el propósito que siempre tuviste para mí.

A mi mamá:

Judith Ramírez

Recibe este trabajo como muestra de mi agradecimiento por todo el apoyo y amor que siempre me diste.

A mi Esposa:

Citlali

Has sido la columna vertebral de este proyecto, siempre te estaré agradecido por todo el apoyo, paciencia y amor con que me sostuviste todo este tiempo.

A mis Hijos:

Ismael y Bebé

Espero que algún día comprendan el esfuerzo que implicó el realizar este trabajo, pues ustedes han pagado el precio más alto para lograrlo y para ustedes es todo el fruto de él.

Los amo

Jorge Jordán

AGRADECIMIENTOS

AL MVZ PABLO MARTINEZ LABAT

Por toda la paciencia, apoyo y entusiasmo que se siempre me brindó para la realización de este trabajo, y por facilitarme todos los recursos a su alcance. Es un asesor de tesis excelente.

AL M. EN C. ALFREDO DELGADO RODRIGUEZ

Por abrirme las puertas del Centro de Investigación en Genética y Ambiente en la Universidad Autónoma de Tlaxcala, y asesorarme en los procedimientos y desarrollo de la Técnica SMART y su constante interés por llevar a su fin esta investigación.

AL DR. RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI

Quien de manera desinteresada y con toda amabilidad e interés, revisó mi protocolo de investigación brindándome el apoyo que necesitaba para iniciar el trabajo enviándome al Centro de Investigación de Genética y Ambiente con este fin.

A LA BIOL. RAQUEL ORTIZ MARTELLO

Quien me facilitó el trabajo en el laboratorio teniendo listo todo el material y equipo que necesité para la Técnica SMART, y por su conducción en el desarrollo de la misma.

A LA M. EN C. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO

Por ser la persona que me introdujo en el campo de la Toxicología Genética y a quien le debo el contacto con el Dr. Villalobos, por la Revista Internacional de Contaminación Ambiental que me facilitó.

AL PROFR. IGNACIO GARCIA SALGADO

Quien desinteresadamente me facilitó la consulta especializada en la base de datos de Campo 1 de la PES-Cuautitlán y obtener así la información que le dio sustento a mi trabajo.

**A MIS SINODALES: DR. MIGUEL ANGEL CARMONA MEDERO
M. EN C. BENITO LOPEZ BAÑOS
MVZ JORGE LUIS RICO PEREZ
MVZ OSWELIA SERNA HUESCA**

Por la revisión y las correcciones que hicieron al trabajo, lo que permitió mejorar su presentación y por el ánimo e interés que mostraron al mismo.

**A LOS DIRECTIVOS DEL CBT DR. ALFONSO LEON DE GARAY,
TEQUIXQUIAC: PROFRA. B. FIDENCIO MIGUEL VILLEGAS
PROFRA. SILVIA REYES ROJAS
PROFRA. VIRGINIA DOMINGUEZ DOMINGUEZ**

Por todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo y de los trámites de titulación.

AL LABORATORIO DE INICIACION A LA CIENCIA EN EL CBT.

Por facilitarme el material y equipo para el montaje y lectura de algunas de las preparaciones con las alas de las moscas, lo que me permitió avanzar bastante en el trabajo.

A MIS COMPAÑEROS MAESTROS.

Por todo su apoyo y el ánimo que me infundieron en los momentos de crisis.

A TODOS MIS HERMANOS.

Por que aunque el tiempo pase, sé que siempre están allí para ayudar a su hermano menor.

A TODOS AQUELLOS QUE PUDIERA OMITIR EN ESTE LISTADO Y QUE PARTICIPARON DIRECTA E INDIRECTAMENTE EN EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

INDICE

	página
CAPITULO 1	
INTRODUCCION	3
1.1 HIPOTESIS	5
1.2 OBJETIVOS	5
CAPITULO 2	
REVISION DE LITERATURA	6
2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS	7
2.2 INSECTICIDAS	12
2.2.1 Piretros	13
2.2.2 Insecticidas carbámicos	14
2.2.3 Insecticidas organoclorados	14
2.2.4 Insecticidas organofosforados	18
2.2.5 Fipronil	20
2.2.6 Toxicidad de insecticidas y determinación de LD50	24
2.2.7 Resistencia de los insectos a los insecticidas	26
2.2.8 Legislación en torno a productos químicos en México	29
2.2.9 Aspectos económicos	32
2.3 PRINCIPIOS DE MUTAGENESIS	33
2.3.1 Riesgos clínicos de la mutación	39
2.3.2 Sistemas de prueba para identificar mutagenos	39
2.3.3 Estrategias para la identificación de un mutageno potencial	44
2.4 <i>Drosophila melanogaster</i> COMO SISTEMA DE PRUEBA	45
2.4.1 Generalidades	47
2.4.1.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	47
2.4.1.2 Ciclo de vida	49
2.4.1.3 Reproducción y etapas del desarrollo	49
CAPITULO 3	
MATERIALES Y METODOS	55
3.1 FUNDAMENTO	56
3.2 DESCRIPCIÓN DE MARCADORES	56
3.3 PROPAGACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS	57
3.4 MEDIO PARA COLECTA DE HUEVOS	58
3.5 OBTENCIÓN DE LARVAS	58
3.6 ENSAYO PARA INDUCIR LA MUTACIÓN EN EL SISTEMA BIOLÓGICO	58

<i>3.7 BASES GENÉTICAS DE LOS EVENTOS DETECTADOS</i>	61
<i>3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	61
<i>3.9 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS</i>	63
CAPITULO 4 RESULTADOS	67
CAPITULO 5 DISCUSIÓN	73
CAPITULO 6 CONCLUSIONES	79
CAPITULO 7 BIBLIOGRAFIA	81

Indice de Cuadros

Número	página
1.- Resumen de los principales grupos de insecticidas	22
2.- Categorías de toxicidad dadas por la LD50	25
3.- Resultados de toxicidad en estudios con ratas	25
4.- Lista de plaguicidas no autorizados para ser introducidos al país	31
5.- Características de la industria química	33
6.- Clasificación de las mutaciones	34
7.- Alteraciones génicas	37
8.- Sistemas de prueba para detectar lesiones génicas	40
9.- Características de los sistemas biológicos para detectar mutagenos	43
10.- Características para reconocer el sexo en moscas adultas	52
11.- Tipos de pelos	60

Indice de Figuras

1.- Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	51
2.- Discos imaginales en la larva	53
3.- Regiones del ala para la lectura de las manchas	60
4.- Tipos de manchas en el ala	64
5.- Eventos genéticos detectados con SMART	65

Indice de Tablas

I. Frecuencia de manchas obtenidas en dos cruzas, Estándar y de Alta Bioactividad	68
II. Resumen de los resultados obtenidos del fipronil en <i>Drosophila</i> con la prueba de mancha en el ala, cruza estándar	68
III. Frecuencia de manchas simples por tamaño de clase clonal	69

Indice de Gráficas

I. Evaluación del fipronil con dos cruzas, estándar y de alta bioactividad de <i>Drosophila melanogaster</i>	70
II. Resultados del fipronil obtenidos en la prueba de la mancha en el ala, con <i>Drosophila</i> cruza estándar	71
III. Distribución de las frecuencias de manchas simples por tamaño de clase clonal	72

RESUMEN

El control de diversas ectoparasitosis que afectan tanto al ganado como al hombre mismo, ha originado que la industria química desarrolle productos cada vez más efectivos para el control de insectos, generando beneficios en la producción y en salud. Por otra parte es indispensable evaluar, no solamente la efectividad de estos productos, sino también la seguridad de su manejo en cuanto a los posibles efectos citogenéticos que estos pudieran tener, tanto en animales como en vegetales, pero sobre todo en el hombre. Un insecticida de reciente introducción es el fipronil, el cual pertenece al grupo de los fenilpirazoles, se caracteriza por actuar como inhibidor no competitivo del ácido gamma-amino-butírico, que es el principal neurotransmisor en insectos. Se ha introducido en México para el control de pulgas. El insecticida se sometió a la prueba de mutación y recombinación somáticas, la cual utiliza como bioindicador a la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, provocando la pérdida de heterocigocidad en las células de los discos imagales para el ala en la larva de tercer estadio, ya que al sufrir una célula alteración genómica al darse las divisiones mitóticas se favorece la expresión de los clones mutantes como alteraciones en la forma de los pelos formando manchas que incluyen desde un clon, hasta las que incluyen más de 200; lo anterior para determinar su efecto genotóxico y así poder demostrar la posibilidad de inducir resistencia en las pulgas. Se cruzaron hembras de la línea *flr3/TM3, Bds* con machos *mwh/mwh*, designada como cruce estándar, para obtener la progenie transheterocigótica para los marcadores en la que el parámetro a evaluar es la aparición de manchas en las alas, alteraciones morfológicas en la estructura de los pelos, *flr* en forma de flama y *mwh* que es la alteración de pelos múltiples en las alas, lo cual es un indicador de mutación. A las larvas de 72 horas de edad, que es la tercera fase larvaria, se les administró el compuesto en el alimento durante 48 horas a concentraciones de 0.01, 0.005 y 0.001 ppm, que fueron las concentraciones en las que se obtuvieron los adultos. Se utilizó como testigo negativo solución de etanol al 5% y como testigo positivo N-Nitrosopirrolidina a 10mM, la cual es un potente agente mutagénico y carcinogénico. A partir de los especímenes obtenidos se hicieron preparaciones permanentes con las alas y se procedió a la lectura y registro de las manchas, las que se clasificaron como manchas simples chicas, manchas simples grandes y manchas gemelas. El análisis estadístico se realizó con el programa de cómputo SMART con $P=0.05$ y el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Wurgler de dos hipótesis. Los resultados indican que el compuesto únicamente induce un incremento en la frecuencia de manchas simples grandes aceptándolo como positivo con respecto al control negativo, además se observa que es sumamente tóxico en este sistema de prueba en base a las concentraciones a las que permitió trabajar, por lo que la aparición de organismos resistentes puede llegar a presentarse si se aplican dosis menores a las recomendadas.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

En el último siglo, a partir de la revolución industrial, con las guerras mundiales y con la llegada del hombre a la luna, el desarrollo científico y tecnológico ha sido enorme. Se ha dado solución a un gran número de problemas, lo que a su vez ha generado otros. Tal es el caso de los productos y subproductos químicos, usados o generados en la agricultura y en las diferentes ramas de la industria, que si bien han participado en el mejoramiento de las condiciones de vida, se ha demostrado que muchos de ellos tienen efectos indeseables. El problema se incrementa debido a que actualmente se producen miles de sustancias que se liberan al ambiente, y de las cuales aún es necesario determinar su capacidad para provocar mutaciones, con la finalidad de evitar sus efectos sobre la población humana y animal. Una mutación es una alteración sobre la secuencia de las bases nitrogenadas que codifican la información en el material genético, ADN. Estas modificaciones pueden ocurrir en los genes o en los cromosomas, y pueden resultar de la acción directa de los agentes químicos sobre el material hereditario, o bien requerir de alguna biotransformación (Instituto de Investigaciones Biomédicas, 1980; Wallace, 1994).

Por lo anteriormente expuesto ha sido necesario establecer sistemas biológicos en los cuales sea posible estimar el riesgo que presenta un compuesto dado para el hombre. En la actualidad se cuenta con diversos sistemas de investigación para identificar mutágenos, uno de estos sistemas que ha cobrado gran importancia en los últimos diez años es el que utiliza insectos para la detección de mutágenos ambientales; en este grupo es usada principalmente, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, constituye probablemente el sistema animal más rápido y más eficiente para detectar mutaciones génicas y cromosómicas en células germinales y somáticas (Instituto de Investigaciones Biomédicas, 1980; Graf, 1984; Paez, 1996; Ramos, 1993; Graf, 1994; Sociedad Mexicana de Genética, 1995; Marec, 1996; Delgado et al., 1995).

Un grupo de compuestos químicos altamente difundidos en todo el planeta y por ende con los que, no solamente el ser humano, sino una gran variedad de especies tiene contacto, son los insecticidas, en esto radica su importancia como objeto de estudio en el campo de la toxicología genética. Sin embargo, el uso constante de este tipo de sustancias ha provocado, el desarrollo de resistencia en los insectos por modificación de su genoma, en algunas de las veces para protegerse de los efectos de los insecticidas y delegar así a sus descendientes esta resistencia. En los mamíferos es importante, no sólo la valoración de su toxicidad por exposición aguda o envenenamiento, sino la repercusión que estos puedan tener como mutágenos potenciales. Aun hace falta determinar la genotoxicidad de la mayoría de estos compuestos, sin perder de vista a los nuevos grupos, como lo son los fenilpirazoles teniendo al fipronil como representante, será necesario evaluarlos detenidamente, y con mayor razón cuando se ha iniciado

mayor comercialización de ellos (Pedigo, 1989; Humphreys, 1990; Colliot, 1992; Cortinas, 1993; Jeannin, 1995; Kale, 1995; Hsieh, 1995).

1.1 HIPOTESIS.

El fipronil podría actuar como agente genotóxico de manera directa o indirecta induciendo mutaciones sobre las células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*, y por ser este un organismo eucariota superior, el riesgo de que los insectos sufran daño genético y que desarrollen resistencia por esta misma causa es muy alto.

1.2 OBJETIVOS.

I. OBJETIVO GENERAL.

- 1) Evaluar la posible capacidad mutagénica del fipronil utilizando la prueba de manchas en el ala con *Drosophila melanogaster*.

II. OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Realizar pruebas de toxicidad con el fipronil para obtener las concentraciones convenientes para llevar a cabo el estudio de mutagenicidad.
- 2) Comparar el efecto mutagénico inducido por el fipronil en dos cruces: la estándar y la de alta capacidad metabólica.

CAPITULO 2

REVISION DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

La relación entre el hombre y los insectos data de tiempos muy remotos donde lo más importante era la supervivencia y el mantenimiento de las especies, con lo que inicia así una lucha encarnizada entre estos dos bandos. Algunos de los insectos, mucho más antiguos que el hombre, desarrollaron mecanismos de adaptación para lograr su desarrollo. Los asentamientos humanos, el cambio de una vida nómada por una sedentaria, alteró el medio para poder habitarlo lo que trajo consigo la modificación de los hábitos de varios grupos de insectos que se vieron favorecidos por el alimento, el calor y refugio que encontraron, algunos desarrollaron adaptaciones estructurales para mejorar la existencia parásita, en las que se incluyen partes bucales picadoras-succionadoras para nutrirse de sangre u otros fluidos de los tejidos, pérdida de alas para el ectoparasitismo y tallas diminutas para permitir la invasión en el cuerpo del vertebrado. Desde milenios anteriores a la aparición de registros humanos relacionados con molestias asociadas a los artrópodos, evolucionaron sistemas de relaciones casuales y obligadas entre los artrópodos y sus hospedadores vertebrados. Los insectos precedieron al hombre sobre la tierra por lo menos 400 millones de años y los microorganismos estaban ya presentes mucho antes que estos. Por lo que se establecieron primeramente relaciones entre estos y posteriormente incluyeron al hombre. El conocimiento de los insectos se remonta sin duda alguna a los tiempos prehistóricos, aunque entonces el hombre se interesaba principalmente por las plagas que le afectaban directamente. Por medio de escritos antiguos se puede observar claramente la trascendencia que representaban las molestias que producían los insectos, como ejemplo mencionaremos que en el antiguo testamento bíblico se narra como el pueblo de Egipto fue castigado por la obstinación del Faraón al no permitir la libertad del pueblo Hebreo, por lo que se hizo acreedor de lo que se conoce como las siete plagas, de las cuales tres tienen que ver con insectos; se dice que Aarón tomó su vara y golpeo la tierra y el polvo se convirtió en piojos e inmediatamente infestaron a hombres, mujeres y el ganado de aquella tierra, después hubo una nube de moscas negras y gordas que atacaban metiéndose en la boca y bajo los párpados de las personas, más adelante se cuenta que un viento del este soplo todo el día y trajo una nube densa de langostas que acabaron con lo quedaba de los cultivos. Aún en la época contemporánea las nubes espesas de langosta destruyen extensas áreas de cultivo en el cercano Oriente y en África, ocasionando grandes pérdidas de alimento. Incluso se han asociado las plagas como castigo divino por los pecados cometidos por hombres, aunque ello no sea muy consistente en el concepto cristiano de un Dios bondadoso, tal ideología perduró durante varias centurias, como lo prueban las crónicas escritas en Hungría durante los siglos XI y XIII, cuando las siembras de cereal fueron destruidas por enfermedades. Los desastres que no se atribuían a la ira de Dios, se consideraban como obra de los espíritus malignos, las

brujas y los duendes o diablillos, todos ellos enemigos de las fuerzas benéficas en el mundo. Hasta el siglo XVIII, se culpaba a estas fuerzas demoniacas de los estragos causados en la agricultura por plagas de insectos y enfermedades y, por consiguiente, en los tratados antiguos de agricultura abundan las recetas mágicas para controlar dichas plagas. No fue sino hasta mediados del siglo XIX, que comenzaron a aplicarse sistemáticamente los métodos científicos en el control de plagas. Ya en nuestra era encontramos evidencias que algunos pueblos tenían conocimiento del papel que jugaban los insectos como causantes de enfermedades, en México se encontró una representación en piedra de una pulga la cual se estima que fué elaborada entre los años 1200 a 1500 d.C.; aproximadamente en el año 1200 d.C. un artesano indio americano representó un enjambre de mosquitos listos para el ataque en una pieza de barro encontrada en Mimbres, Nuevo México; una vasija de barro del Perú, de entre 400 a 900 d.C. muestra las perforaciones de donde se han extraído individuos de *Tunga penetrans* del pie de un hombre (Hardwood, 1987; Cremlyn, 1995).

Muchos aspectos de la civilización moderna han sido influidos por las relaciones que el hombre ha tenido en el pasado con los insectos, los patógenos que transmiten y las enfermedades que resultan de esta transmisión. Cuanto han contribuido estos hechos al estado político-económico actual del mundo es, por supuesto, una cuestión de conjeturas. Se ha sugerido que los patógenos transmitidos por insectos, por ejemplo los tripanosomas transmitidos por la mosca tse-tse en América, pudieron haber contribuido a la extirpación de las faunas de parte del Terciario tardío y del Cuaternario. Sin duda, el desarrollo político y social del hombre prehistórico se vio afectado por epidemias y pandemias asociadas con los artrópodos, cuando menos desde que se constituyeron clases y grupos migratorios. Los registros referentes a la desolación causada por la fiebre amarilla, el tifo y la peste se remontan muy atrás en la historia, encontrándose evidencias de la existencia del paludismo en el periodo neolítico. En tiempos históricos, esta y otras enfermedades han sido determinantes en el florecimiento, decadencia y caída de imperios, así como en el establecimiento o no establecimiento de nuevas áreas y en la construcción de proyectos de ingeniería. Existe una evidencia clara de que las enfermedades asociadas con artrópodos influyeron en curso de los imperios Griego y Romano. La gran peste de Atenas en el año de 430 a.C., que se cree pudo haber sido tifo, desmoralizó a los atenienses y aterrorizó a los peloponenses invasores, causó la muerte de Pericles y, probablemente, amplió la duración de la gran guerra del Peloponeso, tanto como lo hizo la estrategia. En 396 a.C., el sitio cartaginés de Siracusa fracasó debido a una epidemia, que posiblemente fue de la misma enfermedad. Si este sitio hubiese terminado con éxito, Cartago, en lugar de Roma, se habría convertido en el poder dominante del Mediterráneo. La malaria afectó también a Grecia, eliminando la extensión oriental del imperio de Alejandro el grande y conduciendo finalmente, junto con el alcoholismo, a la muerte del

conquistador. Es interesante la especulación de que el paludismo pudo haber exterminado una gran parte de la vigorosa extirpe griega, responsable de la época de oro del imperio, lo cual condujo a reemplazarla en una gran parte por esclavos introducidos para servirles. Se han descrito las diversas epidemias que acontecieron en el imperio romano desde el primer siglo D.C. hasta su caída en el año de 476 D.C., y, finalmente, hasta la época de Justiniano en el siglo IV. Estas epidemias, probablemente debidas a causas mixtas, asociadas o no con artrópodos, fueron propagadas por los ejércitos romanos, los hunos invasores, los godos y otros. No cabe duda de que su influencia en la caída de Roma fue grande. Se cree que la peste de Justiniano dio el golpe "de gracia" al antiguo imperio. Aunque el imperio Inca de Sudamérica fue exterminado por los conquistadores españoles, existe evidencia de que las epidemias pudieron haber conducido a los Incas a un estado de vulnerabilidad en la época de la conquista (Cremlyn, 1995).

No hay duda acerca de la influencia de los patógenos transmitidos por artrópodos en el progreso del hombre en épocas posteriores. Durante y después de la edad media, Europa sufrió repetidas pandemias de peste. La malaria o paludismo fue muy frecuente en la mayor parte del continente; en Inglaterra, Oliver Cromwell y posiblemente Jaime I, murieron de esta enfermedad, y en Francia Luis XIV la contrajo, pero fue curado con quinina. Los pantanos en Roma eran conocidos por su "mal-aria" (mal-aire). La tripanosomiasis impidió el desarrollo de África hasta el presente siglo, y la fiebre amarilla, introducida al nuevo mundo a través del comercio de esclavos de África, impidió el desarrollo de gran parte de América, incluyendo los primeros intentos para construir el canal de Panamá. El tifo fue el responsable en gran parte del colapso de los frentes ruso y balcánico en la primera guerra mundial. Gracias al DDT y al control de los piojos, se controlaron epidemias como la de Nápoles, Italia y la de Colonia, Alemania, que hubieran cobrado un número mucho mayor de vidas en la segunda guerra mundial. Las actividades del hombre, así como los niveles nutricionales, han contribuido en gran medida a los serios efectos de las enfermedades asociadas con artrópodos. Los prejuicios y las supersticiones han frenado, aún en la actualidad, los programas de control y erradicación. Como ejemplo de las relaciones nutricionales, las leishmaniasis americanas tienen mucha mayor importancia clínica en los lugares donde el nivel nutricional es bajo; el paludismo puede minar la fortaleza de las poblaciones rurales, que, por lo tanto, producen menos alimento, con una consecuente disminución del nivel nutricional y un incremento de la susceptibilidad de la población a la enfermedad. Los efectos de las condiciones insalubres son obvios; en donde existen plagas, los niveles de sanidad y nutrición son bajos, mientras que los niveles de las enfermedades parasitarias e infecciosas son altos. De gran influencia han sido las guerras y los desastres naturales, tales como las grandes inundaciones y terremotos. Los programas de control comunes en contra de los artrópodos de importancia médica pueden interrumpirse al disminuir las condiciones de salubridad, que

resultan de migraciones masivas, apiñamientos o cualquier interferencia con los modos de vida. Por ejemplo, en la convención de la Organización de Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas, llevada a cabo en Nairobi, Kenia, se hizo hincapié en que los enfrentamientos entre los ejércitos y las guerrillas en África habían interferido en las operaciones de control de la mosca tse-tse, con el resultado de que las moscas invadieron nuevamente muchas áreas de las que ya habían sido erradicadas, llegando incluso a territorios previamente desocupados. Como consecuencia, se presentaron amenazas de serias epidemias de la enfermedad del sueño y nagana (Tripanosomiasis humana y animal). La perspectiva actual debe incluir ciertas reflexiones acerca del futuro. Las vidas humanas salvadas por la conquista de las enfermedades asociadas con artrópodos se añaden a los problemas poblacionales. Se debe encontrar la forma de que las ventajas deseadas se logren en todos los aspectos, a través de la educación, de estudios socioeconómicos y del ambiente (Hardwood 1987).

El hombre al comprender que los insectos eran los causantes directos o indirectos de diversas enfermedades o de pérdidas en las cosechas comenzó a probar diversas sustancias con el fin de combatirlos. Por ejemplo, el azufre se conocía como preventivo de diferentes enfermedades y se empleaba para combatir a los insectos mucho antes del año 1000 a. de C. incluso su uso como fumigante fue mencionado por Homero. Plinio en el año 79 d.C. recomendaba utilizar al arsénico como insecticida, y en el siglo XVI, los chinos ya aplicaban cantidades moderadas de compuestos de arsénico con este fin. En el siglo XVII apareció el primer insecticida de origen natural; la nicotina, obtenida de los extractos de hoja de tabaco, que se usaba para controlar el picudo del ciruelo y la "chinche de encaje". En 1705 Hamberg propuso el cloruro de mercurio como preservador para la madera y, cien años después, Prévost describió la inhibición de las esporas de anublo por el sulfato de cobre. Se han usado también bastante los insecticidas vegetales, por ejemplo el piretro, al parecer descubierto por los persas, y el polvo de tabaco, utilizado en Europa Occidental como insecticida en el siglo XVIII. Lo más probable es que estos primeros descubrimientos se hicieran gracias a la perspicacia de algún observador, así como a la aplicación del método de prueba y error, sin que faltaran en ello algunos elementos de superstición (Cremlyn, 1995).

En el último cuarto de siglo se han sintetizado muchísimos insecticidas orgánicos. Entre éstos se encuentran los insecticidas organoclorados (hidrocarburos clorados), los compuestos de organofosforados y los carbamatos. El DDT o diclorodifeniltricloroetano fue descubierto en Alemania en 1873, siendo el Dr. Paul Muller quien descubriera en 1939 sus formidables propiedades insecticidas, al inició de la segunda guerra mundial, en Suiza; luego del éxito inicial de las pruebas de campo contra la catarina del colorado se comenzó a comercializarlo, efectuándose un extenso trabajo sobre su aplicación en Inglaterra, los estados Unidos y Alemania. Este compuesto elimina los piojos que transmiten el tifo y es

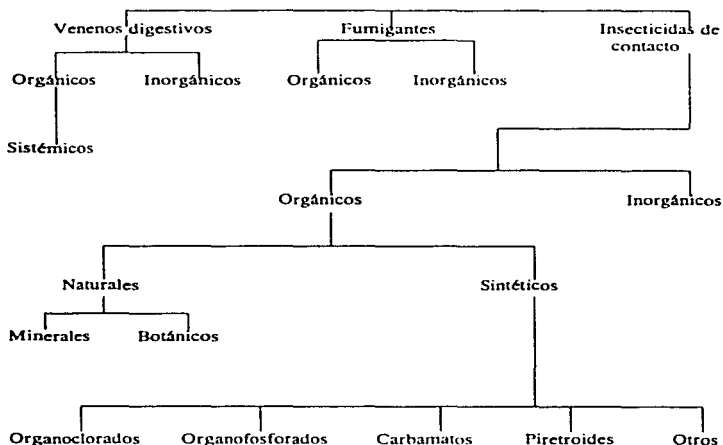
igualmente efectivo contra los mosquitos que propagan el paludismo; su uso, fue sin duda una valiosa ayuda para el triunfo de las potencias occidentales en la segunda guerra mundial, ya que permitió que se llevasen a cabo las operaciones militares en los trópicos, en donde, si no hubiera sido por éste, el peligro de epidemias habría sido demasiado grande. Después del éxito del DDT, varios insecticidas análogos muy útiles, como el metoxicloro, fueron descubiertos y se encontró que un buen número de compuestos organoclorados de diferentes tipos eran excelentes insecticidas de contacto. El hexacloruro de benceno (HCB) o más correctamente el hexaclorociclohexano, fue descubierto por el químico inglés Michael Faraday en 1825, y sus propiedades insecticidas fueron conocidas hasta 1942 también en Inglaterra. Se demostró que sólo uno de los cinco isómeros es altamente insecticida; esta es la forma gamma también conocido como "Gammaexano" o lindano. Este material es habitualmente más tóxico para los insectos que el DDT y también presenta considerable acción acaricida. Utilizando la reacción de condensación de Dies-Alder, los químicos americanos produjeron, a fines de la década de los cuarentas, varios nuevos insecticidas que fueron conocidos como los ciclodienos. Estos compuestos con anillos benzenicos gemelos comenzaron a emplearse en el ganado a principios de la década de los cincuentas; tenemos como ejemplos al dieldrín (isómero del endrín), el aldrín (isómero del isodrín), el heptacloro, el epóxido del heptacloro y el isobenzán (telodrin), estos insecticidas organoclorados tienden a ser muy estables *in vivo*. Durante la segunda guerra mundial se sintetizaron en Inglaterra y en Alemania varios compuestos organofosforados, "gases nerviosos", con gran toxicidad para los mamíferos. El punto de partida para su desarrollo inicial, lo constituyeron las investigaciones sobre su efecto neurotóxico, llevadas a cabo por el doctor Gerhard Schrader y sus colaboradores, en Alemania, con el fin de usar estos gases en la guerra química. Entre los primeros compuestos estaban el paratión, Schradan y Bladan, muy efectivos para el control de insectos pero tóxicos para los mamíferos, por lo que las investigaciones posteriores se han orientado cada vez más hacia el descubrimiento de insecticidas más selectivos y menos peligrosos. El malatión (1950) fue el primero de los insecticidas de amplio espectro de acción y, a la vez, de una toxicidad muy baja para los mamíferos. Una ventaja muy importante que tienen los insecticidas organofosforados es que, por lo general, se degradan rápidamente en materiales atóxicos, después de su aplicación; en consecuencia no tienen efectos duraderos, como los insecticidas organoclorados, de manera que no tienden a acumularse en el ambiente y, por lo tanto, no pasan a las cadenas alimenticias. En 1947, la compañía Geigy, en Suiza, descubrió varios insecticidas, todos del mismo grupo, el de los ésteres carbámicos, siendo el miembro más efectivo de dicho grupo el carbaryl o sevin, que no comercializó si no hasta una década mas tarde. Este producto ha tomado una importancia creciente como posible sustituto del DDT. Debido a su tendencia a tener un espectro insecticida mucho más estrecho que los

organoclorados u organofosforados, los carbamatos han sido llamados insecticidas "rifle" (Hardwood, 1989; Cremlyn, 1995; Ware, 1996).

2.2 INSECTICIDAS

Entre los productos que se han usado como insecticidas se incluyen: agentes obtenidos de plantas como las piretrinas, rotenona y nicotina; compuestos organoclorados como demeton, diclorvos o parati6n. Con la notable excepci6n de la nicotina, los insecticidas obtenidos de plantas son relativamente at6xicos. En general, los compuestos organoclorados tienen la ventaja de ser menos t6xicos que los organofosforados, pero tienen la desventaja de ser relativamente persistentes con ello causan contaminaci6n ambiental. El problema tiene especial importancia para las aves silvestres, abejas y peces, siendo el DDT el insecticida clorado m1s estudiado por esta raz6n (Wallace, 1989).

CLASIFICACION DE LOS GRUPOS COMUNES DE INSECTICIDAS



(Pedigo 1989; Wallace 1989)

2.2.1 PIRETROS.

El piretro es un insecticida de contacto obtenido de las cabezas florales del *Crysanthemum cinerariaefolium* y se ha usado como insecticida desde la antigüedad. La producción del piretro como insecticida data de aproximadamente 1850 y a diferencia de la nicotina y el derris, el uso del piretro ha crecido, a pesar del aumento de insecticidas sintéticos. Este debe su importancia a la notable rápida acción de derribo (unos cuantos segundos) que tiene sobre insectos voladores, aunado a la muy baja toxicidad para los mamíferos, debido a su rápido metabolismo a productos atóxicos. De este modo, a diferencia del DDT, el piretro no es persistente y no deja residuos tóxicos, que puede ser la razón por la cual este insecticida no tiende a desarrollar poblaciones de insectos resistentes. Sin embargo, una de las desventajas principales del piretro es su falta de persistencia, principalmente en su uso contra plagas en la agricultura, debida a su inestabilidad ante la presencia de la luz y el aire. Frecuentemente los insectos se pueden recuperar si han sido expuestos a una dosis subletal de piretro, lo que quiere decir que este compuesto debe ser mezclado con pequeñas cantidades de otros insecticidas para asegurarse de que los insectos no puedan recuperarse. El piretro se obtiene a partir de las flores secas del crisantemo, por medio de la extracción con acetoseno o dicloruro de etileno y el extracto se concentra por destilación al vacío. Contiene cuatro componentes insecticidas principales llamados piretrinas. Estos son los ésteres de dos ciclopentenolonas ($6;R^1: CH_2/CH_3$) y dos ácidos ciclopropanocarboxílicos ($7;R: CH_3$ ó CO_2CH_3), o ácidos crisantémicos y pirétrico. La síntesis de estos compuestos abrió la posibilidad de obtener piretroides sintéticos, el primero de los cuales fue la aletrina. La acción primaria de los piretroides debe ser (pues no se sabe con claridad) sobre el sistema nervioso para producir ese derribo instantáneo en los insectos voladores, algunos estudios histológicos han revelado una desorganización extensiva del tejido nervioso. La capacidad de los insectos tratados para recuperarse de dosis subletales de los piretroides se debe a la rápida desintoxicación enzimática *in vivo* probablemente por medio de mezclas de oxidasas microsómicas. Los piretroides afectan tanto al sistema nervioso central como al periférico de los insectos tratados, causando descargas repetidas seguidas de convulsiones del insecto. La aplicación de concentraciones mayores de piretroides dio como resultado el bloqueo total de la transmisión nerviosa. La actividad insecticida de los piretroides muestra un coeficiente de temperatura negativo, son más potentes a temperaturas más bajas. La adición de sinergistas a las preparaciones de piretro permite reducir sustancialmente la cantidad de componentes activos sin perder su actividad insecticida. Los sinergistas son compuestos caros, pero su uso se justifica con los piretroides que también son caros y casi siempre no son persistentes. Los piretroides son los únicos insecticidas que comercialmente se formulan con sinergistas, ya que así se mejora la eficacia del insecticida durante su vida relativamente limitada (Cremlyn, 1995; Ware, 1996).

2.2.2 INSECTICIDAS CARBÁMICOS.

El desarrollo exitoso de los insecticidas organofosforados estimuló el examen de otros compuestos que se sabe que poseen actividad anticolinesterásica. Uno de dichos compuestos es el alcaloide fisostigmina, ingrediente activo del haba de Calabar. Se supuso que las propiedades fisiológicas de este alcaloide estaban basadas en la parte fenilmetilmetilcarbamato de la estructura, y eso condujo al descubrimiento de un buen número de drogas parasimpaticomiméticas, como la neostigmina. Los compuestos, ya que son bases bastante fuertes, son ionizados en soluciones acuosas y, por lo tanto, tienen una solubilidad en lípidos muy baja. En consecuencia, son incapaces de penetrar la vaina impermeable a los iones que rodea el sistema nervioso de los insectos. De este modo, se hicieron esfuerzos para sintetizar compuestos en los que la parte del carbamato N sustituida en la molécula, fue unida a una fracción menos básica y más lipofílica, ya que estos compuestos deberían mostrar una acción más insecticida (Cremlyn, 1995; Ware, 1996).

Usos. Algunos carbamatos se utilizan como insecticidas, especialmente el carbaril, para el control de ectoparásitos, este es un insecticida de contacto con pocas propiedades sistémicas y un amplio espectro de actividad, se ha usado como sustituto del DDT, con el propósito de reducir la contaminación ambiental, ya que se biodegrada y por lo tanto no se acumula en el ecosistema. Otros se usan como herbicidas selectivos como el barban. Se incluyen en este grupo el carbofuran y el dimetilan.

Acción Tóxica. Los carbamatos son inhibidores reversibles de la colinesterasa. Para su actividad insecticida, los carbamatos parece que requieren un grado de semejanza estructural con la acetilcolina, que es el sustrato natural de la enzima, por lo que el carbamato compite fuertemente con la acetilcolina por los sitios reactivos en la acetilcolinesterasa. El principal mecanismo bioquímico de la resistencia de los insectos a los carbamatos insecticidas parece ser la desintoxicación vía la hidrólisis enzimática; por tal razón, las moscas domésticas resistentes al carbaril, muestran una concentración anormalmente alta de la enzima esterasa carbónica la cual convierte el carbaril en el alfa-naftol inactivo (Cremlyn 1995).

Excreción. Estos compuestos se metabolizan rápidamente; el 80% de la dosis se elimina con la orina en 24 horas, el 0.5-15% con las heces y el 0.1-1% con la leche.

Antídoto. Es la administración intramuscular de sulfato de atropina. Los diuréticos son también útiles. Los reactivadores de la colinesterasa no son efectivos (Humphreys 1990).

2.2.3 INSECTICIDAS ORGANOCOLORADOS.

El miembro más importante de este grupo es el 1,1,1-tricloro-2,2 di-(p-clorofenil)etano, también llamado *dichlorodifeniltricloroetano* o DDT. Es fabricado por la condensación del cloral y el clorobenceno en presencia de un exceso de ácido

sulfúrico concentrado. Los beneficios obtenidos por la humanidad a partir del uso de insecticidas organoclorados han sido enormes, y en particular el DDT se ha convertido en el insecticida más ampliamente utilizado en el mundo. Cuando este se descubrió, sus principales ventajas mostraron ser la estabilidad, su persistencia en la actividad insecticida, bajo costo de fabricación, baja toxicidad para los mamíferos, y un amplio espectro de actividad insecticida. El descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT estimuló la búsqueda de compuestos organoclorados análogos; aunque muchos cientos de compuestos fueron sintetizados, sólo pocos han sido lo suficientemente activos y de bajo costo para su explotación comercial. Todos se obtienen por cloración de diversos hidrocarburos en una proporción del 33-67% y todos ellos, al contrario de la acción no persistente, "fulminante", del piretro, tienen efecto moderadamente prolongado. A pesar del extenso uso del DDT se sabe comparativamente poco acerca de su mecanismo de acción; los síntomas generales de envenenamiento por el DDT en los insectos y vertebrados son temores violentos, pérdida de movimiento seguido de convulsiones y muerte, lo que indica claramente que el DDT actúa sobre el sistema nervioso y produce efectos tóxicos en el tejido nervioso a concentraciones mucho menores que las que inducen efectos tóxicos en otros tejidos y sistemas de enzimas. Aparentemente ejerce su actividad tóxica al unirse a la membrana nerviosa interfiriendo en la transmisión de impulsos nerviosos, posiblemente perturbando el equilibrio iónico del sodio o del potasio a través de las membranas nerviosas. En 1950 se informó acerca de un buen número de ejemplos de cepas de insectos resistentes al DDT (principalmente moscas domésticas) y los problemas que se derivaron de tal situación fueron graves. La resistencia a un determinado insecticida será más extensa si el tóxico es persistente y si el insecto tiene un ciclo de vida corto, lo que explica por qué, dado el uso a gran escala del DDT y otros insecticidas organoclorados, hubo un rápido surgimiento de insectos resistentes. Se han propuesto varios factores para explicar el fenómeno de la resistencia de los insectos. Tales como las características morfológicas, lenta velocidad en la captación del DDT, tendencias del comportamiento y aumento de la detoxificación del DDT y de otros insecticidas organoclorados. Los mecanismos de defensa bioquímicos son los más importantes (Wallace, 1989; Cremllyn, 1995; Ware, 1996).

Absorción, distribución y excreción. Estos compuestos tienen por característica común el ser insolubles en agua y ser solubles en grasas y en los solventes de estas. Aplicados en forma de solución oleosa o de emulsión todos pueden pasar a través de la piel intacta; el dieldrin se absorbe también en forma de polvo. Ya que se han absorbido, a excepción del metoxicloro, se acumulan en la grasa corporal, aunque la concentración varía de acuerdo al compuesto, siendo el DDT el que más fácilmente se almacena en los tejidos. De los isómeros del HCB, el isómero beta se acumula más fácilmente. También varía el tiempo de permanencia de los hidrocarburos clorados en los tejidos, el DDT, el isómero beta del HCB y el

toxafeno pueden permanecer en la grasa corporal más de tres meses. En general, ninguno de estos compuestos muestra tendencia a acumularse en algún órgano vital; no hay evidencia de acumulación en los lípidos cerebrales. Como su absorción intestinal es escasa la mayor parte de la dosis oral se elimina con las heces sin alteración. Una importante vía de excreción del DDT es con la leche, por lo que la mantequilla preparada con aquella puede contener elevados índices de este, la acumulación de estos compuestos en las crías puede causarles intoxicación (Humphreys, 1990).

Toxicidad. Estos compuestos pueden provocar síntomas de intoxicación aguda y por su persistencia en la grasa corporal también pueden originar intoxicación crónica, el peligro de esta depende de la velocidad de liberación del insecticida del tejido adiposo y por ello es mayor en el caso del DDT y del beta-HCB. Los animales con poca grasa corporal son más susceptibles de padecer intoxicación que los gruesos, ya que en estos se acumula e inmoviliza el insecticida en los depósitos grasos, pero en período prolongado de ayuno se movilizan causando intoxicación severa, por lo que también los jóvenes son más susceptibles que los viejos. Para determinar el efecto de cualquier dosis de un compuesto es importante considerar la forma de administración; la dosis letal es menor si el insecticida se aplica en aceite vegetal que si se usa aceite mineral o suspensiones o polvo seco, por ejemplo el DDT es diez veces más tóxico en solución oleosa que en acuosa (Humphreys, 1990).

Sintomatología.

a) Intoxicación aguda. En general los compuestos de este grupo son estimulantes difusos del sistema nervioso central, las manifestaciones son muy diversas predominando las de tipo neuromuscular, estas manifestaciones pueden aparecer desde pocos minutos hasta días después debido principalmente a la dosis y tipo del compuesto, iniciando con hipersensibilidad, espasmos musculares, incoordinación hasta la aparición de convulsiones clónico-tónicas, nistagmos, hipertermia de hasta 47 grados C debida a la actividad muscular y a una interferencia de centros termorreguladores, la muerte se da por insuficiencia respiratoria causando una cianosis generalizada. Algunos en contraste presentan depresión aguda, somnolencia, anorexia y renuencia a moverse, seguidos por emaciación y deshidratación.

b) Intoxicación crónica. En general, los síntomas de la intoxicación crónica son semejantes a los de la intoxicación aguda, pero con frecuencia aparecen en primer lugar los temblores en los músculos del cuello y cabeza. Gradualmente se extienden hasta afectar a la mayoría de los músculos de todo el cuerpo, aumentando su intensidad hasta dificultar o imposibilitar cualquier movimiento voluntario. Los temblores dan paso a convulsiones que gradualmente se hacen más frecuentes y graves. Finalmente aparece depresión, que termina en insuficiencia respiratoria y muerte. A pesar de que las contracciones pueden durar semanas, los animales

pueden recuperarse sin evidencia de lesiones permanentes en el sistema nervioso (Humphreys, 1990).

Lesiones.

Las lesiones no son específicas, debido a la hiperactividad que precede a la muerte, con la consiguiente hipotermia, hay tumefacción turbia en la mayoría de las vísceras y los intestinos están blanquecinos, por todo el organismo se encuentran pequeñas hemorragias distribuidas al azar, pero con frecuencia en el corazón. En el epicardio se encuentran desde algunos cientos de petequias hasta grandes hemorragias, con localización preferente en áreas adyacentes a los vasos coronarios mayores, como norma el corazón está en sístole y el miocardio blanquecino, pudiendo haber hidropericardio. Con algunas excepciones, los pulmones están congestionados, de color oscuro y con algunas hemorragias, pudiendo estar incluso edematosos. Generalmente hay congestión y edema en cerebro y médula espinal. También es frecuente el aumento de líquido cefaloraquídeo, con aumento de la presión. En los casos crónicos es frecuente la pérdida de peso inmediatamente antes de la muerte, aunado a la deshidratación y gelatinización o ausencia de depósitos grasos. A nivel microscópico la alteración más importante es la hepatomegalia con necrosis centrolobulillar, en el caso de la intoxicación crónica. Es importante señalar que nunca se ha encontrado cirrosis (Humphreys, 1990)

Diagnóstico de la intoxicación por organoclorados.

En los animales muertos está claro que el análisis de la grasa corporal puede tener valor en muchos casos para establecer si ha habido o no exposición a algún insecticida organoclorado. En los animales vivos sirve para confirmar un diagnóstico de intoxicación la identificación y cuantificación del insecticida en la sangre (Humphreys, 1990; Waliszewski, 1996).

Tratamiento de la intoxicación por organoclorados.

Se requiere controlar las convulsiones con depresores del sistema nervioso central, los barbitúricos de acción corta son ideales para ello pero deben administrarse por vía intraperitoneal. Al menos que se produzca fibrilación ventricular el pronóstico es bueno, incluso cuando las convulsiones son graves. Debe intentarse la eliminación del producto ingerido mediante un purgante salino, nunca oleoso. Si la intoxicación se ha producido por intoxicación percutánea, debe eliminarse el insecticida de la superficie corporal de forma tan completa como sea posible (Wallace, 1989; Humphreys, 1990).

2.2.4 INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

La fórmula general de los organofosforados es: $(R_1R_2)P=O(S)X$, donde X puede ser algún grupo funcional y R1 y R2 pueden ser cualquier sustituto de los grupos alquil, aril, alcoxi, ariloxi, o de los grupos tioxi, fenoxitio, o amida. Los compuestos organofosforados son, en su mayoría, ésteres, amidas u otros derivados simples de los ácidos forfórico o tiosforfórico. Este es el grupo de insecticidas más numeroso e importante. Algunos de ellos como el malatión, paraoxón, paratión, metilparatión, TEPP y EPN, se usan como insecticidas de contacto. Otros como el demeton, dimetoato, mipafos y escadran se usan como insecticidas sistémicos en la protección de las plantas. Algunos de estos compuestos como el diazinón, dimetoato, malatión y tricloflorón, tienen una toxicidad comparable a los compuestos organoclorados DDT y HCH. Otros compuestos usados como insecticidas sistémicos en los animales, especialmente contra la hipodermosis bovina, como cumafos, crufomato, fenclorfos y tricloflorón, son menos tóxicos. Algunos compuestos de este tipo se usan como antihelmínticos o rodenticidas. En el primer grupo está diclorvos, haloxón y naftalofos, y en el segundo, fosacetin (Cremllyn, 1995; Ware, 1996).

Metabolismo y acción tóxica.

Los compuestos organofosforados se combinan e inhiben a la enzima colinesterasa, provocando la persistencia en las terminaciones nerviosas de excesiva cantidad de acetilcolina. Esta enzima verifica la hidrólisis de la acetilcolina que se genera en las uniones nerviosas, hasta colina. En la ausencia de acetilcolinesterasa efectiva, la acetilcolina liberada se acumula e impide la trasmisión continua de impulsos nerviosos a través del espacio sináptico en las uniones nerviosas. Esto ocasiona la pérdida de coordinación muscular, convulsiones y finalmente la muerte. La acetilcolinesterasa es un compuesto muy importante en el sistema nervioso tanto de los insectos como de mamíferos, así que el mecanismo básico de acción de los compuestos organofosforados se considera que es esencialmente el mismo en insectos que en mamíferos. Algunos de estos inhiben directamente a las colinesterasas *in vitro*, como el demeton, malatión y mipafos. Otros como clorotión, dimefos, EPN, paratión, metilparatión y escadran, deben ser metabolizados en numerosos derivados desconocidos para poder inhibir a las colinesterasas. El paratión, un éster tiosforfórico, se convierte en el correspondiente éster fosfato, paraoxón, el cual inhibe directamente a la colinesterasa (Cremllyn 1995).

Absorción y destino.

En general, los organofosforados se absorben fácilmente por cualquier vía. La velocidad de absorción a través de la piel depende considerablemente del solvente usado. Algunos de estos compuestos o sus metabolitos pueden pasar la barrera placentaria y provocar una disminución de la actividad de la colinesterasa en el feto (Humphreys, 1990).

Toxicidad.

La toxicidad individual entre los organofosforados es muy variada. El TEPP es casi 10,000 veces más tóxico que el temefós. También entre los animales existe una gran variabilidad en la susceptibilidad individual a los efectos nocivos de un determinado compuesto, incluso hay marcadas diferencias de toxicidad aún entre sexos (Humphreys, 1990).

Sintomatología.

Los síntomas que se presentan en la intoxicación por organofosforados se deben a la acumulación de acetilcolina, lo que provoca la sobreestimulación del sistema nervioso parasimpático. Es usual dividir los síntomas en tres tipos, muscarínicos, nicotínicos y de acción central. Los síntomas muscarínicos que se presentan son, tialismo, lagrimeo, sudoración y secreción nasal, también hay miosis, disnea, vómito, diarrea y poliuria. Los síntomas nicotínicos son: fasciculación, debilidad y parálisis. Los síntomas centrales incluyen nerviosismo, miedo, ataxia, convulsiones y coma. La muerte se produce por insuficiencia respiratoria o, a veces, paro cardíaco (Humphreys, 1990).

Lesiones.

No se encuentran lesiones específicas *post-mortem*. Entre las que se han señalado se encuentran, gastroenteritis hemorrágica, edema pulmonar, degeneraciones en hígado y riñón, y otros, estas son secundarias a los síntomas. Sin embargo algunos de estos compuestos como el diflós y mipafós pueden producir desmielinización de los nervios periféricos y de la sustancia blanca de la médula espinal (Humphreys, 1990).

Diagnóstico de la intoxicación por organofosforados.

La exposición a estos insecticidas provoca disminución de los niveles de colinesterasa en los tejidos, lo cual ayuda en el diagnóstico de la intoxicación. El nivel de colinesterasa en la sangre puede valorarse con facilidad y el rango normal de la actividad de la colinesterasa hemática es lo suficientemente pequeño como para reconocer comparativamente la gran reducción que provocan los organofosforados. Pero la disminución de la colinesterasa sanguínea no se correlaciona necesariamente con la gravedad de la intoxicación. Es posible que el nivel se reduzca hasta desaparecer sin que se manifiesten síntomas de intoxicación, o que se reduzca sólo a la mitad de su valor normal y se presente un cuadro de intoxicación grave e incluso la muerte, parece ser que esto está relacionado con la velocidad a la que se produce la disminución de la actividad. Una reducción rápida ocasiona síntomas agudos, pero la disminución gradual puede tener efectos mínimos. No obstante, la determinación del valor de colinesterasa en sangre es una ayuda valiosa para el diagnóstico, puesto que indica que ha habido exposición a algún agente anticolinesterásico. Esto, junto con los síntomas e historia clínica, permite hacer el diagnóstico. En los casos en que el animal ha muerto y no se dispone de sangre, puede ser válido detectar la actividad de la colinesterasa cerebral

para determinar si ha habido exposición a algún organofosorado antes de la muerte (Humphreys, 1990).

Tratamiento de la intoxicación por compuestos organofosforados.

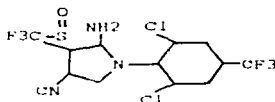
Debe ser orientado en dos sentidos.

El primero es la aplicación de atropina, el cual es un antídoto fisiológico de estas sustancias, y controla o anula el efecto muscarínico, aunque no influye sobre los síntomas nicotínicos. Es fundamental administrar la cantidad suficiente y repetirla en caso necesario si hay recurrencia de síntomas clínicos. El objetivo es conseguir un ligero grado de atropinización. En los casos leves se consigue la curación con la utilización de atropina solamente.

La segunda línea de tratamiento implica el uso de compuestos reactivadores de la colinesterasa forforilada. El más conocido es la pralidoxima, se usa en forma de yoduro, cloruro o mesilato. Esta sustancia se combina con la parte organofosforada de la molécula, regenerando la enzima activa. Es más eficaz con unos organofosforados que con otros y parece ineficaz contra dimetoato y esradán (Humphreys 1990).

2.2.5 FIPRONIL.

Cuya fórmula química es (q)-5-amino-1-(2,6-dicloro-alfa,alfa,alfa-trifluoro-p-tolueno)-4-trifluorometil-sulfinit-pirazol-3-carbonitrilo, es un moderno insecticida del grupo de los fenilpirazoles. (Colliot et al. 1992; My, 1994; Watabe, 1994).



Fórmula molecular:

$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$

Su mecanismo de acción consiste en actuar como inhibidor no competitivo del ácido gama-amino-butírico (GABA), el cual es el neuroregulador más importante del sistema nervioso central en invertebrados; este al fijarse a la superficie externa de la célula nerviosa, permite la apertura del canal cloro y el flujo intracelular de este, lo que provoca una despolarización de la célula nerviosa disminuyendo así su actividad. El fipronil al fijarse sobre su receptor situado en el interior del canal, bloquea el flujo intracelular del ión cloro anulando de esta forma el efecto neuroregulador del GABA, provocando la muerte rápida del insecto por hiperexcitación. Este es un insecticida de contacto, por lo que la molécula penetrará rápidamente a través del exoesqueleto del insecto hasta alcanzar su punto de acción,

el sistema nervioso central (Cole, 1993; Watabe et al. 1994; Jeannin 1995; Bloomquist 1996; Hainzl, 1996).

La LD50 oral y dérmica en ratas es de 100 y >2000 mg/kg, respectivamente; y en perros la LD50 es de >640 mg/kg de peso vivo. En pruebas de laboratorio el fipronil presenta una concentración letal equivalente o menor que la cipermetrina para *Nilaparvata lugens* (la LD90 del fipronil fue de 0.2 mg/l), *Nephotettix cincticeps* (LD90 5.0 mg/l), *Plutella xylostella* (LD90 0.3 mg/l), *Leptinotarsa decemlineata* (LD50 0.03 mg/l) y *Musca domestica* (LD50 0.39 mg/l). El nuevo compuesto fue más tóxico a cepas ciclodieno-resistentes de *Musca domestica* que el dieldrin y considerablemente más tóxico a cepas piretroide-resistentes de *Heliothis armigera* y a una mezcla resistente de colonias de *Leptinotarsa decemlineata* que la cipermetrina o el carbaril. (Colliot et al. 1992) (Rhône Merieux, boletín informativo).

En la agricultura a sido utilizado en forma de granulos incorporados al suelo para el control de plagas en cultivos como el de *Diabrotica spp.* en cultivos de maíz y *Agriotes spp.* en la remolacha, patatas y el girasol, y como granulos aplicados sobre el suelo en cultivos de arroz para el control de *Chilo spp.*, *Nilaparvata lugens* y *Lissorhoptrus oryzophilus*, o en aplicación foliar para el control de *Leptinotarsa decemlineata* en patatas y como tratamiento en granos para el control de *Agriotes spp.* en el maíz y *Frankliniella spp.* en el algodón. Esta investigación fue presentada en la conferencia sobre plagas y protección de enfermedades de cereales en Brighton, Reino Unido en noviembre de 1992. (Colliot et al. 1992; Burris et al. 1994).

Se ha usado también el fipronil en la prevención y tratamiento de diversas ectoparasitosis causadas por artrópodos como pulgas (*Ctenocephalides canis* y *Ctenocephalides felis*) en perros y gatos; e incluso garrapatas (*Rhipicephalus* e *Ixodidae*) y contra acaros (*Sarcoptes scabiei*) en perros (Tomasi y Vinkovic 1995; Genchi et al. 1995; Postal 1995; Searle et al. 1995 y Curtis 1996).

Postal (1995) ha reportado que su efectividad fue del 100% 24 horas después del tratamiento, en una concentración del 0.25% en spray aplicado a un lote de 64 perros y 33 gatos infestados experimentalmente con pulgas, a una dosis de 3 ml/kg. En reinfestaciones posteriores se observó un 95% de eficacia entre 6 a 16 semanas en perros y entre 5 a 7 semanas en gatos. Un lote de 195 perros infestados naturalmente fueron tratados con fipronil y otro de 191 con una preparación de permetrina al 2%. Entre 1 y 2 meses después del tratamiento la reinfestación no ocurrió en un 93 y 61%, respectivamente, en perros tratados con fipronil y un 71 y 21.5% de perros tratados con permetrina. En 41 gatos tratados con fipronil en spray la reinfestación no ocurrió en 92.6 y 61% en 1 a 2 meses después del tratamiento, respectivamente, lo cual concuerda con lo encontrado por Genchi (1995), quien además evaluó la efectividad del fipronil contra garrapatas, *Rhipicephalus sanguineus*, en perros con infestación natural, observando una

eficacia del 96, 95 y 100% a los 30, 60 y 80 días después del tratamiento, respectivamente.

CUADRO 1 . Resumen de los principales grupos de insecticidas, tipos de cada uno y algunas de sus características.

GRUPOS	TIPOS	OBTENCION	MECANISMO DE ACCION	VENTAJAS	DESVENTAJAS
ORGANO-CLORADOS	DDT Aldrin HCB Clordano Dieldrin Endrin Heptacloro Metoxicloro Toxafeno Endosulfan Pertano DDD	Por cloración de diversos hidrocarburos en una proporción del 33 al 67%	Actúan sobre el sistema nervioso, altera la polarización de la membrana, específicamente en el ciclo del Na ⁺ y K ⁺ .	- Alta estabilidad química. - Alta efectividad - Bajo costo - Acción residual	- Se ha presentado resistencia a los medicamentos. - Acumulación progresiva en tejido adiposo y lenta eliminación - Efecto nocivo sobre el ecosistema, crea biomagnificación
ORGANO-FOSFORADOS	Metilazinfos Carbofenotion Cloropirifos Cumafos Crotoxifos Cruformato Cianofenfos Demeton Diazinon Dielorvos Dimetoato Dioxation ENP Fanfur Fenclorfos	Son en su mayoría esteres, amidas u otros derivados simples de los ácidos fosfórico o tiofosfórico.	Tienen en común una habilidad muy variable para inhibir la actividad de la colinesterasa es la base para su selección como pesticidas,	- Alta estabilidad química - Baja toxicidad para los mamíferos - No se acumulan en las reservas de grasa en el mismo grado que los organoclorados. - No persisten	- Causan envenenamiento por inhibición de la colinesterasa - Provocan neurotoxicidad retardada

	<p>Fenitrothion Haloxon Leptofos Malation Mevinfos Monocrotofos Naftalofos Paration Metilparation Fosmet Escradan Sulfotep Temefos Triclorfon</p>		<p>su toxicidad aguda se debe al exceso de estímulo colinérgico resultante.</p>	<p>en el suelo.</p>	
<p>CARBAMATOS</p>	<p>Barmano Carbaril Carbofuran Dimetilan Propoxur Metomilo Lannate</p>	<p>Derivados sintéticos del ácido carbámico (NH_2COOH), similar en su estructura química al agente farmacéutico fisostigmina.</p>	<p>Son inhibidores reversibles de la colinesterasa</p>	<p>- Baja toxicidad para el hombre</p>	<p>- Al utilizarse repetidamente en el mismo lugar pierden efectividad.</p>
<p>PIRETROIDES</p>	<p>Letrina Cipermetrina Decametrina Fenvalerato Fluvalinato Permetrina Tetrametrina Deltametrina</p>	<p>Son derivados sintéticos de las piretrinas naturales</p>	<p>Estimulación transitoria del sistema nervioso</p>	<p>- No son bien absorbidos por la piel - Alta efectividad - Seguridad de aplicación - Estabilidad química dada por sustancias sinérgicas</p>	<p>- Puede causar manifestaciones alérgicas en el hombre - No poseen efecto residual - Requieren mayor frecuencia de aplicación.</p>

FENILPIRAZOLES	Fipronil Jku 0422 Sn 606011		Inhibidor no competitivo del GABA	<ul style="list-style-type: none"> - Alto poder insecticida - No causa alteraciones celulares - Seguridad de aplicación a cualquier edad o estado fisiológico - Efecto sistémico nulo - No bloquea al GABA en vertebrados 	
-----------------------	-----------------------------------	--	---	--	--

(Wallace, 1989; Pedigo, 1989; Humphreys, 1990; Cremlyn, 1995 y Ware, 1996)

2.2.6 TOXICIDAD DE INSECTICIDAS Y DETERMINACION DE LD50.

La toxicidad es usualmente expresada como dosis letal o LD50. La LD50 se refiere a la cantidad de compuesto en miligramos por kilogramo de peso corporal que se requiere para matar al 50% de un grupo de animales de experimentación. Como ejemplo: se tienen, hipotéticamente, 100 ratas para un experimento, cada una pesa 1 kilogramo de peso. Se les administra en el alimento 200 miligramos de un producto "X". Más tarde se observa que 50 (50%) mueren a consecuencia de consumir el químico, la LD50 en este caso es 200. En otras palabras, cada vez que se tomen 100 ratas de un peso de 1 kilogramo y se les administre 200 miligramos de un producto químico "X", se esperará que el 50% de la población muera. La LD50 muestra la potencia de una substancia; lo bajo del número, será la pequeña cantidad de producto que se requiere para matar al animal. Inversamente, un número mayor denota que se requiere una cantidad mayor de producto. La LD50 de diferentes substancias permite la fácil comparación entre ellas y son representados por palabras claves en el caso de pesticidas e insecticidas, como: PELIGRO o VENENO, PRECAUCION o CUIDADO. Estas palabras clave están asociadas a diferentes rangos de LD50, basadas en los diferentes grados de toxicidad como a continuación de muestra (Stein and Ravlin, 1996).

CUADRO 2 . CATEGORIAS DE TOXICIDAD DADAS POR LA LD50.

Categoría de toxicidad	Palabras clave (requeridas en los niveles de pesticidas por la EPA)	Oral LD50 (mg/kg)
I. Altamente tóxico	PELIGRO y VENENO, con el símbolo del cráneo y los huesos cruzados	0 a 50
II. Moderadamente tóxico	CUIDADO	50 a 500
III. Debilmente tóxico	PRECAUCION	500 a 5,000
IV. Considerado no-tóxico	PRECAUCION	más de 5,000

(Stein and Ravlin, 1996)

Por lo anterior es indispensable contar con una valoración de la LD50 de los principales compuestos químicos de mayor uso en el mercado, en el siguiente cuadro se muestran los valores obtenidos con diversos insecticidas.

CUADRO 3. RESULTADOS SOBRE TOXICIDAD AGUDA EN ESTUDIOS CON RATAS

Plaguicida	DL50 oral (mg/kg). A menos que se indique otra.	DL50 dérmica (mg/kg). A menos que se indique otra.
ALDICARB	1	2.5
ALDRIN	39	98
BHC	100	900
CARBARIL	250	4000
CARBOFURAN	5.3	120
CLORDANO	40 (oral en humanos)	700
CLORDIMEFORM	170	4000
2, 4-D	375	1500
DBCP	173	-
DDT	113	1931
DDVP	56	75
DIAZINON	76	455
DIELDRIN	46	60
DIMETOATO	152	353
DINOSEB	25	80
DIQUAT	231	-
DISULFOTON	5	6
EDB	108	300
ENDOSULFAN	18	74
ENDRIN	3	12

EPN	8	25
FLUOROACETAMIDA	5.75	80
HEPTACLORO	40	119
LINDANO	76	500
MALATION	885	4444
METAMIDOFOS	7.5	50
METOMIL	17	-
METILPARATION	6	63
MIREX	2.35	-
MONOCROTOFOS	21	112
PARAQUAT	57	80
PARATION (ETIL)	2	6.8
FOSFAMIDON	17	125
FLUOROACETATO DE SODIO	0.22	-
ESTRICNINA	16	-
2,4,5-T	300	-
TOXAFENO	40	600

(Stein and Ravlin, 1996).

2.2.7 RESISTENCIA DE LOS INSECTOS A LOS INSECTICIDAS

La resistencia puede ser definida como la habilidad de una cepa dada de insectos para tolerar la dosis de un insecticida que mataría a la mayoría de una población normal de insectos de la misma especie. Algunos de los casos mejor documentados de resistencia en insectos han sido observados con el DDT y otros insecticidas organoclorados persistentes, aunque también se ha advertido una seria resistencia a los organofosforados y otros insecticidas, lo que ha ocasionado graves problemas de control (Cremllyn, 1995).

Los plaguicidas no producen resistencia; lo que hacen es simplemente seleccionar individuos resistentes ya presentes en la población natural de la plaga. Los individuos tolerantes confieren resistencia a su progenie en los genes, por lo que las generaciones posteriores de insectos serán resistentes también al plaguicida. En la mayoría de los casos el plaguicida no induce probablemente mutaciones que confieran la resistencia, aunque esto puede ser cierto en algunos casos. Por ejemplo, no se esperaba en la década de los años cuarenta que la introducción de nuevos compuestos sintéticos indujera tan rápidamente la presentación de cepas resistentes. Probablemente la razón fue que estos productos químicos tenían una toxicidad inicial extremadamente alta, por lo que mataron rápidamente a todos los individuos susceptibles en la población de la plaga, dejando un pequeño número naturalmente resistente, disponible para reproducirse explosivamente con poca competencia, ya que estos no selectivos frecuentemente eliminaban muchos de los predadores naturales. Al seleccionar un nuevo insecticida en potencia es importante, por lo

tanto, ver si es efectivo contra cepas de la plaga objetivo que es completamente tolerante a los insecticidas establecidos, y también apreciar qué tan rápido se desarrolla una cepa resistente hacia el nuevo producto químico (Cremlyn,1995).

La herencia de resistencia específica es en general comparativamente simple y monofactorial, aunque la influencia del gene principal puede ser modificada por genes secundarios. Brown y Pal obtuvieron información acerca de las características genéticas de la resistencia de diferentes especies de insectos hacia el DDT, el dieldrin y compuestos organofosforados. En un total de 17 especies la resistencia heredada hacia el DDT fue monofactorial en 13 especies; al dieldrin en 16 especies, y a los compuestos organofosforados en 5 especies. El modo de herencia relativamente simple es probablemente, una razón más para el rápido desarrollo de resistencia en poblaciones de campo de insectos plaga, permitiendo que el insecto adquiriera resistencia a varios insecticidas simultáneamente. Cuando un mecanismo de detoxificación específico confiere la resistencia a dos compuestos, este fenómeno recibe el nombre de resistencia cruzada, ya que involucra los mismos genes para los dos productos químicos. Así, cuando un insecto se vuelve resistente al DDT, también es generalmente resistente a los compuestos relacionados con él, incluyendo al metoxioloro; pero no a los insecticidas ciclodienoicos como al dieldrin, al lindano (HCH) que caen en otro grupo de resistencia cruzada. Los insecticidas organofosforados pueden dividirse en dos grandes grupos de resistencia cruzada representados por el malatión y el paratión, los insectos son también frecuentemente resistentes a los carbamatos insecticidas. Un quinto grupo de resistencia cruzada es el dado por las piretrinas, aunque la resistencia a estas es menos extensiva. Cuando existen diferentes mecanismos de resistencia en un insecto dado, se dice que muestra resistencia múltiple. Esta puede inducirse cuando la población del insecto ha sido expuesta a diferentes insecticidas, y también en algunos casos, cuando la presión parece haber venido de sólo un insecticida y la resistencia múltiple es de origen morfológico o de comportamiento, cuando por lo general puede ser superada por pequeños aumentos en la dosis del tóxico (Cremlyn,1995; Feyerisen,1995).

En la población nativa de insectos sólo unos cuantos individuos están preadaptados contra el insecticida y no hay causas que favorezcan esta mutación en ausencia del insecticida. Por otro lado, cuando se introdujé un insecticida al medio, las cepas tolerantes sobrevivieron, se reprodujeron y de manera simultánea hubo una selección general de un genotipo mejor adaptado al insecticida que prevalece en el ambiente. Los diversos mecanismos fisiológicos de resistencia son también de mucha importancia; en las cepas de insectos resistentes al DDT, la tolerancia casi siempre se debe a una concentración anormalmente alta de la enzima deshidroclorasa del DDT la cual convierte a este en DDE que nos es insecticida. Los mecanismos asociados con la resistencia hacia los compuestos organofosforados son más complejos.

Muchos de estos, como el schradán, tienen que ser metabolizados *in vivo* al insecticida activo. También deberán ser desactivados por las enzimas fosfatasa y carboxiesterasas. De este modo, el grado de toxicidad de un compuesto dado depende del balance de las enzimas activadoras y desactivadoras que contenga el insecto. Con el malatión, por ejemplo, la baja toxicidad para los mamíferos se atribuye a la mayor actividad de la carboxiesterasa en estos, en comparación con la baja actividad de esta enzima en los insectos susceptibles. Los insectos que han mostrado resistencia contra el malatión generalmente no muestran resistencia cruzada a otros insecticidas, lo que sugiere que la tolerancia depende de una alta actividad de la carboxiesterasa, lo cual está respaldado por el descubrimiento de que los inhibidores de la carboxiesterasa actúan como sinérgicos del malatión, y casi elimina la resistencia (Feyereisen, 1995; Cremlyn, 1995).

La resistencia a los organofosforados mostrada por varias cepas de las moscas domésticas y las moscardas, se asocia con los niveles excepcionalmente bajos de actividad de la aliesterasa, la cual es controlada por un sólo gene, mientras que las moscas domésticas normales tienen grandes cantidades de una aliesterasa. Las oxidasas microsómicas de función mixta (MFO) desempeñan un papel vital en la activación y en la degradación de los organofosforados. Una oxidación microsómica que incluye al NADP y al oxígeno, puede ser una de las causas de la resistencia de algunos insectos hacia el DDT y a compuestos organofosforados. El nivel de oxidasas microsómicas varía considerablemente de una cepa de insectos a otra. El gene responsable determina el nivel de actividad de la oxidasa microsómica dependiente del NADP, detoxica ciertos hidrocarburos clorados, piretroides, carbamatos e insecticidas organofosforados. El butóxido de piperonilo, inhibidor de oxidasas previno la degradación metabólica de estos insecticidas (Cremlyn, 1995; Feyereisen, 1995; Waters, 1995).

La resistencia se puede deber también a modificaciones de patrones de comportamiento; como por ejemplo, ciertas cepas de mosquitos anofelidos no reposarán en las superficies que han sido tratadas con DDT y otros no entrarán en construcciones que hayan sido rociadas con este mismo. El nacimiento de generaciones de insectos resistentes al DDT dio lugar a su primer sustituto, que fue el lindano o gama-HCH, seguido de los organofosforados (como el malatión), para el control de estos insectos. Sin embargo, las plagas, después de más o menos de 6 años, en muchos casos, desarrollaron cepas que mostraron resistencia múltiple. Los carbamatos insecticidas, como el carbaril, fueron útiles casi siempre, pero desafortunadamente aquellas plagas que habían desarrollado tolerancia a los organofosforados, frecuentemente mostraron resistencia cruzada a los carbamatos. Muchos insectos plaga importantes vectores de enfermedades tienen resistencia

múltiple y en consecuencia son difíciles de combatir (Thompson,1993; Cremlyn, 1995).

Cuando un insecticida particular no se aplica más, la cepa resistente del insecto frecuentemente revierte a su resistencia natural. Sin embargo, cuando se reintroduce el insecticida, la resistencia vuelve a aparecer muy rápidamente. Hay cierta ventaja al cambiar de un insecticida a otro cada 5 o 6 generaciones. La adición de sinergistas también ayuda, casi siempre, a superar la resistencia. Sin embargo, evidencias recientes indican que los insectos se pueden volver resistentes a los mismos sinergistas, lo cual puede reducir sustancialmente la efectividad de las mezclas de insecticidas con sinergistas (Cremlyn 1995).

2.2.8 LEGISLACION EN TORNO A PRODUCTOS QUIMICOS EN MEXICO.

La constitución política de los Estados Unidos Mexicanos es la ley suprema de la unión, por esta razón se citarán, cuando sea el caso, las disposiciones que de ella emanan en la materia, ya que constituyen las bases constitucionales en las que se construye el sistema jurídico para el manejo y eliminación ambientalmente adecuados de las sustancias tóxicas o peligrosas. El "derecho a la protección de la salud", incorporado en la constitución política como parte de las modificaciones que se introdujeron en ella y entraron en vigor en 1983, permitió crear un sistema de concurrencia en materia de salubridad e introducir la idea de la protección de la salud humana en relación con los efectos adversos del ambiente. La ley general de salud, publicada el primero de julio de 1984 y reformada el 14 de junio de 1991, precisa y reglamenta el derecho a la protección de la salud y establece como materia de salubridad general, entre otras, "la prevención y el control de los efectos nocivos de los factores ambientales en la salud del hombre". Por lo anterior, a continuación se exponen los principales criterios emanados de la ley general de salud que competen a la secretaria de salud para el control sanitario de los productos químicos:

1.- De acuerdo con el artículo 194 de la ley general de salud, se entiende por control sanitario, al conjunto de acciones de orientación, educación, muestreo, verificación, y en su caso, aplicación de medidas de seguridad y sanciones, que ejerce la secretaria con la participación de productores, comercializadores y consumidores, en base a lo que establecen las normas técnicas y otras disposiciones aplicables. El ejercicio del control sanitario se aplica al proceso, uso, importación y exportación, aplicación y disposición final de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas o peligrosas para la salud, así como de las materias primas que intervengan en su elaboración.

2.- En el artículo 210, se indica que los productos que deben expendirse empacados o envasados llevarán etiquetas que deberán cumplir con las normas técnicas que al efecto se emitan.

3.- Mientras en el artículo 214, se señala que la SSA publicará en el diario oficial de la federación, las normas técnicas que expida y en caso necesario, las resoluciones sobre otorgamiento y revocación de autorizaciones sanitarias de medicamentos, estupefacientes, sustancias psicotrópicas, plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas y materias primas que se utilicen en su elaboración.

4.- El artículo 279 indica que corresponde a la SSA:

- I. Establecer, en coordinación con las dependencias del ejecutivo federal competentes y para fines de control sanitario, la clasificación y las características de los diferentes productos a los que se hace referencia, de acuerdo con el riesgo que representen directa e indirectamente para la salud humana
- II. Autorizar, en su caso, los productos que podrán contener una o más sustancias, plaguicidas o fertilizantes, tomando en cuenta el empleo a que se destine el producto.
- III. Autorizar los disolventes utilizados en los plaguicidas y fertilizantes, así como los materiales empleados como vehículos, los cuales no deberán ser tóxicos por sí mismos ni incrementar la toxicidad del plaguicida o fertilizante.
- IV. Autorizar el proceso de los plaguicidas de acción residual o de cualquier composición química, solamente cuando no entran en peligro la salud humana y cuando no sea posible la sustitución adecuada de los mismos.
- V. Establecer las condiciones adecuadas que se deberán cumplir para fabricar, formular, envasar, etiquetar, embalar, almacenar, transportar, comercializar, y aplicar plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas, en coordinación con las dependencias competentes. A efecto de proteger la salud de la población, prevalecerá la opinión de la secretaría de salud.

5.- En lo referente a la importación y exportación el artículo 283, de la ley general de salud, indica que corresponde a la SSA el control sanitario de los productos y materias primas de importación y exportación incluidos en este título, anotando identificación, naturaleza y características de los productos respectivos.

6.- En el artículo 284, se establece que en los casos en que los productos de importación no reúnan los requisitos o características que establezca la legislación respectiva, la SSA aplicará las medidas de seguridad que correspondan.

7.- A su vez, el artículo 285 estipula que el importador de los productos a los que se refiere este título, debe estar domiciliado en el país y sujetarse a las disposiciones aplicables.

8.- Por su parte el artículo 286, establece que para la importación de los productos a que se hace referencia, así como de las materias primas que intervengan en su elaboración, se requerirá que el importador exhiba la documentación sanitaria del país de origen que exija la SSA, legitimada, cuando proceda, por las autoridades consulares mexicanas. Corresponde a la SSA determinar que productos o materias primas de importación requerirán de autorización previa. Cuando la importación esté sujeta a previo permiso de la SECOFI, deberá exhibirse la autorización de la Secretaría de Salud.

9.- En la gaceta sanitaria publicada en diciembre de 1987, aparecen enlistados 26 plaguicidas (cuadro No.4) que por su persistencia en el ambiente y su toxicidad, se les dará negativa automática en las solicitudes de autorización sanitaria para su introducción en el territorio nacional, con fundamento en el artículo 286 de la ley general de salud (ver el siguiente cuadro). Así mismo, se incluye una lista de 110 sustancias o productos tóxicos que requieren autorización sanitaria para su introducción en territorio nacional.

CUADRO 4. Lista de plaguicidas a los que se dará negativa automática en las solicitudes de autorización sanitaria para su introducción al territorio nacional.

Aldrin	Cianofos	Cloramil	Clordecone
Dialifor	Dieldrin	Dinitramina	Dinoseb
Endotion	Endrin	Erbon	Etilan
Fenclorfos	Fluoroacetato de sodio	Formotion	Fostietan
Heptacloro	Isodrin	Mirex	Monuron
Nitrofenó	Schradan	2,4,5-t	Sulfato de talio
TDE	Triamifos		

(Cortinas, 1993)

10.- A la secretaría de comercio y fomento industrial (SECOFI), le corresponde publicar las NOMs (Normas Oficiales Mexicanas), elaboradas bajo la coordinación y con la participación de las distintas secretarías con competencia en la materia, y que en el caso de plaguicidas incluyen:

- Muestreo de plaguicidas pecuarios (NOM-K-431, 1977),
- Etiquetas para plaguicidas de uso doméstico (NOM-Y-304, 1988),
- Etiquetas para plaguicidas para uso agrícola y forestal, pecuario, de jardinería, urbano e industrial (NOM-Y-295, 1988),

--- Muestreo de fertilizantes (NOM-Y-35, 1988), requisitos que deben cumplir los envases y embalajes que se usen para contener plaguicidas, técnicos y formulados, reduciendo el riesgo de los trabajadores y la población en general, así como prevenir efectos adversos al ambiente durante su manejo, almacenamiento y transporte (NOM-EE-216, 1988).

11.- El nueve de noviembre de 1988, la SECOFI publicó, en el diario oficial de la federación, el decreto que establece la codificación y clasificación de mercancías cuya importación está sujeta a regulación sanitaria, fitozoosanitaria y ecológica, con base en la ley orgánica de la administración pública federal y las leyes específicas correspondientes para la protección de la salud pública, la seguridad nacional, la flora y la fauna, el ambiente, sanidad fitopecuaria y en cumplimiento de los compromisos internacionales. El siete de diciembre de 1988 se publicó, en el diario oficial de la federación, el instructivo para el procedimiento uniforme e integral, para la resolución de solicitudes de permisos y registros para plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas, comprendidos o no en los catálogos oficiales respectivos. Un aspecto a destacar, es que en la solicitud de autorizaciones de importaciones de plaguicidas y sustancias tóxicas, se requiere información sobre el nombre genérico, el registro de la Chemical Abstracts Service (CAS), el volumen de la sustancia, la compañía que la importa y la que la exporta, la aduana de entrada al país y la ruta por la que se transportará hacia su primer destino en el territorio nacional, información relevante para la planeación de acciones para prevenir y controlar accidentes químicos y otros fines de control de riesgos.

12.- En México se ha publicado un catálogo oficial de plaguicidas, que es actualizado cada año por la comisión intersecretaral para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST). Dicho catálogo, incluye plaguicidas autorizados y restringidos y contiene especificaciones sobre ellos, que son consideradas con valor normativo, aunque se prevé que paulatinamente se emitan NOMs específicas (Cortinas, 1993).

2.2.9 ASPECTOS ECONOMICOS.

La industria química en los países de la organización para la cooperación y el desarrollo económico (OCDE), constituye uno de los principales integrantes del sector manufacturero, en la que se manejan alrededor de 500 mil millones de dólares (de E.U.) en 1980, en comparación con el sector del acero, 200 mil millones, de las telecomunicaciones, 80 mil millones, y la aviación, 40 mil millones. Dicha industria se ha caracterizado por un crecimiento elevado a partir de la segunda guerra mundial (más de 10% anual hasta mediados de la década de 1970), que prácticamente ha sido cercano al doble del de la producción general. Lo anterior resalta la importancia central de esta industria, como una fuente de ingredientes industriales y comerciales, aunque en los años recientes su crecimiento ha declinado

a la par que el crecimiento económico, con un repunte de alrededor de 2.5 a 3 por ciento anual. Las compañías más importantes se fueron expandiendo, en el período de crecimiento, hasta alcanzar importantes conglomerados, generalmente emparentados con grandes empresas petroleras. Tal sector industrial puede agruparse en tres áreas de producción:

1. Química básica,
2. Materiales químicos (como plásticos y fibras sintéticas),
3. Productos químicos (por ejemplo plaguicidas y cosméticos).

Esta segmentación es útil para fines del análisis económico, en virtud de que los productos se expenden en diferentes mercados y pueden estar sujetos a reglamentaciones diferentes. Por lo general, este sector industrial está menos concentrado que otros como el del transporte, de manera que las cincuenta empresas líderes en los Estados Unidos sólo producen 50% de los productos químicos en ese país, y en el resto de los países de la OCDE también se identifican muchas firmas medianas y pequeñas. En la industria química 50% de los empleos totales, corresponden a empresas en las que trabajan menos de 500 personas. Sin embargo, ciertos segmentos específicos de esta industria están más concentrados, como es el caso de los plaguicidas en el que 12 fabricantes cubren 75% de las ventas mundiales.

La inversión extranjera de las industrias químicas nacionales de distintos países industrializados es sumamente importante, y no es sorprendente encontrar que la industria petroquímica está caracterizada por la formación de compañías multinacionales (Cortinas, 1993).

CUADRO 5. Características de la Industria Química.

1.	Es una de las industrias más importantes en los países industrializados, que contribuye en 2.5% - 3% al producto interno bruto (PIB) y ocupa el 6% de la fuerza de trabajo.
2.	El tamaño de las empresas varía desde las más grandes corporaciones del mundo, hasta pequeñas empresas de menos de 100 empleados.
3.	Tiene una diversificación muy grande de productos y mercados.
4.	Tiene un alto nivel de inversión extranjera.

(Cortinas, 1993).

2.3 PRINCIPIOS DE MUTAGENESIS.

Una mutación se considera como una modificación en la secuencia de las bases nitrogenadas que constituyen el material genético (ADN). Este cambio puede ocurrir en los genes (unidades de información) o en los agrupamientos de genes, denominados cromosomas. Las alteraciones intragénicas pueden producirse por

sustitución de bases o por desfasamiento. La primera resulta de una transición, reemplazo de una base por otra del mismo tipo, o de una transversión, en la que una base es sustituida por otra de tipo diferente. El desfasamiento consiste en el corrimiento de la secuencia nucleotídica por eliminación o adición de bases. Las anomalías que se refieren a grupos de genes pueden deberse a rearrreglos estructurales, tales como inversión o translocación, o anomalías numéricas, como eliminación o adquisición de genes o pedazos de cromosomas, o cromosomas completos. Las mutaciones pueden resultar de la acción directa de los agentes químicos sobre el material genético, o sobre otros componentes celulares ligados a él funcionalmente, como por ejemplo, los que participan en la división celular (centríolo y microtúbulos), las proteínas de la cromatina y las enzimas que contribuyen a la replicación o reparación del ADN. En general, la acción de las sustancias está relacionada con la estructura química, aunque, a una estructura determinada puede corresponder más de una actividad, como en el caso de algunos agentes alquilantes que son al mismo tiempo intercalantes (Instituto de Investigaciones Biomédicas, 1980).

CUADRO 6. CLASIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES (Rivas, 1996).

I. Tamaño	A. Mutación puntual	Cambio en un segmento muy pequeño del ADN; se considera que en general involucra a un sólo nucleótido o a un par de nucleótidos.
	B. Mutaciones gruesas	Cambios que afectan a más de un par de nucleótidos pudiendo involucrar al gen entero, el cromosoma entero o el juego de cromosomas.
II. Cualidad	A. Mutaciones estructurales	cambios en el contenido nucleótido del gen.
	1. Mutaciones por sustitución	sustitución de un nucleótido por otro que sustituyen una purina por otra o una pirimidina por otra.
	a) mutaciones de transición	que sustituyen una purina por una pirimidina o de forma inversa.
	b) mutaciones por transversión.	pérdida de alguna porción de un gen.
	2. Mutantes por pérdida	adición de uno o más nucleótidos extra a un gen.
	3. Mutantes por inserción	el cambio de ubicación de un gen dentro del genoma a menudo conduce a "efectos de posición".
	B. Mutaciones por arreglo	dos mutaciones dentro del mismo gen funcional pueden producir efectos diferentes, dependiendo de si ocurren en la
	1. Dentro de un gen	

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 2. Número de genes por cromosoma. | posición <i>cis</i> o <i>trans</i> .
se pueden producir diferentes efectos fenotípicos si los números de réplicas de un gen no son equivalentes a los cromosomas homólogos. |
| 3. Cambiando el locus del gen | se pueden producir nuevos fenotipos, especialmente cuando el gen está relocalizado cerca de la heterocromatina. |
| a) Translocaciones | movimiento a un cromosoma no homólogo. |
| b) Inversiones | movimiento dentro del mismo cromosoma. |

III. Origen

- | | |
|--------------------------------|---|
| A. Mutación espontánea | origen desconocido, a menudo llamada "mutación antecedente" |
| B. Control genético | se sabe que la mutabilidad de algunos genes está influenciada por otros "genes mutadores". |
| 1. Mutadores específicos | efectos limitados a un locus |
| 2. Mutadores no específicos | afectan simultáneamente a muchos loci. |
| C. Mutaciones inducidas | por medio de la exposición de ambiente anormales como: |
| 1. Radiaciones ionizantes | cambios en la valencia química por expulsión de electrones y son producidas por protones, neutrones o por rayos alfa, beta, gama rayos X |
| 2. Radiaciones no ionizantes | elevan los niveles de energía de los átomos (excitación volviéndolos menos estables, por ejemplo, radiación ultravioleta, calor); los UV a menudo producen dímeros de timina, es decir, unión entre timinas en la misma banda |
| 3. Mutágenos químicos | son sustancias químicas que aumentan la mutabilidad de los genes. |
| a) errores de copia | mutantes que provienen de la replicación del ADN (es decir, los mutágenos análogos a la base que son químicamente similares a las bases de ácido nucleico pueden ser incorporados por equivocación; la acridina causa adiciones o deleciones de bases simples posiblemente por intercalación entre dos bases secuenciales). |
| b) cambio directo del gen | producido en el ADN que no se replica (por ejemplo, el ácido nítrico por desaminación convierte directamente la adenina en hipoxantina y la citosina en uracilo). |

IV. Magnitud del efecto fenotípico.	A. Cambio en la proporción de la mutación	algunos alelos sólo pueden ser distinguidos por la frecuencia con la cual mutan.
	B. Isoalelos	producen fenotipos idénticos en combinaciones homocigóticas o heterocigóticas entre sí, pero son distinguibles en combinaciones con otros alelos.
	C. Mutantes que afectan la viabilidad:	
	1. Subvitales	la viabilidad relativa es mayor que el 10% pero menos que el 100% comparada con el tipo común.
	2. Semiletales	causan más del 90% pero no menos del 100% de mortalidad.
	3. Letales	matan a todos los individuos antes de la edad adulta.
V. Dirección	A. Mutaciones hacia adelante	produce un cambio del fenotipo común al tipo anormal.
	B. Mutación hacia atrás o retromutación	produce un cambio del fenotipo anormal al de tipo común.
	1. Mutación en un sólo sitio	cambia sólo un nucleótido en el gen (por ejemplo, adenina hacia adelante guanina en reversa adenina).
	2. Supresor de mutación	un cambio en un gen que ocurre en un sitio diferente de la primera mutación, sin embargo, invierte su efecto.
	a) supresor extragenético	sucede en un gen diferente del mutante.
	b) supresor intragenético	se presenta en un nucleótido diferente dentro del mismo gen; desvía el molde de lectura hacia el registro.
	c) fotorreactivación	inversión de los dímeros de timina provocados por UV, por enzimas específicas en presencia de ondas de luz visibles.
VI. Tipo de célula	A. Mutación somática	se presenta en las células no reproductivas del organismo, a menudo produciendo un fenotipo mutante en sólo una parte del organismo (mosaico o quimera).
	B. Mutación gamética	se presenta en las células sexuales, produciendo un cambio heredable.

La existencia de un alto número de sustancias producidas en la industria y difundidas en el ambiente, hace necesario identificar aquéllas capaces de inducir mutaciones, con el objeto de prevenir sus efectos sobre la población humana. Es evidente que si se pretende estimar el riesgo de representa un compuesto dado para el hombre, esté es el sistema biológico ideal para determinar los posibles efectos mutagénicos. No obstante, los problemas éticos y económicos, así como la duración de los estudios, dificultan la investigación en los humanos. Por lo anterior, los experimentos con sistemas biológicos no humanos resultan valiosos para evaluar los efectos genéticos de los agentes químicos, por su reproducibilidad, facilidad de realización, relativa economía y corta duración (Instituto de Investigaciones Biomédicas, 1980).

CUADRO 7. ALTERACIONES GENICAS

NIVEL DE LA MUTACION	TIPO DE MUTACION	DESCRIPCION
ALTERACIONES EN LA SECUENCIA DE BASES	SUSTITUCION DE BASES	CAMBIO DE UNA BASE POR OTRA. a) TRANSICION PURINA-----PURINA PIRIMIDINA--- PIRIMIDINA b) TRANSVERSION PURINA PIRIMIDINA CORRIMIENTO DE LA SECUENCIA DE BASES POR PERDIDA O ADICION
	DEFASAMIENTO	
	<u>ANOMALIAS EN EL ARREGLO DE LOS GENES</u> INVERSION	CAMBIO DE ORIENTACION DEL GENE, MANTENIENDO SU POSICION RELATIVASPECTO DE OTROS GENES.
	TRANSLOCACION	CAMBIO DE POSICION DE UN GENE CON RELACION DE OTROS GENES.

ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES -	ANOMALIAS EN EL NUMERO DE LOS GENES ELIMINACION DUPLICACION REARREGLOS : TRANSLOCACIONES, INVERSIONES, ANILLOS.	PERDIDA DE UN GENE ADQUISICION DE UNA COPIA EXTRA DE UN GENE CAMBIO EN EL NUMERO POSICION U ORIENTACION DE GRUPOS DE GENES.
MODIFICACION DEL NUMERO DE CROMOSOMAS	ANEUPLOIDIA a) MONOSOMIA b) POLISOMIA POLIPLOIDIA	SEGREGACION CROMOSOMICA DEFECTUOSA QUE RESULTA EN PERDIDA O ADQUISICION DE UNO O MAS CROMOSOMAS. AUMENTO DE JUEGOS COMPLETOS DE CROMOSOMAS.

(Instituto de investigaciones biomédicas,1980)

La validez de los resultados obtenidos en estos sistemas para la determinación del riesgo que constituye la exposición del hombre a los compuestos químicos, aún es motivo de controversia, ya que, si bien es cierto, los seres vivos comparten algunas características entre las que sobresalen la universalidad del código genético y los mecanismos de transcripción y traducción de la información hereditaria, existen divergencias acentuadas, fundamentalmente en lo que se refiere a la permeabilidad, el transporte y el metabolismo, que afectan la probabilidad de ocurrencia de las alteraciones provocadas por las sustancias químicas. Así pues, la extrapolación es menos confiable a medida que los organismos en los que se realizan las pruebas están más alejados -funcionalmente- del hombre. Cada prueba determina, además, alteraciones precisas en condiciones específicas, por lo que la obtención de datos negativos no debe conducir a una confianza excesiva en el uso de los compuestos. La coincidencia de resultados en varios sistemas que incluyan algunos funcionalmente semejantes al humano, constituye, sin embargo, un elemento de gran utilidad para normar los criterios sobre el uso o difusión de las sustancias, aun cuando no permita predecir el riesgo con precisión (Instituto de Investigaciones Biomédicas,1980).

2.3.1 RIESGOS CLÍNICOS DE LA MUTACION.

Las mutaciones pueden ser ventajosas, neutras o tener manifestaciones patológicas, entre las que se incluyen padecimientos congénitos y cancer. Existen en la actualidad más de dos mil enfermedades hereditarias. Aproximadamente el 3% de todos los recién nacidos son portadores de anomalías congénitas que requieren atención médica y cerca del sesenta por ciento de los abortos que ocurren en el trimestre del embarazo, son consecuencias e aberraciones cromosómicas. Esto pone de manifiesto la contribución de las alteraciones genéticas a la patología humana (Instituto de Investigaciones Biomédicas, 1980).

2.3.2 SISTEMAS DE PRUEBA PARA IDENTIFICAR MUTAGENOS.

A continuación se resumen las características más relevantes de las pruebas más usuales en la identificación de mutágenos.

I. ADN. Sólo las pruebas biológicas pueden corroborar si una alteración particular del ADN se traduce en una mutación, sin embargo, los estudios de las modificaciones producidas directamente en esa molécula, permiten estimar, a corto plazo, lo que puede ocurrir si un compuesto dado tiene acceso a ella *in vivo* e inferir el mecanismo de acción posible. Entre las técnicas más empleadas para detectar cambios en el ADN se encuentran:

- Rompimientos de cadenas sencillas
- Entrecruzamientos inter o intra cadena
- Intercalación de colorantes
- Alquilación de bases

II. PRUEBAS EN MICROORGANISMOS. El gran tamaño y corto tiempo de generación de las poblaciones sobre las que se realiza el estudio, hace de estas pruebas un elemento útil para el examen rápido y preciso de un número elevado de compuestos.

1.- Virus.

Mediante su empleo se valora, fundamentalmente, la capacidad de las sustancias para inducir mutaciones génicas o para activar la liberación y replicación de los virus (pro-fagos) que se encuentran integrados en el cromosoma bacteriano y que producen la muerte de la bacteria (lisogenia).

2.- Bacterias.

La inducción de mutaciones génicas puede determinarse en varias especies bacterianas (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*). Una de las ventajas de algunas de ellas es que proveen indicios de los mecanismos de producción de las mutaciones, además de la información sobre la capacidad mutagénica de los compuestos.

3.- Hongos.

Estos se asemejan más a los mamíferos que los anteriores, ya que sus células poseen un núcleo, los cromosomas contienen ADN asociado a nucleoproteínas y los ciclos de división incluyen procesos meióticos y mitóticos. Entre los más usados en el laboratorio se encuentran *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa*. Las pruebas más importantes comprenden mutaciones génicas, recombinación mitótica, conversión génica y segregación cromosómica defectuosa ("non disjunction").

4.- Estrategias para determinar la actividad genética de los metabolitos.

Los microorganismos no poseen todos los grupos enzimáticos responsables de la activación o detoxificación de las drogas existentes en los mamíferos y en el hombre, por lo que se han desarrollado diversas estrategias para usarlas en la determinación del efecto de los metabolitos. Entre ellas podemos citar:

- El empleo de homogeneizados celulares que contienen las enzimas microsomales provenientes, fundamentalmente, del hígado de roedores (rata, hamster), que ejercen su acción *in vitro* sobre los compuestos.
- La utilización de fluidos cororales, como orina y sangre, de individuos (animales de laboratorio o humanos) expuestos *in vivo* a los agentes químicos.
- El ensayo vía el hospedero, en el que los microorganismos se introducen en un ratón (en el peritoneo o en la sangre), al que administra la sustancia en estudio.

CUADRO 8. SISTEMAS DE PRUEBA PARA DETECTAR LESIONES GENÉTICAS

SISTEMA	MUTACIONES		ABERRACIONES CROMOSÓMICAS					Sistemas de prueba para detección de metabolitos.
	Hacia adelante y/o hacia atrás	Loci Específico (multiple)	Letales dominantes	Translocaciones	Deleciones y Duplicaciones	No disyunción	Recombinación inducida	
Microbianos								
a) Procariontes								
1. <i>S. thypimurium</i>	X							X
2. <i>E. coli</i>	X							X
b) Hongos								
1. Neuroesporas	X				X			X
2. <i>Aspergillus</i>	X	X				X	X	
3. Levaduras	X	X	X			X	X	X

II. Plantas								
a. <i>Viola</i>				X	X	X		
b. <i>Tradescantia</i>	X			X	X	X		
III. Insectos								
a. <i>Drosophila</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
b. <i>Habrobracon</i>	X	X	X				X	X
c. <i>Bombyx</i>	X	X						
IV. Sistemas de células de mamíferos in vitro								
a. Hamster chino	X			X	X	X		X
b. Linfoma de ratón	X			X	X	X		X
V. Sistemas de mamíferos in vivo								
a. Ratón		X	X	X	X	X		
b. Rata			X	X	X	X		
VI. Hombre								
				X	X	X		

(Legator adn Zimmering, 1975)

III. CULTIVOS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS. Se usan diferentes líneas celulares (humanas, de hamster y de ratón) que, al igual que los microorganismos, permiten obtener resultados en un tiempo relativamente corto, en experimentos controlados, y usan un gran número de células. Asimismo, constituyen un material adecuado para el estudio de las mutaciones génicas y de aberraciones cromosómicas, numéricas y estructurales. Las estrategias para determinar la actividad génica de diversos metabolitos en microorganismos, también se aplican a estos cultivos.

IV. PLANTAS. Estas son útiles como dosímetros biológicos en el estudio del efecto de contaminantes ambientales, plaguicidas, herbicidas, fertilizantes químicos y cualquier sustancia distribuida en forma natural en el ambiente, lo cual es difícil de hacer con otros sistemas de prueba. Además, no dejan de ser adecuadas para utilizarse en el laboratorio, debido a su bajo costo de mantenimiento y a los requisitos mínimos de cuidado en experimentos estrictamente controlados. Existen indicios de que las plantas metabolizan las sustancias en forma diferente de como lo hacen los mamíferos. Es probable, entonces, que algunos compuestos que no tienen efecto directamente sobre los mamíferos, puedan verse convertidos en metabolitos activos por la acción de las plantas y constituir así un riesgo para los

consumidores. Las plantas más usadas son la "hierba de pollo" (*Tradescantia paludosa*), la cebolla común (*Allium cepa*) y el haba (*Vicia faba*), en las que se pueden valorar mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas.

V. INSECTOS. La mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), es el insecto más utilizado por el amplio conocimiento que se tiene de su genética y por ser un organismo que se reproduce en un lapso corto de tiempo, generando grandes poblaciones que requieren e un mantenimiento mínimo. Por todo ello, éste es el sistema animal más rápido para detectar mutaciones génicas (de tipo recesivo ligadas al sexo), cromosómicas (segregación efectiva y translocaciones) en células germinales y eventos de recombinación y mutación en células somáticas. Tiene, además, la capacidad de metabolizar los compuestos en forma muy similar a los mamíferos y es susceptible de usarse como dosímetro biológico al igual que las plantas (Batiste, et al., 1995; Graf, 1984; Delgado, et al., 1995).

VI. MAMIFEROS NO HUMANOS. El ratón es el mamífero más estudiado desde el punto de vista genético, lo que favorece su empleo en la identificación de mutagenos. Se utiliza para valorar mutaciones génicas (es un sitio o locus específico en el cromosoma) y aberraciones cromosómicas somáticas y germinales (con efectos dominantes letales o del tipo de translocaciones hereditarias). Estas pruebas, a diferencia de las citadas anteriormente, consumen más tiempo en su realización y análisis y, por lo tanto, su costo es mayor. Una técnica más reciente se basa en el análisis de los cambios morfológicos de los espermatozoides, ya que se ha señalado que estos pueden ser la manifestación de algunas alteraciones genéticas.

VII. HUMANOS. Estos estudios se realizan, en general, en individuos expuestos bajo circunstancias médicas, ambientales, accidentales y excepcionalmente en condiciones experimentales. Sólo se cuenta en la actualidad con pruebas para identificar, en forma directa, lesiones cromosómicas numéricas y estructurales en células de la médula ósea o linfocitos sanguíneos y la presencia de más de un cromosoma "Y" en los espermatozoides. El análisis cromosómico de las células germinales en meiosis, aun cuando técnicamente es posible realizar, rara vez se hace debido principalmente a la dificultad para obtener muestras del tejido de la gónada. Lo mismo que en el caso del ratón, la determinación de anomalías morfológicas en los espermatozoides también puede servir como un indicador de alteraciones reproductivas.

Ninguno de estos estudios proporciona información sobre el impacto más importante de las mutaciones sobre la población, ya que se refieren al efecto producido en el individuo expuesto y se carece de los datos sobre la transmisión de ese daño a su descendencia y a las generaciones subsecuentes. Estos datos sólo pueden obtenerse de estudios epidemiológicos que en muchos casos resultan,

además de costosos en tiempo y dinero, imprecisos, por el tiempo que transcurre entre la exposición de individuos y la manifestación de las alteraciones en sus descendientes, así como por las múltiples variables que interfieren y que es difícil controlar (Instituto de Investigaciones Biomédicas, 1980).

**CUADRO 9. CARACTERISTICAS DE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS
USADOS PARA IDENTIFICAR MUTÁGENOS**

SISTEMA	ALTERACION IDENTIFICADA	DURACION DE UNA PRUEBA	FACTORES LIMITANTES
ADN	CAMBIOS EN LA CELULA	2 - 3 DIAS	COSTO DEL EQUIPO, USO DE ALGUNAS TECNICAS RELATIVAMENTE DIFICILES.
VIRUS	MUTACIONES GENICAS, INDUCCION DE PROFAGOS	2 - 3 DIAS	MINIMOS.
BACTERIAS	MUTACIONES GENICAS	3 - 5 DIAS	MINIMOS
ENSAYO VIA HOSPEDERO: BACTERIAS, HONGOS Y CULTIVO DE CELULAS DE MAMIFERO.	LAS CITADAS EN CADA SISTEMA	1 - 5 SEMANAS	REQUERIMIENTO DE BIOTERIO
HONGOS	MUTACIONES GENICAS, SEGREGACION CROMOSOMICA DEFECTUOSA	1 - 3 SEMANAS	MINIMOS
PLANTAS	MUTACIONES GENICAS, REARREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURALES	1 - 5 SEMANAS	MINIMOS
INSECTOS	MUTACIONES GENICAS, REARREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y	2 - 7 SEMANAS	MINIMOS

CULTIVO DE CELULAS DE MAMIFERO	ESTRUCTURALES MUTACIONES GENICAS, REARREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURALES	2 - 5 SEMANAS	COSTO DEL MATERIAL Y EQUIPO, USO DE TECNICAS LABORIOSAS Y CITOGENETICA.
MAMIFEROS	MUTACIONES GENICAS, REARREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURALES TRANSMISION DE MUTACIONES A DESCENDIENTES.	2 - 7 MESES	COSTO DE LA INVESTIGACION EN ALGUNAS PRUEBAS REQUIERE BIOTERIO.
HUMANOS, EN CUANTO AL TIPO DE CELULAS:	SOMATICO: REARREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURALES CROMOSOMA Y EN EXCESO.	1 - 2 SEMANAS 1 - 2 DIAS	CONTROL DE VARIABLES, OBTENCION DE DONADORES.
	GÉRMINALES: TRANSMISION DE MUTACIONES A LOS DESCENDIENTES.	VARIOS AÑOS	NECESIDAD DE ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS. CARENCIA DE REGISTROS CONFIABLES

(Instituto de Investigaciones Biomédicas, 1980)

2.3.3 ESTRATEGIAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE UN MUTAGENO POTENCIAL.

Para la detección de posibles agentes mutagénicos se incluyen tres etapas:

Pimera. Se sugiere el empleo de organismos unicelulares e insectos para determinar mutaciones génicas y daño cromosómico.

Segunda. Se indican pruebas de detección de metabolitos intermediarios *in vivo* e *in vitro*.

Tercera. En esta última se propone la exposición de mamíferos a los compuestos en estudio, en forma semejante a la que se expone o expondrá el humano. En estos esquemas la investigación de un compuesto sigue una secuencia que depende de factores tales como: la existencia de sustitutos inocuos, los niveles de exposición o consumo, la importancia médico y económica de los compuestos y los resultados

obtenidos en las pruebas de la primera o segunda etapa. Por lo que se refiere a sustancias que aún no salen al mercado, la obtención de resultados positivos en la primera etapa sería concluyente para evitar su comercialización. La segunda etapa se aconseja principalmente para compuestos no indispensables, distribuidos ya en el ambiente y que hayan dado resultados positivos en la etapa anterior. De confirmarse su mutagenicidad, se propone el control estricto de su difusión o eliminación del mercado. Las pruebas de este nivel también se recomiendan para agentes químicos de gran relevancia médica y económica aun cuando anteriormente hayan producido resultados negativos. Si de nuevo no se tiene efecto puede aprobarse su utilización, mientras que si se obtienen resultados positivos y no se tienen sustitutos, se someten a los estudios de mamíferos incluidos en la tercera etapa. La información generada en las pruebas de las tres etapas constituye un elemento primordial para el análisis riesgo-beneficio, el cual permite decidir si el mutígeno debe ser retirado de la producción o del ambiente, o debe regularse rigurosamente su distribución (Instituto de Investigaciones Biomédicas, 1980).

2.4 *Drosophila melanogaster* COMO SISTEMA DE PRUEBA.

Aunque el mejoramiento genético se practicaba desde la época de los griegos, no fue sino hasta 1866 que los principios fundamentales de la herencia fueron descritos por **Gregorio Mendel** en un trabajo realizado en chicharos y publicado en la revista de la Sociedad de Historia Natural de Brun. Sin embargo, en ese tiempo esta información recibió poca atención, siendo en 1902, cuando **Sutton** de los Estados Unidos y **Boberl** de Alemania, revisando los trabajos de Mendel, reiniciaron formalmente los estudios sobre genética y postularon la TEORÍA CROMOSÓMICA DE LA HERENCIA. Una demostración muy antigua de la misma se llevo a cabo en 1910 por **Thomas H. Morgan**, con la pequeña mosca que se encontraba en los fruteros, *Drosophila melanogaster*; siendo así como este insecto, que después fuera descrito por **Dobzhansky** como EL ANIMAL CREADO POR DIOS PARA EL ESTUDIO DE LA GENÉTICA, aparece en el campo de la investigación biológica y se ha convertido en uno de los sistemas más importantes en el entendimiento de los fenómenos relacionados con la herencia, la fisiología, la embriología, la bioquímica, la evolución, etc (Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, 1992).

Fue en *Drosophila* donde **Morgan**, quien ocupara la cátedra de Zoología en la Universidad de Columbia, describió por vez primera la herencia ligada al sexo lo que le haría merecedor del Premio Nobel en 1933. Fue en esta mosca donde comenzó con sus trabajos ya que le pareció el organismo perfecto para iniciar lo que hoy es el comienzo de toda una época en la investigación genética, ya que este es un insecto al que le atrae la fruta putrefacta y fermentada. Entre algunas de las razones por las que comenzó a trabajar con ella son que tiene un ciclo de vida (desde el huevecillo hasta el adulto) de 14 días y con capacidad de producir más de mil huevecillos durante toda su vida, por la facilidad con la que se reproduce, la

longitud del cuerpo supera un poco los tres milímetros y cada dos semanas produce una nueva generación. Además, el vio que una colonia de moscas se podía mantener perfectamente en un frasco de vidrio de un cuarto de litro provisto de alimento y descubrió que esta especie posee sólo cuatro pares de cromosomas, uno de los cuales es muy pequeño. En la naturaleza la mayoría de las *Drosophilas* tienen los ojos rojos y los genetistas las llaman silvestres. En 1909 apareció una variación en una de las poblaciones de esta mosca, un macho de ojos blancos, se dice que fue la esposa de Morgan quien descubrió este espécimen sobre la mesa de trabajo, sorprendida ante tal acontecimiento, reacciono tratándolo de capturar y comenzó la persecución de la mosca por todo el laboratorio, atraído por la extraña actitud de la mujer y al enterarse del asunto el mismo Morgan y sus colaboradores se incorporaron a la cacería del insecto. Había tal excitación, ya que la mosca de ojos blancos no podía proceder del exterior, dado lo cuidadosamente cerrado del laboratorio y por lo tanto su presencia denunciaba la realización natural de un cambio que se hacía visible, lo cual se había logrado después de un millón de replicas de un cromosoma realizadas a lo largo de todo un año. Posteriormente Morgan siguió el protocolo propuesto por Mendel con sus guisantes, cabe mencionar que él se encontraba entre el grupo de biólogos a los que no les satisfacía la teoría Darwiniana y que además se oponía al Mendelismo, al someter a la mosca de ojos blancos a este procedimiento encontró que toda la generación F1 era de ojos de color rojo normal, sugiriendo que el factor para los ojos blancos era recesivo con respecto a este, en la F2 hubo moscas de color de ojos rojo y blancos en proporción Mendeliana 3:1. Aunque lo inusual fue que todas las moscas de ojos blancos eran machos y todas las hembras los tenían rojos. De esto se desprendió una conclusión inevitable el factor responsable de los ojos blancos debía hallarse en el cromosoma X y además tenía carácter de recesivo. Después de realizar estudios de mayor enfoque hacia *Drosophila*, Morgan descubrió otras características de la mosca del vinagre ligadas al sexo, es decir ligadas al cromosoma X. Adoptó entonces el término gen, introducido en 1909 por el botánico Danés Wilhem Johansen y concluyó que los cromosomas portaban un conjunto de genes como cuentas ensartadas de un collar y que cada una determinaba una cierta característica hereditaria. Posteriormente, fue también con la "amante del rocío o *Drosophila*" que Sturtevant y Bridges esclarecieron ininidad de conceptos básicos postulando las bases de la Genética moderna. Mas tarde los trabajos de Muller usando rayos X en 1927 y 20 años después, los de Auerbach y colaboradores usando agentes químicos, prácticamente dieron inicio a la genética toxicológica, al demostrar el efecto mutagénico de agentes físicos y químicos. Ambos descubrimientos se realizaron trabajando con *Drosophila*. Asi mismo en la década de los 40, la genética de poblaciones y la evolución sufren un fuerte impulso con las aportaciones de Hardy, Weinberg, Wright, Fisher, Muller y Dobzhansky entre otros (Rivas,1996).

En este campo, *Drosophila* nuevamente juega un papel trascendental, de tal manera que es en *D. pseudoobscura* y en *D. persimilis* en las que se describe la persistencia de determinados arreglos cromosómicos y la relación de estos con las variaciones ambientales lo que permite profundizar en el conocimiento del valor adaptativo de los genes y su capacidad para alterar la dinámica de las poblaciones. En este sentido, los trabajos desarrollados con *Drosophila*, han permitido desentrañar algunos misterios del proceso evolutivo que pueden ser aplicados a otras especies. En realidad, si *Drosophila* ha jugado un papel tan importante en el esclarecimiento de los fenómenos genéticos es debido, en gran parte, a su gran plasticidad, al amplio conocimiento de su genética y a la facilidad de su manejo, que permite de una manera más rápida, sencilla y económica investigar los mecanismos de su funcionamiento. Estas mismas características son las que le han hecho la herramienta más dúctil en la enseñanza de la biología y particularmente en la genética. De tal manera que prácticamente todos los aspectos importantes de la herencia pueden ser demostrados en este organismo. Como ejemplos, podemos mencionar las leyes de Mendel, puesto que a través de los adecuados sistemas de cruza se puede comprobar que las características genéticas pueden ser dominantes o recesivas (primera ley de Mendel), que estas características son capaces de segregarse (segunda ley de Mendel), y que además, esta segregación es independiente (tercera ley de Mendel). También es posible demostrar que los genes están organizados en los cromosomas; que existe ligamiento entre ellos y que además, son capaces de recombinarse durante la meiosis. Por otra parte, podemos ilustrar el hecho de que existen genes ligados al sexo; realizar el mapeo genético tanto en cromosomas sexuales como autosómicos, probar la interacción génica, la herencia extracromosómica y los fenómenos de mutagénesis. Sin dejar de mencionar los elegantes experimentos diseñados con el objeto de demostrar la ley de Hardy y Weinberg, la deriva génica y la genética del comportamiento (Ramos, 1993; Rivas 1996).

2.4.1 GENERALIDADES

2.4.1.1 *Drosophila melanogaster*:

Es un insecto que pertenece al orden *Diptera*, que se caracteriza por agrupar a organismos en los que sólo el primer par de alas es funcional y el segundo se ha transformado en órganos del equilibrio, los llamados halterios o balancines. Es un organismo representativo de la familia *Drosophiloidae* que incluye a moscas pequeñas, con algunas cerdas y venación de las alas característica, el género *Drosophila* comprende varias especies de moscas con la vena subcostal degenerada, incompleta o ausente, las pertenecientes a la especie *melanogaster* tienen dos interrupciones en la vena costal. Se encuentran ampliamente distribuidas, en todo tipo de climas, especialmente se localizan en frutas suaves en las que se ha iniciado la fermentación, sobre de estas las hembras fecundadas depositan sus huevos, que

llegan a ser algunos cientos, buscando preferentemente a aquellas zonas donde se ha perdido la continuidad de la cáscara de los frutos, ya que su fuente nutritiva son las levaduras, responsables del proceso de fermentación, de las que se alimentarán las larvas hasta alcanzar el estado pupal, por lo que en general se les encuentra rondando alimentos con alto contenido de ácido acético (Ramos 1993).

La *Drosophila* se reproduce sexualmente por lo que se da en ella recombinación genética, pudiéndose llevar a cabo cruzamientos controlados, lo que nos permite escoger la líneas parenterales, con sus respectivos registros de la progeme según sea el caso. Se le ha seleccionado como objeto de estudio en diversos laboratorios de Genética en todo el mundo por presentar características fenotípicas variables y detectables (Rivas 1996).

Dentro de las bondades que brinda este organismo para su uso en el laboratorio se incluyen las siguientes:

- 1.- Ciclo de vida relativamente corto, de entre 10 a 15 días, a temperatura y humedad constantes.
- 2.- Requerimientos nutricionales y preparación de medio de cultivo accesibles.
- 3.- Los cultivos ocupan poco espacio.
- 4.- Amplio control entre cruza experimentales.
- 5.- Poco equipo para su manejo.
- 6.- Gran variedad de marcadores.
- 7.- Gran cantidad de descendencia producida por cada pareja.
- 8.- El costo para su manutención es reducido.
- 9.- Presentan, además, un número cromosómico bajo ($2n=8$)
- 10.- Las larvas presentan cromosomas gigantes en sus glándulas salivales, lo cual es de gran utilidad para estudiar la morfología cromosómica y la evolución cariotípica.
- 11.- Presentan cuatro pares de cromosomas, y se cuenta con mapas bien determinados de cada uno de ellos.
- 12.- Es un organismo ideal para la demostración de muchos principios biológicos y en el análisis de ciencia descriptiva, bioquímica y molecular.

Además de ser un organismo eucariote superior que comparte con los mamíferos la existencia de sistemas enzimáticos muy semejantes en sus funciones, razón por la cual se le ha utilizado como modelo experimental en mutagénesis. Cuenta con una gran cantidad de marcadores mutantes que expresan fenotípicamente diferencias en la forma, color, textura y tamaño de los ojos, distribución de las nervaduras, en la forma de los tricomas (pelos de las alas y del cuerpo). También se cuentan con líneas con características metabólicas específicas o con diferentes capacidades de reparación de daño genético (Instituto de Investigaciones Biomédicas 1980; Rivas 1996).

2.4.1.2 CICLO DE VIDA.

El desarrollo de la mosca *Drosophila melanogaster* presenta un periodo de embriogénesis dentro del huevo y una posterior sucesión de estadios larvarios que culminan en la pupación y una metamorfosis completa (holometábola), de la que finalmente surge un imago o adulto (figura 1). La secuencia y duración de los diferentes estadios en el ciclo de vida son:

1 Desarrollo embrionario (huevo),.....	un día
2 Larva de primer estadio,	un día
3 Larva de segundo estadio,	un día
4 Larva de tercer estadio,	dos días
5 Pre-pupa,	4 horas
6 Pupa,	4.5 a 5 días
7 Adulto,	40 a 50 días.

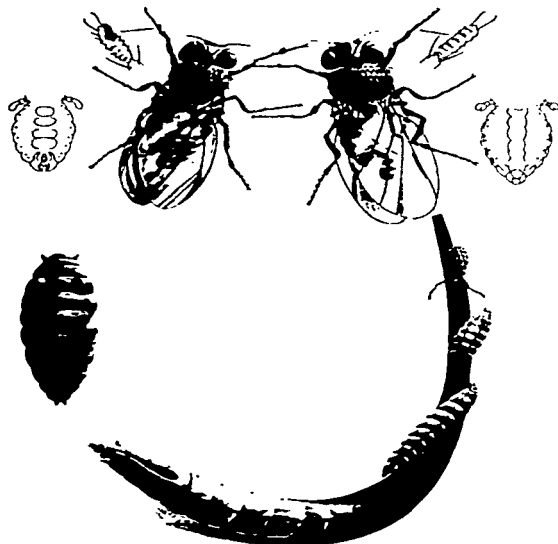
Así, la duración del ciclo de vida es de 9.5 a 10 días bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa de 25°C y 60%, respectivamente, alterándose su duración de acuerdo a la variación de la temperatura y cada hembra puede producir más de mil huevecillos (Ramos 1993; Rivas 1996).

2.4.1.3 REPRODUCCION Y ETAPAS DEL DESARROLLO

El ciclo de vida se inicia en el ovario de la hembra, donde una célula primitiva germinal desencadena un patrón de división altamente especializado. La célula germinal se divide cuatro veces dando lugar al oocito y a quince células llamadas enfermeras. En la estructura folicular las células enfermeras cuidan y ayudan a crecer al huevo, el ARN y organelos como mitocondrias las que pasan a través de canales que conectan al huevo con las células enfermeras. La contribución de estas células ayuda a construir el huevo y prepararlo para la fertilización. En la fertilización el espermia y el oocito se unen y la célula o huevo resultante contiene cromosomas de ambos padres. Después de efectuada la cópula se forma el **huevo** o cigoto ovopositado por la hembra en el medio de cultivo, dándose las primeras etapas del desarrollo embrionario (el cual se lleva a cabo dentro de las membranas del huevo), el huevo mide aproximadamente 0.5 mm de longitud, siendo de forma ovalada, presenta un par de filamentos en la región anterodorsal, los cuales tienen como propósito el evitar que el huevo se hunda en la superficie blanda del alimento donde ha sido depositado. La membrana externa llamada corion es opaca y se le observan pequeños hexágonos dibujados en la superficie, la membrana vitelina es transparente y quitinosa. La penetración del espermatozoide se realiza a través de un pequeño orificio que recibe el nombre de micropilo, que se cierra y se encuentra en la saliente cónica del extremo anterior del huevo. Muchos espermatozoides pueden entrar en él, aunque normalmente sólo uno interviene en la fecundación. El huevo

después de 22 horas da paso a una **larva**, que sufrirá dos mudas, la fase larvaria consta de tres estadios. La larva de primer estadio emerge 22 horas después de ovopositado el huevo, es de color blanco de alrededor de 0.5 mm de longitud, se alimenta vorazmente en el medio de cultivo formando túneles. La del segundo estadio se forma por muda de la del primero 48 horas después, midiendo aproximadamente 2 o 3 mm, continuándose su alimentación. Después de 70 horas la del segundo estadio muda a la del tercer estadio, esta mide 4.5 mm de largo, su actividad y voracidad es muy elevada; morfológicamente posee glándulas salivales, sistema nervioso, tráquea, sistema digestivo, cuerpo graso y gónadas que permiten la diferenciación sexual en estado larvario, la testicular es de mayor tamaño. Este periodo dura de 4 a 5 días a 25°C. La larva del tercer estadio usualmente sale del alimento emigrando a la superficie del frasco, iniciándose así el periodo de **pupación**. La pupación es una metamorfosis, es decir, un proceso de transformación a través del cual las estructuras larvarias se convierten en organismos adultos. Se inicia con la fase prepupal, en donde las larvas del tercer estadio se ubican en un lugar seco de las paredes del frasco, donde permanecen inmóviles; su cubierta es semisuave, tornándose dura poco a poco. Esta transformación de larva a pupa ocurre primero en la región cabeza-torax y luego se da en el abdomen. En el periodo pupal el individuo tiene una forma de alpiste y una cubierta de color café. La cutícula pupal es producida cuando la epidermis es un mosaico de células larvarias y epidermales, ambas secretan la cutícula pupal. La parte anterior es producida por discos imaginales, mientras que la parte posterior es producida básicamente por células larvarias con una pequeña contribución de los histoblastos abdominales y el disco genital. La cutícula se separa de la parte superior del organismo por medio de una contracción del mismo, lo que deja una brecha entre la cutícula y pupa, proceso conocido como apólisis. Subsecuentemente ocurre un oscurecimiento de la piel comenzando por la cabeza y recorriéndose al abdomen. Este proceso se inicia 4 horas después de la formación de la prepupa, técnicamente es ya una pupa. La pupa aún tiene la forma de larva hasta 12 horas después de la formación de la pupa; dándose un proceso de cataclismo, contracción muscular que dura unos segundos y la cabeza es invaginada. La pupa criptocefálica se transforma en panerocefálica. La apólisis de pupa a adulto ocurre en un periodo que abarca hasta las 24 horas una vez iniciada la pupación. Durante la pupación los discos imaginales llevan a cabo la morfogénesis en respuesta a la hormona esteroide (20-hidroxicidiesona) las células se diferencian en las estructuras del adulto. A la mitad del periodo pupal las células producen los organelos fotosensitivos (Rivas 1996; Ramos 1993).

Es importante hacer notar que las larvas se encuentran constituidas por dos linajes celulares diferentes: las **células larvarias** y las **imagales**. Las células larvarias constituyen el cuerpo de la larva, estas han perdido la capacidad de división y solo aumentan su volumen; en algunas se encuentran cromosomas politénicos, son poliploides y están determinadas y diferenciadas genéticamente.



Figural. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, mostrando cada una de las diferentes etapas de su desarrollo, huevo, larvas en estadios I-II-III, pupa y adultos, distinguiendo morfológicamente machos (derecha) y hembras (izquierda).

Las segundas no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva y se distinguen de las primeras por ser de tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, mantienen la capacidad de división celular, están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva entra en metamorfosis; estas células se localizan en estructuras características denominadas **discos imaginales**, los cuales son primordios celulares que incrementan su tamaño al multiplicarse el número de células mediante divisiones mitóticas que ocurren en momentos específicos del desarrollo larvario. Se encuentran siete discos imaginales, que son: labial, antenas, ojo, patas, alas, halterios y genital, a partir de los cuales se formaran estas estructuras del adulto durante la metamorfosis en el estado de pupa (figura 2) (Ramos 1993).

El adulto emerge del caparazón pupal a través de una abertura realizada en la región anterior de la pupa. La mosca recién salida es muy larga con alas sin extender, lo cual hará pocos segundos después (60 seg.). El color de su cuerpo al principio es claro y va oscureciéndose paulatinamente. Para el manejo reproductivo de la mosca se requiere de una identificación morfológica confiable para distinguir entre ambos sexos, esto se logra ya que se cuentan con características morfológicas propias para hembras y machos. Cabe hacer mención de que las moscas recién eclosionadas o con menos de doce horas de edad no están aún pigmentadas, son de color gris claro, lo que facilita su detección a simple vista en un frasco de cultivo (Rivas, 1996).

CUADRO 10. Muestra las características para el reconocimiento del sexo en moscas adultas.

	HEMBRA	MACHO
Terminación del abdomen	En punta	Redondeado
Número de segmentos abdominales.	Siete	Cinco
Peine sexual en patas delanteras.	No posee	Si posee
Tamaño corporal.	Mayor	Menor
Placa anal.	Si posee	Si posee
Placa vaginal.	Si posee	No posee

(Rivas, 1996)

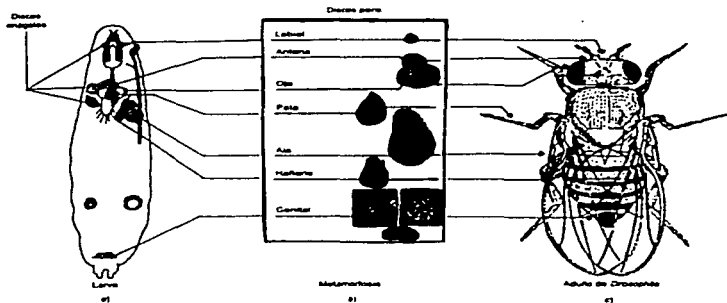


Figura 2. Discos imagales en la larva que darán origen a las estructuras del adulto durante la metamorfosis.

2.4.2 Importancia de *Drosophila melanogaster* como sistema de prueba de mutagenos químicos.

En la última década se ha notado una gran actividad en el campo de la mutagénesis química, derivada del desarrollo de técnicas que permiten medir el efecto de estos mutágenos en animales de experimentación. Paralelamente a este resurgimiento de la actividad, se encontró que algunos sistemas generalmente considerados como irrelevantes para el hombre, tales como los microorganismos y *Drosophila*, ofrecían mayor potencial de detección que el que se les había reconocido con anterioridad.

Drosophila ofrece muchas ventajas en el estudio y detección de los agentes mutagénicos del ambiente: es un organismo superior con tiempo de generación corto, fácil de criar en gran número, de mantenimiento económico y detecta mutágenos que actúan directa e indirectamente *in vivo*. Actualmente constituye el sistema animal más rápido y más eficiente, para detectar la inducción de mutaciones y aberraciones cromosómicas, por agentes del ambiente en células de la línea germinal, con la prueba de letales recesivos ligados al sexo (SLRL), y de la línea somática con la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART).

CAPITULO 3

MATERIAL Y METODOS

3.1 FUNDAMENTO

La prueba de mutación y recombinación somática (SMART), en *Drosophila melanogaster* ha sido desarrollada para la detección rápida y barata de agentes genotóxicos en un ensayo in vivo que utiliza células somáticas de un eucarionte superior. Esta prueba se basa en el principio de que la pérdida de heterocigocidad de genes marcadores adecuados en células de los discos imagales en las larvas (o sea que la pérdida del alelo dominante permita la expresión del alelo recesivo), puede conducir a la formación de clones mutantes, los cuales se expresan fenotípicamente como manchas en la cutícula de las alas de moscas adultas; con este propósito, se realizan cruces con moscas portadoras de mutaciones recesivas para producir la progenie heterocigótica para los marcadores (Centro de Ciencias de la Atmósfera, suplemento 1, 1994)

Las estructuras que se emplean como blanco son los discos imagales, estos se presentan en la larva como pequeños sacos, posteriormente las células contenidas en ellos formarán las estructuras del adulto pero no se diferenciarán sino hasta que el organismo entra en metamorfosis, mientras esto ocurre, los discos imagales crecen por divisiones mitóticas a lo largo de los tres estadios por los que debe pasar la larva hasta convertirse en prepupa. En ciertos discos, como el mesotorácico dorsal, la última división mitótica ocurre 24 horas después de formado el pupario, el siguiente paso es la diferenciación celular (metamorfosis), durante la cual toman forma las estructuras del imago o adulto (García-Bellido y Merriam, 1971). Si durante este proceso sufre alguna alteración heredable en cualquiera de las células imagales, esta dará origen a una estirpe celular con la misma característica alterada, originando así un clon que podrá observarse como una mancha en la estructura imagal correspondiente si se emplean los marcadores fenotípicos adecuados (Graf, 1984).

Este bioensayo requiere únicamente de una generación para la obtención de resultados, detecta diversos eventos genéticos como mutacionales (mutación puntual, delección y tipos específicos de translocaciones), así como también por recombinación mitótica, es sensible a un amplio espectro de agentes genotóxicos que pertenecen a diferentes clases de sustancias químicas ya sean de acción directa y/o indirecta. También puede evaluar antigenotoxicidad de agentes específicos o de mezclas (Graf, 1984; Graf, 1992; Centro de Ciencias de la Atmósfera, 1994; Agurrezabalaga et al., 1994).

3.2 DESCRIPCIÓN DE MARCADORES.

Se utilizaron larvas **flr3 +/+ mwh** de 72 ± 4 h. de edad; las cuales se obtuvieron de la cruz progenitora denominada cruz estándar (Graf, 1984): hembras **flr3/TM3.BdS** con machos **mwh/mwh**.

El marcador "flr3" (pelos en forma de flama), **flr3/TM3.BdS**, se localiza a 39 unidades de mapa en el cromosoma 3; es letal en condición homocigótica en células germinales, pero puede expresarse en las somáticas produciendo tricomas en

forma irregular en el tórax, abdomen y alas, por lo que se les da la designación de flama. Para el mantenimiento de esta línea se usa el cromosoma balanceador **TM3.Bals**, el cual presenta una inversión pericéntrica, abarcando gran parte del cromosoma 3 y que no permite recobrar eventos de recombinación, para distinguir a las moscas portadoras del cromosoma balanceador se utiliza el marcador "Serratia" (**Ser**), un gen letal dominante que se distingue fácilmente porque produce indentaciones en el borde distal de las alas, de esta manera, las únicas moscas que sobreviven son las heterocigóticas para flr3, y para Ser, por lo que se tiene un sistema de letales balanceados (Graf,1984).

El marcador **mwls**, pelos múltiples en el ala, se localiza en el cromosoma 3 a 0.0 unidades de mapa; y se manifiesta fenotípicamente porque altera el número de tricomas por célula en las alas del adulto, produciendo múltiples tricomas, en lugar de uno como ocurre en el fenotipo silvestre (Graf,1984; Graf and van Schaik, 1992).

3.3 PROPAGACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS.

La propagación de las líneas tiene como finalidad la de permitir la obtención de hembras y de machos adecuados para la realización de las cruza requeridas en la prueba. Para la propagación se colocaron de 30 a 40 parejas de moscas en cada frasco, con medio de cultivo fresco, teniendo cuidado de que las moscas eterizadas al ser vaciadas quedaran pegadas en el medio. Cada frasco se etiquetó anotando el o los marcadores de la línea y la fecha de la siembra. Después de 5 días de realizada la siembra se procedió a retirar a los progenitores de los frascos con la finalidad de evitar que se confundieran con la descendencia. Los individuos obtenidos de esta manera se transfirieron a medio de cultivo fresco cada 15 días. Las líneas se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura a 25°C y a 60% de humedad relativa. Para la propagación y mantenimiento de las líneas el medio de cultivo se realizó de la siguiente manera:

Se utilizaron dos gomas, gelamix y liangel, que pertenecen al grupo de las carrageninas por observarse que no afectan el crecimiento de las moscas hecho que permitió reducir en mas del 50% el costo de los insumos.

Ingredientes y procedimiento:

- 1250 ml de agua
- 7.6 g de gelamix
- 2.4 g de liangel
- 70 g de azúcar
- 112 g de harina de maíz
- 55 g de levadura de cerveza seca
- 0.4 g de nipagin simple (fungicida)
- 4 ml de ácido propiónico (bactericida)

Se mezcla el gelamix y el liangel (gomas con el azúcar en 870 ml de agua para que se disuelvan, el otro recipiente se disuelve la harina y la levadura en 380 ml de

agua. El agua con las gomas se dejó hasta ebullición, moviéndose constantemente para que se disolvieran completamente. Después se añadió el nipagin simple y la mezcla de harina y levadura; se dejó cocer durante 10 min. se retiró del fuego y se agregó el ácido propiónico. Por último se sirvió en frascos lecheros limpios y secos de 250 ml de capacidad, aproximadamente (Baez,1996).

3.4 MEDIO PARA COLECTA DE HUEVOS

Este se empleó para coleccionar los huevos y permitir el crecimiento adecuado de las larvas que se usaron para los distintos tratamientos. En frascos con capacidad de 250 ml se preparó una base sólida de gelamix y liangel, que se elaboró como se describe a continuación: se mezclaron en frío las gomas con agua, después, se pusieron al fuego durante 10 min para que se disolvieran, se vaciaron en los frascos, se taparon con plástico adherente y se guardaron en el refrigerador. Una vez solidificada la goma, a los frascos se les agregó una capa espesa de aproximadamente 2 cm de levadura fresca enriquecida con azúcar, se taparon con una gasa y se dejaron secar a temperatura ambiente (Baez,1996).

3.5 OBTENCIÓN DE LARVAS

En estos frascos se colocaron las moscas progenitoras para la ovoposición durante 8 h con el fin de obtener individuos con poca variación en la edad (72 +/- 4 h). Posteriormente los frascos se lavaron con agua corriente para reblandecer y desprender el medio adherido, las larvas se obtuvieron por filtración al ser atrapadas en un colador de malla fina, para ser colocadas después en los viales con el medio tratado para el experimento (Baez 1996).

3.6 ENSAYO PARA INDUCIR LA MUTACIÓN EN EL SISTEMA BIOLÓGICO.

1) COMPUESTO QUÍMICO

La sustancia, el fiponil, se obtuvo del producto comercial Frontline spray al 0.25%, producido por los laboratorios Rhone Merieux.

2) PRUEBAS DE SOLUBILIDAD Y TOXICIDAD PARA EL FIPRONIL

El principio activo en esta presentación se acompaña de isopropanol e ingredientes inertes. Se tomó un volumen conocido de la sustancia (1 ml), y se colocó en un vaso de precipitado de 5 ml y se dejó a temperatura ambiente con el fin de que se evaporara el solvente, asumiéndose que el residuo resultante sería el principio activo, el cual se presentó como cristales transparentes adheridos a las paredes del vaso, se intentó resuspendirlo en agua y los cristales se precipitaron en este solvente. Se repitió el mismo procedimiento probando con etanol, adicionando 1 ml de este al residuo seco, observándose que los cristales se disolvieron por completo en él. Posteriormente se realizaron diluciones del producto iniciando con 100, 75, 50, 25 y 10 ppm, reduciéndolas gradualmente, exponiendo a larvas de

tercer estadio, utilizando 2 tubos por concentración adicionando aproximadamente 50 larvas por tubo, agregando 0.3 g de medio instantaneo Carolina más 1 ml de la solución observando su desarrollo a las diferentes concentraciones hasta obtener adultos vivos que permitieran llevar a cabo la prueba.

3) TRATAMIENTOS A LARVAS DE 72 HORAS DE EDAD

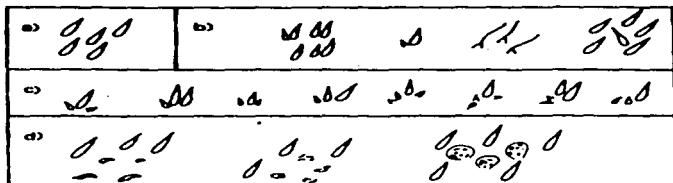
Para dar los tratamientos se utilizaron tubos de ensayo de 10 cm de altura por 1 cm de diámetro, dos por cada concentración, en los cuales se agregó 0.3 g de medio instantáneo para *Drosophila*, marca Carolina, fórmula 4-24, y se hidrataron con 1 ml de las concentraciones del insecticida, agregando alrededor de 50 larvas de cada una de las cruza tapándolos con torundas de algodón.

El compuesto se administró por vía oral durante 48 horas a larvas de 72 horas de edad, en diferentes concentraciones, 1, .5, y .1 $\times 10^{-2}$. Al grupo control negativo se suministró agua destilada más etanol al 5% y como positivo N-nitrosopyrrolidina (NNP) a 10 mM, molécula obtenida por nitrosación de aminas secundarias, con fórmula molecular $C_4H_8N_2O$ la cual se utiliza solamente como reactivo ya que se ha comprobado que es altamente carcinogénico y mutagénico en animales de laboratorio pero probablemente también en humanos. Cada experimento se realizó por triplicado. Una vez que eclosionaron las moscas de cada uno de los tratamientos, se procedió a conservarlas en viales con alcohol al 70%, indicando en cada uno la fecha de tratamiento, la crusa y la concentración respectiva con la finalidad de elaborar preparaciones permanentes de las alas, las moscas fueron separadas por sexo y enjuagadas con agua destilada, para después ser embebidas en una gota de solución Fauré, esta solución puede ser diluida con agua destilada. Posteriormente, con ayuda de un microscopio de disección, las alas se diseccionan del cuerpo utilizando pinzas de relojero del número 5, tomando con una pinza el cuerpo de la mosca y con otra la parte proximal del ala procediendo a adherirla sobre un portaobjetos limpio de manera que se coloquen cuatro hileras horizontales de diez alas cada una para su posterior análisis. Teniendo cuidado de mantener una atmósfera libre de polvo (dentro de una caja de petri) se les deja 24 h para que queden firmemente adheridas al portaobjetos. Pasado este tiempo se pone una gota de solución Faure en el cubreobjetos colocando este sobre las alas evitando que queden burbujas de aire entre ellas. Sobre el cubreobjetos se colocan pesas (aproximadamente 200g) y se deja así por 24 h mientras que la preparación se seca y endurece. Para finalizar con la preparación se limpia el excedente de solución de los bordes con agua y se sella el cubreobjetos con una capa de barniz para uñas.

4) LECTURA Y ORGANIZACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las alas tanto la superficie dorsal como la ventral son analizadas en un microscopio compuesto con un aumento de 40X. Las alas están formadas por dos monocapas celulares de tejido epitelial, superficies dorsal y ventral, ambas se

desarrollan independientemente una de la otra por lo que deben ser analizadas ambas superficies. Debido a que el origen de los tricomas es diferente al de las setas, estas últimas no se consideran para el análisis de los efectos.



CUADRO 11. Tipos de pelos de acuerdo al fenotipo expresado, a) Normal, b) No se cuentan, c) Pelos múltiples, mwh y d) Pelos en forma de flama, flr.

La localización de las manchas es registrado de acuerdo al sector del ala en el cual se hallan, al número de células que las componen y al fenotipo que presentan, pudiendo ser: mwh, flr3, o ambas (mwh/flr3). Para este propósito solamente se examina la región distal del ala para el conteo de las manchas, el cual se subdivide en siete sectores: A, B, C, C', D' y E, (figura 3) de acuerdo con García Bellido y Merriam (1971) y Graf et al. (1984).

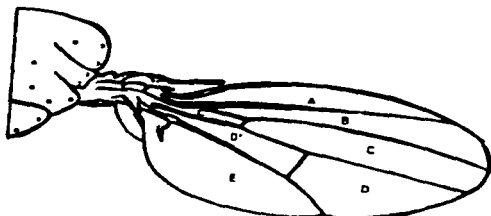


Figura 3. Regiones del ala para la lectura de las manchas

Las manchas se clasifican en tres tipos: Manchas simples pequeñas (1 a 2 células), manchas simples grandes (3 o más células) y manchas gemelas (mwh y flr3). De toda la población que se obtienen en el tratamiento sólo se analizan las

moscas transheterocigóticas, es decir aquellas en que los marcadores "mwh" y "flr3", se encuentran en tal forma que: uno de los cromosomas homólogos porta el alelo silvestre para "mwh" y el recesivo para "flr3", mientras que el otro homólogo porta el mutante "mwh" y el silvestre de flr3" (figura 4).

3.7 BASES GENÉTICAS DE LOS EVENTOS DETECTADOS.

Este ensayo consiste en la exposición de un mutagénico a un grupo de células destinadas a multiplicar una configuración genética relativamente fija, para que al inducirse una mutación en una de las células expuestas le permita al clon ser detectado. Para asegurar que el clon sea detectable, se eligen marcadores genéticos que se expresen autónomamente en la superficie de las alas de la mosca adulta. En estos experimentos se exponen a las células de los discos imagales para las alas en la larva, estas son trans-heterocigóticas para los dos marcadores recesivos localizados ambos en el brazo izquierdo del cromosoma 3. Pelos múltiples en el ala (mwh), en la posición 0.0 y pelos en forma de flama (flr), en la 39.0, mientras que el centrómero está localizado en la posición 47.7. En general, en las series experimentales analizadas, la ocurrencia de varios tipos de manchas es de la siguiente manera: manchas simples que expresan el fenotipo mwh son las más frecuentes, mientras que las manchas gemelas son las menos frecuentes mostrando los subclones mwh y flr, y bastante raras son las manchas simples con el fenotipo flr. Existen varios mecanismos genéticos que conducen a la expresión de clones. Una posibilidad importante es la recombinación mitótica, que se lleva a cabo entre dos cromátidas no hermanas. Se esperan manchas gemelas si la recombinación ocurre entre flr y el centrómero y si a esto le sigue un tipo "X" de segregación cada célula hija recibirá un cromosoma recombinado y uno no recombinado. Un evento de recombinación entre mwh y flr puede dar como resultado una mancha simple mwh. Si ambos tipos de eventos recombinantes (uno entre flr y el centrómero y otro entre mwh y flr) ocurren en la misma célula, una mancha simple flr puede resultar (figura 5) (Graf, 1984).

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos testigo y tratado, se compara la frecuencia de manchas de cada lote mediante el programa de computo SMART y el procedimiento de decisión múltiple de Frej y Wurgler (1988). Este procedimiento implica el contrastar dos hipótesis distintas y se realiza comparando las frecuencias observadas en los grupos tratados con respecto a los testigos.

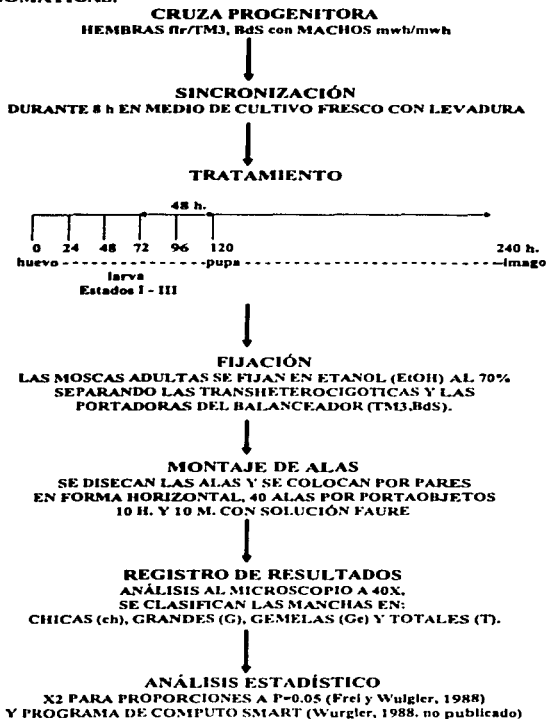
La hipótesis nula (H_0), estipula que no existe diferencia entre la frecuencia de mutación de las series testigo y tratadas; por esta razón, su aceptación indica que el tratamiento no altera la frecuencia de mutación basal. La hipótesis alternativa (H_a), propone que el tratamiento incrementa m veces la frecuencia basal de mutación

respecto al testigo. Su rechazo indica que la frecuencia de mutación inducida no alcanza el incremento de frecuencia postulado (m), mientras que su aceptación señala un efecto positivo del tratamiento. El incremento propuesto m , indica el número de veces que debe aumentarse la frecuencia de mutación del lote testigo, $m = 2$ para manchas simples chicas y manchas totales, debido a que la frecuencia basal de este tipo de manchas es m s elevada y por lo tanto se requiere de una mayor inducción del daño para duplicar la basal; y $m = 5$ para manchas simples grandes y manchas gemelas, debido a que la frecuencia de estos eventos es muy baja, lo que significa un aumento de 5 veces la frecuencia basal para que se obtenga un resultado positivo; todos los análisis se realizan con una probabilidad de error igual o menor a 0.05 ($P=0.05$) (Frei and Wurgler, 1995).

En resumen, los resultados que pueden obtenerse del análisis son los siguientes:

- 1) **Negativo (-).** Si se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.
- 2) **Positivo (+).** Si se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

3.9 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS.



(Pacz 1996)

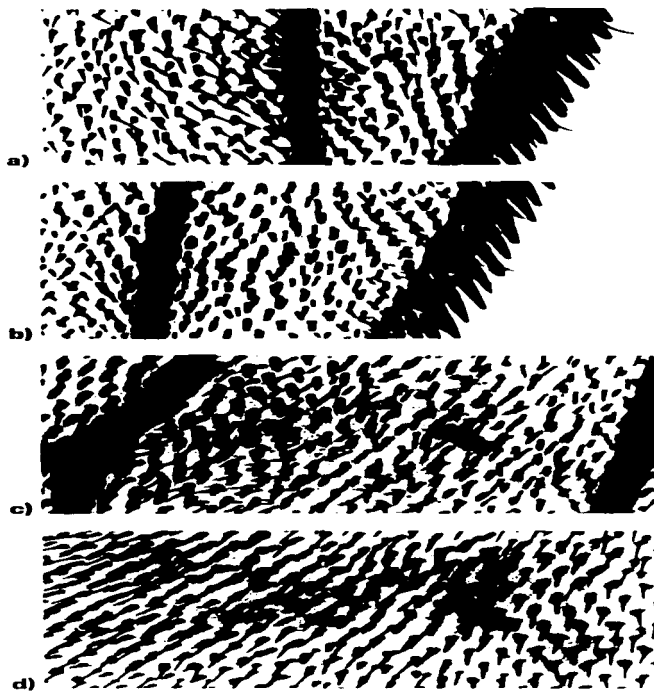


Figura 4. Se observan varios tipos de manchas: a) mancha simple tipo mwh, b) mancha simple grande mwh, c) mancha doble con expresión de flr parte superior y mwh en la parte inferior y d) mancha simple flr, al centro de la foto.

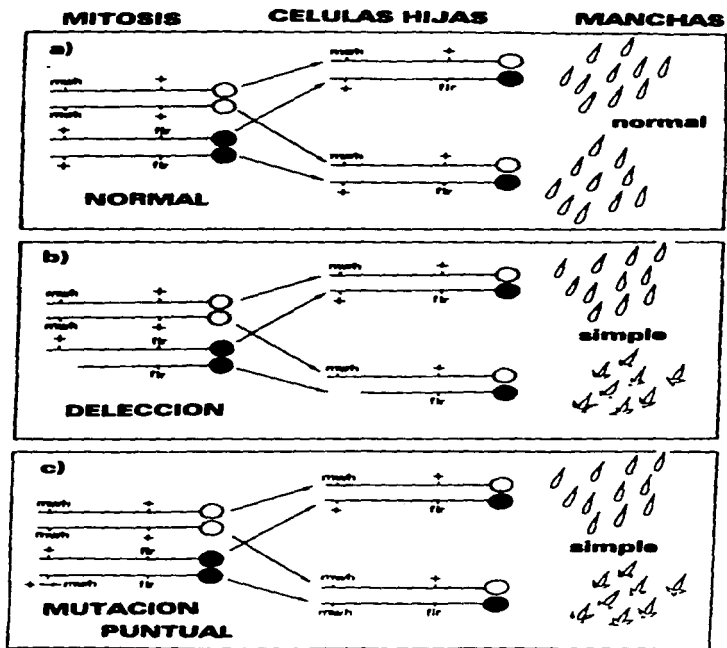


Figura 5. Algunos eventos genéticos detectados con la prueba SMART. a) distribución normal de las cromátidas, mostrando pelos normales tipo silvestre, b) delección que permite la expresión de manchas mwh, c) mutación puntual que da origen a una mancha simple mwh.

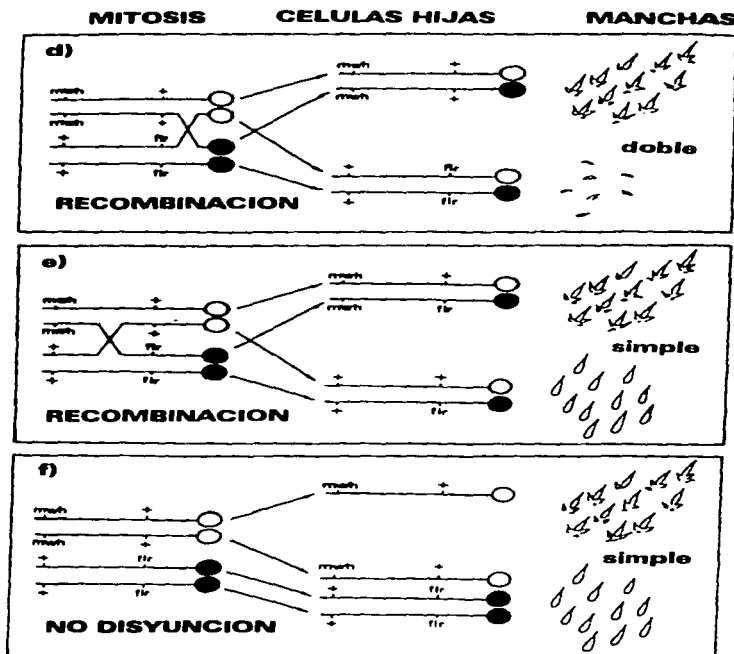


Figura 5 (continuación). d) recombinación que da como resultado la expresión de una mancha doble con los fenotipos *flr* y *mwh*, e) recombinación que sólo expresa manchas simples tipo *mwh*, f) no disyunción, separación del cromosoma de su homólogo dando como resultado una mancha simple *mwh*.

CAPITULO 4

RESULTADOS

La siguiente **tabla I**, muestra la frecuencia de manchas totales obtenida de la exposición al fipronil, para su comparación en dos cruza, de alta capacidad metabólica (AB) y la cruz a estándar (E), se puede observar la distribución en la **gráfica I**.

TABLA I. FRECUENCIAS DE MANCHAS OBTENIDAS EN DOS CRUZAS E. Y AB.

Frecuencia de manchas totales	Agua + 5% Etanol	Fipronil 0.01 ppm	Fipronil 0.005 ppm	Fipronil 0.001 ppm	NNP 10mM
Cruza AB	0.3	0.46	0.39	0.37	5.48
Cruza E	0.3	0.09	0.44	0.29	2.06

Los resultados del ensayo de manchas en el ala con *Drosophila*, para la evaluación genotóxica del fipronil, en la cruz a estándar (E) se muestran resumidos en la **tabla II**, obtenidos con el programa de cómputo SMART.

TABLA II. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL FIPRONIL EN *Drosophila* CON LA PRUEBA DE MANCHA EN EL ALA, CRUZA ESTÁNDAR

Com- pues- to	Núme- ro de alas	Manchas por ala (Número de manchas)			Anal. Estad.	* Manchas con el clon de mw h	Valor de medio de ciclos	Frecuencia de formación clonal
Conc. (ppm)		Manchas simples pequeñas (1-2 células)	Manchas simples grandes (>2 células)	Manchas gémelas	Total de manchas		de divi- sión	ob- ser- vado corre- gido
		<i>m</i> = 2	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 2			
Control Negativo (Agua + 5% etanol)	120	0.24 (29)	0.03 (3)	0.00 (0)	0.27 (32)	32	1.66	1.1
Control Positivo (NNP)	120	1.76 (211)	0.43 (52)	0.10 (12)	2.29 (275)	272	1.85	9.3
Fipronil 0.01	120	0.21 (25)	0.06 (7)	0.02 (2)	0.28 (34)	33	1.73	1.1
Fipronil 0.005	120	0.31 (37)	0.12 (14)	0.03 (4)	0.46 (55)	54	2.43	1.8
Fipronil 0.001	120	0.27 (32)	0.03 (3)	0.00 (0)	0.29 (35)	35	1.49	1.2

* Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Wuergler (Mutation Res. 203 (1988) 297-308) + = positivo, - = negativo, d = débil positivo, i = indéciso. *m* = factor de multiplicación niveles de probabilidad: alpha = beta = 0.05.

Se analizaron 120 alas en cada uno de los grupos, para conservar un tamaño de muestra constante en cada uno de ellos. En el control positivo, N-Nitrosopirrolidina, se observa que la inducción de manchas incrementa m veces su frecuencia en cada uno de los parámetros de manchas por ala en relación al control negativo, solución al 5% de etanol.

En el caso del sipronil para las concentraciones de 0.01 y 0.001 se aprecia un comportamiento similar, donde la frecuencia de manchas totales es negativa. Las manchas gemelas se deben a eventos de recombinación únicamente, y presentan en todas las concentraciones frecuencias muy bajas. Para la concentración de 0.005 la frecuencia de manchas simples pequeñas es negativa, mientras que para las manchas simples grandes y totales es positiva, lo que quiere decir que indujo por eventos mutacionales una frecuencia de manchas mayor que la observada en el testigo negativo.

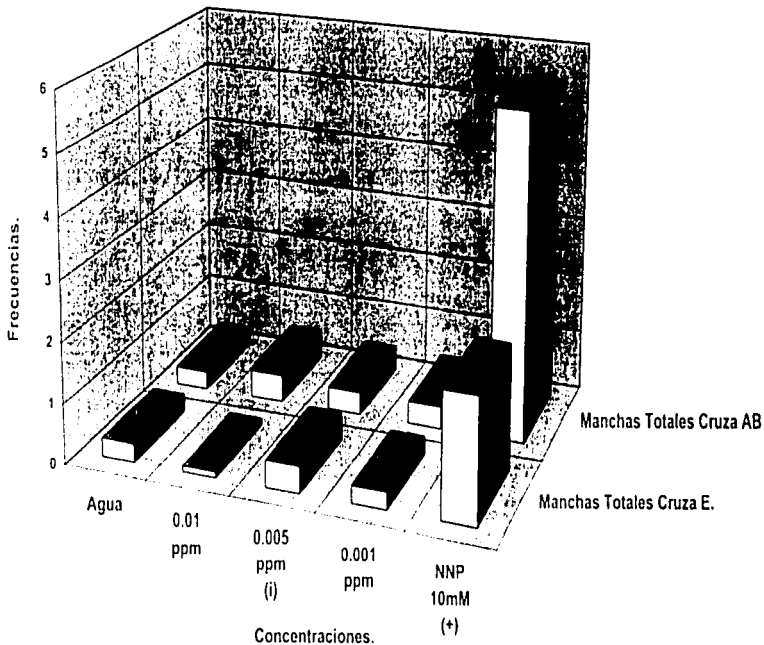
En la **gráfica II** se observa comparativamente el comportamiento de los tratamientos en relación al control negativo, en base a los datos arrojados por el programa SMART (Frei y Wuergler 1988).

En la **tabla III**, se encuentran las frecuencias de manchas simples por el tamaño de la mancha por concentración, y la **gráfica III**, muestra la distribución de frecuencias de manchas simples en relación al tamaño de clase clonal, donde se observa la inducción de manchas por concentración, lo cual nos permite evaluar el nivel y la amplitud de estas.

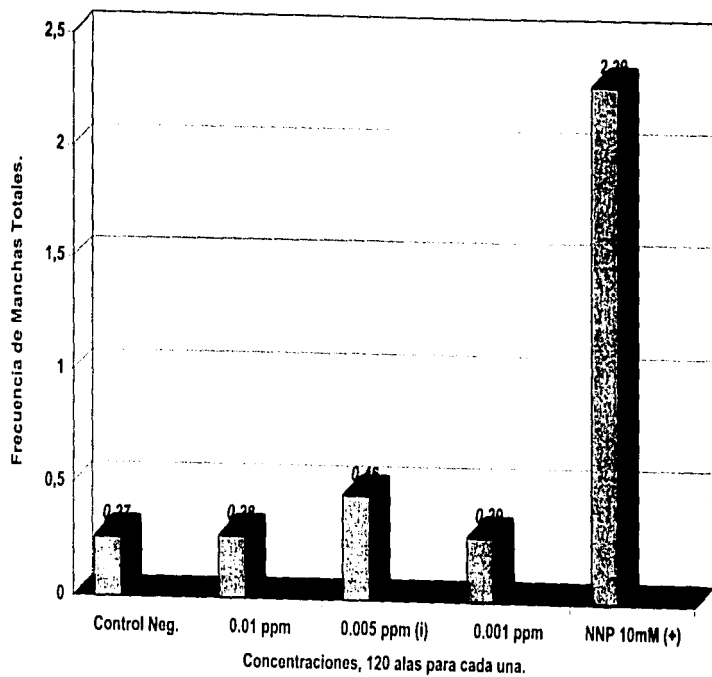
TABLA III. FRECUENCIA DE MANCHAS SIMPLES POR TAMAÑO DE CLASE CLONAL

Tamaño de clase clonal	1	2	3 a 4	5 a 8	9 a 16	17 a 32	33 a 64	a 128	a 256	>256
Agua	0.175	0.067	0.008	0.008	0	0	0	0	0.008	0
0.01 ppm	0.15	0.058	0.033	0.017	0.008	0	0	0	0	0
0.005 ppm	0.217	0.092	0.033	0.017	0.017	0.033	0.008	0.008	0	0
0.001 ppm	0.2	0.067	0.008	0.008	0.008	0	0	0	0	0
NNP 10mM	1.158	0.06	0.283	0.075	0.05	0.025	0	0	0	0

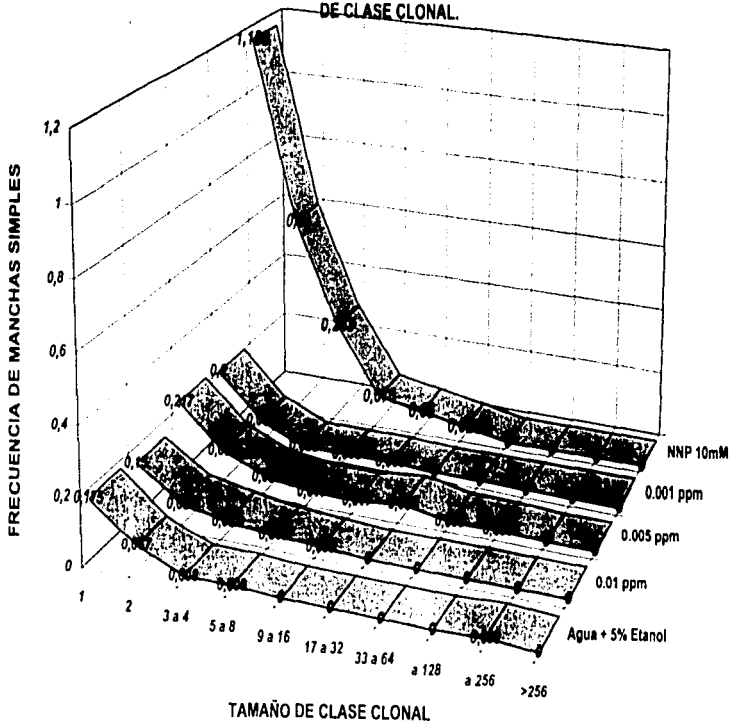
GRAFICA I. EVALUACION DEL FIPRONIL CON DOS CRUZAS, ESTANDAR Y DE ALTA BIOACTIVIDAD DE *Drosophila melanogaster*.



GRAFICA II. RESULTADOS DEL FIPRONIL OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE LA MANCHA DEL ALA, CON *Drosophila* CRUZA ESTANDAR.



GRAFICA III. DISTRIBUCION DE LAS FRECUENCIAS DE MANCHAS SIMPLES POR TAMAÑO DE CLASE CLONAL.



CAPITULO 5

DISCUSION

Efectos genotóxicos y citotóxicos de insecticidas de uso común

Para dar inicio a la discusión es necesario revisar el hecho de que no sólo en los aspectos relacionados con la toxicidad y la resistencia que han ofrecido los compuestos insecticidas hasta ahora se basa la inquietud de su estudio y análisis, aunado a lo anterior se suma el enorme interés, cada vez más creciente, a nivel mundial, por los efectos genotóxicos y citotóxicos que generan o pueden generar estos en los organismos vivos, pero principalmente en el hombre; para facilitar esta tarea, se cuenta actualmente con un gran número de ensayos que emplean a su vez una variedad muy grande de organismos de prueba.

Basta mencionar como ejemplo de esto algunos de los trabajos realizados por investigadores de todas partes del mundo sobre insecticidas de gran difusión y uso utilizando diversas pruebas como es el caso de **Patniak, et al.** (1992), quien evaluó la inducción de mutaciones con clorpirifos (Durnet), con la prueba de manchas en el ala en *Drosophila melanogaster* y en la prueba de letales recesivos ligados al sexo, encontrando que el compuesto es genotóxico tanto en células somáticas como en las germinales. **Miadokova, et al.** (1992), realizó la evaluación del efecto genotóxico de la supercipermetrina, piretroide de segunda generación, en cuatro diferentes sistemas de prueba; en *Salmonella thymiparium* induce conversión de genes en el locus del triptofano e induce mutaciones puntuales en el locus de isoleucina, en *Saccharomyces cerevisiae*; un débil aumento en la frecuencia de anafases aberrantes y telofases en raíces de *Hordeum vulgare* y *Vicia faba*, pero no se detectaron efectos genotóxicos en *Drosophila melanogaster*. **Jena, et al.** (1994), utilizó el ensayo de aberración cromosómica (CA) para la evaluación de un organofosforado, el asataf. El cual indujo significativamente aberraciones a 50 mg/kg después de 24 hrs. de exposición, en un sistema *in vivo* en pollos. A dosis de 25, 50 y 100 mg/kg a 6, 24 y 48 hrs de exposición respectivamente, indujo un incremento significativo de micronúcleos en células de médula ósea y eritrocitos periféricos. **Vijayaraghavan, et al.** (1994), evaluó el efecto genotóxico y citotóxico de los pesticidas metilparatión, bailetón e hisonan, con sistemas de prueba en mamíferos; la frecuencia de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en células de la médula y el perfil de la enzima arginasa en el hígado tiende a mostrar genotoxicidad de organofosforados y de organoclorados en el estudio de respuesta a exposición simple. El metilparatión fue el más peligroso de los tres, mostrando una definida patología en el hígado de ratas tratadas. **Surrallés, et al.** (1995), encontró que los insecticidas piretroides: cipermetrina, deltametrina, fenpropatrina, fenvalerato y permetrina inducen efectos citotóxicos al ser sometidos a la prueba de Whole-Blood y a cultivos de linfocitos humanos para estimar la inducción de micronúcleos a concentraciones de 3 a 6 mg/ml, siendo la permetrina quien presentó resultados negativos aunque aumentó la frecuencia de micronúcleos en linfocitos a 6

mg/ml; los resultados indican que los insecticidas piretroides tienen una débil (cipermetrina, deltametrina y fenpropatrina) o nula (fenvalerato y permetrina) actividad genotóxica *in vitro*, lo cual concuerda con lo encontrado por Pardo, *et al.*, sólo que la evaluación fue hecha utilizando a *Drosophila melanogaster* como bioensayo. Barrueco, *et al.* (1994), probó la habilidad de la permetrina para inducir aberraciones cromosómicas (CA) en cultivos de linfocitos humanos y en células del ovario de hámster chino (CHO), para comparar su efecto clastogénico, es decir la capacidad del compuesto para producir rupturas en los cromosomas, y comparar la respuesta en dos tipos celulares diferentes. En linfocitos humanos se probó en un rango de 50 a 200 µg/ml y en células CHO de 20 a 100 µg/ml. Ambos se realizaron en presencia y ausencia del sistema de activación S9 mix, de hígado de rata. La permetrina puede ser caracterizada como un agente clastogénico S-fase dependiente; mostrando ambos sistemas la misma sensibilidad para detectar clastogenicidad *in vivo*. Dianovsky, *et al.* (1995), probó la habilidad clastogénica *in vivo* de la supermetrina en el análisis cromosómico de células de médula ósea de ovino después de seis semanas de administración oral de 200 mg/kg o 300 mg/kg. Se investigó la inducción de intercambios en cromátidas hermanas sin encontrarse efectos genotóxicos, por lo que este piretroide fue clasificado como tóxico más que como clastogénico o genotóxico.

Toxicidad del fipronil y mecanismos de resistencia.

Los resultados obtenidos en la prueba de mutación y recombinación somáticas para el fipronil, permiten recobrar diferentes aspectos para una evaluación más completa sobre su comportamiento biológico.

En primer término, en base a las pruebas de toxicidad realizadas con el insecticida, se obtuvo que esta es muy elevada. Esto se observa claramente en las concentraciones utilizadas que permitieron recuperar a los adultos vivos 0.01, 0.005, y 0.001 ppm, estas se encuentran drásticamente muy por debajo de la concentración contenida en el producto comercial (solución al 25%). Lo anterior se explica en base al sistema que se utilizó para la evaluación del compuesto, ya que el organismo de prueba en este queda incluido en el grupo para el cual fue diseñado el fipronil, los insectos. La molécula de este compuesto tiene una gran especificidad por su sitio de acción, el ácido gama amino butírico (GABA), que en el caso particular de los insectos es un importante modulador de los impulsos nerviosos al regular el flujo del ion cloro en la membrana celular. Tal aspecto es de suma importancia para el control no solo de ectoparasitosis, sino también de insectos plaga en general debido a su alta efectividad, limitando así la posibilidad de sobrevivencia del insecto ante su aplicación reduciendo de esta forma la posible aparición y desarrollo de cepas resistentes, lo cual constituye el segundo aspecto de importancia que se recobra del fipronil.

Es importante considerar que este último aspecto es valido siempre y cuando se mantenga la concentración adecuada y de manera constante sobre la superficie tratada, dado que algunos reportes indican lapsos de efectividad del fipronil de hasta tres meses. En el caso de control del pulgas, no se debe perder de vista que el poder del compuesto va disminuyendo al paso del tiempo sin una nueva aplicación y es aquí donde podría generarse la aparición de una cepa resistente, sin olvidar tampoco que esta se desarrollaría no solo por la acción directa del fipronil, el cual es un fenilpirazol, sino por resistencia cruzada inducida por otros insecticidas, tal es el caso de los ciclodienos que también actúan sobre el GABA y que inducen resistencia para el JKU 0422 el cual es del grupo de los fenilpirazoles (Bloomquist 1994).

En lo referente al aspecto de la resistencia, **Feyerisen (1995)** del departamento de Entomología de la Universidad de Arizona, realizó una revisión de la biología molecular de la resistencia a insecticidas. El menciona que los mecanismos de resistencia se categorizan bioquímicamente y fisiológicamente en la insensibilidad del sitio de acción, incremento de la detoxificación metabólica y el secuestro o baja disponibilidad del tóxico. A nivel molecular puede deberse a : mutaciones puntuales en la subunidad del receptor del ácido gama amino butírico (insecticidas ciclodienos); mutaciones puntuales en las cercanías del sitio activo de la acetilcolinesterasa (resistencia a organofosforados y carbamatos); mutaciones ligadas genéticamente al gen del canal de sodio (organoclorados como el DDT y piretroides); y mutaciones no caracterizadas que aumentan la detoxificación por enzimas, tal es el caso del citocromo P-450 y la glutatión S-transferasa (por algunas clases de insecticidas)(Narahashi,1996). **Mutero, et al (1994)**, estudió el desarrollo de resistencia por modificación de la acetilcolinesterasa, punto de acción de organofosforados y carbamatos, encontrando cinco mutaciones puntuales que reducen la sensibilidad a los insecticidas en líneas resistentes de *Drosophila melanogaster*. Demostrando la adaptación del genoma eucariótico en un ambiente altamente selectivo. **French Constant, et al (1993)**, demostró por medio del monitoreo de la frecuencia de resistencia en líneas susceptibles de *Drosophila melanogaster* expuestas a ciclodienos, que la resistencia a estos compuestos es más común que a cualquier otro insecticida. Y por medio de la secuenciación y posterior clonación del gen responsable del GABA, regulador del ion cloro, se demostró que la simple sustitución de una base (alanina por serina), marca la diferencia entre susceptibilidad y resistencia en líneas de *Drosophila melanogaster*. **Thompson, et al (1993** ambos artículos), encontró similitud entre el gen causante de la resistencia a ciclodienos en el mosquito *Aedes aegypti* y en la mosca *Drosophila melanogaster*, observándose en esta última que la resistencia es causada también por la simple sustitución de un aminoácido (alanina por serina) en la configuración del GABA y que en el mosquito sucede lo mismo.

En cuanto a la participación del complejo P450 en la resistencia a insecticidas, **Waters (1995)**, realizó un proyecto para determinar los mecanismos moleculares del desarrollo de la resistencia a insecticidas dependiente del citocromo P-450 en *Drosophila melanogaster*. Se escogió este modelo biológico para la investigación, porque en esta mosca el P-450 involucrado en la resistencia ha sido identificado, purificado, se han producido anticuerpos monoclonales y se han aislado sus clones específicos en el DNA. Siendo el punto central de este trabajo la identificación del cambio en los genes que acompañan al incremento de la actividad transcripcional en organismos resistentes. Encontró que los clones genómicos de resistencia relacionados con P-450 y P-450-B1 pueden ser generados tanto por moscas sensibles y resistentes. Las diferencias estructurales entre los dos genes pueden ser determinadas por mapeo con enzimas de restricción y con secuenciación del DNA; además de determinar que la detoxificación metabólica de los insecticidas por las monooxigenasas del citocromo P-450 es el mejor mecanismo de resistencia contra los insecticidas, considerando que la expresión de estos genes no se limita a una sola forma, sino que se relacionan a múltiples mecanismos que pueden controlarla.

Genotoxicidad del fipronil.

Para el estudio del efecto genotóxico del fipronil, se realizó una prueba comparativa entre dos cruza (tabla y gráfica 1), la de alta capacidad metabólica (AB)(Graf and van Schaik, 1992), hembras ORR; flr3/TM3, Bds con machos mwh/mwh, que contiene el gen Oregon 1 y 2 que expresa una alta capacidad de detoxificación por contener altos niveles de citocromo P-450, y la cruz estándar (E), hembras flr3/TM3,Bds con machos mwh/mwh, con el propósito de observar el comportamiento del compuesto en ambas. Se observó que el incremento de manchas totales no fue significativamente diferente entre las dos cruza, razón por la que se decidió utilizar solamente la cruz estándar, sometiendo nuevamente al compuesto a la prueba con la finalidad de aumentar la población hasta alcanzar un número de alas para cada tratamiento de 120 para lograr de esta forma un tamaño de muestra óptimo e igual para cada uno de los grupos experimentales, para evitar con esto la posibilidad de obtener falsos positivos o negativos en el análisis estadístico (Frei y Wurgler 1988 y 1995).

Se puede apreciar en la tabla II y en la gráfica II, que el fipronil a las concentraciones de 0.01 y 0.001 ppm no indujo mutaciones de manera significativa de acuerdo a los resultados arrojados por el sistema de cómputo SMART de Frei y Wurgler (1988), manteniéndose al nivel del testigo negativo en manchas totales; en el caso de la concentración de 0.005 ppm, esta indujo un aumento de manchas simples grandes que rebasa lo requerido (m 5) para considerarse positiva con respecto al negativo, esto sin considerar la frecuencia tan baja de manchas gemelas debido a que estas sólo se obtienen por eventos de recombinación. Este resultado es

significativo en el sentido de que el compuesto llega a inducir un incremento en la frecuencia de estas manchas, lo que indica que aunque la concentración es muy baja sí actúa el compuesto sobre el material genético.

En la gráfica III, en la cual se observa la distribución de frecuencias por tamaño de clase clonal, se aprecia que a 0.005 ppm se presentan manchas de hasta 120 clones, apreciándose de esta forma la gran amplitud de manchas que induce el compuesto a esta concentración, y en el caso de manchas chicas estas se presentan en una frecuencia mucho más elevada que en las concentraciones 0.01 y 0.001 ppm. Lo anterior indica que de aumentar la población expuesta a 0.005 ppm de fipronil, la extensión de los clones probablemente aumentaría, mostrando de esta forma un efecto mucho más evidente en el comportamiento de las concentraciones del compuesto.

El fipronil ha demostrado ser sumamente tóxico para los insectos y la concentración en la cual se observó el efecto genotóxico es demasiado baja, misma que en situaciones de campo difícilmente se podría encontrar por ser el compuesto insoluble en agua. Por lo que antes de actuar sobre el material genético del insecto y causar algún trastorno ya sea somático y/o heredable o llegar a inducir resistencia por alguno de los mecanismos descritos por Feyerisen (1995), causará la muerte del organismo. Por lo que la inducción de resistencia por la generación de mutaciones heredables debidas directamente del fipronil es poco probable, aunque la aparición de cepas con resistencia natural debidas o no a un uso inadecuado del producto como ha sucedido con otros insecticidas de uso común, pudieran presentarse con el paso del tiempo de acuerdo con lo explicado anteriormente.

Los resultados obtenidos en el ensayo de manchas en el ala pretende dar información respecto al comportamiento biológico de este fenilpirazol, y son una invitación a continuar con el análisis del compuesto, pues es necesario realizar pruebas en otros ensayos, como en *vicia faba*, *Salmonella*, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas e incluso en pequeños mamíferos, con la finalidad de tener un campo más amplio de la genotoxicidad que pudiera ser producida por el fipronil.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- 1. El compuesto parece ser genotóxico a la concentración de 0.005 ppm.**
- 2. El fipronil es altamente tóxico para los insectos a las concentraciones de 0.01, 0.005 y 0.001 ppm, cantidades muy inferiores a la contenida en la presentación comercial.**
- 3. No existe diferencia significativa con respecto al efecto mutagénico inducido en la línea estándar y la de alta capacidad metabólica.**

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirrezabalaga, I., Santamaria I., Comendador M.A. (1994): The w/w+ SMART is a useful tool for the evaluation of pesticides. *Mutagénesis* 9:341-6.
- Baez, T.L. (1996): Efecto genotóxico producido por los insecticidas carbámicos propoxur y lannate, en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tesis Biólogo Agropecuario, Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Barruco, C.; Herrera A., Caballo C. and De la Peña E. (1994): Induction of structural chromosome aberrations in human lymphocyte cultures and CHO cells by permethrin. *Ter-Car-and Mut* 14 (1), 31-38.
- Batiste A.M., Xamena N., Creus A. and Marcos R. (1995): Genotoxicity testing of five compounds in three *Drosophila* short-term somatic assays. *Mut-Res* 341:161- 67.
- Bloomquist, J.R. (1994): Cycloxiene resistance at the insect GABA receptor/chloride channel complex confers broad cross resistance to convulsants and experimental phenylpyrazole insecticides. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 26:69-79.
- Bloomquist, J.R. (1996): Ion channels as targets for insecticides. *Annual Review of Entomology*, 41, 163-190.
- Burris, E., Leonard B.R., Martin S.H., White C.A., Graves J.B., Shaw R. and Scott W.P. (1994): Fipronil: Evaluation of soil and foliar treatments for control of thrips, aphids, plant bugs and boll weevils. *Proc. Beltwide Cotton Conf.*, 2:838-44.
- Centro de Ciencias de la Atmósfera (1994): *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, UNAM, vol 10, supl. 1.
- Cole, L.M., Nicholson R.A. and Casida J.E. (1993): Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 46:1, 47-54.
- Colliot, F., Kukorowski K.A., Hawkins D.W. and Roberts D.A. (1992) : Fipronil: a new soil and foliar broad spectrum insecticide. *Proceedings, Brighton crop protection conference, pests and diseases, Brighton, november 23-26.*
- Cortinas, N.C. (1993): Regulación y gestión de productos químicos en México, enmarcados en el contexto internacional. Monografía, 1a. ed. SEDESOL, INE.
- Cremlyn (1995): *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*. UTEHA, Noriega editores, México.
- Curtis C.F. (1996): Use of 0.25% fipronil spray to treat sarcoptic mange in a litter of five week old puppies. *Veterinary Record*, 139: 2, 43-44.
- Delgado R.A., Ortiz M.R., Graf U., Villalobos P.R. and Gómez A.S. (1995): Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat-Res* 341:235-47.

- Dianovski, J. and Sivikova K. (1995): *In vivo* and *in vitro* cytogenetic effect of supermethrin. Biomed-Environ-Sci., Vol. 8, ISS. 4, 359-66.
- Feyerisen, R. (1995): Molecular biology of insecticide resistance. Toxicol. Lett.; 82/83. 1-6, 83-90.
- Ffrench-Constant R.H., Steichen J.C., Rocheleau T.A., Aronstein K. and Roush R.T. (1993): A single aminoacid substitution in a gamma aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90 (5), 1957-61.
- Frei H. and Wurgler F.E. (1988): Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. Mutat-Res 203:297-308.
- Frei H. and Wurgler (1995): Optimal experimental design and sample size for the estastistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. Mut-Res 334:247-58.
- García-Bellido A. and Merriam J.R. (1971): Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. Develop. Biol. 24, 61-87.
- Genchi C., Di Sacco B., Calderone A., Oldani G., Re Callegari M., Morelli M., Venco G. and Del Maso R. (1995): Efficacy of fipronil in a spray formulation (Frontline RM) in treating flea and tick infestations on dogs. Professione Veterinaria. No. 1 supplement, 19-22.
- Graf U., Wurgler F.E., Katz A.J., Frei H., Juon H., Hall C.B. and Kale P.G. (1984): Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ-Mutagen 6:153-88.
- Graf U. and Singer D. (1992): Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Contam. Ambient. 8:15-27.
- Graf U. and van Schaik N. (1992): Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mut-Res. 271, 59-67.
- Graf U. (1994): Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. Food Chem. Toxicol. 32:423-30.
- Hainzl, D. and Casida J.E. (1996): Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, ISS 23, 12764-7.
- Hardwood, J. (1987): Entomologia médica y veterinaria. Limusa.
- Hosie A.M., Baylis H.A., Buckingham S.D. and Sattelle D.B. (1995): Actions of the insecticide fipronil, on dieldrin-sensitive and resistant GABA receptors of *Drosophila melanogaster*. Br. J. Pharmacol; Vol. 115, ISS 6, 909-12.

- Humphreys, D.J. (1990): Toxicología veterinaria. Ed. Interamericana-McGraw-Hill, 3a. ed.
- Instituto de Investigaciones Biomédicas (1980): Manual de Métodos para la Identificación de Mutágenos y Carcinógenos Químicos y Ambientales, UNAM, vol 1.
- Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (1992): Curso de *Drosophila melanogaster*. Manual.
- Jeannin P. (1995): Fipronil: characteristics of a new insecticide. *Professione Veterinaria*. No. suplemento, 15-16.
- Jena G.B. and Bhunya S.P. (1994): Mutagenicity of an organophosphate insecticide acephate an *in vivo* study in chicks. *Mutagenesis*; Vol. 9, ISS 4, 3-19-24.
- Kale P.G., Petty B.T., Walker S., Ford J.B., Dehkordi N., Tarasia S., Tasie B.O., Kale R. and Sohni Y.R. (1995): Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture. *Environ-Mol-Mutagen* 25:148-53.
- Legator M. and Zimmering S. (1975). *Mutation Research* 29, 181-188 pp.
- Lindsley D.L. and Zimm G.G. (1992): The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, CA, 1133 pp.
- Marec F. and Gelbic I. (1994): High recombinagenic activities of tree antiviral agents, adenine derivatives, in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat-Res* 311:305-17.
- Miadokova E., Vlckova V., Duhova V. and Trebaticka M., Garajova L., Grolmus J., Podstavkova S. and Vlcek D. (1992): Effects of supercypermethrin, synthetic developmental pyrethroid, on four biological tests systems. *Mutat-Res, Genetic Toxicology Testing*. 280:3, 161-68.
- Mutero A., Pralavorio M., Bride J.M. and Fournier D. (1994): Resistance associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; Vol. 91, ISS 13, 5922-6.
- My J. (1994): Nine new insecticides and acaricides. *Cultivar-Paris*, No. 357, 57-58.
- Narahashi T. (1996): Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology & Toxicology*. 79 (1), 1-14.
- Paez S.Y. (1996): Calibración del protocolo para evaluar antimutágenos en la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster*. Lic. Biol. Fac. de Cien. UNAM, México.
- Pardo G.A., Creus A., Marcos R. and Xamena N. (1994): Estudio de la posible actividad genotóxica de tres insecticidas piretroides (deltametrina, fenpropatrina y permetrina) en *Drosophila melanogaster*. 3er. Congreso de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental. Resumen 276.
- Patniak K.K. and Tripathy N.K. (1992): Farm-grade chlorpyrifos (Durmex) is genotoxic in somatic end germ-line cells of *Drosophila*. *Mutation-Research, Genetic Toxicology Testing*. 279:1, 15-20.

- Pedigo P.L. (1989): Entomology and pest management. Ed. Macmillan publishing company, & ed., USA.
- Postal J.M. (1995): Efficacy of a 0.25% fipronil based formulation spray in the treatment and prevention of flea infestations of dogs and cats. *Professione Veterinaria*. No. 1, supplement, 1995, 17-18.
- Ramos P. (1993): Manual de laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*. Ed. McGraw-Hill, 1 & ed., México, 1993.
- Rhone Mériux. (1995): Pulgas y garrapatas. Afróntelas I. Folleto promocional del laboratorio, México.
- Rivas B.M.S. (1996): Variación fenotípica en *Drosophila melanogaster* variedad white al ser sometida a luz ultravioleta durante ña fase de gestación. Tesis Q.F.B. FES-C. UNAM.
- Searle A., Jensen C.J. and Atwell R.B. (1995): Results of a trial of fipronil as an adulticide on ticks (*Ixodes holocyclus*) naturally attached to animals in the Brisbane area. *Australian Veterinary Practitioner*. 25:3, 157-158.
- Sociedad Mexicana de Genética (1995): VI congreso nacional de genética. Resúmenes.
- Surralles J., Xamena R., Creus A., Catalán J., Norppa H. and Marcos R. (1995): Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat-Res*. Vol. 341, ISS. 3, 169-84.
- Stein K.J. and Ravlin F.W. (1997): Toxicity of insecticides and determining the LD50. Department of Entomology. Virginia Polytechnic Institute.
- Thompson M., Shotkoski F. and Ffrench-Constant R.H. (1993): Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Conservation of the gene and resistance associated mutation with *Drosophila*. *FEBS-Letters* 325:3, 187-190.
- Thompson M., Steichen J.C. and Ffrench-Constant R.H. (1993): Conservation of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations in insects. *Insect-Molecular-Biology* 2:149-54.
- Tomasic A. and Vinkovik B. (1995): The use of fipronil in the prevention of infectious and parasitic diseases in dog and cats. *Veterinarski Fakultet Sveucilista u Zagrebu*; Zagreb, Croatia, 1995.
- Vijayaraghavan M. and Nagarajan B. (1994): Mutagenic potential of acute exposure to organophosphorus and organochlorine compounds. *Mutat-Res* Vol. 321, ISS 1-2, 103-11.
- Waliszewski S.M., Pardio-Sedas V.T., Waliszewski K.N., Chantiri-Pérez J.N., Infanzón-Ruiz R.M. y Rivera J. (1996): Niveles de plaguicidas organoclorados en carne y grasa de bovinos procedientes de Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* Vol. 12, No. 2, 53-59.
- Wallace H.A. (1989): Principles and methods of toxicology. Ed. Raven press, 2a. ed., USA.

- Ware G.W. (1996):** An introduction to insecticides. Department of Entomology. University of Arizona.
- Watabe T., Kodama S., Masui A., Yokoi S. and Ichinose R. (1994):** Hydrazine derivatives and fipronil as insecticides. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 8 pp., 94293609, 10-21-94.
- Waters L.C. (1995):** Molecular biology of cytochrome P-450 related insecticide resistance. Fedrip. Database, National Technical Information Service (NTIS) USA.