

152  
201



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS - UNAM -

**EFFECTO CITOGENETICO PROVOCADO POR  
LOS HERBICIDAS CARBAMICOS EPTAM Y  
ASULAM EN Vicia faba**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

P R E S E N T A

**BIBIANA ROSALES HERNANDEZ**



BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. SANDRA DEZ GOMEZ ARROYO



MEXICO. D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

257319



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Efecto citogenético  
provocado por los herbicidas carbámicos eptam y asulam en Vicia faba"

realizado por **Rosales Hernández Bibiana**

con número de cuenta **8637307-6**, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario **Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo**

*Sandra Luz Gómez Arroyo*

Propietario **Dr. Rafael Villalobos Pietrini**

*Rafael Villalobos Pietrini*

Propietario **M. en C. María Calderón Segura**

*María Calderón Segura*

Suplente **M. en C. Pedro Rafael Valencia Quintana**

*Pedro Rafael Valencia Quintana*

Suplente **Biól. Miguel Angel Meneses Pérez**

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

*Alejandro Martínez Méndez*



M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENDEZ  
DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

*A la memoria de mi abuelo Efraím Hernández Xolocotzi*

*Al amor de mi mamá Diana Hernández Santamaría*

*Al cariño de mis hermanos Diana, Lorena y Adrián*

Agradezco sinceramente a todas aquellas personas que en algún momento me ayudaron y apoyaron para que pudiera concluir con esta etapa de mi carrera:

A mi familia por su comprensión y empuje.

A mi sobrino Luis Pablo por su cariño y alegría.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias Bety, Lucero, Coral, Angélica, Claudia, Ericka Paz, Libertad, Gabriela y Carlos por hacerme más amena la Universidad.

A mis compañeros del Laboratorio de Citogenética María Elena, Josefina, Ana Rosa, Malinali, Yooko, Ericka M, Ericka S, Miguel A. Meneses, Sofía, Sara, Sra. Emma, Catalina y Pietro por su compañerismo.

A la M. en C. Josefina Cortés Eslava por su cariño, comprensión y sobre todo paciencia para enseñarme correctamente la técnica.

A Rafael, Gerardo, Sergio y Fernando por su amistad y apoyo.

A Jorge por su amor, confianza, motivación y apoyo para dar este paso tan importante en mi vida.

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo por apoyarme en todo momento, aceptarme como alumna, guiarme y corregirme para la realización de este trabajo.

A mis sinodales:

Dra Sandra Gómez Arroyo

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

M. en C. Maria Elena Calderón Segura

M. en C. Pedro Rafael Valencia Quintana

Biol. Miguel Angel Meneses Pérez

Por sus valiosas sugerencias en la corrección del presente trabajo.

Gracias

*Bibiana*

## Indice

	Páginas
<b>Resumen</b>	
<b>I. Introducción</b>	1
1.1 Carbamatos	2
1.1.1 Mutagenicidad	4
1.1.2 Carcinogenicidad	6
1.1.3 Teratogenicidad	7
1.1.4 Herbicidas carbámicos	8
1.1.5 Asulam	9
1.1 Herbicidas tiocarbámicos	9
1.2.1 Mutagenicidad	12
1.2.2 Carcinogenicidad	12
1.2.3 Teratogenicidad	12
1.2.4 Eptam	13
1.3 Sistemas de prueba para evaluación de daño genético	18
1.4 Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)	19
1.4.1 Modelo propuesto para explicar el origen de los Intercambios de Cromátidas Hermanas por Painter (1980)	22
1.5 ICH en plantas	24
1.6 ICH en plantas vs ICH en mamíferos	25
<b>II. Objetivos</b>	27
<b>III. Material y métodos</b>	27
3.1 Características fisicoquímicas del herbicida carbámico <b>Asulam</b>	27
3.2 Características fisicoquímicas del herbicida tiocarbámico <b>Eptam</b>	28
3.3 Tratamientos de las raíces de <i>Vicia faba</i>	29
3.4 Fijación y tinción	30
3.5 Análisis estadístico	31
<b>IV. Resultados</b>	32
<b>V. Discusión y Conclusiones</b>	33
<b>VI. Referencias</b>	36
<b>VII. Tablas</b>	52
<b>VIII. Figuras</b>	58

## RESUMEN

Los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) constituyen un modelo adecuado que ha permitido conocer los efectos que pueden tener contaminantes ambientales de diversa índole a nivel citogenético ya que se ha observado una correlación positiva entre el incremento en la frecuencia de ICH y la actividad mutagénica, carcinogénica y teratogénica de los compuestos.

En el presente trabajo se analizó, mediante la técnica de ICH en *Vicia faba*, dos herbicidas utilizados en el norte de la República Mexicana, el asulam y el eptam, el primero carbámico y el segundo tiocarbámico, en concentraciones de 10, 50, 100, 200, 300, 500 y 1000 ppm de asulam y 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0 y 10 ppm de eptam. A los datos obtenidos se les aplicó la prueba estadística de Newman-Keuls que es un análisis de varianza de comparación múltiple

Ambos compuestos presentaron una respuesta positiva en el incremento en la frecuencia de ICH, observándose en términos generales, una correlación concentración-efecto para ambos herbicidas.

Se mostró claramente que el eptam fue más tóxico que el asulam, ya que a partir de 10 ppm hubo muerte celular, mientras que con el otro herbicida este mismo efecto se produjo en 500 ppm.

Ambos compuestos estuvieron cerca de duplicar el valor de sus respectivos testigos, siendo para el asulam a 100 ppm un valor de  $50.08 \pm 0.9851$  y para el eptam a 2.0 ppm de  $63.84 \pm 1.007$  ICH/metafase



# EFFECTO CITOGENETICO PROVOCADO POR LOS HERBICIDAS CARBAMICOS EPTAM Y ASULAM EN *Vicia faba*

## I. INTRODUCCION

En la actualidad, uno de los grandes problemas que aquejan a la humanidad es la contaminación, en la cual destacan la presencia de enormes y variadas cantidades de productos químicos en el ambiente, que son dispersados ya sea por vía aérea o acuática y se depositan en agua, suelo y aire, afectando seriamente al medio y poniendo en peligro la salud de plantas y animales incluyendo al hombre (Litterst y Lichtenstein, 1971; Mellan, 1977).

Muchas de las plantas utilizadas en la agricultura son expuestas deliberadamente a plaguicidas y productos químicos (Barberá, 1975). Los plaguicidas se han utilizado desde tiempos remotos aportando múltiples beneficios en diversos órdenes, tales como la economía, la industria, etc. Sin embargo, sus efectos biológicos han condicionado su uso (Barthel, 1981) ya que son una clase heterogénea de agentes químicos cuyos efectos citológicos pueden no ser observables (Grant, 1973).

El aumento continuo del uso de plaguicidas ha provocado efectos deletéreos en el ambiente y en la salud de las personas, especialmente cuando implican aspectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos (WHO, 1972; Wild, 1975), además de alergias, alteraciones de las vías respiratorias e intoxicaciones que en algunas ocasiones conllevan a la muerte (Barberá, 1975; Ecobichon y Joy, 1984).

A partir de 1931 se ha descrito en la literatura que ciertos plaguicidas causan alteraciones cromosómicas, así como otras anormalidades citológicas como son: fallas en la división de la pared celular, acción antimitótica, hinchamiento del núcleo, cromosomas pálidos o nebulosos, cromosomas agrupados, contracción cromosómica, cromosomas pegajosos, desespiralización de cromosomas, aberraciones cromosómicas y cromatídicas, rearrreglos cromosómicos, puentes en anafase y telofase, citomixis, acción c-mitótica, anafases tripolares y tetrapolares, endopoliploidias, células binucleadas, multinucleadas así como micronúcleos. La sensibilidad de los organismos a los tratamientos con plaguicidas es muy variada y depende de diversos factores como la ploidia, la forma de vida y el volumen nuclear interfásico (Grant, 1973).

Desde el punto de vista químico los plaguicidas se dividen en clorados, fosforados y carbámicos (Barberá, 1975; Moutschen- Dahmen *et al.*, 1984) siendo los carbámicos los más utilizados debido a su menor longevidad, menor toxicidad y gran eficiencia en comparación con los anteriores.

Una gran cantidad de éstos compuestos son utilizados en diversas áreas, ya sea como aceleradores en la vulcanización del caucho, agentes para acabado en las fábricas, drogas o como intermediarios químicos, lo cual ha provocado la exposición humana ya sea por el manejo de estas sustancias así como por el consumo de productos alimenticios que contienen residuos del plaguicida (Yin-Tak, 1983).

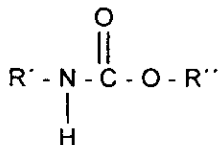
### 1.1 Carbamatos

Estos plaguicidas son empleados ampliamente en la agricultura en México y considerando su acción se dividen en: insecticidas, nematocidas, fungicidas y herbicidas. También son usados en la industria y en otras aplicaciones comerciales así como en el hogar y para el control de vectores en salud pública (Environmental Health Criteria, 1988).

Con anterioridad se habían descrito los carbamatos como "hipnóticos muy seguros" y fueron aplicados con ésta característica hasta que se descubrió su capacidad carcinogénica (Yin-Tak, 1983).

El papel de los carbamatos y sus compuestos relacionados en el control de plagas crece rápidamente, así como el interés por el deterioro que pueden causar en el ambiente, lo cual ha conducido a prohibiciones y restricciones en el uso de algunos de ellos (Yin-Tak, 1983).

La fórmula general de los plaguicidas carbámicos (N-alquil carbamatos) es:



donde R' es radical alquilo (butil, etilisopropil, metil, etc.) R'' es un radical arilo (fenil, naftil heterocíclicos). El esqueleto de los carbamatos es el ácido carbámico del dióxido de carbono, molécula altamente inestable que se descompone rápidamente en dióxido de carbono y amoníaco. El reemplazamiento de uno de los protones asociados con el nitrógeno por un grupo metilo, resulta en la formación de ácidos monoacetil carbámicos (Ecobichon y Joy, 1984) y se estabiliza por la adición de un grupo alquilo (Barberá, 1975).

Pueden ser obtenidos como sólidos cristalinos puros, lo que facilita las investigaciones químicas y biológicas. Ligeramente solubles en agua, pueden ser diluídos en una gran variedad de disolventes. Son sensibles a la luz, al calor y a la oxidación, por ello se había pensado que no representaban mucho riesgo al ambiente (Moutschen- Dahmen *et al.*, 1984).

Existe similitud entre el modo de acción de compuestos organofosforados y carbámicos en todas las clases de animales. La toxicidad es debida a la inhibición de la acetil-colinesterasa en el sistema nervioso central, que produce parálisis. A diferencia de los organofosforados, no requieren de conversión metabólica para manifestar efectos nocivos. Además la supresión puede ser reversible y la actividad enzimática, algunas veces, regenerada (Moutschen- Dahmen *et al.*, 1984).

Los plaguicidas carbámicos han sido ampliamente utilizados debido a su baja toxicidad para los mamíferos y a su degradación relativamente rápida en el suelo (Dulout *et al.*, 1982).

Algunos carbamatos han sido detectados en cantidades residuales en verduras y frutas durante o poco después de la cosecha. La mayoría de estos plaguicidas se espera que se degraden en los siguientes días o semanas y probablemente solo las porciones solubles en agua de los residuos en alimentos son biodisponibles, sin embargo se han detectado cantidades traza de uretano en ciertos fermentados tratados con dietilpirocarbamato como preservador (Yin-Tak, 1983).

El cloroprofán ha sido determinado principalmente en papas, en rangos de 0.004-0.653 ppm y 0.023-0.469 ppm. La ingesta accidental diaria aproximada de cloroprofán por niño fue de 0.002-0.394  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Yin-Tak, 1983).

### 1.1.1 Mutagenicidad

Cheng y Conner (1982) mostraron la potencia de 5 carbamatos para inducir intercambios de cromátidas hermanas en macrófagos de los alveolos pulmonares del ratón correlacionándola con su potencia carcinogénica.

El uretano, el N-hidroxiuretano y el vinil carbamato provocan intercambios de cromátidas hermanas en cultivos de linfocitos humanos pero requieren de activación metabólica para ser efectivos (Csukas *et al.*, 1981).

Varios carbamatos acetilénicos han sido probados para evaluar su mutagenicidad en el ensayo de Ames, mostrando que algunos fácilmente actúan directamente como alquilantes (Yin-Tak, 1983). El barbán y el clorobufan son análogos estructurales y negativos en la prueba de Ames (De Lorenzo *et al.*, 1978; Yin-Tak, 1983).

De los plaguicidas carbámicos que han sido probados en el ensayo de Ames sólo el benomilo presenta una ligera actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium* TA 1535, una cepa que muta por substitución de pares de bases (Yin-Tak, 1983); este resultado no fue confirmado en otros dos estudios (Yin-Tak, 1983). El benomilo fue considerado mutagénico en *Escherichia coli* y en uno de dos estudios en *Aspergillus nidulans* (Yin-Tak, 1983). La porción estructural responsable del efecto genotóxico potencial se ha postulado que es el benzimidazol, que puede ser incorporado en el DNA como un análogo purínico o causar disturbios mitóticos mediante el desdoblamiento de la tubulina (Yin-Tak, 1983).

Otros plaguicidas carbámicos con resultados positivos en uno o más ensayos relacionados con mutagenicidad son landrin, carbarilo, profan y clorofan.

El landrín presenta actividad mutagénica en cultivos de células de criceto chino (Yin-Tak, 1983), el resultado positivo indica que el potencial genotóxico de este plaguicida debe ser evaluado más críticamente. Dos homólogos del landrin (3-metil fenil y 3, 4-dimetil fenil-N-metil carbamato) son también positivos en una prueba de aberraciones cromosómicas *in vitro* en células de criceto chino (Ishidate y Odashima, 1977). El carbarilo es positivo en un ensayo de síntesis no programada de DNA (Ahmed *et al.*, 1977) y en la prueba de aberraciones

cromosómicas (Ishidate y Odashima, 1977), pero negativa en otros 4 sistemas. Tanto el profán como el cloroprofán son fuertemente mutagénicos en *Pelargonium* (una planta monoploide con flores) pero inactivo en un ensayo de *Bacillus subtilis* (Yin-Tak, 1983).

El aldicarb produce incremento significativo de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) (González-Cid y Matos, 1984) y de aberraciones cromosómicas (González-Cid y Matos, 1987) en ausencia o en presencia de la mezcla S9 y en este último caso decrece la progresión sucesiva de la mitosis de las células humanas en cultivo (González-Cid y Matos, 1984).

Se ha mencionado que el aldicarb puede ser transformado en una sustancia genotóxica cuando forma N-nitroso-aldicarb en presencia de nitritos (González-Cid y Matos, 1984). Este derivado es mutagénico en *Salmonella typhimurium* (Yin-Tak, 1983) y es capaz de producir numerosas rupturas de cadena sencilla del DNA en células normales de piel humana (Blevins *et al.*, 1977b).

El carbarilo, en *Hordeum vulgare* aumenta la cantidad de rupturas cromosómicas en mitosis y en meiosis (Wuu y Grant, 1966, 1967). En *Drosophila melanogaster* se observa una ligera tendencia mutagénica (Hoque, 1972). En una línea celular de fibroblastos de criceto chino causa rupturas, intercambios y huecos (Ishidate y Odashima, 1977). Además, provoca desincronización en la síntesis de DNA *in vitro* de fibroblastos humanos (Ahmed *et al.*, 1977), en la prueba de letales dominantes en ratones, ocasiona reabsorción embrionaria y muerte fetal temprana (Epstein *et al.*, 1972).

El derivado nitroso del carbarilo (N-nitroso carbarilo) resulta mutagénico en *Escherichia coli* (Egert y Greim, 1976), *Salmonella typhimurium* (Egert y Greim 1976; Blevins *et al.*, 1977b) y *Haemophilus influenzae* (Beattie, 1975). En *Saccharomyces cerevisiae*, Siebert y Eisenbrand (1974) obtienen respuesta positiva. Numerosas rupturas de una sola hebra fueron provocadas en el DNA de células humanas (Blevins *et al.*, 1977b).

El tiram eleva la inducción del fago lambda en *E. coli*, en presencia de activación metabólica y tiene efecto mutagénico en *S. typhimurium*. En *A. nidulans*, causa mutaciones en ausencia de activación metabólica (Yin-Tak, 1983) y es capaz de producir segregación

cromosómica anormal, detectada por la recuperación de colonias hiperhaploides e hiperdiploides del organismo (Upshal y Johnson, 1981).

Las frecuencias de micronúcleos, puentes cromatídicos y mitosis multipolares se incrementan significativamente en ratones tratados con tiram, pero disminuyen la cantidad de anafases (Dulout *et al.*, 1982).

Con el carbofuran se han descrito resultados contradictorios en el sistema de Ames (Gentile *et al.*, 1982; Shirasu *et al.*, 1976).

El tiofanox es capaz de inducir ICH en linfocitos humanos en ausencia de activación metabólica (Debuyst y Larebeke, 1983).

Aunque la mayoría de los resultados obtenidos sobre efectos genotóxicos con carbamatos son negativos, sus derivados nitrosos parecen tener actividad mutagénica, tal es el caso del propoxur, del BUX-ten y del landrin en *S. typhimurium* (Blevins *et al.*, 1977a) y de propoxur en *S. cerevisiae* (Siebert y Eisenbrand, 1974).

### 1.1.2 Carcinogenicidad

Los carbamatos diarilacetilénicos fueron originalmente considerados como una nueva clase de agentes antineoplásicos potenciales. Un estudio de toxicidad subaguda del 1, 1-difenil-2-propinil N-ciclohexilcarbamato reveló inesperadamente su actividad carcinogénica. El análisis subsecuente muestra que el compuesto es un carcinógeno potente, que altera diferentes partes en ratas, ratones y jerbos (*Jaculus jaculus* rata canguro asiático-africana). Niveles dietéticos de 0.025-0.1% son carcinogénicos (Yin-Tak, 1983).

Al aplicar zectran a ratones machos se produce una mortalidad del 50% y los sobrevivientes presentan tumores en hígado y piel (NCI, 1978). Sin embargo, no es carcinogénico en ratas. Su uso ha sido discontinuado en EUA desde 1975. El carbarilo ( $\alpha$ -sevin) produce sarcomas en ratas criadas con una administración oral diaria de 30 mg/kg durante 20 meses (Yin-Tak, 1983). De igual manera no se han observado efectos carcinogénicos en varios estudios donde se utilizan 7 líneas diferentes de ratones y ratas CF-N,

mientras que el  $\beta$ -sevin, isómero del carbarilo, ha demostrado claramente ser carcinógeno en ratones y ratas (Yin-Tak, 1983).

En un estudio de toxicidad crónica el benomilo (benlate) no muestra efectos carcinogénicos en mamíferos (ACGIH, 1977), sin embargo datos preliminares proporcionados por la agencia de protección ambiental de E.U.A. (1982) afirman lo contrario (Yin-Tak, 1983).

Ha sido demostrado que los derivados N-nitrosos del carbarilo, propoxur, bux-ten, carbofurán, landrin, metil-fenil-carbamato, metomilo y aldicarb son carcinógenos activos. Las ratas que se alimentaron con disulfiram o tiram junto con nitrito, desarrollan tumores en el esófago o en el estómago, respectivamente y si se considera el hecho de que el nitrito está presente en la saliva humana normal y en la dieta (Eisenbrand *et al.*, 1975, 1976), la formación *in vivo* de compuestos N-nitrosos puede ocurrir como resultado de la exposición humana a carbámicos, tiocarbámicos y compuestos relacionados. A gran escala, los nitroso metilcarbamatos producen pocos tumores, siendo los más efectivos el NO-carbofuran, el NO-Baygón y el NO-landrin (Moutschen-Dahmen *et al.*, 1984).

Se han descrito a los insecticidas disulfiram y tiram como venenos altamente tóxicos en mamíferos sin efectos carcinogénicos, neurotóxicos o reproductores (Marshall, 1985).

### **1.1.3. Teratogenicidad**

En ratones y criceto sirio dorado se encontró que el uretano es capaz de pasar libremente la barrera placentaria y se ha observado que eleva las frecuencias de malformaciones así como alteraciones de órganos en un periodo de gestación de 8 a 12 días. Las relaciones de dosis-respuesta no muestran una frecuencia lineal. Estos efectos disminuyen significativamente por la administración de cafeína (Yin-Tak, 1983).

El propoxur provoca muerte temprana en embriones de pollo (Tyrkiel, 1977).

El carbarilo es considerado teratogénico para perros y embriones de pollo (Eto *et al.*, 1980; Yin-Tak, 1983), pero inactivo en ratones, ratas, (Yin-Tak, 1983), cricetos (Eto *et al.*, 1980) y monos (Yin-Tak, 1983).

Eto *et al.* (1980) realizan un estudio en embriones de pollo y perros de la relación de la capacidad teratogénica con la estructura, notando que la sustitución del grupo N-metil del carbarilo con un grupo alquilo más alto (etilo o propilo) o grupo alqueril (alil) elimina completamente esa acción. El isómero  $\beta$ -sevin del carbarilo tampoco es teratogénico. La introducción de un grupo adicional metil a la terminal amino parece no afectar la teratogenicidad. No se han realizado estudios en mamíferos.

Al benomilo se le considera como no teratogénico en ratas, después de administrarlo en la dieta (Yin-Tak, 1983). Sin embargo, otros estudios muestran lo contrario, ya que si se toma en cuenta la ruta de administración como factor importante para evaluar el potencial de daño, es teratogénico o fetotóxico dependiendo del ensayo y se propone que la porción benzimidazol esta involucrada en su acción teratogénica (Yin-Tak, 1983).

La actividad teratogénica del carbarilo se ha demostrado en aves, peces, ratones, cobayos, cricetos, conejos, cerdos, perros y monos; encontrándose anomalías como: embriotoxicidad, decremento en el tamaño de las camadas, esterilidad, aumento de individuos nacidos muertos, malformaciones de las vértebras, reabsorciones embrionarias, fisuras torácico-abdominales, falta de formación del esqueleto, etc., causadas por diferentes concentraciones y vías de administración (Moutschen-Dahmen *et al.*, 1984).

El propineb presenta actividad teratogénica en ratas (Yin-Tak, 1983), al igual que la propilentiourea, su principal metabolito y producto de degradación (Bleyl y Lewerenz, 1978).

#### **1.1.4 Herbicidas carbámicos**

Los herbicidas carbámicos difieren de los insecticidas del mismo grupo en que tienen una mayor sustitución en el nitrógeno (radicales alquilos y arilos) que en el oxígeno. Algunos ejemplos son: asulám, barbán, carbetamido, cloroprofán, desdemifám, fenifenisofám, femedifám, profám y swep. Además no inhiben a la colinesterasa y su toxicidad en mamíferos usualmente es mucho más baja. Para éstos compuestos los valores LD<sub>50</sub> en las ratas van de 550 a 11000 mg/kg; siendo para la mayoría de ellos a partir de 4000 mg/kg (Hayes y Laws, 1991).



### 1.1.5 ASULAM

El **Asulam** o Asulox  $C_8H_{10}N_2O_4S$  es un herbicida carbámico, sistémico, post-emergente, de uso agrícola y urbano; no debe ser mezclado con otros plaguicidas, no se recomienda sembrar otros cultivos en áreas tratadas donde se siembra caña de azúcar, ni utilizarla como forraje para ganado. Absorbido a nivel de raíz provoca clorosis en plantas e interfiere en la división y en la elongación celulares.

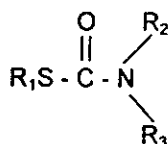
Se usa con aplicaciones post-emergente para el control de *Rumex spp.* en pastos y hortalizas, epifitas conocidas como pastos tropicales de las copas de los árboles, en *Pteridium aquilinum* en pastura y empleo forestal, *Avena fatua* y linaza, en caña de azúcar, de amplio rango en hierbas y pastos con semilla oleosa (Tabla I).

Toxicología: en mamíferos se ha probado en ratas, ratones y conejos, detectándose que más de 4000 mg de **Asulam-sodio**/kg les provoca la muerte. En pollos y palomas causa la muerte en dosis mayores a 2000 mg. Se ha demostrado su toxicidad en peces gato y dorado y en trucha arcoiris, a concentraciones mayores de 5000 mg/L (Worthing y Walker, 1991).

Shirasu *et al.* (1976) utilizando el ensayo Rec, con H17 Rec<sup>+</sup> y M45 Rec<sup>-</sup> de *Bacillus subtilis* y el de reversión con cepas auxótrofas de *Escherichia coli* (WP2) y *Salmonella typhimurium* (Ames), observan que el **Asulam** no es mutagénico. En general se han realizado pocos estudios con este compuesto.

### 1.2 Herbicidas Tiocarbámicos

Algunos de los herbicidas tiocarbámicos también tienen acción como insecticidas y fungicidas, su fórmula general es:



donde  $R_1$  es el grupo alquilo unido al azufre formando el S-tiocarbámico o al oxígeno constituyendo el O-tiocarbámico,  $R_2$  y  $R_3$  representan grupos alquilos o un alquilo y un anillo cíclico o un grupo hexametileno (Environmental Health Criteria, 1988).

Estos herbicidas son líquidos o sólidos, con bajo punto de fusión, volátiles, solubles en agua, algunos son estables en medios acuosos ácidos. Su oxidación secuencial a sulfóxido disminuye su estabilidad hidrolítica (Fukuto, 1972).

Los tiocarbamatos se eliminan fácilmente del suelo, debido a su volatilidad, al movimiento, a la porosidad del suelo y a la solubilidad en el agua y en algunas ocasiones se produce fotodegradación. Otros factores que influyen en la biodegradación de los herbicidas son la humedad, su capacidad de adsorción, pH, temperatura, así como el tiempo de exposición (Environmental Health Criteria, 1988).

Los microorganismos también contribuyen a la degradación del herbicida en el suelo, ya que conjuntamente con las plantas, provocan que se hidrolice y se formen dióxido de carbono ( $CO_2$ ) y otros compuestos metabólicos (Environmental Health Criteria, 1988).

En general, son absorbidos por los animales a través de la piel, membranas de la mucosa y tractos respiratorio y gastrointestinal, aunque pueden ser eliminados rápidamente por las vías respiratoria y urinaria (Environmental Health Criteria, 1988).

Ha sido descrito que los microorganismos son eminentemente responsables de la degradación del herbicida (Eptam) en medios naturales (Obrigawitch *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984; Wilson, 1984; Tam *et al.*, 1987).

En las plantas, los herbicidas tiocarbámicos son metabolizados en poco tiempo en reacciones típicas de oxidación, del azufre a un sulfóxido y reacciones intermedias en grupos sulfhidrilos (como glutatión, cisteína) a sus formas conjugadas. En la hidrólisis se originan mercaptanos, dióxido de carbono y alquilaminas (Environmental Health Criteria, 1988).

La capacidad tóxica de estos herbicidas por las vías oral y dérmica, es generalmente baja; pero por inhalación es elevado el daño que puede causar (Environmental Health Criteria, 1988).

Algunos tiocarbamatos, como el molinate, tienen efectos en la morfología del espermatozoide y por lo tanto en la reproducción, sin embargo, no se han observado consecuencias teratogénicas, tampoco se han realizado estudios adecuados con los herbicidas de este grupo para conocer su capacidad carcinogénica (Environmental Health Criteria, 1988.)

Se han realizado estudios metabólicos en ratas, a las cuales se les administra oralmente, dosis de 0.16-1.95  $\mu\text{g}/\text{animal}$  de pebulate marcado con  $\text{C}^{14}$ , observándose una rápida eliminación, aproximadamente el 55% es exhalado como  $\text{CO}_2$ , el 23% se elimina por orina y el 5% en heces, lo restante se detecta principalmente en hígado, pulmón y riñones y en pequeñas dosis en otros órganos (Fang *et al.*, 1964).

Cuando se aplican oralmente altas dosis de tiocarbamatos a mamíferos, se presentan diferentes signos, como anorexia, bizqueo, hipersalivación, lagrimeo, encrespamiento, respiración agitada, ataxia, hipotermia, torpeza, depresión; también se ha observado fibrilación muscular y convulsiones que pueden provocar la muerte (Akulov *et al.*, 1972; IARC, 1976).

Dosis letales de dialate administrada a ratas y a cobayos les causan impaciencia en las primeras 2 h, seguidas de carencia de coordinación y muerte debida a parálisis respiratoria. La autopsia revela dilatación vascular en el cerebro, cerebelo y vísceras abdominales, hemorragias en las meninges y alargamiento de las glándulas adrenales (Yin-Tak, 1983).

En conejos, una dosis simple de trialate (450-500 mg/kg) disminuyó la actividad de la acetilcolinesterasa en cerebro y eritrocitos (Zhavoronkov *et al.*, 1974).

Se ha encontrado que el dialate, trialate y sulfalate son compuestos carcinogénicos y/o mutagénicos. (Environmental Health Criteria, 1988).

### 1.2.1 Mutagenicidad

En la prueba de Ames, el dialate, el trialate y el sulfalate son consistentemente mutagénicos después de activación metabólica induciendo revertantes (De Lorenzo *et al.*, 1978; Sikka y Florczyk, 1978; Yin-Tak, 1983).

El vernolate, butilate y otros herbicidas tiocarbámicos provocan mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster*, excepto el trialate (Murnik, 1976; Sandhu *et al.*, 1984).

Gómez-Arroyo *et al.* (1992a) evaluaron la acción de molinate (Ordram) en dosis de 25 a 300 ppm en *Vicia faba*, encontraron que al aumentar las dosis se incrementan la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

### 1.2.2 Carcinogenicidad

Al dialate (abadex) se le describe como inductor de tumores en hígado y pulmones de ratas (Bionetics Research Laboratories, 1968; Innes *et al.*, 1969). Ulland *et al.* (1973) sugieren que causa un incremento significativo de tumores malignos en ratas. El sulfalate ha mostrado claramente ser carcinogénico. Induce tumores en las glándulas mamarias en ratones y ratas hembras así como tumores en el estómago y pulmones de los machos (NCI, 1978).

Con dialate y trialate en linfoma de ratón la respuesta es positiva únicamente cuando hay activación metabólica (Sandhu *et al.*, 1984). En células de mamífero produce aberraciones cromosómicas e ICH (Douglas *et al.*, 1981). Exposiciones al dialate causan desarrollo de tumores en ratas (Innes *et al.*, 1969; Ulland *et al.*, 1973).

### 1.2.3 Teratogenicidad

Únicamente el dialate ha sido probado para efectos teratogénicos y fetotóxicos en conejos y es negativo (US Environmental Protection Agency, 1977).

#### 1.2.4 EPTAM

En el grupo de los tiocarbámicos está incluido el **Eptam** o Eptc  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2]_2\text{NCOSCH}_2\text{CH}_2$  que es un herbicida, sistémico, pre-emergente, no se debe mezclar con otros plaguicidas. Se utiliza para matar malezas e inhibir el desarrollo de las partes bajas de malezas perennes. Se recomienda incorporarlo al suelo mecánicamente o por irrigación para evitar pérdidas por volatilización (Tabla II a y b).

Usado particularmente para el control de pastos como *Elymus repens* y de malezas como *Cyperus spp* perenne. También se considera que es tóxico a peces.

El **Eptam** es el primer herbicida tiocarbámico desarrollado, este compuesto tiene una variabilidad alta en el control de maleza o en el desarrollo temprano del semillero.

Se utiliza en cultivos de alfalfa, algodón, cártamo, frijol, maíz, mandarina, naranja, papa, toronja aplicado en el campo o en almácigos.

El **Eptam** (eptc o etilidipropiltiocarbamato) cuando se aplica en cantidades de 0.6-103 µg/animal se elimina completamente en 15 h a través de la orina, pero cuando la concentración es mayor se efectúa aproximadamente en 35 h (Ong y Fang, 1970).

Se han utilizado fracciones microsómicas aisladas de tejidos de brotes y de raíces de plántulas etioladas en maíz (*Zea mays* L. DeKalb XL72AA y DeKalb XL67) de 4 días para estudiar el metabolismo del **Eptam**. En éstas se observa que se requiere de  $\text{O}_2$  pero no NADPH como cofactor para la formación de sus metabolitos (Jablonkai y Hatzios, 1994).

Al administrar **Eptam** y tres de sus metabolitos (los derivados sulfóxido, N-depropil y S metil) intraperitonealmente (ip) 8 mg/kg a ratones se observa la inhibición de 56% a 82% de la aldehído dehidrogenasa (ALDH) mitocondríca en hígado después de 2 h de ser administrado. Asimismo se eleva mucho el nivel del acetaldehído en la sangre (a partir de 500 µM igual a 12.39 ppm) y en el cerebro (arriba de 121 µM ó 3 ppm), 30 min después de dos tratamientos ip, el primero con el tiocarbamato a 40 mg/kg y 2 horas después con etanol a 1000 mg/kg. El **Eptam** a 4 mg/kg inhibe en 50% la actividad de la ALDH en el hígado y a 8 y 18 mg/kg provoca

la mitad de la elevación máxima de los niveles del acetaldehído etanol-dependiente en sangre y cerebro, respectivamente. Se ha mostrado que la droga disulfiram que es antagonista al alcohol es transformada a S-metil **Eptam** y su sulfóxido como metabolitos que inhiben ALDH. Por lo tanto, los herbicidas tiocarbámicos y sus derivados actúan como inhibidores de la ALDH *in vivo*, por lo que pueden sensibilizar a los trabajadores agrícolas a las intoxicaciones alcohólicas (Quistad *et al.*, 1994).

La sulfoxidación de los tiocarbamatos, como **Eptam**, molinato, perbulato y vernolato, representa un mecanismo de desintoxicación en mamíferos, puesto que los sulfóxidos generalmente son menos tóxicos que sus compuestos primarios. La baja toxicidad de los sulfóxidos es atribuida a la elevada tasa de rompimiento y a la eliminación de glutatión conjugado (Casida *et al.*, 1975). Sin embargo, en la primera evaluación del efecto de estos herbicidas en el metabolismo de la coenzima A, el **Eptam** inhibe 3 enzimas que sintetizan el acetil CoA, el complejo piruvato deshidrogenasa cloroplástica (PDC), la sintetasa acetil CoA cloroplástica y el PDC mitocondrial, a concentraciones submicromolares (Wilkinson y Oswald, 1987). Esta inhibición es contraria a la hipótesis de que el sulfóxido es la forma inactiva del herbicida (Fuerst, 1987). Es posible que el sulfóxido sea más efectivo en éste sitio pero esto no se ha examinado debido a que los sustratos enzimáticos, piruvato o acetato revierten competitivamente la inhibición. La supresión de la biosíntesis de ácidos grasos en los cloroplastos es también revertida por el acetato (Wilkinson y Smith, 1975).

Se requieren mayores investigaciones para evaluar el significado de la inhibición del **Eptam** en la síntesis de acetil CoA y la validez de la hipótesis contradicha en ésta investigación (Wilkinson y Oswald, 1987).

En el metabolismo de mamíferos existen métodos de oxidación de la molécula de los tiocarbamatos, en el sistema de microsomas de hígado con NADPH, el **Eptam** provoca oxidación en los grupos azufre, en el carbono  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de los propilos y en el  $\beta$ -carbono del grupo etilo (Environmental Health Criteria, 1988).

Los sulfóxidos son detectados como metabolitos transitorios en el hígado de ratones inyectados con **Eptam**, molinate o pebulate, pero no con butilate o cicloate (Casida *et al.*, 1975).

En plantas, los resultados de las investigaciones con C<sup>14</sup> muestran que los herbicidas son metabolizados por reacciones típicas de oxidación (Hubbell y Casida, 1977; Carringer *et al.*, 1978; Cheng y Casida, 1978).

En organismos acuáticos la toxicidad de los tiocarbamatos es rara, sin embargo, en el caso del **Eptam** se observaron resultados positivos.

En aves se describe que al administrar **Eptam** a la codorniz de pecho blanco durante 7 días a concentraciones de 1000 a 32 000 mg/kg, no se encontraron efectos en cantidades menores a 1800 mg (Environmental Health Criteria, 1988).

En abejas, la toxicidad de **Eptam**, molinate, cicloate, butilate, pebulate y vernolate es mayor de 11 µg/abeja (LD<sub>50</sub>). Por lo que se puede concluir que estos compuestos son poco tóxicos para estos organismos comparados con compuestos organoclorados y organofosforados (Stauffer Chemicals, 1978).

La toxicidad del **Eptam** en diferentes animales (mamíferos) varía mucho, aunque el gato parece ser el más sensible (Akulov *et al.*, 1972; IARC, 1976).

Los estudios concernientes a los efectos de los tiocarbamatos en el hombre son escasos, sin embargo, se ha detectado que en personas que han estado expuestas a concentraciones de 135 a 210 mg de **Eptam** por m<sup>3</sup> de aire se presentan efectos adversos como dolor de cabeza y náusea (Medved e Ivanova, 1971).

Dawson (1963) al estudiar la acción del **Eptam** en el crecimiento de plántulas de "pasto de corral", observa mayor elongación en el primer internodo, con enrollamiento en un patrón en zig-zag, las hojas no se desarrollan o emergen de manera anormal siendo este el sitio más susceptible. Se demuestra también que los vapores de **Eptam** a concentraciones altas inhiben casi completamente el crecimiento de las hojas y tienen poco efecto en la constitución de las raíces adventicias de la corona y del primer internodo. Los espacios intercelulares son

reducidos y las filas lineales de células se pandean y enrollan. En malezas de hojas anchas se producen hojas con forma de copa con tejido necrosado alrededor de los bordes.

Gentner (1966) y Still *et al.* (1970) describen que el **Eptam** inhibe la salida de la cera del follaje en col y chicharos en forma proporcional con la concentración.

Wilkinson y Ashley (1978) observan que el **Eptam** incrementa los contenidos de clorofila  $\alpha$  y  $\beta$ , así como los carotenoides en plantas de trigo cultivadas bajo alta intensidad de luz.

Yamaguchi (1961) usando  $^{35}\text{S}$ -**Eptam** encuentra que tiene mucha movilidad en plantas. Aplicado en forma de vapor a las hojas, este rastreador revela que se absorbe y transloca simplásticamente en lima, frijol rojo arriñonado, maíz, remolacha y toloache.

Se han realizado diversos estudios para conocer la actividad fitocida del **Eptam** en diferentes estadios y zonas de las plantas. Oliver *et al.* (1968) detectan en raíces de cebada, trigo, avena, sorgo y cola de zorro gigante (*Setaria faberii*) la absorción de  $^{14}\text{C}$ -**Eptam**, notando que en ese orden incrementan su sensibilidad y concluyen que las diferencias en la tolerancia pueden estar asociadas con los sitios de absorción. Prendeville *et al.* (1967) determinan los efectos de **Eptam** aplicado en distintas zonas de los brotes bajo la superficie del suelo después de la emergencia de cebada, trigo, avena y sorgo. Trigo, cebada y avena son severamente dañados cuando el tratamiento se aplica al nodo coleoptilar, mientras que la exposición del resto del brote no afecta al crecimiento. El sorgo es muy alterado sin importar la zona del brote expuesto. Los autores consideran que las respuestas de crecimiento de las especies al **Eptam** aplicado a brotes dependen del estadio del desarrollo de la planta en que se verifica el tratamiento.

Parker (1966), Eshel y Prendeville (1967), Knake *et al.* (1967) y Prendeville *et al.* (1967) describen que cuando la absorción del **EPTAM** ocurre por el brote antes de emerger del suelo es más importante que por la raíz. Sin embargo, utilizando el método de barrera de carbón para prevenir el movimiento de vapor del **Eptam** en suelo, Gray y Weireich (1965) notan que en las raíces causa más daño en cebada, avena, "pasto de corral", pasto italiano (*Lolium multiflorum*), trigo, arroz, algodón, "yellow nutsedge" (*Cyperus rotundus*) pero en los brotes del pasto Johnson, sorgo y chicharos es más efectivo. En semillas a concentraciones tan bajas



como 1 ppm, aplicadas en solución, inhiben el crecimiento de los brotes de avena, cebada, sorgo y maíz.

Los herbicidas tiocarbámicos son rápidamente absorbidos por raíces, coleóptilos y brotes emergentes y translocados apoplásticamente y simplásticamente. Como estos herbicidas son normalmente aplicados al suelo se ha limitado el análisis principalmente a los efectos a nivel foliar. Sin embargo, como son rápidamente metabolizados por las plantas y los métodos utilizados usualmente no distinguen si es el herbicida aplicado o un metabolito es el que se está movilizando (Ashton y Crafts, 1981).

Ashton *et al.* (1963, 1977) demuestran en células de hojas de frijol que el Eptam a  $10^{-4}$ M (2.47 ppm) inhibe la síntesis de lípidos, RNA, proteínas, fotosíntesis y la respiración. A concentraciones más altas se observa un bloqueo mayor.

Mann *et al.* (1965) informan que el Eptam inhibe la incorporación del  $^{14}$ C-L-leucina en segmentos de coleóptilos de cebada o hipocotilos de *Sesbania exaltata*. A 2 y 5 ppm, bloquea la entrada en un 38% y 22% respectivamente en cebada y 14% y 11% en *Sesbania*.

Moreland *et al.* (1969) utilizando Eptam a  $10^{-4}$ M (2.47 ppm) en secciones de hipocotilo de frijol de soya, muestran una disminución del 24% en la síntesis de proteínas. Asimismo describen que el ácido giberélico en mitades de semilla de cebada es inhibida en 39% por  $6 \times 10^{-4}$  M de Eptam.

Gruenhagen y Moreland (1971) no encuentran daño en los niveles de ATP con Eptam en tejidos de hipocotilo de frijol de soya. Sin embargo, sugieren que no penetra de manera efectiva en el tejido.

Beste y Schreiber (1972) observan inhibición del crecimiento y de la síntesis de RNA en tejido de frijol de soya por Eptam.

Algunos de los síntomas de la toxicidad de este herbicida tiocarbámico son característicos de deficiencia del ácido giberélico (DAG): elongación de la lámina de las hojas, tallo quebradizo, atrofia y retorcimiento de la vaina de la hoja (Wilkinson y Ashley, 1978). Sin embargo, el DAG ha mostrado revertir la morfogénesis anormal del maíz dañado con Eptam

(Donald *et al.*, 1977; Donald, 1978). Posteriormente, Wilkinson y Ashley (1978) al investigar el efecto sobre la biosíntesis de DAG, demuestran que a 125 ppb en raíz de trigo se reduce 96% su contenido en los brotes y cuando se aplicó  $^{14}\text{C}$ -ácido mevalónico más Eptam a 250 ppb se evidencia que la incorporación de  $\text{C}^{14}$  en kaurenos (precursor de DAG) decrece 90%. Aunque estos resultados sugieren que el Eptam interfiere en la biosíntesis del DAG, los autores mencionan que no está claro que su mecanismo de acción sea reducir las concentraciones y los precursores del DAG.

Haciendo otras consideraciones se puede resumir que los mayores intereses desde el punto de vista ambiental en el uso de carbamatos, tiocarbamatos y compuestos relacionados, son:

- 1) Daño potencial a la salud por exposición ambiental.
- 2) Sinergismo y/o potenciación del daño a la salud con o por otros agentes ambientales.
- 3) Posible formación ambiental de más compuestos dañinos.

### **1.3 Sistemas de prueba para evaluación de daño genético**

En vista de que es difícil realizar experimentación directa sobre el hombre, se han implementado una serie de sistemas de evaluación de daño (bacterias, plantas, animales, etc.) que constituyen una batería de pruebas que permiten evaluar el riesgo que implican para el mismo (EMS, 1975).

Uno de estos sistemas lo constituyen los meristemos radiculares del haba (*Vicia faba*), ya que es un ensayo relativamente barato, de fácil manipulación que no requiere equipo sofisticado, las porciones meristemáticas poseen células en diferentes etapas de la mitosis. Tiene pocos cromosomas ( $2n=12$ ) y de gran tamaño, de los cuales un par son metacéntricos con largos satélites separados del resto del cromosoma por la constricción nuclear y 5 pares de subacrocéntricos de tamaño similar. Su ciclo celular es corto: a  $19\text{ }^{\circ}\text{C}$  dura 19.3 h, el período presintético ( $G_1$ ) es de 4.9 h, el sintético (S) 7.5 h y el postsintético ( $G_2$ ) de 4.9 h y la mitosis 2 h (Evans y Scott, 1964).

#### 1.4 Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH)

Los ICHs involucran un cambio simétrico en un *locus* dado entre cromátidas hermanas sin alterar la morfología del cromosoma (Perry y Evans, 1975). Este fenómeno es considerado como indicador de la presencia de lesiones en el DNA, por ello esta prueba ha sido utilizada para evaluar el efecto de mutágenos tanto *in vivo* como *in vitro* (Perry y Evans, 1975, Stetka y Wolff, 1976).

El ICH representa los productos de replicación de intercambio de DNA en aparente *loci* homólogos. Se considera que el proceso de intercambio implica rompimientos y uniones del DNA, aunque se conoce poco de sus bases moleculares.

Asimismo los ICHs han resultado ser una prueba rápida y sensible, ya que este fenómeno se induce con concentraciones hasta 10 veces menores que las requeridas para producir alteraciones cromosómicas (Wolff, 1974) y ofrece un método adecuado para la detección de mutágenos ambientales (Perry y Evans, 1975; Zhurkov y Yakovenko, 1976).

Para realizar la técnica del ICH se requiere necesariamente de la incorporación de 5-bromodesoxiuridina (BrdUrd), análogo de la timina, durante 2 ciclos de replicación, de tal manera que una cromátida estará bifilarmente substituída en su DNA (BB), mientras que su cromátida hermana estará unifilarmente substituída (TB) (Fig. 1), este hecho aunado a la tinción con el fluorocromo Hoescht 33258 más el colorante de Giemsa permite la tinción diferencial de los cromátidas hermanas y de esta manera detectar los intercambios que en ellos ocurren (Latt, 1974a).

La demostración citológica de que las cromátidas se segregan de manera semiconservadora es mediante el uso de la técnica de ICH (Taylor *et al.*, 1957).

Se ha propuesto que los ICH se forman por ruptura y unión de la polaridad estricta de 4 cadenas de DNA (Taylor, 1958).

Kihlman (1975) fue el primero en describir la frecuencia de ICH recíprocos involucrando material de dimensiones menores del diámetro total de la cromátida en *V. faba*. La ocurrencia de estos minúsculos ICH parecidos a puntos fueron analizados posteriormente en *Allium cepa*

(Schvartzman y Cortés, 1977; Schvartzman *et al.*, 1978; Cortés *et al.*, 1983 a, b) y se encuentra que estos intercambios subcromatídicos pueden tener 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Dichos intercambios diminutos son consecuencia de dos ICH adyacentes que han ocurrido en una proximidad muy cercana en el cromonema de la misma espiral (Ohnuki, 1968). Esto apoya la existencia de una ordenada estructura subcromatídica llamada cromonema.

Los ICH pueden ocurrir a todo lo largo del cromosoma dándose con más frecuencia en la eucromatina (replicación temprana) que en la heterocromatina (replicación tardía) (Carrano y Wolff, 1975; Schvartzman y Cortés, 1977; Friebe, 1978; Cortés y Hazen, 1981; Cortés *et al.*, 1983 b). También hay una breve tendencia de los ICH a ocurrir en las uniones de los bloques de eucromatina y heterocromatina (Carrano y Wolff, 1975; Friebe, 1978; Cortés, 1980; Ambros y Schweizer, 1986), siendo las uniones entre ellos los puntos críticos de los ICH (Schvartzman, 1987).

La cantidad de ICH es proporcional a la longitud del cromosoma, por lo que en las especies que presentan diferentes longitudes cromosómicas, muestran una mayor cantidad de ICH (Ikushima y Wolff, 1974; Bloom y Hsu, 1975; Kihlman y Andersson, 1982).

Se ha demostrado que el mayor incremento en la frecuencia de ICH se obtiene cuando la inducción de los daños coincide con el inicio de la fase S (Latt y Loveday, 1978; Schvartzman y Gutiérrez, 1980). Estas observaciones han conducido a la noción de que los ICH son formados como una consecuencia del daño en el DNA que altera el patrón de replicación.

En resumen, los ICH son una consecuencia de la alteración de los patrones de replicación del DNA que no conducen a la muerte de las células (Schvartzman, 1987).

Para la realización de un experimento de ICH, las curvas dosis-efecto deben incluir un testigo y al menos 3 dosis ascendentes, con una dosis máxima que sea un indicador del límite tóxico por ejemplo el índice mitótico reducido, la muerte celular o para estudios *in vivo*, la muerte del animal (Latt *et al.*, 1981).

Los datos que se han reportado sugieren que el análisis de ICH es útil, como una prueba para detectar mutágenos o carcinógenos (Latt *et al.*, 1981).

Los ICH son la demostración citogenética de un intercambio de doble banda entre dos moléculas idénticas de DNA que puede concebiblemente ocurrir al menos por 3 diferentes mecanismos:

- 1) Un intercambio de 2 cromátidas que han sido rotas en su doble cadena en sitios homólogos independientemente.
- 2) Un sistema de reparación que opera durante la replicación del DNA y no es escisión.
- 3) Un error de la replicación del DNA por si mismo.

El ICH es un fenómeno S dependiente (Wolff *et al.*, 1974), por lo tanto, la replicación del DNA es un prerequisite para que se efectúe. Esto sugiere que el ICH no es una manifestación de la reparación por escisión porque ésta ocurre en todo el ciclo celular, no solamente en la fase S.

Ahora generalmente se cree que la reparación post-replicación no está involucrada en los ICH.

#### **1.4.1 Modelo propuesto para explicar el origen de los Intercambios de Cromátidas Hermanas por Painter (1980).**

El modelo se fundamenta en experimentos con agentes que inhiben la síntesis de DNA y bloquean la elongación de la cadena tales como la mitomicina C, la luz UV y el benzo-a-pireno y predice que estos agentes que dañan al DNA de esta manera, son potentes inductores de ICH.

El esquema está de acuerdo con bases teóricas (estructura y replicación del DNA) y experimentales. Se basa en la idea de que los rompimientos de doble hebra, o sea de cada hebra progenitora, ocurren frecuentemente en las conjunciones de grupos de replicones adyacentes durante su replicación. Es decir que el ICH se origina en el punto de coincidencia de un replicón completamente duplicado y otro parcialmente duplicado donde se provoca la lesión generándose así un ICH.

Para la formación de los ICH debe existir un mal funcionamiento de las enzimas girasas que actúan detrás de la horquilla de replicación del DNA, las cuales fungen como endonucleasas específicas para ciertas secuencias de bases, rompiendo ambas hélices del DNA evitando la tensión durante la replicación, si estas enzimas no funcionan bien pueden romper ambas cromátidas y reunir las de manera intercambiada, produciendo así un ICH. Este fenómeno se ha observado en bacterias donde éstas enzimas son altamente específicas y el intercambio no implica ni deleciones ni duplicaciones, manteniendo intacto el genoma (Wolff, 1982). Aunque se ha sugerido que existen enzimas similares a las girasas bacterianas en las células de eucariontes, esto no ha sido comprobado (Wolff, 1981).

Existe reducción en la velocidad de desplazamiento de la horquilla de replicación del DNA, el cual genera 4 extremos libres (2 nacientes y 2 progenitores de un racimo de replicones completamente duplicados y opuestos a los extremos libres progenitores), del replicón adyacente que se encuentra parcialmente duplicado. Esto conduce a la conexión entre los grupos de replicones en los cuales un segmento duplicado se encuentra al lado de un segmento no duplicado (como es normal durante el periodo S en las uniones de la eucromatina y la heterocromatina), lo que sugiere que los rompimientos de la molécula de DNA de doble

banda en éstas conexiones son formados y reunidos de manera espontánea y el sellado quizás es catalizado por una topoisomerasa II, la cual ha sido localizada en diferentes eucariotes. Ocasionalmente en lugar de que se realice una reunión normal el rompimiento se sella por unión de las hebras hijas de una molécula replicada a las hebras progenitoras de la molécula no replicada (Fig. 2).

Una vez que esto ocurre, el ICH es iniciado cuando las hebras hijas nacientes de un grupo se combinan con las hebras progenitoras de un grupo parcialmente replicado y sólo cuando éstos terminan de duplicarse se genera totalmente el ICH. Este intercambio requiere de un solo evento, el rompimiento de doble hebra el cual es consistente con los datos que muestran que el ICH es producido en función lineal a la dosis de un agente (Carrano *et al.*, 1975; Perry y Evans, 1975).

Se propone que los ICH aparecen solo en la región del cromosoma donde estas subunidades se empalman, por 2 razones:

1) La frecuencia de ICH es siempre solamente una pequeña fracción de las lesiones inducidas en el DNA, ej. la LUV.

2) Se cree que el ICH espontáneo ocurre preferentemente en los empalmes entre subunidades estructurales y estos a su vez corresponden a las porciones entre eucromatina y heterocromatina (Carrano y Wolff, 1975; Bostock y Chriesti, 1976).

También importa para el modelo del ICH que la eucromatina replica de manera temprana y la heterocromatina lo hace de manera tardía en el periodo S. Agentes como la mitomicina C y la luz UV, inhiben la síntesis de DNA principalmente por bloqueo en la elongación de la cadena y sus efectos ocurren en los grupos de replicones que están en varios estadios de terminación (Carrano *et al.*, 1975; Perry y Evans, 1975).

## 1.5 ICH en plantas

El estatus de *Vicia faba* a través del tiempo es de una planta muy sensible para detectar mutágenos ambientales que causan aberraciones cromosómicas e ICH (Khilman, 1977) y por sus cromosomas grandes con un alto contenido de DNA, que son adecuados por retener buena visibilidad bajo condiciones de hidrólisis extensa.

Ha sido mostrado que *Vicia* es sensible tanto a compuestos simples como mezclas complejas haciéndola confiable como bioindicador y biomonitor (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995).

Hault y Taylor (1967) describen que la incorporación de BrdUrd no es tan fácil en plantas como en cultivos de células de los mamíferos. Esto puede deberse al mayor tamaño de las reservas del ribonucleótido trifosfato de las células de las plantas superiores.

Los meristemos son expuestos a una mezcla nucleotídica que contiene 5-Bromodesoxiuridina (BrdUrd), 5-Fluorodesoxiuridina (FrdUrd) y Uridina (Urd) por un período que corresponde a un primer ciclo de replicación de DNA. Durante un segundo ciclo de replicación, las raíces son colocadas nuevamente en una solución fresca de análogos, para obtener cromátidas hermanas con una constitución TB-BB (Fig. 1).

El análisis de ICH en plantas superiores con la tinción de Feulgen fue descrita por Tempelaar *et al.* (1982). Con ésta técnica no es necesario el uso del fluorocromo Hoescht 33258 que se utiliza para linfocitos y como el reactivo de Feulgen es específico para DNA, no se requieren las enzimas para remover el RNA del citoplasma que antes era teñido y dificulta una óptima visualización (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995).

La reacción Feulgen-Schiff está basada en la conversión ácido-catalizada del DNA al polialdehído ácido apurínico, seguido de la tinción de estos aldehídos con el reactivo de Schiff. Se sabe que la intensidad de la tinción está influenciada por factores tales como tipo de fijación, pH, proceso de hidrólisis, composición del reactivo de Schiff y la compactación de la cromatina (Duijndam y van Duijn, 1975a).



La resistencia de la pared celular a ser macerada en monocapa puede evitarse usando enzimas y ácidos que ablandan el tejido (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1995).

### 1.6 ICH en plantas vs ICH en mamíferos

Zhang *et al.* (1991) hacen una comparación entre ICH de plantas y de mamíferos con el fin de observar su capacidad de detectar mutágenos, así como para proveer un método más simple y barato. Se prueban con etanol, óxido de cromo, sacarina sódica, fluorouracil, ácido ascórbico, ometoato y fenol. Los resultados indican que todos los productos químicos, excepto el ácido ascórbico, incrementan los niveles de ICH en células de linfocitos humanos, en células de bazo de ratón y en células de plantas. La cantidad de ICHs por célula en plantas corresponden a las observadas en células de animales. Para algunos agentes químicos las plantas son más sensibles.

La utilización de ICH en plantas es una técnica simple y barata para detectar agentes potencialmente mutagénicos en el ambiente, es uno de los métodos citológicos más sensibles para evidenciar daño en el DNA inducido por factores ambientales y por muchos años el análisis de las frecuencias de ICH ha sido aceptado como un método para detectar mutágenos y carcinógenos (Kato, 1974; Latt, 1974; Perry y Evans, 1975; Gómez-Arroyo y Villalobos Piertrini, 1995).

Los rangos de ICH en *Vicia faba* son más altos que los de linfocitos humanos, aunque son aproximados para la mayoría de los mutágenos, lo que indica que los cromosomas de ambos son tan sensibles a los mismos mutágenos en la inducción de ICH (Xing y Zhang, 1990).

Así la prueba de ICH en plantas es un ensayo citogenético para determinar varios agentes químicos que son mutágenos y/o carcinógenos y que pueden dañar el DNA de células humanas. Sin embargo, debido a las diferencias en los metabolismos vegetal y animal, cualquier ensayo de prueba usando el sistema de plantas debe ser verificado en el sistema celular humano para conclusiones finales (Xing y Zhang, 1990).

## **Ventajas de los bioensayos genéticos en plantas superiores para probar y monitorear contaminantes ambientales**

1. Las plantas superiores (en este caso *Vicia faba*) son organismos eucariotes.
2. Son fáciles de cultivar y de bajo costo.
3. Se obtienen generaciones celulares en corto tiempo.
4. No requiere de material estéril ni equipo sofisticado.
5. Pueden ser utilizadas para evaluar genotoxicidad desde agentes químicos sencillos hasta mezclas complejas.
6. La técnica de Feulgen para la tinción diferencial es corta y menos complicada que la usada para mamíferos, además se logra buena tinción y los resultados son muy reproducibles.
7. Se pueden hacer monitoreos *in situ* de contaminantes mutagénicos.
8. Varios estudios han demostrado una correlación positiva con ensayos citogenéticos en mamíferos.
9. Las plantas superiores pueden combinarse con ensayos microbianos y células de mamíferos para detectar mutágenos.

## II. OBJETIVOS

Debido a que se ha incrementado el uso de plaguicidas en el mundo así como en México y dado que los efectos que provocan se hacen más trascendentes cuando alteran los niveles heredables y a que lamentablemente en el hombre el efecto sólo se detecta cuando éste ha ocurrido. En éste trabajo, empleando como sistema de prueba a *Vicia faba*, se evaluó el daño citogenético provocado por dos herbicidas carbámicos ampliamente usados en la agricultura, principalmente en el Norte de la República Mexicana, el **Eptam** y el **Asulam**, mediante el análisis de intercambios de cromátidas hermanas.

## III. MATERIAL Y METODOS

### 3.1 Características fisicoquímicas del herbicida carbámico Asulam

Fórmula:



Nombre común: **Asulam, Asulame, Asulox.**

Nombre químico: (IUPAC) metil sulfanilcarbamato

metil 4-aminofenilsulfonilcarbamato.

metil 4-aminobencenosulfonilcarbamato.

(CA) metil [(4-aminofenil)sulfonil]carbamato

**asulam-sodio.**

Nombre comercial: **Asulox.**

Peso molecular: 230

Puro: cristales incoloros

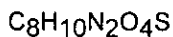
## II. OBJETIVOS

Debido a que se ha incrementado el uso de plaguicidas en el mundo así como en México y dado que los efectos que provocan se hacen más trascendentes cuando alteran los niveles heredables y a que lamentablemente en el hombre el efecto sólo se detecta cuando éste ha ocurrido. En éste trabajo, empleando como sistema de prueba a *Vicia faba*, se evaluó el daño citogenético provocado por dos herbicidas carbámicos ampliamente usados en la agricultura, principalmente en el Norte de la República Mexicana, el **Eptam** y el **Asulam**, mediante el análisis de intercambios de cromátidas hermanas.

## III. MATERIAL Y METODOS

### 3.1 Características fisicoquímicas del herbicida carbámico Asulam

Fórmula:



Nombre común: **Asulam, Asulame, Asulox.**

Nombre químico: (IUPAC) metil sulfanilcarbamato

metil 4-aminofenilsulfonilcarbamato.

metil 4-aminobencenosulfonilcarbamato.

(CA) metil [(4-aminofenil)sulfonil]carbamato

**asulam-sodio.**

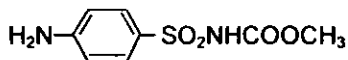
Nombre comercial: **Asulox.**

Peso molecular: 230

Puro: cristales incoloros

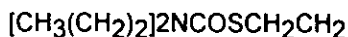
Punto de fusión: 143 - 144 °C

Solubilidad: Escasamente soluble en agua, soluble en acetona y metanol.



### 3.2 Características fisicoquímicas del herbicida tiocarbámico Eptam

Fórmula:



Nombre común: **Eptam**

Nombre químico: (IUPAC) etildipropiltiocarbamato

(CA) S-etildipropilcarbamoato

Nombre comercial: **Eptam**, eradicane, eptc.

Puro: líquido amarillo.

Olor: aromático, característico de los tiocarbámicos.

Punto de ebullición: 127 °C a 27 mbar.

Presión de vapor: 4.7 mbar a 25 °C.

Densidad: 0.9546 gr/L.

Solubilidad: miscible en disolventes orgánicos

Se recomienda no sembrar cultivos susceptibles por lo menos 6 meses después de la aplicación.

Moderadamente persistente y peligroso. Tóxico a peces, mamíferos y aves.

### 3.3 Tratamientos de las raíces de *Vicia faba*

Se utilizaron semillas de *Vicia faba* (var. *minor*) las cuales se lavaron en agua corriente durante dos horas, para la eliminación de esporas de hongos. Posteriormente se sumergieron en agua durante 24 h en obscuridad a temperatura de 21 °C, esto con el fin de acelerar la germinación, al término de dicho tiempo se volvieron a lavar y se colocaron entre dos capas de algodón húmedo, se mantuvieron en la obscuridad hasta que aparecieron las radículas, en ese momento se les retiró la testa para tener mayor control sobre la posible contaminación por hongos.

Cuando las raíces tuvieron de 1.5 a 2.5 cm de longitud (tamaños en que se presentó el mayor índice mitótico) se acomodaron cada una en un tubo de ensaye con una solución fresca de análogos BrdUrd 10 µM, 5-FrdUrd 0.1 µM y Urd 5 µM, durante 20 h en obscuridad que es el tiempo que corresponde al primer ciclo de replicación para obtener cadenas unifilarmente substituidas (T-B, T-B).

Posteriormente fueron tratadas durante 2 horas con concentraciones de 10, 50, 100, 200, 300, 500 y 1000 ppm de **Asulam** y 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0 y 10 ppm de **Eptam**; se emplearon 10 raíces por concentración y se pusieron en un vaso de precipitados con una tapa de papel aluminio con orificios suficientes para poner a las raíces en contacto con la solución. El testigo se mantuvo en las mismas condiciones experimentales pero con las raíces en contacto con agua destilada.

Debido a que las raíces de *Vicia faba* no incorporan suficiente BrdUrd, el análogo de la timina, no permite la diferenciación en las cromátidas hermanas y para incrementar su incorporación es necesario la adición de un análogo de la uridina que suprime la síntesis de ácido timidílico, siendo utilizada la 5-FrdUrd (Kihlman y Andersson, 1982), que evita la incorporación de timina en el DNA debido a que inhibe la síntesis *de novo* (Uggla y Natarajan, 1982), de la enzima timidilato sintetasa, que cataliza la metilación de ácido uridílico en ácido timidílico. También se añade Urd para contrarrestar cualquier efecto adverso de la FrdUrd sobre la síntesis de RNA (Kihlman y Andersson, 1982).

### 3.4 Fijación y tinción

Después del tratamiento, las raíces de cada lote se colocaron en una solución fresca de BrdUrd, FdrUrd y Urd durante un segundo ciclo de replicación (20 h). Obteniéndose cadenas bifilarmente substituídas (TB-BB). Posteriormente se hicieron cortes de raíz de aproximadamente 2 mm y se pusieron en colchicina al 0.05 % en oscuridad por 3 h.

La fijación se llevó a cabo en ácido acético al 100% durante 1 hora a 21 °C; se deshidrataron en etanol-acido acético (3:1) a 20 °C durante 48 h, posteriormente se sumergieron en etanol al 70% por 15 minutos.

Existen una serie de adaptaciones para las células vegetales, en la cual se usa como colorante del DNA, el reactivo de Feulgen para contrastar las cromátidas hermanas, en este procedimiento es muy importante la hidrólisis de DNA con HCl para obtener tinción diferencial (Tempelaar *et al.*, 1982). La despolimerización de DNA, que es una despurinación, se realiza para que la cromatina compacta se convierta en cromatina difusa (Duijndam y van Duijn, 1975b). La BrdUrd tiene una fuerte afinidad por las proteínas, comparada con la timina contenida en el DNA (Gordon *et al.*, 1976).

Se hidrolizaron en HCl 5N durante 80 minutos en baño María a 28 °C; se lavaron las raíces con agua destilada por lo menos 3 veces y se tiñeron con el reactivo de Schiff (tinción de Feulgen) durante 30 minutos en la oscuridad.

Las raíces se trataron con pectinasa al 2% disuelta en amortiguador de citratos a pH 4.7 durante 15 minutos a 28°C (esto con el fin de romper la pared celular). Después se colocaron en ácido acético al 45% por 10 minutos y finalmente se transfirieron a etanol frio al 70% por 30 minutos (Tempelaar *et al.*, 1982).

Se realizó un aplastamiento en monocapa del tejido ("squash") utilizando ácido acético al 45% y se hicieron preparaciones permanentes con la técnica del hielo seco (Conger y Fairchild, 1953) deshidratando con dos cambios de butanol y se montaron en bálsamo de Canadá.

El registro de los ICH para cada concentración de los plaguicidas fue analizada en 50 cromosomas metacéntricos (M) y 250 subacrocéntricos (S), que son los correspondientes a los

cromosomas contenidos en 25 células. En los registros los intercambios terminales se cuantificaron como un evento y los intersticiales como dos. Para efectuar las observaciones al microscopio y evitar el prejuicio del observador, las preparaciones fueron reetiquetadas con clave desconocida. Para comprobar la validez de los resultados se efectuaron dos o más repeticiones. Asimismo se fueron elevando las concentraciones hasta obtener las finales.

### **3.5 Análisis estadístico**

A los datos obtenidos para cada concentración se les aplicó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls para verificar la existencia de diferencias significativas con respecto al testigo de cada compuesto (Tablas III y IV).



#### IV. RESULTADOS

En la tabla III y en la figura 3 se evidencia que en la primera concentración de **Asulam** (10 ppm) no hay incremento con respecto al testigo, pero al ir aumentando la concentración se eleva también la respuesta para la inducción de ICH obteniéndose el valor máximo con 100 ppm y a partir de ésta decrece hasta causar la muerte celular en 500 ppm, pasando primero por un deterioro en las células y en el tejido de la raíz a partir de 100 ppm. Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y los grupos de tratamiento por análisis de varianza  $F=61.807$  y al aplicar la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls con  $p<0.001$ .

Con éste producto se determinaron inmediatamente las concentraciones que fueron utilizadas para el ensayo usándose primeramente 10, 50 y 100 ppm para posteriormente elevarlas a 200, 300, 500 y 1000 ppm.

Los resultados obtenidos con el **Eptam** expresados en la tabla IV y en la figura 4 muestran que a partir de 1 ppm hay un incremento significativo en la frecuencia de ICH con respecto al valor del testigo hasta 2 ppm, pero desde 2.5 van disminuyendo, aunque también son significativas, hasta provocar inhibición de la división celular. Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y los grupos de tratamiento por análisis de varianza  $F=144.40$  y al aplicar la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls con  $p<0.001$ .

Con este compuesto se tuvieron que realizar diversos ensayos, debido a que no se encontró inmediatamente las dosis adecuadas para la utilización de la técnica, primero se usaron concentraciones de 10, 50 y 100 ppm, pero únicamente se observaron células en primera división, se hicieron 2 ensayos más con las mismas concentraciones, las cuales repetían lo antes descrito, por ésta razón se optó por probar las concentraciones de 1.0, 1.5 y 2.0 ppm y al obtener respuesta significativa en dichas concentraciones se decidió aumentar a 2.5 y 5.0 ppm y realizar las repeticiones para corroborar los resultados.

## V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Al hacer una comparación de la actividad de los dos herbicidas, el **Eptam** resultó ser mas efectivo en la inducción de ICH que el **Asulam**.

Los niveles basales de los testigos del **Eptam** y del **Asulam** son sumamente cercanos 33.76 y 32.99 respectivamente, que coinciden con los encontrados por Kihlman y Andersson (1982) y por Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini (1995) cuyos promedios varían entre 28 y 32 ICH por célula.

Los resultados obtenidos con el **Asulam** y el **Eptam** (Tablas III y IV y Figs. 3 y 4) muestran un comportamiento de concentración-efecto, asimismo en todos los casos (excepto con **Asulam** a 10 ppm) se observan diferencias significativas con respecto al testigo con  $p < 0.001$ , al aumentar la concentración se incrementan las frecuencias de ICH hasta llegar a su máximo valor y posteriormente comenzar a disminuir. Lo anterior permite considerarlos como agentes químicos eficientes en la inducción de ICH de acuerdo con el criterio de Latt *et al.* (1981).

Shirasu *et al.* (1976) notan que el **asulam** no es mutagénico en *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Coballase (1997) al realizar un estudio en *Salmonella typhimurium* con las cepas TA98 y TA100 con y sin activación metabólica vegetal (*Nicotiana tabacum*) y con la fracción enzimática S9 animal, empleando la prueba de Ames con **Eptam** y **Asulam** encuentra resultados negativos tanto en forma directa como cuando son aplicados ambos metabolismos.

Lo descrito anteriormente no coincide con los datos obtenidos en éste estudio, debido a que el resultado negativo en las cepas bacterianas puede deberse a diferencias en el metabolismo con respecto a *V. faba*, la cual presenta la fracción enzimática S10, formándose diferentes compuestos que actúan a nivel del DNA induciendo los ICHs. Contradiendo a lo descrito por Casida *et al.* (1975) y Fuerst (1987) respecto a la baja toxicidad del primer metabolito del **Eptam** (sulfóxido), Lamoreaux y Russness (1987) encuentran que éste presenta acción alquilante que daña al DNA produciendo mutaciones, detectables mediante la prueba de ICHs y aunque no se ha descrito esto en el **Asulam**, pudiera ser el mismo mecanismo.

Gray y Weirich (1969) describen que se requieren concentraciones bajas de Eptam para inhibir el crecimiento de avena, cebada, sorgo y maíz, así como el crecimiento y la síntesis de RNA en frijol de soya (Beste y Schreiber, 1972), datos que concuerdan con el presente trabajo, ya que se necesitaron concentraciones bajas (1 ppm) para obtener efecto en la inducción de ICH y en dosis altas (10 ppm) se provoca inhibición de la división celular.

La técnica de Feulgen para la tinción diferencial de los cromosomas de plantas es corta y menos complicada que la técnica de fluorescencia más Giemsa; además, la diferenciación de cromátidas hermanas es buena y los resultados son reproducibles (Gómez-Arroyo *et al.*, 1988 a, b; Gerster y Grant, 1989).

Otra ventaja del ensayo cromosómico de *Vicia* es que es una prueba *in vivo* de un organismo eucarionte completo. Así, de ésta manera es importante mencionar que *Vicia* como sistema de prueba también tiene una fracción metabólica S-10 que convierte promutágenos en mutágenos (Takehisa y Kanaya, 1983; Takehisa *et al.*, 1988; Gómez-Arroyo *et al.*, 1995). Este aspecto es significativo porque muchos agentes químicos no son mutagénicos por sí mismos, pero se activan por medio de la transformación metabólica vegetal. Así, un promutágeno o mutágeno indirecto es convertido en un mutágeno a través de la activación metabólica animal o vegetal (Plewa y Gentile, 1976, 1982).

Se ha encontrado que la frecuencia de ICH en plantas es muy incrementada por tratamientos con agentes físicos y químicos usados también en células animales *in vitro* e *in vivo* (Takehisa *et al.*, 1982). Se llegó a ésta conclusión por el empleo de 12 agentes químicos (actinomicina D, NF-133, bensultap, tiociclám, dimehípo, ometoato, monocrotofos, benzidina y benzoato de sodio). Aunque se conoce muy poco acerca del mecanismo de formación del ICH, los estudios sugieren que la prueba con ICH en plantas puede proveer una herramienta poderosa para detectar una gran variedad de agentes químicos o físicos dañinos al DNA (Xing y Zhang, 1990; Zhang *et al.*, 1991).

La cantidad de ICH se sabe que es afectada por gran variedad de factores celulares internos y externos. La frecuencia de distribución de los ICH en los cromosomas o en las células siguen las expectativas de Poisson (Wolff y Perry, 1974; Schwartzman y Cortés, 1977).

Sin embargo, en la mayoría de las publicaciones la media y la varianza son calculadas como si los ICH siguieran una distribución normal (Gómez-Arroyo *et al.*, 1992b). Dufrain *et al.* (1979) y Worthon *et al.* (1984) basándose en estas observaciones y en otras similares sugieren que los datos de ICH deberían ser analizados utilizando métodos estadísticos de análisis de varianza. Por ello en este trabajo se aplica un análisis de varianza (ANOVA) así como la comparación múltiple de Newman Keuls.

Es importante hacer mención de que al aplicar **Asulam** en caña de azúcar no se recomienda dar como forraje al ganado, sin embargo para el consumo humano no se hace especificación alguna sobre el manejo del mismo.

Como puede esperarse del uso del **Eptam** y del **Asulam** en la agricultura extensiva, en la industria y, en menor proporción, en usos veterinarios, la exposición humana puede ser inevitable. Esto puede ocurrir durante la mezcla/carga para aplicación en el campo, por la cosecha tratada o mediante el uso en casa. Además de la parte ocupacional, la población a la larga puede ser afectada por el consumo de vegetales, frutos, tabaco y bebidas que contengan residuos de plaguicidas.

## VI REFERENCIAS

- ACGHI. (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). 1977. Documentation of the Threshold Limit Values for Substances in Workroom Air. 3a. ed.
- Ahmed, F. E., Hart, R. W. y Lewis, N. J. 1977. Pesticide induced DNA damage and its repair in culture human cells. *Mutat. Res.* **42**: 161-174.
- Akulov, A.A.V., Verkhovskiy, A.P. y Yevdokimov, S.M. 1972. Triallate poisoning of animals. *Veterinariya* **10**: 105-106.
- Ambros, P. y Schweizer, D. 1986. Euchromatin-heterochromatin junctions are sister chromatid exchange (SCE) hot-spots. En: P.E. Brandham y M.D. Bennett (Eds.). *Kew Chromosome Conference II*, Allen Unwin, Londres, 326 p.
- Ashton, F. M. 1963. Effect of EPTC on photosynthesis, respiration and oxidative phosphorylation. *Weeds* **11**: 295-297.
- Ashton, F. M., de Villiers, O. T., Glenn, R. K. y Duke, W. B. 1977. Localization of metabolic sites of activation of herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**: 122-141.
- Ashton, F. M. y Crafts, A. S. 1981. **Mode of Action of Herbicides**. 2a ed. Wiley, Nueva York.
- Barberá, C. 1975. **Pesticidas agrícolas**. Omega, Barcelona. 425 p.
- Barthel, E. 1981. Increased risk of lung cancer in pesticide-exposed male agricultural workers. *J. Toxicol. Environ. Health* **8**: 1027-1040.
- Beattie, K. L. 1975. N-nitrosocarbaryl-induced mutagenesis in *Haemophilus influenzae* strains deficient in repair and recombination. *Mutat. Res.* **27**: 201-217.
- Beste, C. E. y Schreiber, M. M. 1972. RNA synthesis as the basis for EPTC and 2,4-D antagonism. *Weed Sci.* **20**: 8-11.

- Bionetics Research Laboratories. 1968. **Evaluation of Carcinogenic, Teratogenic and Mutagenic Activities of Selected Pesticides Industrial Chemicals**. Vol. 1 Carcinogenic Study. NTIS Publ. No PB-223159, National Technical Information Service, Springfield, Virginia.
- Blevins, R. D., Lee, M. y Regan, J. D. 1977a. Mutagenicity screening of five methyl carbamate insecticides and their nitroso derivates using mutants of *Salmonella typhimurium* LT<sub>2</sub>. *Mutat. Res.* **56**: 1-6.
- Blevins, R. D., Lijinski, W. y Regan, J. D. 1977b. Nitrosated methylcarbamate insecticides: effect on the DNA of humans cells. *Mutat. Res.* **44**: 1-7.
- Bleyl, D. W. R. y Lewerenz, H. J. 1978. Zur teratogen Wirkung von Propylenthioharnstoff bei Ratten. *Monatshefte Veterinarmed* **33**: 137-139.
- Bloom, S. E. y Hsu, T. C. 1975. Differential fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5-bromodeoxyuridine. *Chromosoma* **51**:261-267.
- Bostock, C.J. y Christie, S. 1976. Analysis of the frequency of sister chromatid exchange in different regions of the kangaroo rat (*Dipodomys ordu*) *Chromosoma* **56**: 270-285.
- Carrano, A. V., Thompson, L. H., Lindl, P. A. y Mixtler, J.L. 1975. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* **227**: 551-585.
- Carrano, A. V. y Wolff, S. 1975. Distribution of sister-chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian muntjac. *Chromosoma* **53**: 361-369.
- Carrano, A. V. y Thompson, L. H. 1982. Sister chromatid exchange and single gene mutation. En: S. Wolff (Ed.). **Sister chromatid exchange**. Wiley, Nueva York, pp. 59-86.
- Carringer, R.D., Rieck, C.E. y Bush, L.P. 1978. Metabolism of EPTC in corn (*Zea mays*). *Weed Sci.* **26**: 157-160.

- Casida J.E., Kimmel, E.C., Ohkawa, H. y Ohkawa, R. 1975. Sulfoxidation of thiocarbamate herbicides and metabolism of thiocarbamate sulfoxides in living mice liver enzyme systems. *Pestic. Biochem. Physiol.* **5**: 1-11.
- Cheng, M. y Conner, M. K. 1982. Comparison of sister chromatid exchange induction and known carcinogenic activities of vinyl and allyl carbamates. *Cancer Res.* **42**: 2165-2167.
- Cheng, Y. S. y Casida, J. E. 1978. Thiocarbamate herbicide metabolism: microsomal oxygenase metabolism of EPTC involving mono and dioxygenation at the sulfur and hydroxylation at each alkyl carbon. *J. Agric. Food. Chem.* **26**: 263-267.
- Coballase Urrutia, E. 1997. El metabolismo vegetal y animal en la expresión mutagénica de algunos herbicidas carbámicos. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F. 56 p.
- Conger, A. D. y Fairchild, L. M. 1953. A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain. Technol.* **28**: 28-283.
- Cortés, F. 1980. Occurrence of sister-chromatid exchanges at euchromatin-C band junctions in *Allium cepa* chromosomes. *Experientia* **36**: 1290-1291.
- Cortés, F. y Hazen M. J. 1981. Suppression of dot-like exchanges in C-bands and late replicating DNA-rich regions of chromosomes. *Experientia* **37**: 695-696.
- Cortés, F., Escalza, P., Rodríguez-Higueras J. M. y Muñoz-García, J. 1983a. Frequency and distribution of spontaneous and induced SCEs in BrdU-substituted satelized chromosomes of *Allium cepa*. *Mutat. Res.* **109**: 249-257.
- Cortés, F., Escalza, P. y Rodríguez-Higueras, J. M. 1983b. Insight of plant chromosome structure provided by the FPG technique. *Exp. Cell. Res.* **147**: 221-225.

- Csukás, I., Gungl, E., Antoni, F. y Vida, G. 1981. Role of metabolic activation in the sister chromatid exchange-inducing activity of ethyl carbamate (urethane) and vinyl carbamate. *Mutat. Res.* **89**: 313-316.
- Dawson, J. H. 1963. Development of banyardgrass seedlings and their response to EPTC. *Weeds* **11**: 60-66.
- Debuyst, B. y Larebeke, N. V. 1983. Induction of sister chromatid exchange in human lymphocytes by aldicarb, thiophanox and methomyl. European Environmental Mutagen Society (abstract). *Mutat. Res.* **113**: 242-243.
- De Lorenzo, F., Staiano, N., Silengo, L. y Cortese, R. 1978. Mutagenicity of diallate, sulfallate, and triallate and relationship between structure and mutagenic effects of carbamates used widely in agriculture. *Cancer Res.* **38**: 13-15.
- Diccionario de Especialidades Agroquímicas. 1997. Ediciones PLM, México. 1172 p.
- Donald, W. W., Harvey, R. G. y Fawcett, R. S. 1977. The role of gibberellins in the abnormal morphogenesis of EPTC injury to corn seedlings. *WSSA (Abstr.)*, p. 92.
- Donald, W. W. 1978. The role of gibberellins in EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) injury to corn (*Zea mays* L.). *Dissertation Abstr. Internat. B.* **38**: 3985-3986
- Douglas, G.R., Nestman, E.R., Grant, C.E., Bell, R.D.L., Wytsma, J.M. y Kowbel, D.W. 1981. Mutagenic activity of diallate and triallate determined by a battery of *in vivo* mammalian and microbial tests. *Mutat. Res.* **85**: 45-56.
- Dufraín, R., Littlefield, L. G. y Wilmer, J. 1979. Cyclophosphamide-induced SCEs in rabbit lymphocytes. *Environ. Mutagen.* **1**: 283-286.
- Duijndam, W. A. y van Duijn, P. 1975a. The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Schiff procedure studied in model films. I. Theoretical



- kinetics and experiments with films containing isolated deoxyribonucleic acid. *J. Histochem. Cytochem.* **23**: 882-890.
- Duijndam, W. A. L. y van Duijn, P. 1975b. The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Schiff procedure studied in model films. II. Investigations on films containing condensed or swollen chicken erythrocyte nuclei. *J. Histochem. Cytochem.* **23**: 891-900.
- Dulout, F. N., Olivero O. A. y Pastori, M. C. 1982. The mutagenic effect of thiram analysed by the micronucleus test and the anaphase-telophase test. *Mutat. Res.* **105**: 409-412.
- Ecobichon, D. F. y Joy, R. 1984. **Pesticides and neurological disease**. CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 285-310.
- Egert, B. y Greim, H. 1976. Formation of mutagenic N-nitroso compounds from the pesticides prometryne, dodine and carbaryl in the presence of nitrite at pH 1. *Mutat. Res.* **37**: 179-186.
- Eisenbrand, G., Ungerer, O. y Preussmann, R. 1975. The reaction of nitrite with pesticides. II. Formation, chemical properties and carcinogenic activity of the N-nitroso derivatives of N-methyl-1-naphthylcarbamate (carbaryl). *Food Cosmet. Toxicol.* **13**: 365-367.
- Eisenbrand, G., Schmäl, D. y Preussmann, R. 1976. Carcinogenicity in rats of high oral doses of N-nitrosocarbaryl, a nitrosated pesticide. *Cancer Lett.* **1**: 181-284.
- EMS (Environmental Mutagen Society) 1975. Environmental mutagenic hazards. *Science* **187**: 503-514.
- Environmental Health Criteria. 1988. **Thiocarbamate pesticides. A general introduction (76)**. World Health Organization, Ginebra.

- Epstein, H. J., Arnold, E., Andrea, J., Bass, W. y Bishop, Y. 1972. Detection of chemical mutagens by the dominant lethal assay in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **23**: 288-325.
- Eshel, Y. y Prendeville, G. N. 1967. A technique for studying root vs shoot uptake of soil-applied herbicides. *Weed Res.* **7**: 242-245.
- Eto, M., Seifert, J., Engel, J. L. y Casida, J. E. 1980. Organophosphorus and methyl carbamate teratogens: structural requirements for inducing embryonic abnormalities in chickens and kynurenine formamidase inhibition in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **54**: 20-30.
- Evans, H. J. y Scott, D. 1964. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by x-rays and maleic hidrazide in *Vicia faba*. *Genetics* **49**: 17-38.
- Fang, S.C., George, M. y Freed, V.H. 1964. Metabolism of herbicides: the metabolism of S-propyl-1-14C-nn-butylethylthiocarbamate (tillam 14C) in rats. *J. Agric. Food Chem.* **12**: 37-40.
- Friebe, B. 1978. Analysis of sister-chromatid exchange (SCE) in *Secale cereale*. *Microsc. Acta* **81**: 159-165.
- Fuerst, E. P. 1987. Understanding the mode of action of the chloroacetamide and thiocarbamate herbicides. *Weed Technol.* **1**: 270-277.
- Fukuto, T.R. 1972. Metabolism of carbamate insecticides. *Drug. Metab. Rev.* **1**: 117-150.
- Gentile, J., Gentile, G., Bultman, J., Sechriest, R., Wagner, E. y Plewa, M. 1982. An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* **101**: 19-29.
- Gentner, W. A. 1966. The influence of EPTC on external foliage wax deposition. *Weed Sci.* **14**: 27-30.

- Gerster, J. L. y Grant, W. F. 1989. A cytogenetic study of factors affecting sister chromatid differentiation in *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*. *Cytologia* **48**: 523-537.
- Gómez-Arroyo, S., Hernández-García, A. y Villalobos-Pietrini, R. 1988a. Induction of sister chromatid exchanges in *Vicia faba* by arsenic-contaminated drinking water. *Mutat. Res.* **208**: 219-224.
- Gómez-Arroyo, S., Castillo-Ruiz, P., Cortés-Eslava, J. y Villalobos-Pietrini, R. 1988b. *Vicia faba* sister chromatid exchange of the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, oxydemeton methyl, azinphos methyl and phoxim. *Cytologia* **53**: 627-634.
- Gómez-Arroyo, S., Rodríguez-Madrid, L. y Villalobos-Pietrini, R. 1992a. Chromosomal alterations induced by the thiocarbamate herbicide molinate (ordram) in *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **8**: 77-80.
- Gómez-Arroyo, S., Noriega-Aldana, N., Osorio, A., Galicia, F., Ling, S. y Villalobos-Pietrini, R. 1992b. Sister-chromatid exchange analysis in a rural population of Mexico exposed to pesticides. *Mutat. Res.* **281**: 173-179.
- Gómez-Arroyo, S. y Villalobos-Pietrini, R. 1995. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change**, En: F.M. Butterworth, L. D. Corkum y J. Guzmán-Rincón (Eds.), Plenum Press, Nueva York, pp. 95-113.
- Gómez-Arroyo, S., Calderón-Segura, M. E. y Villalobos-Pietrini, R. 1995. Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutagen.* **26**: 324-330.
- González-Cid, M. y Matos, E. 1984. Induction of sister chromatid exchanges in culture human lymphocytes by aldicarb, a carbamate pesticide. *Mutat. Res.* **138**: 175-179.

- González-Cid, M. y Matos, E. 1987. Chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes treated with aldicarb, a carbamate pesticide. *Mutat. Res.* **191**: 9-103.
- Gordon, J.S., Bell, G. I., Martinson, H.C. y Rutter, W.J. 1976. Selective interaction of 5-bromodeoxyuridine substituted DNA with different chromosomal proteins. *Biochemistry* **15**: 4778-4786.
- Grant, W. F., 1973. Cytological effects of environmental mutagens-pesticides. *Mutat. Res.* **21**: 221-222.
- Gray, R. A. y Weierich, A. J. 1969. Importance of root, shoot and seed exposure on the herbicidal activity of EPTC. *Weed Sci.* **17**: 223-229.
- Gruenhagen, R. D. y Moreland, D. E. 1971. Effect of herbicides on ATP levels in excised soybean hypocotyls. *Weed Sci.* **17**: 223-229.
- Hault, W. F. y Taylor, J. H. 1967. Studies of bromouracil deoxyriboside substitution in DNA of bean roots (*Vicia faba*). *J. Mol. Biol.* **26**: 389-401.
- Hayes, W. J. y Lewis, E. R. 1991. **Handbook of Pesticide Toxicology. Classes of Pesticides.** Vol. 3 pp. 1346.
- Hoque, M. Z. 1972. Carbaryl a new chemical mutagen. *Curr. Sci.* **41**: 855-856.
- Hubell, J. P. y Casida, J. E. 1977. Metabolic fate of the N, N-diakylcarbomoyl moiety of thiocarbamate herbicide in rats and corn. *J. Agric. Food Chem.* **25**: 404-413.
- IARC. 1976. Diallylate. In: **some carbamates, thiocarbamates, and carazides.** Lyons, International Agency for Research on Cancer, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. pp. 69-75.
- Ikushima, T. y Wolff, S. 1974. Sister-chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine and 5-iododeoxyuridine-substituted Chinese hamster chromosomes. *Exp. Cell Res.* **87**: 15-19.

- Innes, J.R.M. Ulland, B.M., Valerio, M.G., Petrucelli, L., Fishbein, L., Hart, E.R., Pallota, A.J., Bates, R.R., Falk, H.L., Gart, J.J., Klein, M., Mitchell, I. y Peters, J. 1969. Bioassay of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: preliminary note. *J. Natl. Cancer Inst.* **42**: 1101-1113.
- Ishidate, M. y Odashima, S. 1977. Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster ovary cells *in vitro* a screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.* **48**: 337-354.
- Jablonkai, I. y Hatzios K.K. 1994. Microsomal oxidation of the herbicides EPTC and acetochlor and of the safener MG-191 in maize. *Biochem. Physiol.* **48**: 98-109.
- Kato, H. 1974. Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Exp. Cell Res.* **85**: 238-247.
- Kihlman, B. A. 1975. Sister-chromatid exchanges in *Vicia faba*. II. Effects of thiotepa, caffeine and 8-ethoxycaffeine on the frequency of SCEs. *Chromosoma* **51**: 11-18.
- Kihlman, B. A. 1977. Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. En :B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols y C. Ramel (Eds.). **Handbook of Mutagenicity Test Procedures**, Elsevier, Amsterdam, pp. 531-554.
- Kihlman, B.A. y Andersson, H.C. 1982. Sister chromatid exchanges in plants. En: S. Wolff (Ed.). **Sister Chromatid Exchanges**. Wiley, Nueva York, pp. 243-265.
- Knake, E. L., Appleby, A. P. y Furtick, W. R. 1967. Soil incorporation and site of uptake of preemergence herbicides. *Weeds* **15**: 228-232.
- Lamoreaux, G. L. y Russness, D. G. 1987. EPTC metabolism in corn, cotton, and soybean: identification of a novel metabolite derived from the metabolism of a glutathione conjugate. *J. Agric. Food. Chem.* **35**: 1-7.

- Latt, S. A. 1974a. Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science* **185**: 74-76.
- Latt, S. A. 1974b. Sister chromatid exchanges indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **71**: 3162-3166.
- Latt, S. A. y Loveday, K. S. 1978. Characterization of sister-chromatid exchange induction by 8-methoxypsoralen plus near UV light. *Cytogenet. Cell Genet.* **21**:184-200.
- Lee, A., Rahman, A. y Holland, P.T. 1984. Decomposition of the herbicide EPTC in soil with a history of previous EPTAM applications. *N. Z. J. Agric. Res.* **27**: 201-206.
- Litterst, C. L. y Lichtenstein, E. P. 1971. Effects and interactions of environmental chemicals on human cells in tissue culture. *Arch. Environ. Health.* **22**: 454-459.
- Mann, J. D., Jordan, L. S. y Day, B. E. 1965. A survey of herbicides for their effect upon protein synthesis. *Plant Physiol.* **40**: 840-843.
- Marshall, E. 1985. The rise and decline of temic. *Science* **229**: 1369-1371.
- Medved, I. e Ivanova, Z.V. 1971. Hygienic establishment of working conditions during Eptam application in agriculture. *Gig. i Sanit.* **2**: 29-32.
- Mellan, I. 1977. **Industrial Solvents Handbook**. Noyes Data Corp. Nueva Jersey. pp. 1-5.
- Moreland, D. E., Malhotra, S. S., Gruenhagen, R. D. y Shokraih, E. H. 1969. Effects of herbicides on RNA and protein synthesis. *Weed Sci.* **17**: 556-563.
- Moutschen-Dahmen, J., Moutschen-Dahmen, H. y Degraeve, N. 1984. Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of insecticides. En: M. Kirsch-Volders. (Ed.) **Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Industrial Pollutants**. Chap. 3. Plenum, Nueva York. pp. 127-203.
- Murnik, M.R. 1976. Mutagenicity of widely-used hebicides. *Genetic* **83**: 854 (abstract).

- NCI. 1978. **Bioassay of Mexacarbate for Possible Carcinogenicity**, NCI Tech. Rep. No. 147, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland.
- Obrigawitch, T., Martin, A. R. y Roeth, F. W. 1983. Degradation of thiocarbamate herbicides in soil exhibiting rapid EPTC breakdowns. *Weed Sci.* **31**: 197-192.
- Ohnuki, Y. 1968. Structure of chromosomes. I. Morphological studies of the spiral structure of human somatic chromosomes. *Chromosoma* **25**: 402-428.
- Oliver, L. R., Prendeville, G. N. y Schreiber, M. M. 1968. Species differences in site of root uptake and tolerance to EPTC. *Weed Sci.* **16**: 534-537.
- Ong, V.Y. y Fang, S.C. 1970. *In vivo* metabolism of ethyl-1-14C-N, N-di-n-propylthiol carbamate in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **17**: 418-425.
- Painter, R.B. 1980. A replication model for sister chromatid exchange. *Mutat. Res.* **70**: 337-341.
- Parker, C. 1966. The importance of shoot entry in the action of herbicides applied to the soil. *Mutat. Res.* **14**: 117-121.
- Perry, P. y Evans, H. J. 1975. Cytological detection of mutagen, carcinogen exposure by chromatid exchanges. *Nature* **258**: 121-124.
- Plewa, M. J. y Gentile, J. M. 1976. Mutagenicity of atrazine: a maize-microbe bioassay. *Mutat. Res.* **38**: 287-292.
- Plewa, M. J. y Gentile, J. M. 1982. The activation of chemicals into mutagens by green plants. En: F. J. de Serres y A. Hollaender. (Eds.), **Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection**. Plenum, Nueva York. Vol.7 pp. 401-420.
- Prendeville, G. N., Eshel, Y., Schreiber, M. M. y Warren, G. F. 1967. Site of uptake of soil-applied herbicides. *Weed Res.* **7**: 311-312.

- Quistad, G.B., Sparks, S.E. y Casida, J. E. 1994. Aldehyde dehydrogenase of mice inhibited by thiocarbamate herbicides. *Life Sci.* **55**: 1537-1544.
- Sandhu, S.S., Waters M.D., Mortelmans, K.E., Evans, E.L., Jotz, M.M., Mitchell, A.D. y Kasica, V. 1984. Evaluation of diallate and triallate herbicides for genotoxic effects in a battery of *in vitro* and short-term *in vivo* tests. *Mutat. Res.* **136**: 173-183.
- Schvartzman, J. B. y Cortés, F. 1977. Sister-chromatid exchanges in *Allium cepa* L. *Chromosoma* **62**: 119-133.
- Schvartzman, J.B., Cortés, F. y López-Saez, J. F. 1978. Sister-subchromatid exchanges segments and chromosome structure. *Exp. Cell Res.* **114**: 443-446.
- Schvartzman, J. B. y Gutiérrez, C. 1980. The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of a damaging treatment in provoking the formation of sister-chromatid exchanges. *Exp. Cell Res.* **134**: 73-79.
- Schvartzman, J. B. 1987. Sister-chromatid exchanges in higher plant cells: past and perspectives. *Mutat. Res.* **181**: 127-145.
- Shirasu, Y., Moriya, M., Kato, K., Furuhashi, A. y Kada, T. 1976. Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutat. Res.* **40**: 19-30.
- Siebert, D. y Eisenbrand, G. 1974. Induction of mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae* by N-nitrosated pesticides. *Mutat. Res.* **22**: 121-126.
- Sikka, H.C. y Florczyk, P. 1978. Mutagenic activity of thiocarbamate herbicides in *Salmonella typhimurium*. *J. Agric. Food Chem.* **26**: 146-148.
- Stauffer Chemicals, S.A. 1978. Product safety and toxicology review. Behavior of thiocarbamates in the environment. Ginebra. (Report No. Tox-05-78-01).



- Stetka, D. G. y Wolff, S. 1976. Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II. *In vitro* test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* **41**: 343-350.
- Still, G. G., Davis, D. G. y Zander, G. L. 1970. Plant epicuticular lipids: alteration by herbicidal carbamates. *Plant Physiol.* **46**: 307-314.
- Takehisa, S., Kanaya, N. y Rieger, R. 1982. Induction of SCEs in CHO cells by extracts from *Vicia faba* roots exposed to ethanol. *Mutat. Res.* **105**: 169-174.
- Takehisa, S. y Kanaya, N. 1983. A comparison of *Vicia faba* root S10 and S9 activation of ethanol, maleic hydrazide and cyclophosphamide as measured by sister chromatid exchange induction in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **121**: 145-151.
- Takehisa S., Kanaya, N. y Rieger, R. 1988. Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **197**: 195-205.
- Tam, A.C., Behki, R.M. y Khan, S.U. 1987. Isolation and characterization of an S-Ethyl-N, N-Dipropylthiocarbamate for plasmid-associates S-Ethyl-N, N-Dipropylthiocarbamate degradation. *Microbiology* **53**: 1088-1093.
- Taylor, J. H., Woods, P. S. y Hedges, W. L. 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **43**: 122-127.
- Taylor, J. H. 1958. Sister chromatid exchange in tritium-labeled chromosomes. *Genetics* **43**: 515-529.
- Tempelaar, M.J., de Both, M.T.J. y Versteegh, J.E.G. 1982. Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Feulgen-staining procedure for *Vicia faba*. *Mutat. Res.* **103**: 321-326.

- Tyrkiel, E. 1977. Mutagenic action of O-isopropoxy-pheniol-N-methyl-carbamate (propoxur) on mouse gametes. *Rocz. Pzh.* **28**: 601-613.
- Uggla, A.H. y Natarajan, A.T. 1982. SCE in plants. En: Sandberg A. A. (Ed.). **Progress and Topics in Cytogenetics Sister Chromatid Exchanges**. Alan Liss, Nueva York, Vol. 2, pp. 217-233.
- Ulland, B., Weisburger, E.K. y Weisburger, J.H. 1973. Chronic toxicity and carcinogenicity of industrial chemicals and pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **25**: 446-452.
- Upshal, A. y Johnson, P. E. 1981. Thiram induced abnormal chromosome segregation in *Aspergillus nidulans*. *Mutat. Res.* **48**: 225-236.
- U S Environmental Protection Agency: Fed. 1977. Register. **42**: 27669.
- WHO (World Health Organization). 1972. *Health Hazards of Human Environment*. Ginebra.
- Whorton, E.B., Tice, R.R. y Stetka, D.G. 1984. Statistical design, analysis and interference issues in studies using sister-chromatid exchanges, En: R.R. Tice y A. Hollaender (Eds.) **Sister Chromatid Exchange: 25 Years of Experimental Research, Part A**. Plenum, Nueva York, pp. 431-440.
- Wild, D. 1975. Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutat. Res.* **32** : 133-150.
- Wilkinson, R. E. y Smith, A. E. 1975. Thiocarbamate inhibition of fatty acid biosynthesis in isolated spinach chloroplasts. *Weed Sci.* **23**: 100-104.
- Wilkinson, R. E. y Ashley, D. 1978. EPTC induced modifications of gibberellin biosynthesis. *Weed Sci.* **27**: 270-274.
- Wilkinson, R. E. y Oswald, T. H. 1987. S-ethyl dipropylthiocarbamate (EPTC) and 2,2-dichloro-N,N-di-2propenylacetamide (dichlormid) inhibitions of synthesis of acetyl-coenzyme A derivates. *Pestic. Biochem. Physiol.* **28**: 38-43.

- Wilson, R.G. 1984. Accelerated degradation of thiocarbamate herbicide exposure. *Weed Sci.* **32**: 264-268.
- Wolff, S. 1974. Sister chromatid exchanges: the most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic, carcinogenic. *Expert. Conference Oslo. Noruega*, pp. 11-13.
- Wolff, S. y Perry, P. 1974. Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister-chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma* **48**: 341-353.
- Wolff, S. Bodycote, J. y Painter, R.B. 1974. Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. *Mutat. Res.* **25**: 73-81.
- Wolff, S. 1981. Induced-chromosome variation. *Chromosomes Today* **7**: 226-241.
- Wolff, S. 1982. Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and lesions that produced them. En: Wolff, S. (Ed.), **Sister Chromatid Exchanges**. Wiley, Nueva York, pp. 43-86.
- Worthing, C.R. y Walker, S.B. 1991. **The Pesticide Manual: A World Compendium**. 9a. ed. Croydon, British Corp. Protection Council.
- Wuu, K. D. y Grant, W. F. 1966. Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in barley (*Hordeum vulgare*). *Can. J. Genet. Cytol.* **8**: 481-501.
- Wuu, K. D. y Grant, W. F. 1967. Chromosomal aberrations induced by pesticides in meiotic cells of barley. *Cytologia* **32**: 31-41.
- Xing, W., Zhang, Z. 1990. A comparison of SCE test in human lymphocytes and *Vicia faba*: a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* **241**:109-113.
- Yamaguchi, S. 1961. Absorption and distribution of <sup>35</sup>S-EPTC. *Weeds* **9**: 374-380.

- Yin-Tak, W. 1983. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of carbamates, thiocarbamates and related compounds: an overview of structure-activity relationship and environmental concerns. *J. Environ. Sci. Health* 1: 97-133.
- Zhang, Z., Yang, J., Zhang, Q. y Cao, X. 1991. Studies on the utilization of a plant SCE test in detecting potencial mutagenic agents. *Mutat. Res.* 261: 69-73.
- Zhavoronkov, N. I., Akulov, A. V. , Antiseferov, S.D., Verkhovskiy, A.P. y Yevdokimov, S.M. 1974. Effect of carbamates on hens. *Pestic. Abstr.* 7: 372.
- Zhurkov, V. S. y Yakovenko, K. N. 1976. The culture of human lymphocytes as a test subjet for evaluation of mutagenic activity of chemicals. *Mutat. Res.* 41: 107-112.

**TABLA I.** Especies que controla el herbicida carbámico **Asulam**, en cultivos de caña de azúcar en solución de 6-8 L

Tomado de: Diccionario de Especialidades Agroquímicas, 1997.

	(4 semanas entre la última aplicación y la cosecha)
<b>Malezas de</b>	<b>hoja angosta</b>
Zacate Johnson de semilla y de rizoma	<i>Sorghum halepense</i>
Zacate Para	<i>Panicum spp</i>
Zacate Brambilia	<i>Digitaria spp</i>
Zacate Cadillo	<i>Cenchrus spp</i>
Zacate cola de zorra	<i>Paspalum spp</i>
Zacate cuerquilla	<i>Brachiaria spp</i>
Zacate liendrilla	<i>Leptochloa spp</i>
Zacate pelón al pistilo	<i>Sectaria spp</i>
Zacate pinto	<i>Echinochloa spp</i>
Zacate privilegio	<i>Panicum maximum</i>
Grana caballona	<i>Eleusine spp</i>
	<b>hoja ancha</b>
Cardo santo, chicalote	<i>Artemisa spp</i>
Chilillo	<i>Polygonum spp</i>
Lengua de vaca	<i>Rumex spp</i>
Rabanillo	<i>Raphanus spp</i>

**TABLA II a. Cultivos en los que se utiliza el herbicida tiocarbámico EPTAM**

Tomado de: Diccionario de Especialidades Agroquímicas, 1997.

Cultivo	Dosis (L/Ha)	Recomendaciones
Alfalfa (semilla)	3.5-5.0	Aplicar e incorporar poco antes de la siembra pues deberá sembrarse inmediatamente después del tratamiento
Alfalfa (establecida)	2.5 en primer, segundo, tercer y quinto corte	Se sugiere aplicarlas para primavera y verano en el agua de riego inmediatamente después del corte.
Control de cultivo de zacate en invierno	4.5-5.0	En el agua de riego en los meses de octubre y noviembre y antes de la germinación de las gramíneas.
Cártamo	4.5	Aplice e incorpore EPTAM 840-E por Ha sembrando inmediatamente.
Cítricos (naranja, mandarina y toronja)	4.5	Después del rastreo hasta antes de la emergencia de maleza en los árboles en producción. Se aplica EPTAM 840-E por Ha. Mediante el riego de inundación de surco. Introducir en el agua durante un lapso completo de riego. No se aplica en los quince días anteriores a la cosecha.
Almácigo de cítricos y plantas sin producción (huertas de naranja y toronja que no producen)	4.5-5.0	Después del trasplante se aplica EPTAM 840-E con aspersión dirigida hacia el suelo y se incorpora a él.

**TABLA II (Continuación)**

Frijol	4.5 4.5-5.0	<p>Antes de la siembra (siembra plana). Se aplica e incorpora inmediatamente después.</p> <p>Al momento de efectuar el último cultivo del ciclo se aplica e incorpora EPTAM 840-E para controlar el coquillo y el zacate Johnson. Se usa la dosificación más baja para suelos livianos. Se aplica con aspersión dirigida hacia el suelo antes de que se comiencen a formar las vainas del frijol</p>
Algodón	2.5-3.5	(Establecido). Se aplica EPTAM 840-E por Ha. en el agua de riego al cierre del cultivo.
Papa	4.5-5.0  5.0  2.5  4.5	<p>a) Presiembra: Se aplica EPTAM 840-E. Se aplica antes de haber removido las camas seguido de la incorporación.</p> <p>Se usa un arado de dientes (escardilla) o equipo de rastreo</p> <p>b) Se aplica e incorpora EPTAM 840-E después de que las plantas de papa hayan emergido del suelo. No se coloca durante los 45 días anteriores a la cosecha.</p> <p>c) La aspersión es dirigida hacia el suelo en bandas de 30 cm de ambos lados de los surcos de un metro (equivalente a 4.5 L/Ha. en aplicaciones totales). Se cubren inmediatamente las bandas tratadas con una rastra de discos para aporcar.</p> <p>d) Herbicación. Se Aplica en el agua de riego después del paso de cultivador.</p>

**TABLA II b Especies que controla herbicida tiocarbámico EPTAM**

<b>Malezas perennes</b>	
Coquillo púrpura	<i>Cyperus rotundus</i>
Coquillo amarillo	<i>Cyperus esculentus</i>
Zacate bermuda	<i>Cynodon dactylon</i>
Tigrillo	<i>Agropyron repens</i>
<b>Zacates anuales</b>	
Zacate azul	<i>Poa annua</i>
Centeno silvestre	<i>Lolium multiflorum</i>
Zacate de agua	<i>Echinochloa spp</i>
Zacate pinto	<i>Echinochloa colonum</i>
<b>Zacates anuales</b>	
Pasto silvestre	<i>Digitaria spp</i>
Cola de zorra	<i>Setaria fabenil</i>
Cola de zorra verde	<i>Setaria viridis</i>
Cola de zorra amarilla	<i>Setaria glauca</i>
Pata de ganso	<i>Eleusine indica</i>
Zacate Johnson (semilla)	<i>Sorghun halepense</i>
Cadiilo o huizapol	<i>Cenchrus pauciflorus</i>
Brachiaria	<i>Brachiaria spp</i>
Hierba hedionda	<i>Eragrostis silianencis</i>
Avena silvestre	<i>Avena fatua</i>



**TABLA III. FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS PROVOCADOS POR EL HERBICIDA CARBAMICO ASULAM EN *Vicia faba***

CONCENTRACION (ppm)	$\bar{X} \pm EE$
Testigo*	32.99 $\pm$ 0.5317
10	35.06 $\pm$ 0.8164
50	40.78 $\pm$ 0.9464*
100	50.08 $\pm$ 0.9851*
200	40.12 $\pm$ 0.7198*
300	39.52 $\pm$ 0.8302*
500	<b>MUERTE CELULAR</b>
1000	<b>MUERTE CELULAR</b>

\*Tamaño de la muestra de 100 metafases.

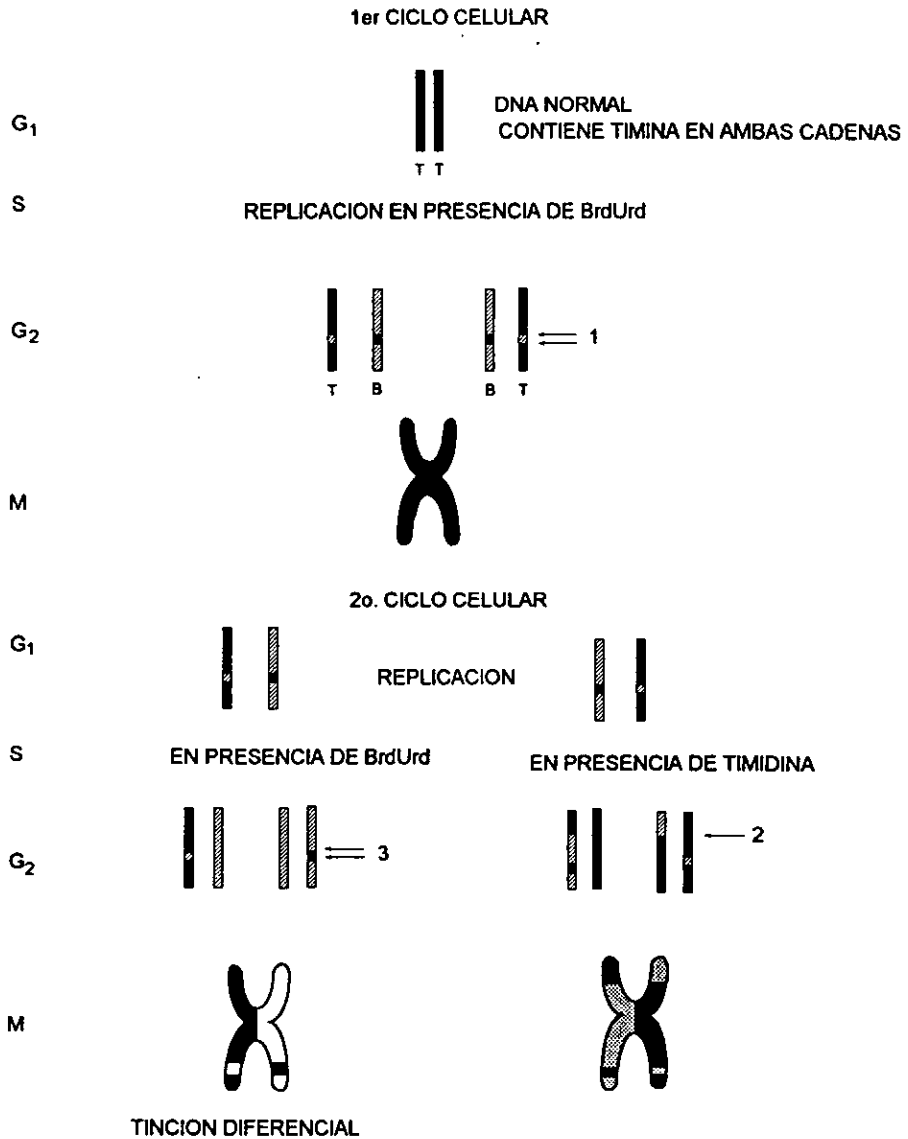
Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y los grupos de tratamiento por análisis de varianza  $F=61.807$ , con  $p < 0.001$ , entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls  $*p < 0.001$

**TABLA IV. FRECUENCIA DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS PROVOCADOS POR EL HERBICIDA TIOCARBAMICO EPTAM EN *Vicia faba***

CONCENTRACION (ppm)	$\bar{X} \pm EE$
Testigo*	33.76 $\pm$ 0.6673
1.0	41.68 $\pm$ 0.9674*
1.5	54.98 $\pm$ 0.9464*
2.0	63.84 $\pm$ 1.007*
2.5	57.44 $\pm$ 1.608*
5.0	47.76 $\pm$ 1.148*
10.0	Inhibición en la división celular

\*El tamaño de la muestra fue de 75 metafases excepto para 2.5 que fue de 25 metafases, los restantes fueron de 50 metafases.

Se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls \*p<0.001



**Fig. 1 Diagrama del patrón de tinción diferencial.**

**1 ICH doble no detectable en la primera mitosis por no haber tinción diferencial.**

**2 ICH sencillo no detectable al igual que el ICH doble de la primera mitosis.**

**3 ICH doble de la primera mitosis que se evidencia por haber tinción diferencial.**

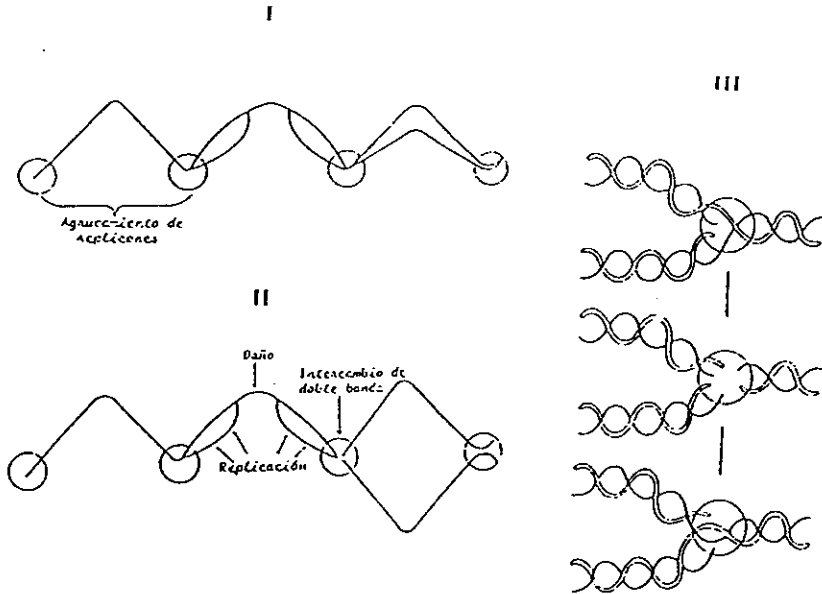
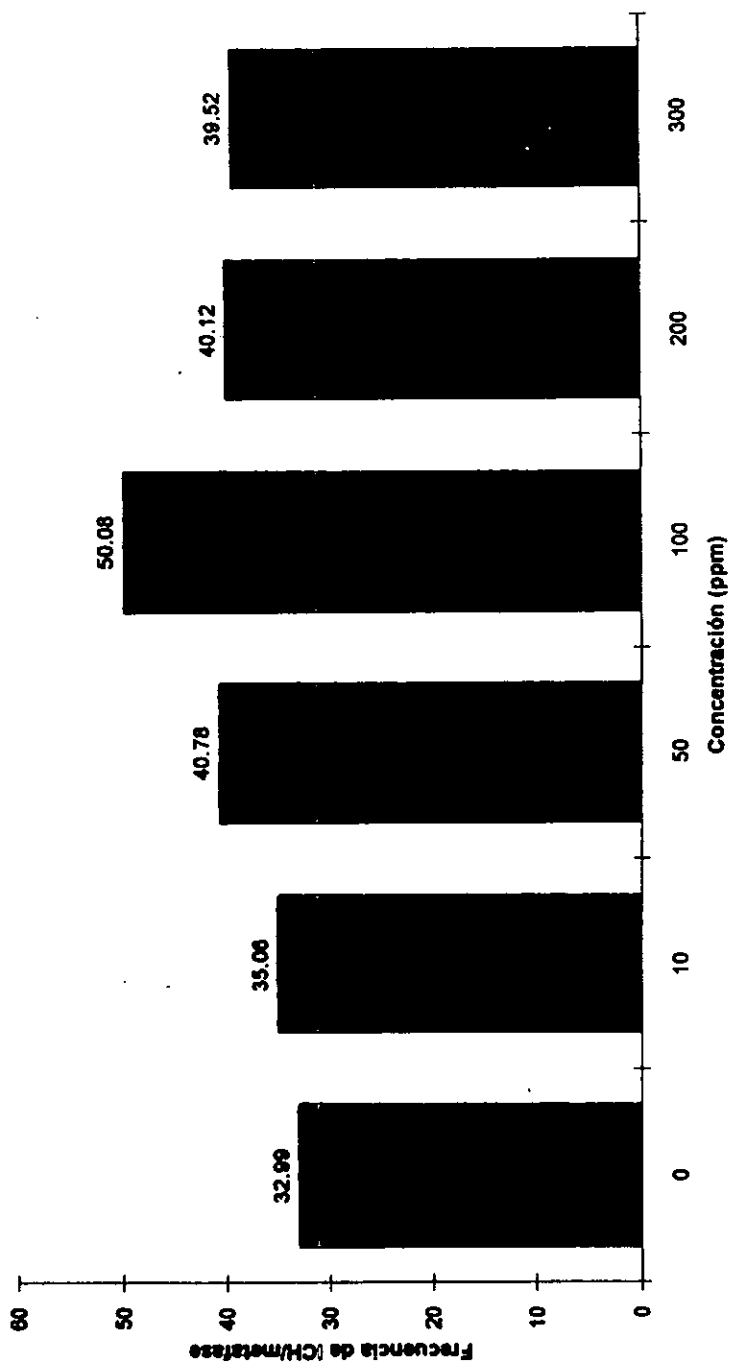
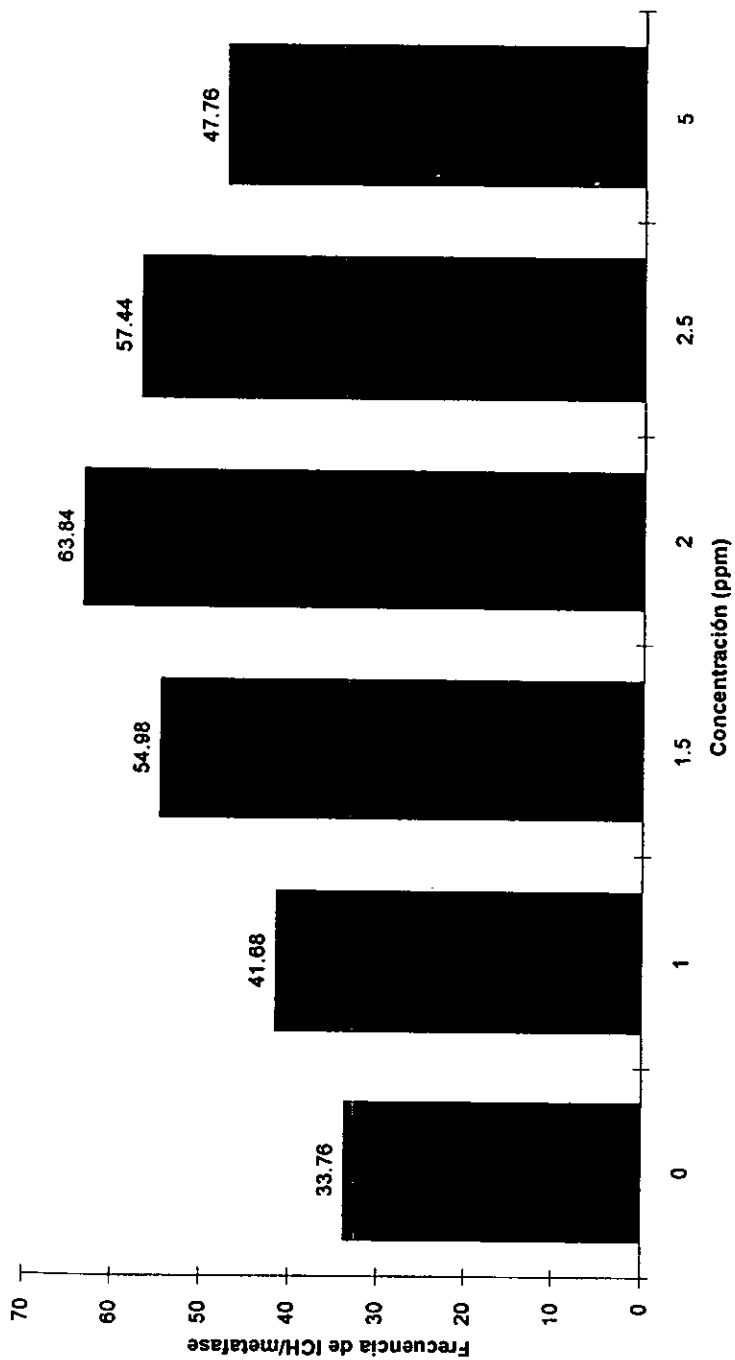


Fig. 2 Modelo de inducción de ICH de Painter (1980).

- I Progresión de la duplicación del DNA entre los agrupamientos de replications (círculos) que separan replicones subsecuentes.
- II Retardo en la duplicación debido al daño e incremento de la posibilidad de intercambio de doble banda.
- III Ruptura de doble banda y reunión de la banda hija de la molécula replicada a la molécula no replicada dando lugar al intercambio de doble banda



**Fig. 3 Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas provocados por el herbicida carbámico ASULAM en *Vicia faba*.**



**Fig. 4 Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas provocados por el herbicida tiocarbámico EPTAM en *Vicia faba*.**