



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION GENOTOXICA DE LOS PLAGUICIDAS
EPTAM Y ASULAM CON Y SIN ACTIVACION
METABOLICA POR LA FRACCION ENZIMATICA
S 10 DE LA RAIZ DE *Vicia faba* EN CULTIVO DE
LINFOCITOS HUMANOS

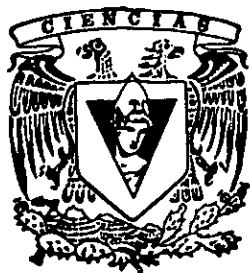
T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE JUAN LUNA MARTIN DEL CAMPO



BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO

MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis.
"Evaluación genotóxica de los plaguicidas Eptam y Asulam con y sin
activación metabólica por la fracción enzimática S10 de la raíz de
Vicia faba en cultivo de linfocitos humanos"

realizado por **Luna Martín del Campo José Juan**

con número de cuenta **9455626-5** 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

Dra. María Elena Calderón Segura

María Elena Calderón Segura

Suplente

M. en C. Saúl Flores Maya

Saúl Flores Maya

Suplente

Biol. Yooko Díaz Sánchez

Yooko Díaz Sánchez

FACULTAD DE CIENCIAS

U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a Dios por haberme colmado de bienes desde el inicio de mi vida hasta este momento, permitiéndome llegar a una de las tantas metas que tengo por conquistar. A mis padres José y Georgina por los valores inculcados en mí desde pequeño, por estar al pendiente en todos mis pasos brindándome siempre su ayuda, cariño y comprensión. Por que gracias a ellos y a los innumerables sacrificios que han hecho, este trabajo ha llegado a su culminación, y yo a una etapa mas de mi vida, sin embargo, nunca voy a dejar de necesitarlos. A mi hermano, por haber compartido conmigo tantos momentos agradables en la infancia, unas buenas parrandas ahora, y las regañadas que papá nos sigue dando. A todos mis tíos tanto paternos como maternos por el cariño brindado a lo largo de los años, y muy especialmente a mis tíos Daniel, Bernabé y María por su ayuda y consejos, por que "esto no es nada mas cuidar acociles". A mi tía Beatriz Rodríguez, por ayudarme y ser tan buena onda. A mis primos, para que sea un ejemplo a seguir y terminen la escuela. Y a una persona muy especial que llegó a mi vida, hace 6 años, durante los cuales hemos compartido tantos momentos inolvidables y que espero se quede junto a mí para siempre: mi novia Lilián P. H.

A la memoria de mis abuelos Beatriz (Mamátiz), Jesús, María y José.

A la Universidad Nacional Autónoma de México junto con mis maestros de la Facultad por haberme dado los conocimientos necesarios para ejercer esta profesión.

A la Doctora Sandra Gómez Arroyo, por la dedicación, paciencia, conocimientos y apoyo brindados a lo largo de mi estancia en el Laboratorio de Citogenética y para la culminación de esta tesis.

A la Doctora Maria Elena Calderón Segura, por haberme invitado a trabajar en este laboratorio, por la haberme enseñado la técnica y por el asesoramiento que me daba siempre que metí cultivos.

Al Doctor Rafael Villalobos Pietrini por sus valiosas aportaciones hechas en cada revisión a mis trabajos tanto de congresos como de tesis y por conservar ese buen humor que lo caracteriza.

Al Doctor Saúl Flores Maya por la ayuda aportada a lo largo de este trabajo, por su compañerismo y amistad.

A la Maestra Yooko Díaz Sánchez por la gran ayuda que me dio siempre que recurrí a ella, también por ser una gran amiga a la que aprecio y estimo.

A todos mis compañeros de Laboratorio comenzando por Ana Rosa, Josefina, Sofia, Ma. Esther, Susana, Sra. Emma, Lety, Selene, Omar, Leonel el "Monsieur", Mtro Miguel Ángel y Luz, por haber formado un gran equipo de trabajo y sobre todo por haber sido tan buenos amigos.

Y a todas las personas con las que tuve contacto a lo largo de mi carrera y que contribuyeron con su granito de arena.

INDICE

CONTENIDO	PAG
I. Resumen	3
II. Introducción	5
II.I Intercambio de cromátidas hermanas	9
II.II Metabolismo de tiocarbamatos	11
II.III Reacciones de oxidación o de fase I	11
II.IV Reacciones de conjugación o de fase II	13
II.V Reacciones terciarias o de fase III	14
III. Carbamatos	15
III.I Mutagenicidad	16
III.II Carcinogenicidad	17
III.III Teratogenicidad	18
IV Herbicidas carbámicos	19
V Objetivos	21
VI Materiales y métodos	22
VI.I Tratamientos directos y mediante activación con la mezcla S10 de <i>Vicia faba</i> a los herbicidas Eptam y Asulam en linfitos humanos en cultivo.	24
VI.II Obtención de la fracción enzimática S10 de la raíz de <i>Vicia faba</i>	24
VI.III Mezcla enzimática S10	25
VI.IV Cosecha de linfocitos humanos	25
VI.V Tinción diferencial de cromátidas hermanas	26
VII Resultados	28

VIII	Discusión y conclusiones	30
IX	Referencias	34
X	Tablas	44
XI	Figuras	48

I. RESUMEN

Como bien es sabido, a lo largo de la historia, la producción agrícola es parte fundamental de la alimentación en nuestro país, de manera que existe una gran preocupación por el mejoramiento de los campos de cultivo. Se han venido desarrollado desde hace varias décadas diversos compuestos que evitan el crecimiento de plagas ya sean animales o vegetales como son las malezas postemergentes que puedan afectar dicha producción.

Estos productos químicos denominados plaguicidas, se han convertido en herramienta indispensable para los agricultores, por lo que cada vez se utilizan en mayor cantidad.

La exposición a dichos plaguicidas representa un gran riesgo potencial para la salud ya que también provocan daño genético, cuyas consecuencias al final son la iniciación de cáncer. Es por ello el gran interés de realizar pruebas de alta confiabilidad y que proporcionen resultados en lapsos cortos.

Estos ensayos consisten de (1) células periféricas humanas (linfocitos) que serán las indicadoras del daño genético y (2) un sistema metabolizador donde el compuesto que se quiere evaluar se incuba con una fracción enzimática, simulando el metabolismo de un organismo superior ya sea mamífero o planta. El daño genético se expresa por un aumento en la frecuencia del intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en metafases de segunda división, así como en la desincronización del ciclo celular.

Para este estudio se empleó el cultivo de linfocitos humanos, y la mezcla enzimática S10 de las raíces de *Vicia faba* para la transformación de los herbicidas Eptam y Asulam y como criterio de evaluación del daño genético, la frecuencia de ICH, así como los índices de replicación y mitótico.

Como testigos negativos se utilizaron cultivos celulares más bromodesoxiuridina y cultivos celulares más la mezcla enzimática S10 sin plaguicidas y como testigos positivos a los linfocitos expuestos al etanol más la mezcla S10.

Para este trabajo se valoraron diversas concentraciones tanto de Eptam como de Asulam con y sin la participación de la mezcla S10 de *Vicia faba* para determinar el nivel de toxicidad en los linfocitos.

Los resultados obtenidos para ambos plaguicidas sin activación metabólica, no tuvieron efectos genotóxicos en los linfocitos que de acuerdo al análisis de varianza no hubo diferencia de los valores testigos con respecto a los tratados en la producción de ICH, mientras que con activación metabólica ambos plaguicidas mostraron un incremento significativo, al aplicar el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls, lo que significó que los dos herbicidas son mutágenos indirectos activados por el metabolismo vegetal. De la misma manera ambas pruebas fueron aplicadas para los índices de replicación y mitótico, tanto de manera directa, como con activación metabólica y obteniendo como resultado que ambos plaguicidas retrasan el ciclo celular y disminuyen el índice mitótico en las dos concentraciones más altas.

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 el agua, suelo y aire, afectando seriamente al medio y poniendo en peligro la salud de plantas y animales incluyendo la del 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). Estos se han utilizado desde tiempos remotos aportando múltiples beneficios en diversos órdenes, 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 en el empleo 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).

La Red Internacional de Acción contra el Uso de Plaguicidas informa que los países en vías de desarrollo aplican la quinta parte de plaguicidas que se consumen mundialmente y se estima que la verdadera cifra de intoxicaciones ocupacionales anuales por dichas sustancias asciende a 25 millones de casos, siendo el 99% de las defunciones atribuibles a los plaguicidas en estos países (PAN International 1990).

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, basadas en una cantidad limitada de estudios en algunos países en todo el mundo, se provocan aproximadamente un millón de intoxicaciones agudas accidentales al año, de las cuales cerca del 70% se debe a exposiciones profesionales y el resto a intoxicaciones por consumo de alimentos contaminados. Además se calculan hasta dos millones de intoxicaciones agudas deliberadas. En total entre los dos grupos la mortalidad alcanza la cifra de 22,000 defunciones al año (OMS 1990).

En América latina en los años 90, varios estudios especifican que ocurren por lo menos de 1000 a 2000 intoxicaciones por plaguicidas anuales y debido a que no se registran todas las intoxicaciones que se

producen resulta difícil elaborar evaluaciones precisas (Rivera y Rivera 1990). En 1993 se describen para nuestro país un total de 1207 casos de intoxicaciones de plaguicidas con una tasa de 1.36 % (SS 1993)

El estado con más incidentes reportados es Nayarit con 277, el Estado de México con 145, Michoacán con 115, Jalisco con 112, Guerrero con 99 y Morelos con 88. La mayor tasa de intoxicaciones es de 31 % de Nayarit, le continúa Baja California Sur con 10 %, Morelos con 7 %, Aguascalientes y Campeche con 5 % (SS 1993). En este mismo año se evidencian 154 defunciones por envenenamiento químico en la lista básica de la Dirección General de Estadística Informática y Evaluación (DGEIE 1995).

El empleo continuo y a gran escala ocasiona daños a largo y a corto plazos en la salud de la población expuesta directa e indirectamente. Así mismo, se ha demostrado la acción carcinogénica y mutagénica de estos compuestos (Moutschen-Dahmen *et al.* 1984).

Los experimentos de autorradiografía hechos por Kato (1974) demuestran que los mutágenos inducen intercambio de cromátidas hermanas y con la introducción de la técnica que incluye a la 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdU) descrita por Latt (1973), es cuando los ICH son considerados como indicadores del potencial mutagénico. Actualmente existen evidencias de que con muchos agentes químicos, el análisis de ICH proporciona el índice más sensible para detectar daño genético, debido a que se han encontrado correlaciones entre las frecuencias de ICH y la concentración del mutágeno. Por esta razón se han diseñado protocolos de investigación que relacionan el uso de activadores metabólicos (plantas y animales) con ICH de poblaciones vegetales y humanas expuestas a mutágenos potenciales como podrían ser los herbicidas de los grupos de la triazinas y de los carbamatos.

Por otro lado, se ha descrito que algunos mutágenos actúan directamente sobre el DNA, mientras que otros requieren del metabolismo vegetal o animal para activarse y así provocar daño.

Tanto en plantas como en animales, muchas de las enzimas que intervienen en el metabolismo de los xenobióticos (agentes externos a un organismo), entre los que se encuentran plaguicidas, partículas suspendidas en el aire, medicamentos, diversos compuestos químicos, entre otros, se localizan en el retículo endoplásmico (Veleminsky y Gichner 1988), sin embargo en los vegetales varias enzimas que participan en la activación mutagénica no solo se han detectado en este organelo sino también en el citoplasma y en la región de la pared celular (Sandermann 1988). Además de las reacciones enzimáticas que aparecen en los

animales, los vegetales incluyen las denominadas enzimas de conjugación secundaria, las cuales forman metabolitos insolubles en agua que por lo general son biológicamente inactivos y pueden depositarse en compartimientos específicos de la célula vegetal (Shimabukuro *et al.* 1982).

Durante algún tiempo se consideró que los vegetales carecían de dicho metabolismo, sin embargo, recientemente, se ha demostrado la activación de compuestos, incluyendo a los plaguicidas (Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999), por las plantas, los cuales muestran su actividad mutagénica en diversos organismos que se utilizan como sensores del daño genético. A los agentes químicos que por sí mismos no son mutagénicos y que requieren de la activación metabólica para ejercer dicho efecto se les denomina promutágenos o mutágenos indirectos (Plewa y Gentile 1982). Por ello es importante la incorporación de un esquema adecuado de activación metabólica cuando se investigan las propiedades mutagénicas de los plaguicidas.

En general, las plantas superiores metabolizan compuestos xenobióticos mediante mecanismos que incluyen oxidación, hidrólisis, conjugación y ocasionalmente reducción. Tanto en animales como en vegetales, el paso final de la biotransformación de la molécula es la conjugación, los conjugados son fácilmente excretados en animales mientras que en las plantas no existen sistemas excretores y son polimerizados y/o incorporados a sus componentes estructurales, de tal manera que los productos iniciales, los intermedios y los productos finales pueden seguir varias rutas:

1. Causar daño en la planta misma.
2. Conjugarse y/o almacenarse e inactivarse en la planta y liberarse en el tracto gastrointestinal o en otros órganos cuando son consumidos por los animales o por el hombre (Sandermann 1988).

Situación que en particular puede ocurrir después de la aplicación de pesticidas en plantas alimenticias.

El hecho de considerarse a los vegetales como alimentos sanos e inocuos debe revisarse, ya que ellos contienen tanto los residuos de los plaguicidas como sus metabolitos almacenados en diversas estructuras, por lo que resultan un riesgo ya que al ser ingeridos por los animales o por el hombre pueden causarles alteraciones en el funcionamiento de diversos órganos, mutaciones, cáncer o muerte.

En esto radica el interés en la investigación de los problemas que provocan dichos agentes químicos y sus metabolitos.

Las plantas dentro de la cadena trófica tienen el papel de iniciar el flujo de energía que aportará a los demás organismos compuestos orgánicos, oxígeno y mantenimiento del agua en la biosfera (Higashi 1988).

La biomasa vegetal global es aproximadamente 8.3×10^4 Kg de peso seco, un valor que representa más del 90 % de la masa total de la biota mundial. De esta proporción, alrededor del 30 % corresponde a tierras cultivadas por el hombre que cada día van ganando más terreno a la vegetación silvestre (Plewa y Wagner 1993).

Gracias al mejoramiento genético de las plantas, a la práctica de manejo de cultivos y al avance en la tecnología agrícola, se ha logrado un aumento en la productividad, sin embargo el uso de productos químicos para el control de plagas y malezas ha ido en aumento, esto representa un problema serio para la salud humana y el ambiente de las plantas (Junnila *et al.* 1993, Davies *et al.* 1994).

El tratamiento con herbicidas, dentro de los cuales se encuentran los carbámicos y las triazinas son una parte de la agricultura moderna que aporta beneficios al reducir la competencia con las malas hierbas por el agua, la luz y los nutrientes. En la actualidad su uso en la práctica agrícola ha sido contraproducente, por que se han ido incrementando los niveles de compuestos xenobióticos en el suelo, el agua y la atmósfera. La información acerca de sus efectos citotóxicos, genotóxicos y carcinogénicos es muy escasa. Está demostrado que el diallato, triallato y molinato (0.5-200 mg/kg) ocasionan en rata anorexia, hipersalivación, lagrimeo, piloerección, hipotermia, depresión y convulsiones. Las necropsias han revelado parálisis respiratoria, dilatación vascular en el cerebro, en el cerebelo, vísceras, hemorragia meníngea, daño gonadal y cambio en la estructura de los espermatozoides, no se observan anomalías fetales (WHO / FAO 1976).

En estudios empleando cultivo de linfocitos humanos al aplicar benomilo no se incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Machemer y Pickel 1994). Asimismo, han sido descritas evidencias de carcinogenicidad utilizando zectran, carbaril y benomilo (Woo 1983). Con el Eptam se han inducido anomalías cromosómicas y micronúcleos, reducción de la división celular a medida que aumenta la concentración (WHO / FAO 1976). En *Vicia faba* se observa que el Eptam y el Asulam incrementan el ICH conforme se eleva la concentración (Rosales-Hernández 1998).

Lamentablemente en el hombre las alteraciones se determinan cuando estas ya han ocurrido, además de que por razones éticas no es posible realizar experimentación directa en él, por ello con el fin de detectar el daño genotóxico provocado por la gran variedad de agentes físicos y químicos presentes en el ambiente y de evaluar el riesgo que representan para la salud de las personas, se han desarrollado diversos sistemas de evaluación como la prueba de Ames que utiliza diversas cepas de *Salmonella typhimurium*, organismos tales como ratones, y conejos así como células meristemáticas de *Vicia faba* (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1995) y linfocitos de sangre periférica humana, en este último se tiene la ventaja de obtener poblaciones numerosas por medio de mitógenos con la fitohemaglutinina (Evans y O'Riordan 1975, Jasinka *et al.* 1977).

II.1 INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH)

Una prueba útil para evaluar el efecto citogenético de agentes químicos lo constituye el ICH que desde el punto de vista molecular es un fenómeno que implica transposiciones simétricas de DNA de doble cadena equivalentes entre las dos cromátidas de un mismo cromosoma. Algunos estudios han evidenciado que el proceso de ICH requiere que la célula pase por la etapa de síntesis (S) del DNA (Wolff 1974) y se ha sugerido que es durante o inmediatamente después de que se ha formado la horquilla de replicación cuando se lleva el intercambio de doble banda entre las cadenas de DNA (Kato 1974, Painter 1982).

Esta técnica consiste en la sustitución de la 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU) en el DNA por la timina endógena (dT_{hd}) en las células que crecen por dos generaciones consecutivas en presencia de este análogo de base o durante la primera división, obteniéndose diferenciación entre las cromátidas hermanas en los cromosomas metafásicos, de tal manera que los cromosomas de la segunda mitosis poseen una cromátida sustituida por la 5-BrdU en una cadena de DNA, mientras que su cromátida hermana es sustituida en sus dos cadenas y los ICH observados son la suma de todos los intercambios ocurridos en las dos divisiones celulares (Fig. 1). Las cromátidas hermanas sustituidas tiñen diferencialmente por combinación del fluorocromo Hoechst 33258 y Giemsa (Perry y Wolff 1974). El fluorocromo actúa como fotosensibilizador (Scheid 1976) y la irradiación de las preparaciones celulares con luz ultravioleta (UV-Luz de onda larga) ocasiona desbrominación y eventualmente rompimientos en una sola hebra en las cadenas reemplazadas con la 5-BrdU (Lyon 1970).

La incubación de las laminillas con un amortiguador a temperatura alta (60°C) guía a la extracción preferencial de las nucleoproteínas de las cromátidas que fueron sustituidas con el colorante resultando la tinción diferencial de la cromátida menos organizada que es la que contiene más timina (dThd) (Fig. 1) (Schvartzman 1987).

II.II Metabolismo de los tiocarbamatos.

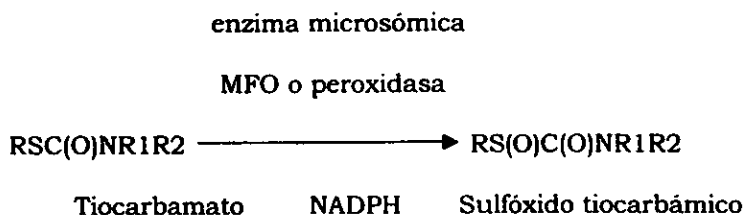
Los herbicidas tiocarbámicos son rápidamente metabolizados, absorbidos y transportados por las raíces y las hojas, trasladados a diferentes partes de la planta y acumulados en las hojas (Grover y Cessna 1991). La absorción de los herbicidas está en función de numerosos factores como las propiedades físico-químicas del compuesto, del suelo y del ambiente (temperatura, luz, humedad) y la especie vegetal, entre otros (Devine 1989, Devine y Vanden-Born 1991, Sterling 1994).

El metabolismo involucra tres fases, las reacciones primarias o de fase I, incluyen la sulfoxidación y la N-desalquilación, las secundarias o de fase II, la conjugación con glutatión, azúcares o aminoácidos y las terciarias o de fase III, la incorporación en productos naturales de la planta (Shimabukuro *et al.* 1981, 1982, Grover y Cessna 1991).

II.III Reacciones de oxidación o de fase I

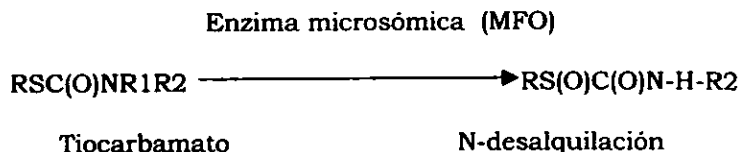
Las transformaciones oxidantes ocurren en la parte primaria del metabolismo, son procesos no sintéticos y pueden activar o desactivar al compuesto original. Estas reacciones dependen del sistema enzimático de los citocromos P450, enzimas conocidas como oxidasas de función mixta (MFO), las cuales intervienen en la desintoxicación de los xenobióticos, estas enzimas se localizan principalmente en el retículo endoplásmico y en la pared celular, requieren de oxígeno molecular y como sustratos secundarios o cofactores, nicotinamina adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) o nicotinamina adenina dinucleótido reducido (NADH) que son altamente específicas e inducibles por sus sustratos (Higashi *et al.* 1981, Higashi 1988). Las peroxidasas y otras oxigenasas también intervienen en el metabolismo oxidante. La oxidación en el átomo del azufre forma sulfóxidos de tiocarbamatos que tienen mayor solubilidad en el agua y son más reactivos y tóxicos que la molécula original. Los sulfóxidos son capaces de reaccionar con los sulfhidrilos y son potentes agentes carbamilantes de los grupos tioles del glutatión (GSH), de la coenzima A (CoASH) y de otros componentes tisulares incluyendo proteínas, además son fuente de ácidos sulfónicos (Casida *et al.* 1974, 1975a,b, Hubell y Casida 1975, 1977, Lay y Casida 1976, Carringer *et al.* 1978, Chen y Casida 1978, Gray 1991, Hatzios 1991).

La reacción general de la oxidación de los tiocarbamatos en las plantas es:



N-desalquilación

La N-desalquilación es una reacción oxidante muy común, considerada de desactivación, sin embargo con otros herbicidas no carbámicos se producen derivados bioactivados, muy tóxicos, involucra la eliminación de un grupo metilo o alquilo cercano al átomo de nitrógeno, la oxidación es catalizada por el sistema MFO, procede a la formación de un producto inestable el N-hidroximetil (Casida *et al.* 1974, Hubell y Casida 1977).



Formación de sulfonas

Los sulfóxidos tiocarbámicos sufren transformaciones que originan los derivados sulfonas, los cuales son mas inestables, de vida muy corta o con menor efectividad como herbicidas (Casida *et al.* 1974, 1975 a, b, Hubell y Casida 1977, Stephenson *et al.* 1979).

II.IV Reacciones de conjugación o de fase II

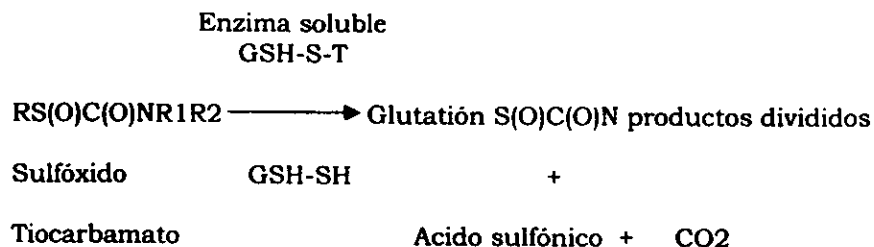
En general, la conjugación es considerada como una reacción de desactivación y de desintoxicación, involucra la interacción de los metabolitos provenientes de la fase I con un sustrato endógeno que puede ser el glutatión, los azúcares, los aminoácidos y, en menor frecuencia, las proteínas. El sustrato principal es el glutatión (GSH) (o hemoglutación de ciertas leguminosas) que está presente en todas las células vegetales y en los animales en su forma reducida abreviado comúnmente como GSH, el grupo estructural sulfhidrilo (SH) de la cisteína es el más importante en su interacción con los sulfóxidos tiocarbámicos y los xenobióticos (Chen y Casida 1978, Fuhreman *et al.* 1978, Stephenson *et al.* 1979, Horvath y Pulay 1980, Breaux 1986, 1987).

La biodegradación de los sulfóxidos tiocarbámicos es una reacción muy rápida con glutatión (GSH) y/o cisteína y glicina asistida por el sistema enzimático glutatión-S-transferasa (GSH-S-T) que son enzimas citosólicas solubles, con especificidad limitada a herbicidas y cuya función es estrictamente catalizar el ataque del glutatión, romper el enlace carbonilo y transferir el grupo carbamoilo de los sulfóxidos al GSH, esta división enzimática requiere de NADPH. Los productos de las reacciones secundarias son conjugados, malonilcisteína y ácidos malonil-3-tioláctico de alto peso molecular, más polares y solubles en agua (Lamoureux y Frear 1979, Lamoureux y Rusness 1987), difíciles de extraer, aislar, purificar y caracterizar de los extractos vegetales (Huckle y Milburn 1982).

La conjugación con GSH es una reacción enzimática que probablemente se realiza en pocas horas o tal vez menos, lo cual sugiere que los herbicidas durante poco tiempo son activos y solo permanecen a bajas concentraciones dentro de la planta (Lay *et al.* 1975, Lay y Casida 1976, Carringer *et al.* 1978, Leavit y Penner 1979, Breaux 1987).

Varios estudios indican que las reacciones de carbamitación son importantes en el metabolismo y posiblemente en el modo de acción de los herbicidas tiocarbámicos (Fuerts 1987). El significado biológico de los metabolitos es desconocido. Sin embargo, son considerados como un mecanismo de regulación y control de los niveles de los productos tóxicos que resultan de las reacciones de fase I. Aparentemente pueden ser metabolizados y convertidos a compuestos biológicamente activos (Grover y Cessna 1991).

La reacción de conjugación de los sulfóxidos tiocarbámicos en plantas es la siguiente:



II.V Reacciones terciarias o de fase III

En animales, los pesticidas o xenobióticos son metabolizados en dos fases, las reacciones primarias originan sulfóxidos tiocarbámicos los cuales son conjugados en productos secundarios solubles y fácilmente excretados por la orina, sin embargo, en las plantas no existe este fenómeno. Shimabukuro *et al.* (1981, 1982) incluyeron al metabolismo de los pesticidas las reacciones terciarias o de fase III, exclusivas de los vegetales superiores, las cuales limitan la biodisponibilidad de los herbicidas por incorporación a residuos insolubles.

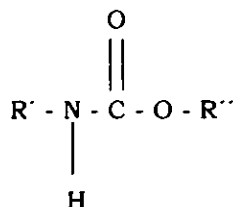
Los productos primarios y/o secundarios pueden ser compartamentalizados en vacuolas, transferidos al espacio extracelular o a la pared celular por mecanismos enzimáticos desconocidos, parece ser que se unen a moléculas específicas como ligninas, taninos, pectinas, polisacáridos (celulosa, almidón) y algunos polipéptidos (globulinas) u otros componentes vegetales y de sus estructuras (tejidos, órganos, etc.) (Sandermann *et al.* 1990, 1992, Sandermann 1992).

III 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 utilizados en la industria y en otras aplicaciones comerciales así como en el hogar y para el control de vectores en la salud pública (Environmental Health Criteria 1988).

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 el radical alquilo (metil, butil, etilisopropil, 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 con 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 diluidos 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 acetilcolinesterasa 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 muy utilizados debido a su baja toxicidad para los mamíferos y a su degradación relativamente rápida en el suelo (Dulout *et al.* 1982).

Se han detectado algunos carbamatos en cantidades residuales en verduras y fruta durante o poco después de la cosecha. Se espera que la mayoría de estos plaguicidas 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 vestigiales de uretano en ciertos fermentados tratados con dietilpirocarbamato como preservador (Yin-Tak 1983).

III.I MUTAGENICIDAD

Cheng y Conner (1982) mostraron la potencia de cinco carbamatos para inducir intercambios de cromátidas hermanas en macrófagos de los alvéolos pulmonares del ratón y la correlacionaron 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 para ello de la activación metabólica (Csukas *et al.* 1981).

De los plaguicidas carbámicos que han sido probados en el ensayo de Ames solo el benomilo presenta ligera actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium* TA 1535, una cepa que muta por sustitución de pares de bases; este resultado no es confirmado en otros dos estudios. El benomilo es considerado mutagénico en *Escherichia coli* y en uno de dos estudios en *Aspergillus nidulans*. 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 causa 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, profán y clorofán (Yin-Tak 1983).

III.II 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 revela inesperadamente su actividad carcinogénica. El análisis subsecuente muestra que el compuesto es un carcinógeno potente, que produce el cáncer en diversos sitios en ratas, ratones y jerbos (*Jaculus jaculus* rata canguro asiática africana). Niveles dietéticos de 0.025 a 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 el hígado y en la piel (NCI 1978). Sin embargo, no es carcinogénico en ratas. Su uso se ha interrumpido en Estados Unidos desde 1975. El carbarilo (alfa-servin) produce sarcomas en ratas criadas con una administración oral diaria de 30 mg/kg durante 20 meses. 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-servin, isómero del carbarilo ha demostrado ser carcinógeno en ratones y ratas (Yin-Tak 1983).

Se ha demostrado que los derivados N-nitrosos del carbarilo, propuxur, 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 a carbámicos, tiocarbámicos y compuestos relacionados. A gran escala los nitroso metilcarbamato producen pocos tumores, siendo los más efectivos los NO-carbofuran, el NO-Baygón y el NO-landrin (Moutschen-Dahmen *et al.* 1984).

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

III.III 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 propuxur 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).

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

IV HERBICIDAS CARBÁMICOS

Los herbicidas carbámicos difieren de los insecticidas del mismo grupo en que presentan mayor sustitución en el nitrógeno (radicales alquilos y arilos) que en el oxígeno. Algunos ejemplos son Asulam, barbán, carbetamido, cloroprofán, desdemifán, fenifenisofám, femedifám, profám y swep. Además no inhiben a la colinesterasa y su toxicidad en mamíferos es mucho más baja. Para estos compuestos los valores (CD50) generalmente en las ratas van de 550 a 1100 mg/kg; siendo para la mayoría de ellos a partir de 4000 mg/kg (Hayes y Lewis 1991).

El Asulam o Asulox C₈H₁₀N₂O₄S es un buen herbicida carbámico, sintético post-emergente, de uso agrícola o urbano; no debe de ser mezclado con otros plaguicidas, tampoco es recomendable sembrar otros cultivos en áreas tratadas donde se cultiva caña de azúcar, ni utilizarla como forraje para ganado. Absorbido a nivel de raíz provoca clorosis en plantas e interfiere en la división y elongación celulares (Worthing y Walter 1991).

Se usa con aplicaciones post-emergentes 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 en empleo forestal, *Avena fatua* y linaza, en caña de azúcar de amplio rango en hierbas y pastos con semilla oleosa (Worthing y Walter 1991).

En las plantas suprime la síntesis de folatos por lo que inhibe la vía metabólica sintetasa que está asociada a los procesos de la división celular, ya que este tipo de herbicidas se une directamente a las proteínas que forman los microtúbulos, inhibiéndose la polimerización de la tubulina (Duke 1990).

Kishore y Sha (1988) mencionan que se produce la inhibición de la vía glutamina sintetasa (GS), que participa en la ruta metabólica de los aminoácidos en donde se ha observado que la histidina es la principalmente afectada.

Con relación a sus efectos genotóxicos, Shirasu *et al.* (1976) reportan con el ensayo rec de *Bacillus subtilis* (sin S9 de mamífero) su acción negativa y Moriya *et al.* (1983) describen resultados negativos en 5 cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 y TA1538, así como con la cepa WP2 hcr de *Escherichia coli* sin S9. Sin embargo en células meristemáticas de *Vicia faba* produce aumento de ICH (Rosales-Hernández 1998).

El herbicida Asulam (marcado radioactivamente), administrado por vía oral o intravenosa en ratas fue excretado por la orina en 24 horas de la siguiente manera: como asulam de 70-65%, como N-acetilasulam de 8-14% y de 2.5% como N-acetilsulfanilamida, además se encuentran en las heces incrementos pequeños de radioactividad (WHO 1976).

Entre los herbicidas carbámicos el EPTC (cuyos nombres comerciales son Eptam o eradicane su nombre químico S-etil dipropil tiocarbamato) es ampliamente usado en México. Su acción herbicida es a nivel de la división celular e inhibe la elongación celular en los internódulos de las hojas y de la raíz (Worthing 1991).

En estudios con células de las hojas del frijol una concentración de 1×10^{-4} suprime la síntesis de lípidos (52 %), de RNA (28 %), de proteínas (13 %), así como la fotosíntesis (21 %) y la respiración (14 %) en un periodo de incubación de dos horas y los mismos procesos son alterados en 15 minutos a concentraciones de 1×10^{-3} M (Ashton *et al.* 1977).

La toxicidad en los mamíferos es baja en piel, membranas mucosas, tractos respiratorio y gastrointestinal (WHO 1976), pero se reporta como ligeramente tóxico para los seres humanos (Whorthing 1991).

Con referencia a su genotoxicidad, Moriya *et al.* (1983) describen resultados negativos empleando 5 cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 y TA1538 y en la cepa WP2 hcr de *E. coli*. Asimismo, se han observado anomalías cromosómicas, puentes anafásicos y micronúcleos, así como reducción de la división celular a medida que aumenta la concentración de Eptam (WHO 1976).

Meligan (1991) menciona que este herbicida altera el apareamiento, la copula, fertilización y la cantidad de la progenie de *Gammarus kisoninefrensis*.

Por otro lado, la principal vía de desintoxicación en las plantas es por conjugación con glutatión y en ciertas legumbres con homoglutatión (análogo del glutatión) (Carringer *et al.* 1978). Los conjugados con glutatión son subsecuentemente metabolizados con el conjugado malonil cisteína o con el ácido malonil 3-tioláctico (Lamoureux y Rusness 1987), que no son considerados como fitotóxicos.

V OBJETIVOS

1. Estimar el daño citogenético provocado por los herbicidas Eptam y Asulam aplicados directamente a los cultivos de linfocitos humanos periféricos, mediante el análisis de intercambio de cromátidas hermanas.

2. Evaluar la capacidad del metabolismo *in vitro* de *Vicia faba* para transformar a los herbicidas y verificar el efecto de sus productos metabólicos a través del intercambio de cromátidas hermanas en el cultivo de linfocitos humanos.

3. Analizar la influencia sobre la cinética de replicación celular y el efecto citotóxico de estos plaguicidas al ser aplicados directamente y de los productos metabólicos a través de los índices de replicación y mitóticos, respectivamente.

VI MATERIALES Y METODOS

ASULAM

CATEGORIA TOXICOLOGICA USO: AGRÍCOLA Y JARDINERÍA

CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA: CL50 ORAL (RATA) > 5000 mg/kg, CL50 DÉRMICA > 2000mg/kg.

TIPO DE PLAGUICIDA: HERBICIDA CARBÁMICO SISTÉMICO, POSTEMERGENTE.

INCOMPATIBILIDAD: NO MEZCLARLO CON OTROS PLAGUICIDAS.

CONTRAINDICACIONES: NO SE APLIQUE CUANDO EXISTAN CULTIVOS SUSCEPTIBLES CERCANOS QUE PUEDAN SER DAÑADOS POR ARRASTRE O DERIVA.

PERSISTENCIA: MODERADAMENTE PERSISTENTE.

EFFECTOS ADVERSOS AL AMBIENTE:
A LAS ABEJAS. ALTAMENTE TÓXICO A PECES, NO TÓXICO

A LA SALUD: CARCINOGENICO Y TERATOGENICO.

PRECAUCIONES: LAS GENERALES PARA EL MANEJO DE PLAGUICIDAS.

CULTIVOS EN LOS QUE SE UTILIZA EL HERBICIDA CARBÁMICO ASULAM:

ZACATE PINTO, ZACATE PRIVILEGIO, ZACATE PELÓN ALPISTILO, ZACATE CADILLO, ZACATE COLA DE ZORRA, ZACATE CUERDILLA, CARDO SANTO, CHILILLO, LENGUA DE VACA, RABANILLO.

EPTC

CATEGORIA TOXICOLÓGICA USO: AGRÍCOLA

CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA: CL 50 ORAL (RATA) 1144-1272 mg/kg.

TIPO DE PLAGUICIDA: HERBICIDA TIOCARBÁMICO, SISTÉMICO, PREEMERGENTE.

INCOMPATIBILIDAD: NO DEBE MEZCLARSE CON OTROS HERBICIDAS.

CONTRAINDICACIONES: NO SIEMPRE CULTIVOS SUSCEPTIBLES POR LO MENOS SEIS MESES DESPUÉS DE LA APLICACIÓN.

PERSISTENCIA: MODERADAMENTE PERSISTENTE.

EFFECTOS ADVERSOS AL AMBIENTE: TÓXICO PARA PECES.

A LA SALUD: CARCINOGENICO Y TERATOGENICO.

PRECAUCIONES: LAS GENERALES PARA EL MANEJO DE PLAGUICIDAS.

CULTIVOS EN LOS QUE SE UTILIZA EL HERBICIDA TIOCARBÁMICO EPTAM:

ALFALFA, ZACATE DE INVIERNO, CÁRTAMO, NARANJA, MANDARINA, TORONJA, FRIJOL, ALGODÓN, PAPA, PASTO SILVESTRE, AVENA SILVESTRE, CENTENO SILVESTRE, ZACATE DE AGUA, PATA DE GANSO.

VI.I TRATAMIENTOS DIRECTOS Y MEDIANTE ACTIVACION CON LA MEZCLA S10 DE *Vicia faba* A LOS HERBICIDAS Eptam y Asulam EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

Se prepararon soluciones madre de los herbicidas considerando su grado de pureza con agua destilada de las cuales se obtuvieron las siguientes concentraciones, para Eptam: 6.5, 12.5, 25 y 35 ppm y para Asulam: 35, 70, 105 y 210 ppm, utilizando como testigo positivo 3600 ppm de etanol.

A los frascos de cultivos se les adicionaron 4.5 ml de medio Gibco (RPMI 1640) complementado con 0.18 ml de fitohemaglutinina más 8 gotas de sangre heparinizada de un donador sano y a las 24 horas se les aplicó 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU) a una concentración final de 5 mg/ml. A las 48 horas se les agregaron 35, 70, 105 y 210 ppm de Asulam y 6.5, 12.5, 25 y 35 ppm de Eptam por 4 horas para los tratamientos directos, para los indirectos se les añadieron 500 µl de la mezcla S10, y al testigo negativo solo la 5-BrdU. Posteriormente todos los tubos fueron lavados dos veces con suero fisiológico y se les suplementó nuevamente medio Gibco complementado con 0.18 ml de fitohemaglutinina más 100 µl de 5-BrdU. A las 70 h se les aplicó 100 µl de colchicina por una hora y a las 72 horas se cosecharon las células y se realizó la tinción diferencial con fluorescencia mas Giemsa (Perry y Wolff 1974).

VI.II OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN ENZIMÁTICA S10 DE LA RAÍZ DE *Vicia faba*

Las semillas de *Vicia faba* (var. minor) se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave, cuando las raíces alcanzaron una longitud aproximada de 4 cm, a 50 plántulas se les cortó 2 cm de la punta, se maceraron con amortiguador de fosfatos de sodio (0.1 M) pH 7.4, mas manitol 1mM (Baker), ditiotreitól 1 mM (Sigma), EDTA 1 mM (Sigma) y polivinilpolipirrolidona, a temperatura de 4°C, se homogeneizaron en un macerador de tejidos vegetales. La relación de volumen de la solución amortiguadora (ml) a peso fresco de los cortes de la raíz (g) fue de 1:1 (Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa *et al.* 1988).

El homogeneizado fue ultracentrifugado por 15 minutos a 15,000 rpm a 4°C, el sobrenadante (fracción enzimática S10) (Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa *et al.* 1988), fue esterilizado por filtración miliporo (0.45 µm), y usado para la activación metabólica *in vitro* de los dos herbicidas y de los

testigos negativo y positivo coincubados con los cultivos de linfocitos humanos.

VI.III MEZCLA ENZIMÁTICA S10

La mezcla S10 se preparó con la fracción microsómica S10 de *Vicia faba* en una relación de 1:9 (volumen/volumen) con los siguientes compuestos: 1 ml de MgCl $8 \times 10^{-3} \text{M}$ (Baker), 1 ml de KCL $3.3 \times 10^{-3} \text{M}$ (Baker), 1 ml de glucosa-6 fosfato $5 \times 10^{-3} \text{M}$ (Sigma), 1 ml de NADP $4 \times 10^{-3} \text{M}$ (Sigma) y 1 ml de NAD $4 \times 10^{-3} \text{M}$ (Sigma), 4 ml de amortiguador de fosfatos (pH= 7.4)= 9 ml + 1ml de fracción S10.

VI.IV COSECHA DE LINFOCITOS HUMANOS

1. Cada cultivo se transfirió a un tubo y se centrifugó a 1,250 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Se eliminó el sobrenadante e inmediatamente se resuspendió el botón con KCL (Merck) 0.075 M a 37 ° C, se dejó reposar durante 20 minutos en la incubadora.
3. De nuevo se centrifugó a 1,250 rpm durante 10 min.
4. Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió rápidamente con el fijador metanol - ácido acético (3: 1), dejándolos reposar durante 20 min.
5. Se centrifugaron a 1,250 rpm durante 10 min.
6. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el botón con el fijador y se les permitió reposar durante 10 min a temperatura ambiente.
7. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 0.5 ml de fijador, después se hicieron las preparaciones.
8. Cada preparación se hizo por goteo, realizándose como mínimo 3.
9. Se dejaron secar verticalmente al aire.
10. Las preparaciones con metafases fueron reetiquetadas con clave desconocida para el observador y posteriormente fueron teñidas mediante la técnica de fluorescencia más Giemsa.

VI.V TINCIÓN DIFERENCIAL DE CROMÁTIDAS HERMANAS

Las preparaciones con metafases se sumergieron en el colorante fluorocromado Hoestch 32258-agua destilada (1:9), las cuales fueron mantenidas en obscuridad por 20 min en cajas de Koplín.

1. Se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire verticalmente.
2. Posteriormente fueron colocadas en citrato de sodio salino (CSS, 0.03M) y se irradiaron con luz ultravioleta durante 60 min.
3. Se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire verticalmente.
4. Después se colocaron en cajas de Koplín con CSS en baño de agua a 60°C durante 60 min.
5. Se lavaron con agua de la llave y se dejaron secar al aire verticalmente.
6. Se tiñeron con el colorante Giemsa-agua destilada (1:10) durante 3 min.
7. Se enjuagaron con agua de la llave y se dejaron secar verticalmente al aire.
8. Se registraron los tipos de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) terminales como un evento y los intersticiales como dos.

Evaluación de la cinética de proliferación celular y del índice mitótico.

Con el objeto de estimar el posible efecto citotóxico de los dos herbicidas tiocarbámicos en los linfocitos humanos en cultivos se analizaron la cinética de proliferación celular a través del índice de replicación y también se estableció el índice mitótico.

El índice de replicación se determinó examinando en 100 células las metafases que estuvieran en primera, segunda y tercera divisiones de acuerdo con Lamberti *et al.* (1983) de la siguiente forma:

$$\text{Índice de replicación (IR)} = 1M1 + 2M2 + 3M3 / 100$$

Donde: M1, M2 y M3 representaron los porcentajes de metafases de primera, segunda y tercera divisiones celulares. Se consideraron M1 aquellas células cuyo DNA se replicó una vez después de la adición de la 5-BrdU, M2 a células cuyo DNA se replicó dos veces en presencia de la 5-BrdU y M3, aquellas que presentan mayor número de cromátidas bifilarmente incorporadas, ya que estuvieron tres ciclos con la 5-BrdU.

Para el índice mitótico se cuantificó el número de metafases en 1000 células estimuladas en cada experimento de la siguiente manera:

$$\text{Índice mitótico (IM)} = \text{No. de metafases} / 1000 \text{ células estimuladas y} \\ \% \text{ IM} = \text{IM} \times 100.$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cuantificar los ICH se registraron 25 metafases de segunda división. En todos los casos se realizaron dos experimentos cuyos valores se compararon entre sí mediante la *t* de Student, $p > 0.001$. Posteriormente a los promedios se les aplicó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls, $p > 0.001$ y la X^2 para los índices de replicación y mitótico $p < 0.05$.

La prueba de análisis de varianza (ANOVA), permite comparar la variación de los valores testigos con los tratados e indica si presentan

diferencias significativas entre ellos. Si este es el caso, la distribución no es normal y por lo tanto se deberá utilizar una prueba no paramétrica como la de Newman-Keuls.

VII. RESULTADOS

En los tratamientos sin activación, se observa que en las concentraciones de 35, 70, 105 y 210 ppm de Asulam y 6.5, 12.5 y 25 ppm de Eptam aplicadas directamente a los cultivos de linfocitos *in vitro* no tienen efecto, ya que no hay diferencias significativas al aplicar la prueba de ANOVA en la inducción de ICH al agregar los herbicidas sin la participación del metabolismo vegetal comparado con el del testigo que contenía únicamente el medio, este mismo comportamiento se observó para el etanol, el Eptam a 35 ppm fue tan tóxico que produjo la muerte celular al no encontrarse células (Tabla I).

En cuanto a los índices de replicación y mitótico en el caso del Asulam en 35 y 70 ppm aumenta la cantidad de células M1 y disminuye de manera significativa la de M3 mientras que para 105 ppm se incrementan las de M3. Asimismo para el etanol no hay diferencias significativas con relación al testigo de acuerdo con la prueba de X^2 (Tabla II).

Las alteraciones observadas en la cinética de proliferación celular, no se reflejan en el IR, ya que no hay diferencias de este con el testigo. Respecto al IM en los tratamientos con Asulam disminuye de acuerdo con la concentración siendo significativo en 70 y 105 ppm, lo mismo sucede con el Eptam en donde se observa una disminución de acuerdo con la concentración siendo significativa en 12.5 y 25 ppm (Tabla II).

Cuando se produce un aumento en la cantidad de células M1 y un decremento significativo en las M3, implica que estos herbicidas están provocando retraso en la progresión del ciclo celular, aunque este comportamiento también se nota en el testigo, existen diferencias significativas en 35 y 70 ppm de Asulam.

En los tratamientos donde se incuban los herbicidas con la mezcla S10 de *Vicia faba* las concentraciones de 100, 200, 300, y 400 ppm de Asulam y 2.0, 2.5, 5.0 y 6.5 ppm de Eptam en los cultivos de linfocitos humanos, Tabla III se mostró un comportamiento de ICH concentración-efecto sobre estos, así como una diferencia significativa con respecto al testigo negativo que contenía únicamente el medio más la BrdU, y para la concentración de 500 ppm de Asulam se produjo muerte celular de la

misma manera que con el Eptam al llegar a 10 ppm. Los tratamientos con etanol presentaron diferencias significativas al aplicar la prueba Newman Keuls ($p > 0.001$) al ser coincubados con la mezcla S10, lo cual corrobora que este compuesto es un mutágeno indirecto activado por el metabolismo vegetal (Tabla III). La cantidad de ICH inducida por el testigo positivo es muy similar a las concentraciones máximas tanto de Eptam como de Asulam siendo estas de 15.56, 14.36 y 15.48, respectivamente (Tabla III).

En cuanto al índice mitótico en el caso del Asulam 100, 200 y 300 ppm no hay diferencias significativas con relación al testigo negativo, mientras que para 400 ppm si las hay. Para el Eptam en las concentraciones de 2.0, 2.5 y 5.0 ppm no se muestran diferencias significativas, siendo lo contrario para 6.5 y 8.0 ppm (Tabla IV).

Respecto al índice de replicación, tanto para Eptam como para Asulam, no se evidencian diferencias significativas en ninguna de las concentraciones con respecto al testigo negativo y de acuerdo a la prueba estadística X^2 (Tabla IV).

Para el testigo positivo existen diferencias significativas, presentando un incremento en las células M1 y una disminución en M2 con relación al testigo negativo, mientras que para M3 existe una disminución que no se muestra como significativa. En cuanto al índice de replicación no muestra diferencias con respecto al testigo negativo, sin embargo el IM sí las presenta (Tabla IV).

Para el Asulam, no existe un aumento significativo en las células de 1ª, 2ª, y 3ª metafases con relación al testigo en 100 y 200 ppm. Sin embargo, para 300 y 400 ppm se produce aumento en las células M1, disminución en M2 y se mantiene igual en M3 (Tabla IV).

En cuanto a la cinética de proliferación celular en los cultivos con Eptam, la concentración de 2.0 ppm no muestra diferencias significativas en las células M1 y M2 pero si las hay para las M3. Para la concentración 2.5 ppm se muestra significancia en M1 y M2 pero no para las M3, mientras que para Eptam 5.0 únicamente la hay en M1. Para 6.5 las células M1 y M2 muestran diferencias con respecto al testigo y en 8.0 ppm solamente en las células de la primera replicación. La concentración de 10 ppm provoca muerte celular ya que no aparecen células estimuladas (Tabla IV).

VIII DISCUSION Y CONCLUSIONES

El uso del cultivo de linfocitos humanos para evaluar el daño cromosómico producido por diferentes agentes, tanto físicos como químicos han sido de gran utilidad ya que este método es uno de los más sencillos y confiables para observar en metafases los cambios producidos sobre los cromosomas.

Además de este método, el sistema de intercambio de cromátidas hermanas ha sido utilizado con éxito para detectar el daño sobre el DNA con concentraciones 10 veces menores que las usadas normalmente para producir aberraciones cromosómicas (Wolff 1977).

Los tratamientos directos con etanol (Tabla I) tuvieron un comportamiento similar con respecto a ICH al testigo negativo, lo cual implica que este compuesto se ha descrito como mutágeno indirecto activado por el metabolismo vegetal (Takeisha *et al.* 1982, 1988, Takeisha y Kanaya 1983, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999), no actúa sobre el cultivo de linfocitos en ausencia de transformación enzimática, como se esperaba.

El retraso en la progresión del ciclo celular de los linfocitos producido por los plaguicidas Eptam y Asulam agregados en concentraciones bajas directamente a los cultivos (Tabla II), sugiere que las moléculas originales de ambos, posiblemente interfirieron con el estímulo de la fitohemaglutinina, con la disponibilidad de los nutrientes y otros factores que afectaron a los linfocitos a continuar su ciclo normal. A este respecto se ha descrito que la modificación de la proliferación celular de los linfocitos humanos inducida por un mitógeno ha sido propuesta como un biomarcador de exposición a los agentes tóxicos (Snyder y Valle 1991, Rojas *et al.* 1992, Gonsebatt *et al.* 1995). Diversos agentes químicos que son inmunodepresores en los seres humanos, también muestran acción carcinogénica (Tomatis *et al.* 1989). Sin embargo no hay evidencias que determinen correlación entre los dos procesos, pero se ha sugerido que si un agente químico carcinogénico altera los patrones normales de la proliferación o diferenciación celular debe ser considerado como inmunotóxico (Luster *et al.* 1992).

En cuanto a la inducción de ICH por estos herbicidas solo se produce cuando se lleva a cabo la transformación metabólica de ambos plaguicidas a través de la mezcla enzimática S10 de *Vicia faba*.

Los resultados obtenidos con el Asulam y el Eptam (Tablas I y III) muestran que a medida que aumenta la concentración se eleva la frecuencia de ICH, y en todos los casos hasta llegar a su valor máximo y posteriormente se presenta la muerte celular, a excepción de Eptam 8.0 ppm en donde disminuyó la cantidad de ICH (Tabla III). Por lo anterior es posible considerarlos como promutágenos eficientes en la inducción de ICH de acuerdo con el criterio de Latt *et al.* (1981).

Por otro lado, para tener la certeza de la capacidad metabólica de *Vicia faba* se emplea como testigo positivo a los cultivos de linfocitos coincubados con el etanol al 1×10^{-1} M; los datos obtenidos demuestran la activación de dicho compuesto por los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con el alcohol, debido a que el ICH aumenta a más del doble que cuando se aplica éste alcohol directamente sobre los linfocitos (Tabla III), dicho comportamiento es similar al encontrado por Takehisa *et al.* (1982, 1988) y Takehisa y Kanaya (1983), que describen al etanol como un potente inductor de ICH en el cultivo de células de criceto chino y en linfocitos humanos (Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999) con el mismo sistema de activación vegetal.

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

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

Los datos anteriores no coinciden con los resultados obtenidos en este estudio debido a que el resultado negativo en las cepas bacterianas puede deberse a diferencias en el metabolismo que realiza la fracción S9 de *N. tabacum*, mientras que *Vicia faba*, que presenta la fracción enzimática S10, formándose diferentes compuestos que posiblemente actúan de manera distinta sobre el DNA.

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 (Betse y Schreiber 1972), datos que concuerdan con el presente trabajo ya que a concentraciones bajas (2.0 ppm) se obtuvieron efectos en la inducción de ICH y en dosis altas (10 ppm) se provoca muerte celular.

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

Sin embargo en la mayoría de las publicaciones se usan la media y la varianza ya que los ICH siguen una distribución normal en el caso de poblaciones expuestas a plaguicidas (Gómez-Arroyo *et al.* 1992). 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 a la caña de azúcar no se recomienda darla como forraje al ganado, sin embargo para el consumo humano no se hace especificación alguna sobre el manejo del mismo.

Los resultados obtenidos al coincubar la mezcla S10 con Asulam y con Eptam, muestran que existe una transformación de dichos plaguicidas y que no son las moléculas originales las que provocan daño al DNA que se expresa como ICH, sino que probablemente los productos metabólicos (sulfóxidos de tiocarbamato) son los causantes de dicho efecto ya que son alquilantes y presentan gran afinidad para reaccionar con el DNA.

Al graficar los resultados obtenidos con Asulam más la fracción S10 se obtiene una recta que tiene una correlación positiva, es decir que conforme se eleva la concentración de plaguicida, aumenta la cantidad de ICH, ya que la capacidad metabólica de la mezcla S10 para transformar al Asulam no alcanza su límite de saturación por lo que no se repiten los valores de ICH. Sin embargo con 500 ppm se produce muerte celular, este mismo comportamiento se observa en los datos obtenidos por Calderón-Segura *et al.* (1999) al coincubar butilate más la mezcla S10, en linfocitos humanos, en donde la mayor frecuencia de ICH es a una concentración de 200 ppm y a 300 ppm induce muerte celular,.

En cuanto al Eptc, la gráfica obtenida muestra un comportamiento diferente al Asulam, ya que al aplicar de la segunda concentración (2.5 ppm) hasta la antepenúltima (6.5 ppm) se obtienen los mismos valores para ICH, a 8 ppm hay una disminución de dichas referencias lo que sugiere que puede estar involucrado algún mecanismo de desintoxicación y a 10 ppm muerte celular. Lo que sugiere que este plaguicida satura de inmediato la capacidad de dicha mezcla para transformar al herbicida, estos datos coinciden con los obtenidos por Calderón-Segura *et al.* (1999) al coincubar Molinate más la mezcla S10 en linfocitos humanos en donde las frecuencias de ICH obtenidas no presentan una relación dosis respuesta y a 300 ppm inducen muerte celular.

REFERENCIAS

- Ames B. N., McCann J. y Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella mammalian* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 3, 347-363.
- Ashton F. M., de Villers O. T., Glenn R. K. y Duke W. B. 1977. Localization of metabolic sites of action of herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7, 122-141.
- 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.
- Betse C. E. y Schreiber M. M. 1972. RNA synthesis as the basis for EPTC and 2,4-D antagonism. *Weed Sci.* 20, 8-11.
- Breaux E. J. 1986. Identification of initial metabolites of acetochlor in corn and in soybean seedling. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1098-1104.
- Breaux E. J. 1987. Initial metabolism of acetochlor in tolerant and susceptible seedling. *Weed Sci.* 35, 474-478.
- Calderón-Segura M.E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Ramírez M. 1999. *In vitro* and *in vivo* promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchange in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 438, 81-88.
- Carringer R. D., Rick C. E. y Bush L. P. 1978. Metabolism of EPTC in corn (*Zea mays*). *Weed Sci.* 26, 157-171.
- Casida J. E., Gray R. A. y Tilles H. 1974. Thiocarbamates sulfoxides potent, selective, and biodegradable herbicides. *Science* 184, 573-574.
- Casida J. E., Kimmel E. C., Lay M. M., Ohkawa H., Rodebush J. E., Gray R. A., Tseng C. K. y Tilles H. 1975a. Thiocarbamate sulfoxide herbicides. *Environ. Qual. Saf. Duppl.* III. 675-679.
- Casida J. E., Kimmel E. C. y Ohkawa R. 1975b. Sulfoxidation of thiocarbamate herbicides and metabolism of thiocarbamate in living mice and liver enzyme system. *Sci. Pestic. Biochem. Physiol.* 7, 122-141.

Chen Y. S. y Casida J. E. 1978. Thiocarbamate herbicide metabolism: microsomal oxygenase metabolism of EPTC involving mono-and dioxygenation and the sulfur and hidroxilation at each alkyl carbon. *J. Agric. Food Chem.* 26, 263-267.

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.

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.

Csukas 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.

Davies P. E., Cook L. S. J. y Barton J. L. 1994. Triazine herbicide contamination of Tasmanian streams: sources concentrations and effects on biota. *Australian J. Mar. Freshwater Res.* 45, 209-226.

Devine M. D. 1989. Phloem translocation of herbicides. *Rev. Weed Sci.* 4, 191-213.

Devine M. D. y Vanden-Born W.H. 1991. Absorption and transport in plants. En: Grover R. y Cessna A. J. (Eds.). *Environmental Chemistry of Herbicides*. Vol II. CRC Press, Boca Ratón, pp. 119-140.

Dufraín R., Littlefield L. G. y Wilmer J. 1979. Cyclophosphamide-induced SCE in rabbit lymphocytes. *Environ. Mutagen.* 1, 283-286

DGEIE (Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación). 1995. Informe Anual Agrícola. México, D.F.

Duke O. S. 1990. Overview of herbicide mechanism of action. *Environ. Health Perspect.* 87, 263-271.

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, pp. 285-310.

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., Schmal D. y Preussmann R. 1976. Carcinogenicity in rats of high oral doses of N-nitrosocarbaryl, a nitrosated pesticide. Cancer Lett. 1, 181-284.

Environmental Health Criteria. 1988. Thiocarbamate pesticides. A general introduction (76). World Health Organization, Ginebra.

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 kinurenine formamidase inhibition in mouse liver. Toxicol. Appl. Pharmacol. 54, 20-30.

Evans J. H. y O'Riordan M.L. 1975. Human peripheral blood lymphocytes for analysis of chromosome aberration in mutagen test. Mutat. Res. 31, 135-148.

Fuerst E.P. 1987. Understanding the mode of the action of the chloroacetamide and thiocarbamate herbicides. Weed Technol. 1, 270-277.

Fuhremann T.W., Lichtenstein E. P. y Stratman F. W. 1978. Effects of naturally occurring food plants components on insecticide degradation in rats. J. Agric. Food Chem. 26, 1068-1075.

Gonsebatt M. E., Herrera L.A. y Ostrosky-Wegman P. 1995. Lymphocyte proliferation as a biomarker in environmental monitoring. En: Butterworth F.M., Corkum L.D. y Guzmán Rincón J. (Eds.), Biomonitoring and Biomarkers as indicator of Environmental Change. Plenum Press, Nueva York, pp. 81-94.

Gómez-Arroyo S., Noriega-Aldana N., Osorio A., Galicia F., Ling S. y Villalobos-Pietrini R. 1992. Sister-chromatid exchange analysis in a rural population of México exposed to pesticides. Mutat. Res. 281, 173-179.

Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini R. 1995. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitor of environmental pollutants. En: Butterworth. F. M. Corkum L.D. y Guzmán-Rincón J. (Eds.), Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. 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.

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

Gray L. 1991. Behavior persistence and degradation of carbamate and thiocarbamate herbicide in the environmental. En: Proceeding of the California Weed Control Conference, pp. 128-134.

Gray R. A. y Weirich A. J. 1969. Importance of root, shoot and seed exposure on the herbicidal activity of EPTC. Weed Sci. 17, 223-229.

Grover R. y Cessna A. J. 1991. *Environmental Chemistry of Herbicides*. Vol. II. CRC Press, Boca Ratón, pp. 2-15.

Hayes W. R. Jr., Laws E. R. Jr. 1991 (Eds.). Handbook of Pesticides Toxicology. Vol III. Academic Press, Nueva York, pp. 1346.

Hatzios K. K. 1991. Biotransformation of herbicides in higher plants. En: Grover R. y Cessna A. J. (Eds.) *Environmental Chemistry of Herbicide*. CRC Press, Boca Ratón, pp.141-185.

Higashi K., Nakashima K., Karasaki Y., Fukunaga M., y Misugashi K. 1981. Activation of benzo (a) pyrene by microsomes of higher plant tissues and their mutagenicity. Biochem. Int. 2, 373-380.

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

Horvath L. y Pulay A. 1980. Metabolism of EPTC in germinating corn: sulfone as the true carbamoylating agent. Pestic Biochem. Physiol. 14, 265-269.

Hubell J. P. y Casida J. E. 1975. Dichloroacetamide antidotes for thiocarbamate herbicides: mode of action. Science 189, 287-289.

Hubell J. P. y Casida J. E. 1977. Metabolic fate of the N,N-dialkylcarbamoyl moiety of thiocarbamate herbicides in rats and corn. J. Agric. Food Chem. 25, 404-413.

Huckle K. R. y Milburn P. 1982. Biochemical mechanism of aminoacid conjugation of xenobiotics. En: Hutson D. H. y Roberts T. R. (Eds.).

Jasinka J., Steffen J. y Michaelowski A. 1977. Studies on *in vitro* lymphocyte proliferation in cultures synchronized of DNA synthesis. II. Kinetics of the initiation of the proliferation response. *Exp. Cell. Res.* 61, 333-341.

Junnila S., Heinonen-Tanski H., Ervio L.R. y Laitinen P. 1993. Phytotoxic persistence and microbiological effects of metribuzin in different soils. *Weed Res.* 33, 213-223.

Kato H. 1974. Spontaneous sister chromatid exchange detected by BrdU-labeling method. *Nature* 251, 70-72.

Kishore G. M. y Shah D. P. 1988. Aminoacid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 627-663.

Lamberti L., Bigatti P. P. y Ardito G. 1983. Cell kinetics and sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 120, 193-199.

Lamoureux G. L. y Frear D. S. 1979. Pesticides metabolism in higher plants. En: Paulson G. D., Frear D. S. y Marks E. P. (Eds.). *Xenobiotic Metabolism. In vitro Methods*. Symp. Series 97. Amer. Chem. Soc. Washington, pp. 77-128.

Lamoureux G. L. y Rusness D. G. 1987. EPTC metabolism in corn, cotton and soybean: identification of a novel metabolism of a glutathione conjugate. *J. Agric. Food Chem.* 35, 1-7.

Latt S. A. 1973. Microfluorometric detection of DNA replication in human metaphase chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 70, 3395-3399.

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.

Latt S. A. y Loveday K. S. 1981. 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.

Lay M. M., Hubbell J. P. y Casida J.E. 1975. Dichloroacetamide antidotes thiocarbamate herbicides detoxification. Mode of action. *Science* 189, 287-288.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Lay M. M. y Casida J. E. 1976. Dichloroacetamide antidotes enhance thiocarbamate sulfoxide detoxification by elevation corn root glutathione content and glutathione S-transferase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 6, 442-456.

Leavitt J. R.C. y Penner D. 1979. *In vitro* conjugation of glutathione and other thiols with acetanilide herbicides and EPTC sulfoxide and the action of the herbicide antidote R-25788. *J. Agric. Food Chem.* 27, 533-536.

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.

Luster M.I., Portier C., Pait D.G., White K.L. Jr., Gennings C., Munson A. y Rosenthal G.J. 1992. Risk assessment in immunotoxicology. *Fundam. Appl. Toxicol.* 10, 2-19.

Lyon M. B. 1970. Search for a mechanism for the increase sensitivity of 5-bromouracil-substituted DNA of ultraviolet radiation. II single strand breaks in the DNA of irradiated 5-bromouracil-substituted T3 coliphage. *Biochem. Biophys. Acta* 209, 24-33.

Machemer H. y Pickel M. 1994. Carbamate herbicides and fungicides. *Toxicology* 91, 105-109.

Marshall E. 1985. The rise and decline of temic. *Science* 229, 1369-1371.

Meligan R. I. 1991. Effects of the eptam. *Hidrobiol. J.* 27, 33-36.

Mellan I. 1977. *Industrial Solvents Handbook*. Noyes Data Corp. Nueva Jersey, pp. 1-5

Moriya M., Otha T., Watanabe K., Miyazawa T., Kato K. y Shirasu Y. 1983. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay system. *Mutat. Res.* 116, 185-216.

Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen H. y Degraeve N. 1984. Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of insecticides. En: M. Kirsch-Volders. (Eds.). *Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of industrial pollutants*. Cap. 3. Plenum Press, Nueva York, pp. 127-203.

NCI (National Cancer Institute) 1978. Bioassay of mexacarbamate for possible carcinogenicity, NCI Tech. Rep. No. 147, , Bethesda, Maryland, pp. 115-155.

Obe G. y Ristow H. 1977. Acetaldehyde, but not etanol, induces chromatid exchanges in Chinese hamster cells *in vitro*. *Mutat. Res.* 56, 211-213.

Obe G., Natarajan T., Meyers A. y Den Hertog A. 1979. Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood *in vitro*, and of SCE in bone-marrow cells of mice *in vivo* by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutat. Res.* 68, 291-294.

Obe G., Jonas R. y Schmith S. 1986. Metabolism of etanol *in vitro* produces a compound which induces sister-chromatid exchange in human peripheral lymphocytes *in vitro*: acetaldehyde not ethanol is mutagenic. *Mutat. Res.* 174, 47-51

OMS (Organización Mundial de la Salud). 1990. Plaguicidas. Informe técnico No.12.

PAN International (Pesticide action network international) 1990. Consult manual.

Painter. R. B. 1982. A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* 70, 337-341.

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

Plewa M.J. y Gentile J. M. 1982 Mutagenicity of atrazine: a maize microbe bioassay. *Mutat. Res.* 38, 287-292.

Plewa M.J. y Wagner D. E. 1993. Activation of promutagens by green plants. *Ann. Rev. Genet.* 27, 93-113.

Rivera J. y Rivera M. 1990. Organophosphate poisoning. *Boletín de la Asociación Médica de Puerto Rico.* Vol. 82. pp.201-209.

Rojas E., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt M.E., Montero R., Rodriguez R. y Ostrosky-Wegman P. 1992. Mitotic index and cells proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti Cancer Drugs* 4, 637-640.

Rosales-Hernández B. 1998. Efecto citogenético provocado por los herbicidas carbámicos Eptam y Asulam en *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F., 61 p.

Sandermann H. Jr. 1988. Mutagenic activation of xenobiotic by plants enzymes. *Mutat. Res.* 197,183-194.

Sandermann H. Jr., Arjmad M., Gennity I. y Winkler R. 1990 Animal bioavailability of defined xenobiotic lignin metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1877-1880.

Sandermann H. Jr. 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* 17, 82-84.

Sandermann H. Jr., Musick T. J. y Aschbacher P. W. 1992. Animal bioavailability of a 3,4-dichloroaniline-lignin metabolite fraction from wheat. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2001-2007.

Scheid W. 1976. Mechanism of differential staining of BrdU-substituted *Vicia faba* chromosomes. *Exp. Cell Res.* 101, 55-58.

Schwartzman J. B. y Cortés F. 1977. Sister-chromatid exchanged in *Allium cepa* L. *Chromosoma* 62, 119-133.

Schwartzman J. B. 1987. Sister chromatid exchange in higher plant cells: and perspectives. *Mutat. Res.* 181, 127-147.

Shimabukuro R. H., Lamoureux G. L. y Frear F. S. 1981. Pesticide metabolism in plants: principles and mechanism. En: Matsumura F. (Ed.). *Biological Degradation of Pesticides*. Plenum Press, Nueva York, pp. 123-145.

Shimabukuro R.H., Lamoureux G. L. y Frear F. S. 1982. Pesticide metabolism in plants reaction and mechanism. En: Matsumura F. y Murti C. R. K. (Eds.). *Biodegradation of Pesticides*. Plenum Press, Nueva York, pp. 21-66.

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

Snyder C. A. y Valle C.D. 1991. Lymphocyte proliferation assay as potential biomarkers for toxicant exposures. *J. Toxicol. Environ. Health* 34, 127-139.

SS (Secretaría de Salud) Anuario estadístico. 1993. Dirección General de Estadística Informática y Evaluación. Octubre, México D.F.

Stephenson G. R., Bunce N. J., Makowski R. I., Bergsma M. D. y Curry J.

C. 1979. Structure activity relationships for antidotes to thiocarbamate herbicides in corn. *J. Agric. Food Chem.* 27, 543-547.

Sterling T. M. 1994. Mechanism of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells. *Weed Sci.* 42, 263-276.

Takeisha S., Kanaya N. y Rieger R. 1982. Induction of sister chromatid exchange in CHO cells by extracts from *Vicia faba* roots exposed to ethanol. *Mutat. Res.* 105, 169-174.

Takeisha S. y Kanaya N. 1983. A comparison of *Vicia faba* root S10 and rat liver S9 activation of ethanol, maleic hidrazide and cyclophosphamide measured by sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 197, 206-209.

Takeisha S., Kanaya N y Rieger R. 1988. Promutagen activation by *Vicia faba*: and assay on the sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 197, 206-209.

Tomatis L., Aitio A., Wilbourn J. y Shuker L. 1989. Human carcinogens so far identified. *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 795-807.

Tyrkiel E. 1977. Mutagenic action of O-isopropoxy-phenyl-N-methylcarbamate (propoxur) on mouse gametes. *Rocz. Pzh.* 28, 601-613.

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

WHO (World Health Organization). 1972. Health Hazard of Human Enviroment. Ginebra. pp. 97-105.

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

WHO (World Health Organization). 1976. Technical Report Series No. 365. *Safe use of pesticides in public health*. WHO Finlandia. (Eds.), pp. 1-40.

Wild D. 1975. Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutat. Res.* 32, 133-150.

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

Wolff S. 1977. Chromosome effects induced by low levels of mutagens. *Research in Photobiology*, Plenum Press, Nueva York.

Woo Y. 1983. Carcinogenicity, mutagenicity, and teratogenicity of carbamates, thiocarbamates and related compounds: an overview of structure-activity relationships and environmental concerns. *J. Environ. Sci. Health* 1, 97-153.

Worthing R. C. 1991. *The Pesticide Manual. A world compendium*. 9th ed. Worthing R. C. y Walter, R. J. (Eds.). The British Crop Protection Council, 336 p.

Worthing R. E., Glaze N. C., Dowler C.C. y Joung C. T. 1984. Turnip green, cucumber, snapbean, and southern pea response to pesticides in intensive-cropping sequences. *J. Agric. Food Chem.* 27, 900-904.

Yin-Tak W. 1983. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of carbamates, thiocarbamates and related compounds: and overview of structure-activity relationships and environmental concerns. *J. Environ. Sci. Health* 1, 97-133.

X TABLAS

TABLA I. INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR ASULAM Y EPTAM EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO TRATADOS POR 4 h^a

	\bar{X}^b	\pm	E.E
Testigo negativo	4.40	\pm	0.27
Etolol 3600 ppm ($1 \times 10^{-1} M$)	4.76	\pm	0.51
Cultivo de linfocitos			
Tratamientos directos			
Asulam			
ppm			
35	4.72	\pm	0.31
70	4.52	\pm	0.34
105	4.20	\pm	0.36
210	4.10	\pm	0.38
Eptam			
ppm			
6.5	4.00	\pm	0.58
12.5	4.20	\pm	0.43
25.0	4.82	\pm	0.81
35.0	Muerte celular ^c		

^a Promedio de dos experimentos

^b n= 50 metafases

^c No se observaron células estimuladas

* No se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento por análisis de varianza F= 9.100 el valor de $p < 0.001$.

TABLA II. FRECUENCIA DE CÉLULAS DE PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES, ÍNDICE DE REPLICACIÓN (IR) E ÍNDICE MITÓTICO (IM) DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO TRATADOS POR 4 h CON ASULAM Y EPTAM^a

	M1	M2	M3	IR ^b	IM ^c
Testigo negativo	38±2.25	47±3.68	15±1.47	1.77±0.035	5.0±0.0
Etanol 3600 (1X10 ⁻⁴ M)	51±9.19	20±19.09	33±12.72	1.46±0.21	4.0±0.7
Cultivo de linfocitos					
Tratamientos directos					
Asulam					
ppm					
35	54±22.62	40±4.95	6±27.57*	1.52±0.17	3.0±1.41
70	61±6.26	33±12.02	6±27.57*	1.35±0.29	1.0±2.82*
105	32±4.24	34±9.19	34±9.19	2.12±0.24	1.2±2.68*
210	33±12.02	32±4.24	34±9.19	1.52±0.17	3.0±1.41
Eptam					
ppm					
6.5	46±5.65	44±2.12	10±3.53	1.74±0.02	2.0±2.12
12.5	68±21.21	25±15.55	7±5.65	1.35±0.29	1.0±2.82*
25.0	53±10.60	36±7.77	11±2.82	2.12±0.24	1.2±2.68*
35.0			Muerte celular ^d		

^a Promedios de dos experimentos

^b Índice de Replicación=1M1+2M2+3M3/100

^c Índice Mitótico, n= 1000 células

^d No se observaron células estimuladas

* Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento X², p<0.05.

TABLA III INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR ASULAM Y EPTAM EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO COINCUBADOS CON LA MEZCLA S10 DE *Vicia faba* TRATADOS POR 4 h^a

	\bar{X}^b	\pm	E.E
Testigo	4.40	\pm	0.27
Etanol 3600 ppm (1X10 ¹ M)	15.56*	\pm	0.51
Cultivo de linfocitos			
Tratamientos directos			
Asulam			
ppm			
100	11.44*	\pm	0.53
200	13.48*	\pm	0.51
300	14.92*	\pm	0.48
400	15.48*	\pm	0.30
500	Muerte celular^c		
Eptam			
ppm			
2.0	12.48*	\pm	0.42
2.5	15.28*	\pm	0.53
5.0	15.48*	\pm	0.33
6.5	15.52*	\pm	0.22
8.0	14.36*	\pm	0.30
10.0	Muerte celular^c		

^a Promedio de dos experimentos

^b n= 50 metafases

^c No se observaron células estimuladas

* Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento por análisis de varianza F: 20.200 y posteriormente se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls a P<0.001.

TABLA IV FRECUENCIA DE CÉLULAS DE PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES, ÍNDICE DE REPLICACIÓN (IR) E ÍNDICE MITÓTICO (IM) DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO COINCUBADOS CON LA MEZCLA S10 DE *Vicia faba* TRATADOS POR 4 h

	M1	M2	M3	IR ^b	IM ^c
Testigo	38±2.12	47±3.53	15±1.41	1.77±0.03	5.0±0.0
Etanol 3600 (1X10 ⁻¹)	59±14.84*	20±19.09*	9±4.24	1.26±0.36	1.0±2.8*
Cultivo de linfocitos					
Tratamientos directos					
Asulam					
ppm					
100	33±3.53	47±0.0	20±3.53	1.70±0.49	3.5±1.06
200	33±3.53	41±4.24	26±7.77	1.65±0.08	3.0±1.41
300	48±8.48	30±8.88	20±4.95	1.50±0.19	2.3±1.9
400	49±10.6	30±8.48	21±7.07	1.43±0.24	1.8±2.26*
500	M u e r t e c e l u l a r ^d				
Eptam					
ppm					
2.0	43±1.41	39±7.78	26±6.36*	1.74±0.02	3.3±1.2
2.5	53±8.48*	29±12.72*	18±0.70	1.65±0.08	2.9±1.48
5.0	52±9.19	38±6.36	10±2.24	1.59±0.12	2.4±1.83
6.5	53±10.6*	29±12.7*	18±2.82	1.50±0.18	1.6±2.4*
8.0	53±10.6*	30±12.0	17±1.41	1.25±0.36	1.5±2.47*
10.0	M u e r t e c e l u l a r ^d				

^a Promedios de dos experimentos

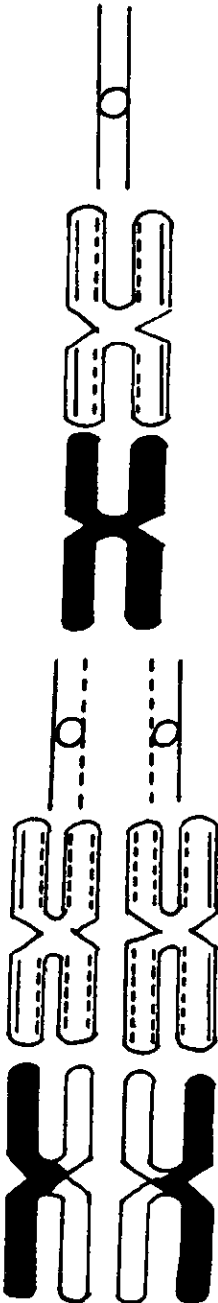
^b Índice de Replicación=1M1+2M2+3M3/100

^c Índice Mitótico, n= 1000 células

^d No se observaron células estimuladas

* Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento con X². P<0.05

NORMAL



CON INTERCAMBIO

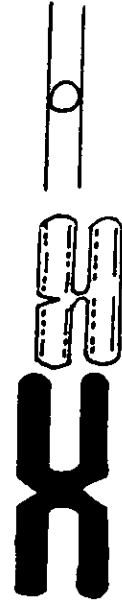
Primer ciclo de replicación

G1

S

G2

M



Segundo ciclo de replicación

G1

S

Bifilarmente sustituida

Unifilarmente sustituida

Intercambio intersticial

Intercambio distal

