

0038  
15

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



UNAM

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDO POR  
DOS HERBICIDAS DEL GRUPO QUÍMICO TRIAZINA EN  
CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS PREVIA ACTIVACIÓN  
METABÓLICA POR UN BIOMONITOR VEGETAL (*Vicia faba*).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)  
P R E S E N T A:  
M. EN C. SAÚL FLORES MAYA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. EN C. SANDRA GÓMEZ-ARROYO

0332



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, bajo la dirección de la Doctora en Ciencias Sandra Gómez Arroyo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN216098) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM

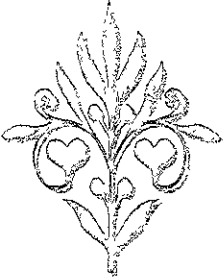
Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado Tesis (PAEP-Tesis 002356) de la Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PASPA) UNAM

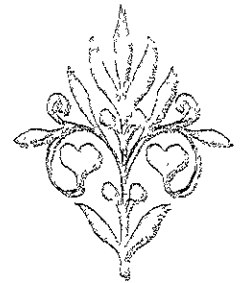
A la Dirección de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM.

A la Facultad de Ciencias de la UNAM

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera UNAM



A mi hijo Saúl Alejandro  
Renacimiento de mi vida.  
Nov.30 99



Para todas las personas que de alguna manera estuvieron involucradas para lograr una meta más en mi vida

Gracias

A mis padres, a mis hermanos, a ti Selene, a los abuelos maternos de mi hijo, a mis cuñados y mis pequeños sobrinos, por su cariño y motivación.

A la Dra. Sandra Gómez-Arroyo, al Dr. Rafael Villalobos-Pietrini, al Dr. Stefan Marian Waliszewski Kubiak, a la Dra. María Elena Calderón-Segura, a la M. en C. Josefina Cortés Estava, al Dr. Guillermo Laguna Hernández, al Dr. Luis Felipe Jiménez García, a la Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón, por sus enseñanzas, motivación y amistad.

# INDUCCIÓN DE ICHs POR Metribuzina y Ametrina

## Contenido

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	
Antecedentes.....	5
Toxicidad de metribuzina y ametrina.....	10
Metabolismo de las triazinas.....	11
Mutágenos directos e indirectos y sistemas bioindicadores.....	15
Criterios genéticos	
Intercambio de cromátidas hermanas.....	17
Cinética de proliferación linfocitaria e índice mitótico.....	18
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	19
HIPOTESIS.....	21
MATERIALES Y METODOS	
Clasificación y características químicas de las triazinas.....	22
Cultivo de linfocitos humanos y tratamientos directos.....	26
Activación metabólica <i>in vivo</i> .....	28
Intercambio de cromátidas hermanas, cinética de proliferación linfocitaria, índices de replicación y mitótico de los linfocitos periféricos en cultivo.....	30
Tratamientos directos con metribuzina y ametrina en las raíces de <i>Vicia faba</i> .....	32
RESULTADOS.....	35
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS.....	55
Tablas y figuras.....	68

## RESUMEN

Metribuzina y ametrina son herbicidas muy comunes y ampliamente utilizados en la agricultura mexicana. Sin embargo, hay poca información sobre su toxicidad y mutagenicidad en humanos, animales y plantas. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluaron los efectos de estos herbicidas cuando fueron aplicados directamente a los meristemos apicales de la raíz de *Vicia faba* y en ellos se registró la inducción de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y también cuando se agregaron al cultivo de linfocitos humanos usando la misma prueba (ICH). Además se verificó la cinética de proliferación linfocitaria (CPL), a través del índice de replicación (IR) y el efecto citotóxico de estos herbicidas mediante el índice mitótico (IM) con y sin la activación metabólica.

Por lo anterior puede notarse que el estudio estuvo dividido en 3 etapas, en la primera se aplicaron en forma directa concentraciones a partir de 0.3 mg/L hasta 1000 mg/L de cada uno de los herbicidas sobre cultivos de linfocitos humanos, en la segunda se utilizaron concentraciones de cada herbicida a partir de 750 mg/L hasta 490 g/L empleando el metabolismo de *Vicia faba*.

A los extractos de esta planta se les determinó la cantidad de proteínas y fueron aplicados a cultivos de linfocitos y en la tercera fase se usaron concentraciones altas de los herbicidas directamente sobre las células meristemáticas apicales de las raíces de *Vicia faba* y en ellas se evaluó el daño genotóxico por el análisis de los ICH.

Tanto en la primera fase como en la segunda se determinó los índices mitótico y de replicación solo de los linfocitos en cultivo. En los tratamientos de diversas concentraciones de ametrina y metribuzina aplicadas directamente al cultivo de linfocitos se observó que ninguno incrementó la frecuencia de ICH. con ametrina, se notó que a partir de 6.5 mg/L se provocó la inhibición del ciclo celular y con metribuzina en 1.5 mg/L, siendo por lo tanto más tóxico este último.

Tanto con el testigo negativo como con el positivo (etanol) los valores obtenidos estuvieron dentro de los esperados.



Estos herbicidas tienen un comportamiento "promutagénico" es decir que requieren ser activados metabólicamente por el sistema enzimático S10 de *Vicia faba* para provocar daño mutagénico. Los metabolitos de estos herbicidas contenidos en los extractos de las raíces de *Vicia faba* sometidas durante 4 horas a concentraciones distintas de cada uno de los herbicidas sí aumentaron significativamente el ICH pero tienen un comportamiento asintótico.

Al determinar las concentraciones de proteína contenidas en dichos extractos, se notó que los valores no difieren significativamente del testigo, así como tampoco de los de etanol, en ambos casos.

Los resultados sobre la activación metabólica que ejerce *Vicia* sobre estos herbicidas mostraron que no hay estímulo sobre el ICH a concentraciones bajas.

A partir de los resultados, se concluye que estas triazinas fueron capaces de provocar efectos citotóxicos cuando hubo exposición directa a los cultivos de los linfocitos. La metribuzina en exposición directa a bajas concentraciones es más citotóxica que la ametrina, notándose en la disminución de células de tercera división y del IM al aumentar la concentración.

En la activación de estos herbicidas por *Vicia faba* se sugiere la participación de la homoglutationa y el compuesto 2-hidroxiametrina en el efecto citotóxico sobre el ICH, la CPL, el IR y el IM de los cultivos. Se observó, que las diferentes concentraciones de los herbicidas expuestos a la activación *in vivo*, éstos provocaron la disminución de células de primera división y el aumento de células de tercera división, además de un descenso del IM en los linfocitos cultivados.

Se estableció una correlación positiva entre la concentración del herbicida y la producción de ICH en las células meristemáticas de *Vicia faba*.

## ABSTRACT

Metribuzin and ametrine are herbicides of broad and common use in Mexican agriculture. However, there is scarce information on their toxicity and mutagenicity in human, animals. Therefore, in the present study the effects of these herbicides were evaluated when these were applied directly to *Vicia faba* root tip meristems on the induction of sister chromatid exchange (SCE) and in human lymphocytes culture using SCE analysis, the lymphocyte proliferation kinetics (LPK), through the replication index (RI) and on the effect cytotoxic of these herbicides by means of mitotic index (MI) with and without metabolic activation.

This study was divided in three steps in the first concentrations from 0.3 mg/L up to 1000 mg/L of each one of the herbicides were applied directly on human lymphocyte cultures, the second, the root meristem of *Vicia faba* were exposed to concentrations from 750 mg/L up to 490 g/L of each herbicide then the extracts of this plant were obtained and the quantified its protein concentration and were applied to lymphocyte cultures and in the third, the herbicides were applied in high concentrations directly to *Vicia faba* root tip meristems to evaluate the increase of SCE. In the first step as well as in the second, SCE, MI and RI were evaluated. In the treatment in which several concentrations of the herbicides were applied directly to lymphocytes cultures, the two herbicides did not increase the frequency of SCE. Ametrine caused cellular inhibition since 6.5 mg/L and with metribuzin since 1.5 mg/L. Therefore, is more toxic this last one.

With the negative control and the ethanol (positive control), the obtained values were those expected.

The activity of these herbicides was "promutagenic" that is to say that they require to be transformed in mutagen through metabolic activation by *Vicia faba in vivo*. The extracts of the roots

treated for 4 h with several concentrations of each one of the herbicides were applied to lymphocyte cultures and although the SCE frequencies increased significantly its behaviour was asymptotic

The values of protein concentrations contained in the extracts, did not differ significantly to negative control, and neither to the positive control (ethanol)

The results of *Vicia faba* metabolism to biotransform low concentrations of these herbicides showed that they had no affect on the SCE in cultured human lymphocytes neither *Vicia faba* root tip meristems

The results suggest that these triazines were able to cause cytotoxic effects but in higher level when these herbicides were applied directly to human lymphocytes Low concentrations of metribuzin in direct treatments were more cytotoxic than ametrine, because the cells of third division and the MI decreased when concentrations increased

In the metabolic activation (*in vivo* plant activation) of these herbicides suggested the participation of the homoglutatione and the compound 2- hidroxyametrine in the citotoxic effects on SCE, the LPK, RI and MI. It was observed that several concentrations of the herbicides with the plant activation caused the decrease of cell of first division and the increase of the frequency of cells of third division, besides the decrease of the MI on human peripheral blood lymphocytes culture.

A positive correlation settled down between the concentration of the herbicide and the production of SCE in *Vicia faba* root tip meristems

## INTRODUCCION

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 el mantenimiento del agua en la biosfera (Higashi 1988)

La biomasa vegetal global es aproximadamente  $8.3 \times 10^4$  kilogramo de peso seco, un valor que representa más del 90 % de la masa total de la biota mundial. De este porcentaje el 30 % aproximadamente es de 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 plantas, a los sistemas de siembra y al avance en tecnología agrícola se ha logrado un aumento en la producción de cultivos en las últimas décadas. Dentro de las técnicas agrícolas que han logrado el incremento de la productividad de vegetales de importancia económica se pueden mencionar el manejo de malezas, el control de insectos y de las enfermedades por el uso de compuestos químicos además de la mecanización para elevar el aporte de agua y de nitrógeno y la optimización de la densidad de plantación

El tratamiento por herbicidas es una parte de la agricultura moderna que aporta beneficios al reducir la competencia con las malas hierbas, por el agua, la luz y los nutrimentos. Los herbicidas son comercialmente exitosos por poseer una actividad biológica potente contra un espectro amplio de malezas y al mismo tiempo por no provocar toxicidad en los cultivos comerciales, en los mamíferos y en los invertebrados; sus residuos en suelo son pocos y su transformación es rápida (Brian 1979)

Varias clases de herbicidas entre ellas las triazinas son diseñadas exclusivamente para combatir las malezas sin causar daño a los cultivos. Esta selectividad resulta de la desintoxicación metabólica del herbicida por la planta cultivada pero no por la maleza. En otros casos, la selectividad del herbicida se da por su aislamiento o captura dentro de un compartimiento interno de la planta cultivada que las malezas no poseen o es poco funcional. Alternativamente, barreras externas como la cutícula vegetal pueden prevenir la penetración del herbicida (Lanfranconi *et al.* 1993, Smeda *et al.* 1993).

Actualmente se conoce que algunos agentes químicos de uso agrícola provocan directamente efectos sobre el DNA y que otros para causar este daño requieren ser activados metabólicamente por sistemas enzimáticos que poseen los animales y las plantas. A estos agentes químicos se les conoce como "promutágenos" o "mutágenos indirectos" (Plewa 1978, Gentile *et al.* 1982, 1986, Plewa y Gentile 1982, Plewa *et al.* 1984, Gómez-Arroyo *et al.* 1995).

En el aspecto de genotoxicidad se han establecido pruebas citogenéticas rápidas y sensibles para detectar mutágenos y carcinógenos ambientales, tales como intercambios de cromátidas hermanas (ICH), la cinética de proliferación linfocitaria (CPL) y los índices mitóticos (IM) y de replicación (IR) (Latt 1973, 1974, Perry y Evans 1975, Kato 1977, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura y Espinosa-Ramírez 1998)

En diferentes investigaciones realizadas *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que estos agentes causan translocaciones cromosómicas, cambios en el ADN o en la expresión genética y alteraciones en los ciclos meióticos y mitóticos de vegetales y animales. Algunos producen efectos teratogénicos, aumento de rompimientos cromatídicos y cromosómicos, elevación del intercambio de cromátidas hermanas, alta incidencia de micronúcleos y otros tienen efectos clastogénicos (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1995, Gómez-Arroyo *et al.* 1995)

El grupo de las triazinas destaca entre los herbicidas más empleados por los agricultores de los Estados Unidos de América y México (Bayer 1994, CIBA-GEIGY MEXICANA 1996)

En la actualidad, la utilización de las triazinas en la práctica agrícola ha sido contraproducente, porque se han ido incrementando los niveles de los compuestos xenobióticos en suelo, agua y atmósfera, lo que representa problemas serios para la salud humana y el ambiente de las plantas (Higashi 1988, Ikonen *et al.* 1988, Tu 1992, Junnila *et al.* 1993, Porter *et al.* 1993, Brusick 1994, Davies *et al.* 1994)

Los trabajos de investigación con cierto tipo de herbicidas del grupo de las triazinas (atrazina, deisopropilatrazina, metribuzina, simazina, cianazina y ciprozina) se han enfocado en registros de persistencia de los metabolitos en el suelo, en la forma de afectar la productividad del cultivo y en el nivel de toxicidad genética en humanos y otros organismos, así como también sobre sus efectos en el ambiente (Murnik y Nash 1977, Scorgie y Cooke 1979, Kulshrestha *et al.* 1982, Ghazza *et al.* 1984, Roloff *et al.* 1992 a y b, Venkatesh *et al.* 1992, Ademola *et al.* 1993, Guigas *et al.* 1993, Krugar *et al.* 1993, Porter *et al.* 1993, Smeda *et al.* 1993, Dunkelberg *et al.* 1994, Herelia *et al.* 1994, Peterson *et al.* 1994, Loosli 1995, Sathiakumar y Delzell 1997, Taets *et al.* 1998).

Kuroda *et al.* (1992) detectan niveles altos de diez pesticidas (uno de ellos es la simazina) en el río Yodo en Osaka, Japón, cuya agua es utilizada como potable y abastece a trece millones de personas. Por lo que estos investigadores se dan a la tarea de investigar la toxicidad *in vitro* de cada uno de los pesticidas en células de criceto V79 y evalúan el índice mitótico (IM) y el índice mitótico secundario (IS)

El IS es la tasa de metafases en segunda división para observar intercambio de cromátidas hermanas. El IM y el IS de cada pesticida son muy similares y no impiden la división celular. Ninguno de los compuestos químicos induce más de las 1.5 veces de intercambio de cromátidas hermanas que el testigo.

En sus conclusiones determinan que las dosis pequeñas de clometoxifen y simazina afectan significativamente la frecuencia de los intercambios de cromátidas hermanas en células V79.

Roloff *et al.* (1992 b) establecen que la cianazina y el metolaclolo son clastogénicos en células humanas a 1 µg/ml, observando que esta concentración no es tóxica porque no hay disminución en el índice mitótico y que es posible que estos herbicidas puedan ser carcinogénicos.

Venkatesh *et al.* (1992) detectan que microsomas de la piel del ratón metabolizan atrazina, simazina y terbutrina, con actividad de 2 a 5 % con respecto a los microsomas de hígado.

Krugar *et al.* (1993) encuentran que los productos de la degradación en suelo de la (<sup>14</sup>C) atrazina y (<sup>14</sup>C) deisopropilatrazina fueron detilatrazina y diidealquiltrazina, respectivamente. La deisopropilatrazina fue más susceptible a la mineralización que la atrazina que disminuye con el aumento de la profundidad del suelo.

Brusick (1994) observa que la atrazina en un rango amplio de pruebas genéticas ha aportado resultados predominantemente negativos. Este investigador compara y evalúa dos métodos para lograr la clasificación del compuesto, estableciendo que la atrazina no implica riesgo genético para el hombre en condiciones generales de uso, pero los efectos mutagénicos de la atrazina en plantas y eucariotes inferiores pueden considerarse como un riesgo potencial.

para otros animales. Es decir, que no se le ha atribuido a la atrazina riesgo genotóxico o carcinógeno para humanos, sin embargo se ha descrito que al ser transformada por el metabolismo vegetal, se activa y provoca efecto mutagénico en diversos sistemas de prueba (Plewa *et al* 1988)

Smeda *et al.* (1993) identifica una mutación del gen *psbA* en células de papa seleccionadas para resistencia a la atrazina. En células sensibles se detecta una proteína con M-r de 32 000 en la membrana de los tilacoides, la cual no está presente en las células resistentes. Esta proteína es una quinona secundaria aceptora del fotosistema II (Q-B). La resistencia a la atrazina en células seleccionadas es atribuida a una mutación de la serina a treonina en el codón 264 del gen *psbA* que codifica a la proteína Q-B.

Meisner *et al* (1993) observan en cultivos de linfocitos humanos expuestos a concentraciones de N-nitrosoatrazina (NNAT) por debajo de 0.0001 µg/ml una elevación significativa de rompimientos cromosómicos así como también el aumento del índice mitótico. En contraste, se requieren concentraciones grandes de nitratos, nitritos y atrazina para producir daño cromosómico y en estos casos donde el índice mitótico es afectado, se nota que disminuye.

La administración simultánea de nitritos o nitratos con atrazina causan menos daño cromosómico que las concentraciones bajas de NNAT sin afectar el índice mitótico, ilustrando que la conversión metabólica de los contaminantes con genotoxicidad mínima puede dar origen a compuestos tales como NNAT que son aún más genotóxicos.

Hercía *et al* (1994) reportan que la cianazina aplicada en médula ósea de ratas y linfocitos periféricos humanos no provoca intercambio de cromátidas hermanas ni aberraciones cromosómicas.



Ribas *et al* (1998) revelan que no existen efectos significativos de la atrazina con y sin activación microsómica (S9) *in vitro* en la inducción de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos, pero presenta citotoxicidad evidenciada por el descenso de la proliferación celular entre 25 y 200 µg/ml de concentración de la atrazina en cultivo de linfocitos humanos

### **TOXICIDAD DE METRIBUZINA Y AMETRINA**

Peterson *et al* (1994) evalúan la fitotoxicidad de 23 diferentes pesticidas (donde se incluyen 5 triazinas) en 9 especies de algas, 1 especie de cianobacterias y una planta acuática vascular con el fin de proveer un margen aceptable de seguridad para detectar el riesgo presentado por estos productos químicos en ambientes acuáticos

Los 5 herbicidas del grupo de las triazinas (atrazina, cianazina, hexazinona, metribuzina y simazina) bloquean los mecanismos de adquisición de carbón de todas las algas y de la cianobacteria por más del 50 % e inhiben el crecimiento de *Lemna minor*, siendo así clasificados como altamente fitotóxicos

Heindel *et al.* (1994) valoran el efecto de la mezcla de pesticidas/fertilizantes sobre el desarrollo y la reproducción del ratón suizo CD-1, con base en concentraciones encontradas en aguas subterráneas contaminadas de California (CAL) y de Iowa (IOWA)

En las dos concentraciones probadas se detectan atrazina, simazina, cianazina y metribuzina junto con otros pesticidas más cloruro de amonio. No encuentran efectos relacionados con la fertilidad o la reproducción de las generaciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> de los ratones expuestos a los tratamientos aumentando su concentración 100 veces más a la descrita en las aguas subterráneas. Simiarmemente, observan normalidad en la espermatogénesis, la concentración de esperma epididímico, la movilidad del esperma, el porcentaje de esperma y

la histología testicular y epididímic. En el estudio del desarrollo, las hembras expuestas a CAL ó IOWA no muestran señales de toxicidad relacionadas con los tratamientos. Ningún efecto adverso de CAL ó IOWA es observado para toxicidad embrionaria/ fetal, incluyendo el número de camada, tamaño de la cría o el peso del cuerpo fetal. Las concentraciones encontradas en CAL y IOWA no causan incremento en la incidencia de malformaciones fetales o variaciones. Por lo tanto, la administración de esta mezcla de pesticidas/fertilizantes en niveles 100 veces mayores que la concentración media en aguas subterráneas en California y Iowa no provocan daños detectables en la reproducción de ratones o de toxicidad en el desarrollo de ratas.

#### *METABOLISMO DE LAS TRIAZINAS*

Dado el impacto ambiental potencial que tienen los residuos de los compuestos xenobióticos y su participación en las vías metabólicas de la célula vegetal, los investigadores en toxicología ambiental han comenzado a darles mayor importancia.

Se sabe que las células vegetales metabolizan algunos de los compuestos xenobióticos, como una manera de desintoxicación y/o de inmovilización de los metabolitos. Aunque no se ha confirmado esta aseveración, se menciona que este proceso bioquímico es una respuesta de las plantas para su protección (Sandermann 1988, Ducruet *et al.* 1993).

Los vegetales metabolizan los compuestos xenobióticos por alguna de estas vías: oxidación, transformación y conjugación, almacenando los productos tóxicos en sus tejidos. Esto representa un riesgo potencial para la salud humana y animal ya que muchos de éstos son consumidos (Higashi 1988).

Las propiedades mutagenicas de los compuestos xenobióticos y sus metabolitos, están siendo estudiadas ya que varios agentes quimicos carcinógenos son tambien mutágenos. A diferencia de la actividad carcinogénica, la mutagénica puede ser determinada fácilmente mediante una amplia gama de sistemas de ensayo como son microbianos, mamíferos y vegetales (Plewa *et al.* 1988, Sandermann 1988, Plewa y Wagner 1993).

A pesar de que existen gran cantidad de estudios para entender el metabolismo de numerosos herbicidas, en el grupo de las triazinas, principalmente atrazina y simazina, se han podido caracterizar las vías de acción metabólica en diferentes plantas pero no en animales. Sin embargo, se ha descrito la transformación de los herbicidas ametrina y metribuzina y de algunos otros miembros de este grupo por el metabolismo de las plantas y algunos animales (Ashton y Bayer 1979, Naylor 1979)

Los herbicidas de triazinas son poderosos inhibidores de la fotosíntesis. Al parecer, su selectividad depende, en parte, de la capacidad de las plantas tolerantes para inactivar la triazina en cantidades más grandes que las plantas sensibles.

Otro factor de la selectividad es la cantidad que llega a la planta. Los estudios iniciales sobre el metabolismo de las clorotriazinas sugieren que un metabolito es el derivado hidroxilo inactivo. Se sabe que las plantas de maíz convierten las clorotriazinas al derivado hidroxilo. En esta reacción figura como mediador un constitutivo del maíz, a saber, 2,4-dihidroxi-8-metoxi-1,4-benzoxazina-3-ona. Esta misma vía metabólica ha sido demostrada en otras plantas. En microorganismos hay otros mecanismos de degradación, que incluye la desalquilación a clorotriazinas (Rodríguez de la Torre 1990)

Algunas plantas, principalmente las gramíneas maíz, sorgo y caña de azúcar no son afectadas por atrazina y simazina. La falta de sensibilidad probablemente resulta de la capacidad para neutralizar o metabolizar estos compuestos. Los herbicidas s-triazinas son rápidamente absorbidos y translocados por toda la planta. Aunque no son eliminados por secreción pueden ser completamente oxidados a  $\text{CO}_2$  ó incorporados en uno o más residuos. La degradación puede realizarse por hidrólisis, N-desalquilación y conjugación peptídica (Hatzios y Penner 1982, Kulshrestha *et al.* 1982, Hatzios 1988)

El primer mecanismo de desintoxicación potencial de atrazina y simazina fue una reacción de desclorinación no enzimática acompañada por una sustitución de un grupo hidroxilo en la posición 2. Tanto los extractos de raíces como de yemas de *Zea* contienen compuestos para llevar a cabo la hidroxilación de atrazina y de simazina. El compuesto activo es aislado e identificado como 2,4-dihidroxi-8-metoxi-1,4-benzoxazina-3-ona.

Se ha observado que la hidroxilación ocurre predominantemente en la raíz. La habilidad para hidroxilar 2-cloro-s-triazinas no siempre asegura la resistencia a estos herbicidas por las plantas, esto sugiere la idea de que existe otra ruta de desintoxicación. Esta puede ser a través de la producción de conjugados peptídicos (Fig. 4)

La simazina forma estos productos químicos en las yemas de maíz y de sorgo. Solo una enzima involucrada en la producción del conjugado ha sido purificada y caracterizada sin descartar la participación de otras que aún no han sido identificadas. Esta es la glutatona-S-transferasa que tiene un peso molecular de 40,000 y se ha encontrado en hojas de maíz, caña de azúcar y sorgo (Means *et al.* 1988, Hatzios y Penner 1982, Kulshrestha *et al.* 1982)

Se ha determinado que las atrazinas y las simazinas son absorbidas igualmente por la raíz, pero hay diferencias en la velocidad con la cual son metabolizadas. El 70 % de las atrazinas y el 30 % de las simazinas absorbidas y translocadas a las yemas son transformadas en las primeras 24 horas. Los metabolitos formados son derivados hidroxilos con menor cantidad de conjugados peptídicos. La hidroxilación de los dos herbicidas ocurre en la misma proporción, aunque en la caña silvestre se forman rápidamente los conjugados peptídicos por las atrazinas más que las simazinas (Hatzios y Penner 1982, Kulshrestha *et al.* 1982, Hatzios 1988).

La ruta metabólica de la atrazina en la raíz de sorgo ocurre de la forma siguiente: atrazina  $\rightarrow$  S-(4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazinil-2) glutationa  $\rightarrow$   $\gamma$ -glutamyl-S-(4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazinil-2)cisteina  $\rightarrow$  S-(4-etilamino-6-isopropil-s-triazinil-2)cisteina  $\rightarrow$  N-(4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazinil-2)cisteina  $\rightarrow$  N-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazinil-2) lantionina. Además se ha evidenciado que la atrazina puede metabolizarse por esta vía siguiendo una N-desalquilación. Completada la N-desalquilación se produce 2-cloro-4,6-diamino-s-triazina. Algunas evidencias apoyan que la completa desalquilación de 2-hidroxil-s-triazinas origina 2-hidroxil-4,6-diamino-s-triazina (ammelina) (Naylor 1979).

Aizawa (1979) reporta una ruta metabólica de sencor en alfalfa, frijol, caña de azúcar, papa, tomate y algunas gramíneas. El átomo de azufre del grupo S-Me de sencor es algunas veces oxidado a sulfona y finalmente eliminado y sustituido por un grupo hidroxilo. Este metabolito hidroxilado es equivalente a la forma keto, ó 4-amino-6-t-butyl-1,2,4-triazinil-3,5-diona. El grupo amino en la posición 4 es además desechado de plantas y suelo (Fig. 5).

Se indica también que los herbicidas del grupo de las triazinas reducen la cantidad de glucosa, fructuosa y sacarosa en plantas, sin embargo, este es uno de los primeros efectos de inhibidores de la fotosíntesis (Ashton y Bayer 1979)

Varios de los metabolitos de la transformación de las triazinas no han sido caracterizados químicamente, pero por la importancia toxicológica ambiental y su potencial tóxico en la cadena alimenticia del hombre revela la necesidad de su identificación (Ikonen *et al.* 1988, Kross *et al.* 1992 y Arru *et al.* 1997)

### MUTAGENOS DIRECTOS E INDIRECTOS Y SISTEMAS BIOINDICADORES

Algunas plantas pueden almacenar mutágenos xenobióticos o convertir los derivados metabólicos no mutagénicos o promutágenos a metabolitos mutagénicos. La actividad mutagénica de un xenobiótico requiere una activación previa.

En plantas este fenómeno se estudia en dos niveles I) el metabolito vegetal xenobiótico puede causar daño en la misma planta y II) los metabolitos mutagénicos pueden ser conjugados y almacenados en la planta hasta ser liberados, pudiendo llegarse a activar al ser consumida por los animales o el hombre. Esta situación, en particular, puede ocurrir después de la aplicación de pesticidas a plantas comestibles. Las enzimas microsómicas, las peroxidasa y los compuestos oxigenados activos parecen ser los vehículos bioquímicos mayores para la activación en vegetales.

Las reacciones oxidantes superficialmente se asemejan a la oxidación de un electrón catalizado por sistemas de citocromo P-450 de mamíferos como a la prostaglandina H sintetasa. Asimismo, aparentemente la bioquímica vegetal para la activación mutagénica puede ser relacionada a reacciones de defensa de los vegetales a condiciones de estrés (Sandermann 1988, Mazur y Falco 1989)

En los tiempos actuales, los organismos están expuestos a gran cantidad de agentes químicos y físicos que potencialmente, pueden interactuar con su DNA celular y producir mutaciones, es decir, cambios estructurales o numéricos en esta molécula. Si dichas alteraciones se producen en células germinales existe la posibilidad de que la descendencia de los individuos afectados manifiesten anomalías hereditarias. Por otro lado, si las células afectadas son las somáticas es probable que las personas directamente expuestas desarrollen algún cáncer (Sathiakumar y Delzell 1997).

Con el fin de detectar los efectos genotóxicos provocados por la gran variedad de mutágenos tanto físicos como químicos presentes en el ambiente y evaluar el riesgo que representan para la salud del hombre se han desarrollado diversos sistemas de prueba como los que se emplearon en este estudio. células meristemáticas de *Vicia faba* y linfocitos de sangre periférica humana, en este último se tiene la ventaja de obtener poblaciones numerosas por medio de mitógenos como la fitohemaglutinina (Evans y O'Riordan 1975, Jasinka *et al* 1977)

Las características de *Vicia faba* como biomonitor están basadas en su sensibilidad a pruebas con tratamientos cortos y los resultados obtenidos son comparables con los de otros laboratorios. Como sistema de análisis es económico y fácilmente manejable, por lo que no requiere equipo sofisticado. Para la detección del daño cromosómico, *Vicia* es un material experimental ideal, porque tiene pocos cromosomas y son grandes ( $2n=12$ ). El complemento cromosómico consiste de cinco pares de cromosomas subacrocéntricos que son similares en tamaño y un par de cromosomas metacéntricos con satélites grandes. El ciclo celular es corto 19.3 horas a 19 °C en el cual el período presintético ( $G_1$ ) dura 4.9 horas, la síntesis del DNA

(S) su tiempo transcurre en 7.5 horas, la etapa postsintética ( $G_2$ ) abarca 4.9 horas y la mitosis en 2 horas (Evans y Scott 1964). Las puntas de las raíces de *Vicia* tienen una proporción alta de células en diferentes estados de mitosis. Por todas estas razones, resulta muy útil como sistema de prueba experimental, que ofrece excelentes resultados, especialmente en aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (Gómez-Arroyo y Viallobos-Pietrim 1995).

### **CRITERIOS GENÉTICOS**

#### ***Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)***

El intercambio de cromátidas hermanas (ICH) ha resultado ser una prueba rápida y sensible, puesto que se induce con concentraciones hasta diez veces menores que las requeridas para producir aberraciones cromosómicas (Wolff 1974, 1982) y aporta un método adecuado para la detección de los mutágenos ambientales (Perry y Evans 1975, Zhurkov y Yakovenko 1976).

A pesar de que los experimentos de autorradiografía de Kato (1974, 1977) indican que los mutágenos inducen ICH, no es sino hasta la introducción de la técnica con 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdU) descrita por Latt (1973), cuando los ICH son considerados como indicadores del potencial mutagénico y carcinogénico.

Actualmente existen evidencias de que para muchos agentes químicos, el análisis de los ICH proporciona el índice más sensible en la detección del daño genético, debido a que se han encontrado correlaciones entre la frecuencia de ICH y la concentración del mutágeno.



Por esta razón se han diseñado protocolos de investigación que relacionan el uso de activadores metabólicos (plantas, animales y microorganismos) con los ICH de poblaciones vegetales y humanas expuestas a mutágenos potenciales como pueden ser los herbicidas del grupo de las triazinas

Es importante mencionar que no se conoce el significado biológico de los ICH, pero el hecho de que se hayan observado en las células de todos los organismos estudiados, sugieren que estos son un fenómeno común y fundamental en las células (Tice y Hollander 1984) Por otro lado, es posible que el fenómeno de los ICH sea la consecuencia de un proceso que permite a la célula dividirse aún en presencia de lesiones en su DNA, de ser así puede existir alguna correlación entre el fenómeno y la mutación (Carrano y Thompson 1982), dado que las lesiones persistentes aumentarían la probabilidad de la mutación en el DNA

#### *Cinética de proliferación linfocitaria e índice mitótico*

El proceso de la actividad celular, por ser un evento genético donde la expresión o la represión de los genes estimula su activación y progresión, se ha tomado como un criterio importante en la evaluación genotóxica de los agentes químicos (Sandermann 1988, Pagano *et al* 1992)

Los resultados sobre el efecto de algunos plaguicidas en estudios *in vitro* y en personas expuestas han demostrado retraso en el ciclo de proliferación celular y disminución en el índice mitótico (Sobti *et al.* 1982, Rupa *et al* 1991)

## JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

El grupo de las triazinas, especialmente las que interesan en este estudio, son clasificadas por la Organización Mundial de la Salud como las menos tóxicas y que en condiciones generales de uso las triazinas aparentemente no implican un riesgo para los humanos (Ribas *et al* 1998). Sin embargo, los niveles de los compuestos xenobióticos de este grupo se acumulan en los tejidos de los vegetales, por lo tanto, representan un riesgo para la salud del hombre (Plewa 1978, Higashi 1988, Tu 1992, Junnila *et al* 1993, Davies *et al.* 1994).

Varios autores han descrito una relación de la exposición de ciertos tipos y mezclas de las triazinas que pueden provocar neoplasias. Sin embargo, estos estudios no aportan evidencias claras de que la atrazina u otras triazinas son carcinogénicas (Plewa 1978, Higashi 1988, Rasquinha *et al.* 1988, Sandermann 1988, Velemínky y Gichner 1988, Sathakumar y Delzell 1997, Ma 1999, Waters *et al* 1999).

Son pocos los estudios genotóxicos llevados a cabo sobre herbicidas pertenecientes al grupo de las triazinas, donde se observan efectos directos y usando su activación metabólica por plantas o animales *in vitro* (Lioi *et al* 1998, Roloff *et al* 1992 a, b, Ribas *et al* 1998). Con respecto a metribuzina y ametrina en este rubro de la investigación *in vivo* no se encuentran reportes en la literatura científica.

Por lo anterior, se justifica la investigación sistemática de estos agentes químicos sobre la formación y el almacenamiento de mutágenos y promutágenos en el metabolismo de las plantas para utilizarlas como monitor y determinar el daño genético en linfocitos humanos, de este modo, en un futuro los resultados de estos estudios contribuirán en sugerir el control o regular su empleo en las prácticas agrícolas.

Por estas razones, en esta investigación se evaluó la capacidad de los herbicidas metribuzina (Sencor) y ametrina (Gesapax) para provocar daños a nivel cromosómico mediante el registro de intercambios de cromátidas hermanas en las células meristemáticas de las raíces de *Vicia faba* y en células de sangre periférica humana y su influencia sobre la cinética de proliferación celular y el índice mitótico de estas últimas. Además, se determinó la capacidad de este vegetal en la activación de promutágenos a mutágenos mediante su metabolismo, a través del efecto en la producción de intercambios de cromátidas hermanas y en el índice mitótico y la cinética linfocitaria en el cultivo de sangre periférica humana, al aplicarles extractos de la planta que contenía los metabolitos.

#### ***Objetivos particulares***

1. Evaluar el daño genotóxico de los herbicidas metribuzina y ametrina a diferentes concentraciones en células meristemáticas de *Vicia faba*, mediante el análisis de los intercambios de cromátidas hermanas.
2. Determinar si la metribuzina y la ametrina son promutágenos a través del metabolismo vegetal de las raíces de *Vicia faba* (activación metabólica *in vivo*), utilizando como prueba del efecto genético al intercambio de cromátidas hermanas en cultivo de linfocitos humanos.
3. Analizar los efectos de los dos herbicidas sobre la cinética de proliferación celular y el índice mitótico con y sin la participación de la activación metabólica de *Vicia faba in vivo*.
4. Valorar la concentración de proteína total por el método de Bradford, en los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con los dos herbicidas del grupo de las triazinas.

## HIPOTESIS

Si los herbicidas metribuzina y ametrina son promutágenos activados por los vegetales, entonces, los metabolitos producidos inducirán cambios en la frecuencia de los intercambios de cromátidas hermanas y alteraciones en la cinética de proliferación celular y en el índice mitótico en los linfocitos humanos en cultivo, previa transformación metabólica por las raíces de *Vicia faba* en los tratamientos *in vivo* y este mismo efecto genotóxico se evidenciará en los cromosomas de las células meristemáticas de esta leguminosa.

## MATERIALES Y METODOS

### CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LAS ATRAZINAS

#### *Compuestos heterocíclicos nitrogenados*

##### *Triazinas simétricas*

Las triazinas constituyen un grupo importante de herbicidas. Cuando se realizan diversas sustituciones en el núcleo de la triazina se producen compuestos con propiedades químicas y biológicas muy diferentes. Así pues, esta clase de productos presenta un amplio espectro de selectividad y actividades biológicas. El núcleo fundamental de la triazina se observa en la figura 1.

Junto con la estructura de la triazina se encuentran algunos de los sustituyentes que se han empleado para obtener materiales biológicamente activos

#### Sustituyentes y su posición en el anillo

	2	4	6
Simazina	CL	-etilamino	-etilamino
Atrazina	CL	-etilamino	-isopropilamino
Propazina	CL	-isopropilamino	-isopropilamino
Prometona	OCH <sub>3</sub>	-isopropilamino	-isopropilamino
Prometrina	SCH <sub>3</sub>	-isopropilamino	-isopropilamino
Ametrina	SCH <sub>3</sub>	-etilamino	-isopropilamino

Con base en el sustituyente que ocupa la posición dos, la simazina se clasifica como una clorotriazina, la prometona como una metoxitriazina y la prometrina como una metiltiotriazina o metilmercaptotriazina (Smith 1988)

Las clorotriazinas son incoloras, no explosivas, no corrosivas y de baja toxicidad para los mamíferos. Aunque las clorotriazinas son compuestos estables, a temperaturas elevadas la

posición dos puede hidrolizarse a la correspondiente triazina hidrosustituida en ácido o base (Bayer 1994),

La prometrona (2-metoxi-4, 6-bis (isopropilamino)-s-triazina), el análogo metoxi de la propazina, es representante de las metoxitriazinas. La prometrona tiene una solubilidad en el agua de 750 mg/L (a 20 °C) y es muy soluble en muchos disolventes orgánicos como benceno, cloroformo, metanol y acetona. Es una sustancia incolora, incombustible, no corrosiva y con valor pK de 4.3. La prometrona se puede destilar con agua. En soluciones básicas o ligeramente aciduladas permanece estable y neutra. A temperaturas elevadas y en una base fuerte o un ácido fuerte, el herbicida pronto se hidroliza al compuesto hidrógeno inactivo (Brian 1979).

Las metoxitriazinas se preparan haciendo reaccionar con metanol la clorotriazina adecuada, en presencia de un equivalente de base. Los derivados metoxi difieren de los derivados cloro porque tienen mayor solubilidad en el agua, poseen selectividad diferente y el follaje de la planta los absorbe más fácilmente (Ashton y Bayer 1979).

Las metilmercaptotriazinas incluyen la prometrina y la ametrina. La prometrina, derivado trimetilo de la propazina, tiene peso molecular de 241.35, punto de fusión de 118 °C y solubilidad de 48 mg/L en agua. Es muy soluble en muchos disolventes orgánicos. Debido a su presión de vapor, la LD<sub>50</sub> de la prometrina para los mamíferos en forma oral aguda es de 3.750 mg por Kg (Brian 1979, Bayer 1994).

Las metiltio-triazinas se pueden preparar haciendo reaccionar clorotriazinas sustituidas en forma adecuada con metilmercaptano en presencia de hidróxido de sodio (Rodríguez de la Torre 1990).

Los productos químicos que se comercializan como herbicidas del grupo triazina son simazina, simetona, simetrina, atrazina, atratona, cianazina, ametrina, propazina, prometona, prometrina, trietazina, ipozina, clorazina, desmetrina, terbutrina, ciprazina y metribuzina (Brian 1979)

### ***METRIBUZINA***

Sencor cuyo compuesto químico activo es la metribuzina, 4-amino-6-(1,1-dimetil-etil)-3-(metiltio)-1, 2, 4-triazina-5 (4H)-ona, pertenece al grupo de los derivados metiltiotriazinas

El sencor puro forma cristales incoloros con una solubilidad (20 °C) 1.2 g/L agua, 820 g/Kg acetona, 220 g/Kg benceno, 850 g/Kg cloroformo, 1 Kg/Kg ciclohexanona, 190 g/Kg etanol, 2 g/Kg hexano y 120 g/Kg tolueno. El grado técnico tiene un ligero olor a azufre. Es objeto de descomposición microbiana en suelos húmedos. La fórmula estructural de la metribuzina es mostrada en la figura 2.

La LD<sub>50</sub> oral de la metribuzina para ratas es de 2200-2345 mg/Kg, para ratón es de 678-710 mg/Kg y para codorniz blanca es de 164-168 mg/Kg. La LD<sub>50</sub> dérmica para ratas es > 20 000 mg/Kg (Bayer 1994)

### ***Aplicaciones en la agricultura***

Sencor (metribuzina) combate la maleza anual de hoja ancha y los zacates. Actúa a través del follaje y de las raíces. Se disuelve fácilmente en agua y ésta lo fija en la materia orgánica del suelo sin necesidad de incorporarlo por medios mecánicos. Las raíces y las hojas absorben la sustancia activa de sencor. Una vez dentro, se difunde en la planta y actúa sobre la clorofila, es decir, bloquea la fotosíntesis, en consecuencia, los tejidos se desecan hasta que

mueren la maleza. En los cultivos tolerantes a este herbicida las plantas descomponen la sustancia y no sufren daño. La toleran bien los cultivos de avena, caña de azúcar, cebada, espárrago, lenteja, maíz, papa, sorgo, zanahoria y muchas variedades de chícharo, tomate y trigo.

Sencor 480 SC es una suspensión concentrada con 480 gramos de metribuzina por litro para el control de la maleza anual (hoja ancha y zacates). Pertenecen a la categoría número cuatro, ligeramente tóxica (Milburn *et al.* 1991, Johnson 1993, Shaw e Hydrick 1993, Richard y Griffin 1993, Walsh *et al.* 1993, Willard y Griffin 1993, Bayer 1994)

#### *AMETRINA*

La ametrina cuyo nombre comercial es Gesapax, el ingrediente químico activo se muestra en la figura 3. Este compuesto es una sustancia incolora con peso molecular de 227.33, punto de fusión de 84 a 85 °C y solubilidad aproximada en agua de 185 mg/L. Es muy soluble en muchos disolventes orgánicos y no es inflamable ni corrosiva. Sus propiedades químicas son similares a las de la prometrina. Su LD<sub>50</sub> oral para las ratas es de 1,405 mg/Kg.

#### *Aplicaciones en la agricultura*

La ametrina es muy selectiva en los cultivos de caña de azúcar, maíz, piña, plátano y naranjo. Al igual que todas las triazinas requiere de humedad en el suelo para ejercer mejor su efecto.

Actúa inhibiendo la reacción de Hill bloqueando la fotosíntesis en la maleza. Este herbicida puede ser usado en pre y post-emergencia, pues tiene una acción enérgica sobre la maleza (CIBA-GEIGY MEXICANA 1996)



Para mejores resultados, es necesario regar o tener lluvia en los 10 días posteriores a su aplicación. Su efecto residual es prolongado y va de 3 a 6 meses según el tipo de suelo y de clima.

#### *Preparación de las soluciones de las triazinas para los tratamientos directos y para la activación metabólica in vivo*

Se prepararon concentraciones de 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 4, 5, 50, 750, 1000, 2500, 5000, 6000, 7000, 8000, 15000, 20000, y 480 000 mg/L de la solución de metribuzina (Sencor 48 % proporcionado por Bayer de México) y 1.5, 2, 2.5, 5, 6.5, 12.5, 20, 30, 50, 750, 2500, 6000, 8000, 30000, 50000 y 490 000 mg/L de ametrina (Gesapax 49 % donada por CIBA-GEIGY Mexicana), con agua desionizada estéril que fueron aplicadas a cada cultivo de los tratamientos directos y la activación metabólica con *Vicia faba*.

#### *Cultivo de linfocitos humanos y tratamientos directos*

A los frascos de cultivo se les agregó 3 ml de medio Gibco (RPMI 1640) complementado con 0.12 ml de fitohemaglutinina al 4 % (Gibco) más 0.5 ml de sangre heparinizada de 4 donadores sanos, 24 horas después del cultivo se adicionaron las siguientes concentraciones en 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 4, 5, 50, 750 y 1000 mg/L de metribuzina y 1.5, 2, 2.5, 5, 6.5, 12.5, 20, 30, 50, 750 y 1000 mg/L de ametrina y 3600 mg/L de etanol más 100 µl de bromodesoxiuridina (5-BrdU, 20 µg/ml, Sigma) y al testigo negativo solo la 5-BrdU. A las 70 horas se les aplicaron 100 µl de colchicina al 0.05 % (Merck) y a las 72 horas se cosecharon las células.

#### *Cosecha*

1. Cada cultivo fue trasladado a un tubo y centrifugado a 1000 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, dejándolo reposar durante 20 minutos en la incubadora
- 3 Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos
- 4 Después fue desechado el sobrenadante y el botón resuspendido rápidamente con el fijador metanol-ácido acético (Sigma) 3:1 y se dejó reposar durante 20 minutos
5. Nuevamente fue centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos.
6. Fue removido el sobrenadante, resuspendiendo el botón con el fijador durante 10 minutos a temperatura ambiente
- 7 Inmediatamente fue eliminado el sobrenadante y se resuspendió el botón con 0.5 ml de fijador para después elaborar las preparaciones
- 8 Cada preparación fue hecha por goteo a 1.0-1.5 metros de altura, realizando como mínimo cuatro, dejándolas después secar al aire
- 9 Las observaciones fueron hechas en un microscopio de contraste de fases con los objetivos de 16X y 40X para seleccionar las que tuvieron mayor cantidad y calidad de metafases

#### *Tinción diferencial de cromátidas hermanas*

- 1 Las preparaciones con metafases fueron colocadas en el colorante fluorocromado Hoechst 3325-8-agua destilada (1:9) y mantenidas en la obscuridad durante 30 minutos en cajas de Koplín
2. Después fueron enjuagadas con agua corriente y colocadas verticalmente para que se secaran al aire
- 3 Posteriormente fueron colocadas en cajas de Petri con citrato de sodio salino (CSS) e irradiadas con luz ultravioleta durante 1 hora

- 4 Se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire en forma vertical
- 5 Después fueron colocadas en cajas de Koplín con CSS (citrato de sodio salino) a 60 °C durante 1 hora
6. A continuación fueron lavadas una vez más con agua de la llave y se dejaron secar verticalmente al aire
- 7 Inmediatamente se sumergieron en colorante Giemsa (Merck)-agua destilada (1:10) durante 2 minutos (Perry y Wolff 1974)
- 8 Finalmente fueron lavadas con agua corriente y dejadas verticalmente para que el aire las secase
- 9 Con el objeto de lograr objetividad en las observaciones, las laminitas fueron reetiquetadas, de tal manera que no se tuvo conocimiento del grupo al cual pertenecían hasta que finalizó el experimento y se descifró la clave
- 10 Para el análisis de las frecuencias de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), fueron considerados como un evento a los terminales y como dos a los intersticiales

#### *Activación metabólica in vivo.*

#### *Aplicación de los extractos de las raíces de Vicia faba (var. minor) tratadas con metribuzina y ametrina al cultivo de linfocitos humanos.*

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 entre 4 y 6 cm se sumergieron en las siguientes concentraciones: 750, 1000, 2500, 5000, 6000, 7000.

8000, 15000, 20000 y 480 000 mg/L de metribuzina y 750, 2500, 6000, 8000, 30000, 50000 y 490 000 mg/L de ametrina durante 4 horas a temperatura ambiente y en la obscuridad, tiempo necesario para que los agentes químicos puedan ser absorbidos y biotransformados por las raíces de acuerdo con Frear *et al.* (1983), Gawronski (1983), Milburn *et al.* (1991) y Shaw e Hydrick (1993)

Las raíces del testigo positivo se sumergieron en etanol al 98 % de pureza (Sigma) a 3600 mg/L durante 4 horas a temperatura ambiente, se ha comprobado que éste compuesto es promutágeno para esta planta e incrementa la frecuencia de ICH en células de criceto chino (Takehisa *et al.* 1982, 1988) y en linfocitos humanos *in vivo* (Calderón-Segura 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999)

El testigo negativo estuvo bajo las mismas condiciones experimentales pero en agua desionizada estéril (fracción S10) y el otro testigo negativo fue el cultivo de linfocitos solo con 100  $\mu$ l de 5-BrdUr (20  $\mu$ g/ml) que se aplicó a las 24 horas de haberlos puesto a 37 °C de incubación

Después de los tratamientos, las raíces se lavaron con agua desionizada estéril y se cortaron aproximadamente 2 cm de la raíz principal, se homogeneizaron por separado en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4 y a temperatura entre 0-4 °C en un homogeneizador de tejidos vegetales de 3 a 5 minutos. La relación de volumen de la solución amortiguadora (ml) a peso fresco de los cortes de la raíz (g) fue de 1:1

El homogeneizado fue ultracentrifugado por 15 minutos a 11,500 rpm a 4 °C. El sobrenadante en el cual se encontraron los metabolitos de la transformación de los herbicidas aplicados a diversas concentraciones, así como del etanol fueron esterilizados con filtros miliporo (0.45  $\mu$ m)

A estos extractos se les determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (1976), detectando 14.6 mg/ml constante en todas las concentraciones de los herbicidas por lo cual inmediatamente se agregaron 100  $\mu$ l de extracto de las raíces tratadas con las diferentes concentraciones de metribuzina y ametrina más 100  $\mu$ l de 5-Bromodesoxiuridina (20  $\mu$ g/ml) a los linfocitos cultivados a las 24 horas y se continuó con la técnica mencionada para todos los casos.

*Intercambio de cromátidas hermanas (ICH), cinética de proliferación linfocitaria (CPL), índices de replicación (IR) y mitótico (IM) de los linfocitos periféricos en cultivo*

Con la finalidad de cuantificar la frecuencia del ICH se registraron 25 metafases de segunda división para cada caso. Se realizaron dos experimentos y se aplicó la prueba *t* de Student para comparar las medias del experimento y su réplica usando un nivel de significación de  $p < 0.005$ , al no encontrarse diferencias significativas entre ellas, se promediaron los valores y se compararon entre sí, mediante análisis de varianza (ANOVA), cuando el valor de *F* fue significativo a  $p < 0.05$ . entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls a  $p < 0.001$ .

La incorporación de la 5-BrdU en los linfocitos en cultivo fue utilizada para analizar la cinética de proliferación celular y el índice de replicación en presencia de los dos herbicidas.

El índice de replicación (IR) se evaluó de acuerdo con la fórmula propuesta por Krishna *et al* (1985).  $IR = \frac{1M_1 - 2M_2 - 3M_3}{100}$  donde se examinaron 100 metafases de buena calidad con una apropiada tinción diferencial de cromátidas, que se clasificaron en primera, segunda y tercera división de acuerdo con la tinción diferencial de las cromátidas hermanas.

El índice mitótico (IM) se determinó por medio del análisis de 1000 células estimuladas (células en interfase con grandes núcleos que se tiñen claramente y en las no estimuladas los núcleos son muy pequeños y que presentan coloración azul muy intensa al observarlas al microscopio óptico) consecutivas anotando cuantas de ellas se encontraban en mitosis para utilizar las fórmulas  $IM = \text{No de metafases}/1000$  y el  $\% IM = IM \times 100$  (Husgafvel-Pursiainen 1987, Ioannidou *et al.* 1989, Rupa *et al.* 1989, Vijayalaxmi *et al.* 1996, Madrigal-Bujaidar *et al.* 1997, Sujatha y Hegde 1998)

Todos los tratamientos se hicieron por duplicado y se aplicó la prueba *t* de Student para comparar las medias del experimento y su réplica usando un nivel de significación de  $p < 0.05$ . Al no encontrarse diferencias significativas entre ellos se promediaron los valores y a los resultados se les aplicó la prueba de  $X^2$ , en el nivel de significancia  $p < 0.05$ . La relación concentración-IM fue analizada por el coeficiente de regresión usando la prueba *t* (dos colas). El nivel de probabilidad 0.05 fue usado como criterio de significación (Chakrabarti *et al.* 1997)

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

*Procedimiento de tinción diferencial para el análisis de intercambios de cromátidas hermanas en Vicia faba.*

*Tratamientos directos con metribuzina y ametrina en las raíces de Vicia faba*

Con la finalidad de verificar el efecto de los dos herbicidas en la planta misma se analizó la frecuencia de ICH en los cromosomas de los meristemos radiculares de *Vicia faba*, variedad minor, que ha resultado ser un buen bioindicador de mutágenos (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1995).

1 Incorporación de 5- BrdUrd

Las semillas una vez germinadas y cuando las raíces alcanzaron de 2 a 3 cm se sometieron 8 plántulas a una solución de análogos (5-Bromodesoxiuridina 100  $\mu$ M+ Uridina 5 $\mu$ M +Fluorodesoxiuridina 0.1  $\mu$ M) para un primer ciclo de replicación por 18 horas en la oscuridad a 20 °C

2 Tratamientos

Después de las 18 horas en la solución de análogos las plántulas se lavaron con agua corriente y posteriormente en agua destilada e inmediatamente se sumergieron en grupos de 8 durante 4 horas en oscuridad en las concentraciones de 250, 500, 750, 1000, 3000 mg/L tanto para metribuzina y ametrina, además 480 000 y 490 000 mg/L de metribuzina y ametrina, respectivamente, y el testigo estuvo sometido solo en agua destilada

Se volvieron a lavar con agua corriente en dos ocasiones y agua destilada, a continuación se dejaron por un segundo ciclo (19 horas) en una solución nueva de análogos de la misma concentración anterior (BrdUrd-FdUrd-Urd) a 20 °C y en oscuridad

Transcurrido este tiempo se limpiaron las puntas de las raíces, se cortaron 2 mm y se colocaron por 2 horas en una solución de colchicina 0.05 % en la oscuridad

### 3. Fijación

Pasado este lapso se sumergió en una solución de ácido acético glacial concentrado a las raíces a temperatura ambiente durante 1 hora y posteriormente se cambiaron a otra solución de etanol-ácido acético (3:1) a -20 °C protegiendo los frascos de la luz con papel aluminio y se dejaron por lo menos 2 días

### 4. Tinción

Se colocaron los meristemas en etanol al 70 % a 28 °C en baño de agua por 15 minutos e inmediatamente fueron sometidas a hidrólisis con HCL 5N a 28 °C en el mismo baño durante 80 minutos agitando frecuentemente. Se enjuagaron con agua destilada por lo menos tres veces con 2 minutos de intervalo entre cada enjuague. Los meristemas se tñieron con el reactivo de Schiff (tinción de Feulgen) por 45 minutos a 20 °C en la oscuridad

Se ablandaron los meristemas para su posterior aplastamiento colocándolos en pectinasa al 2 % disuelta en solución amortiguadora de citratos pH 4.7 durante 15 minutos a 28 °C en baño de agua

Se colocaron los meristemas en ácido acético al 45 % por 10 minutos, después se sumergieron en etanol al 70 % frío por 30 minutos en el refrigerador

Las laminillas se hicieron por aplastamiento en monocapa (squash) con ácido acético al 45 % en portaobjetos etiquetados

### 5. Preparaciones permanentes

Se colocaron las preparaciones en un congelador con aire líquido (Meneses 1987) de 3 a 5 segundos, posteriormente se desprendió el cubreobjetos con un bisturí. Las preparaciones se sumergieron en butanol absoluto realizando dos cambios rápidos para la deshidratación



de las células meristemáticas. Finalmente se montaron las preparaciones en balsamo de Canadá.

## 6 Registro y análisis estadístico

Por cada grupo experimental se registraron 50 cromosomas metacéntricos (M) y 250 subacrocentricos (S) que corresponderían al número de cromosomas contenido en 25 células. Los intercambios terminales se cuantificaron como uno y los intersticiales como dos. Para efectuar las observaciones al microscopio y con el objeto de evitar prejuicios del observador las preparaciones fueron reetiquetadas por otra persona.

En todos los casos se realizaron dos experimentos cuyos valores se compararon entre sí mediante el análisis de varianza (ANOVA),  $p < 0.05$ . Posteriormente a los promedios se les aplicó la prueba de comparación múltiple de Neuman-Keuls,  $p < 0.05$ . La correlación entre el ICH y la concentración fue analizada por el coeficiente de regresión usando la prueba  $t$  (dos colas). El nivel de probabilidad 0.05 fue usado como criterio de significación (Chakrabarti *et al.* 1997).

## RESULTADOS

### *Tratamientos directos con ametrina, metribuzina y etanol a los cultivos de linfocitos humanos*

Dentro de los objetivos propuestos se planteó detectar la acción directa de los herbicidas ametrina y metribuzina sobre el cultivo de linfocitos humanos, mediante la prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

A este respecto se llevaron a cabo tratamientos en que se expusieron directamente estos compuestos al cultivo de linfocitos. En las tablas I a IV se presentan los resultados de un experimento y su réplica, donde se aplicaron las concentraciones 1.5, 2, 2.5 y 5 mg/L de ametrina y 0.3, 0.4, 0.5, y 1 mg/L de metribuzin y 3600 mg/L de etanol a los cultivos de linfocitos humanos. No se presentaron aumentos significativos en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH). A partir de la concentración de 1.5 mg/L del tratamiento con metribuzina las células no se dividen, el mismo efecto se observó en el tratamiento de 6.5 mg/L de ametrina, por lo que se consideró a la metribuzina más citotóxica en concentraciones bajas (Tablas I a IV).

Tanto para el testigo negativo (cultivo de linfocitos + 5-BrdUd) como para el etanol, los valores obtenidos estuvieron dentro de los esperados (Takehisa *et al.* 1982).

En vista de que al aplicar la prueba de t de Student entre los experimentos I y II de cada herbicida no hubo diferencias significativas, se promediaron ambos valores y en las tablas II y IV se presentan los datos, a los cuales se les aplicó el análisis de varianza (ANOVA), siendo los valores de F no significativos a  $p < 0.001$ .

*Activación metabólica in vivo.*

*Determinación de proteínas totales por el método de Bradford*

*Extractos de las raíces de Vicia faba tratadas con metribuzina, ametrina y alcohol aplicados a los cultivos de linfocitos humanos*

El contenido de proteínas totales en los extractos de las raíces tratadas con 750, 1000, 2500, 3000, 5000, 6000, 7000, 8000, 12000, 15000, 20000 y 490 000 mg/L de metribuzina y 750, 2500, 6000, 8000, 30000, 50000 y 480 000 mg/L de ametrina no tuvieron variaciones significativas con respecto al testigo negativo (Tablas V y VI)

*Aplicación de los extractos de las raíces de Vicia faba tratadas con las diferentes concentraciones de metribuzina, ametrina y etanol a los cultivos de linfocitos humanos*

En los experimentos preliminares de la activación metabólica *in vivo* se observó que las concentraciones bajas de los herbicidas no fueron suficientes para provocar efecto sobre los linfocitos en cultivo, por lo que se decidió aumentar las concentraciones para establecer dicho efecto

La activación *in vivo* de metribuzina, ametrina y etanol por la enzima S10 de las raíces de *Vicia faba* fue evidente (Tablas VII y VIII) A partir de 750 mg/L de cada uno de los herbicidas, sus metabolitos provocaron un incremento en el ICH en las células de linfocitos humanos en cultivo Sin embargo la respuesta fue asintótica al aumentar la concentración Cuando estos resultados se compararon con los testigos, las diferencias fueron estadísticamente significativas  $F = 60.056$  con metribuzina y  $F = 69.886$  con ametrina, en los dos casos la  $p < 0.001$  (Tabla VIII)

El tratamiento con alcohol (3600 mg/L) fue activado por la fracción S10 de las raíces de *Vicia faba* y duplicó la frecuencia de ICH (Tabla VIII). La activación *in vivo* del alcohol con *Vicia faba* fue previamente reportado por Fakehisa *et al* (1982), Gómez-Arroyo *et al* (1995) y Calderón-Segura *et al* (1999)

En el transcurso de estos experimentos las raíces sometidas a las concentraciones altas de los herbicidas no mostraron ningún cambio morfológico y celular aparente, del mismo modo las células linfocitarias al ser sometidas a los extractos de las raíces tratadas con los herbicidas no sufrieron daño ni muerte celular

#### *Evaluación de la cinética de proliferación linfocitaria y los índices de replicación y mitótico*

En las tablas I y II se presentan los promedios de los datos obtenidos en los tratamientos y sus réplicas, que de acuerdo con la prueba de *t* de Student los efectos fueron similares

El ciclo de proliferación linfocitaria (CPL) de algunos de los cultivos tratados directamente con metribuzina mostró diferencias significativas con la cinética del cultivo asignado como testigo negativo (Tabla IX)

Los cultivos tratados directamente con metribuzina tuvieron un comportamiento irregular en el CPL, ya que con 0.3 y 1 mg/L se notaron valores bajos de metafases de primera división para 0.4 y 0.5 mg/L fueron más elevadas. Este comportamiento se manifestó en forma inversa para las segundas divisiones, donde las frecuencias más altas se observaron en 0.3 y 1 mg/L

A partir de 0.3 a 1 mg/L se registro incremento en la frecuencia de células metafásicas de tercera división al compararlo con el testigo negativo (Fig. 8). Por otro lado, no se encontraron células en metafase ni en otra fase de la división de los linfocitos sino sólo células no estimuladas a partir de 1.5 mg/L considerándose que hubo un bloqueo drástico de la mitosis.

El índice mitótico (IM) de los cultivos de linfocitos tratados con metribuzina presentó diferencias significativas con respecto al testigo negativo, estos valores tienen un comportamiento asintótico. Los datos del índice de replicación (IR) de los tratamientos de 0.3, 0.5 y 1 mg/L de metribuzina no evidenciaron diferencias significativas con relación al testigo negativo.

En el caso de la ametrina la cinética de proliferación también fue afectada en algunos cultivos y estadísticamente hubo diferencias significativas con el testigo negativo (Tabla IX). A partir de la concentración de 1.5 mg/L en el número de metafases de primera división se notó una tendencia de disminución al aumentar la concentración hasta 5 mg/L. Sin embargo, en el tratamiento de 2 mg/L se observó un ligero incremento que no fue significativo con el testigo negativo (Tabla IX), por lo cual, no se consideró relevante en la apreciación del efecto de disminución (Fig. 9).

Los datos obtenidos para las células metafásicas de segunda división tuvieron un comportamiento similar a los tratamientos de metribuzina. Los cultivos tratados con concentraciones de 1.5 hasta 5 mg/L de ametrina presentaron un aumento en las células de tercera división.

El IR de los tratamientos con ametrina no tuvo diferencias significativas con el testigo negativo. Los datos del IM mostraron diferencias significativas con relación al testigo negativo, ya que hubo cierta correspondencia de las concentraciones altas con la disminución del valor del IM. Desde la concentración de 6.5 mg/L de ametrina el proceso celular no tuvo continuidad (Tabla IX).

En el sistema de activación metabólica in vivo (Tabla X), la concentración de 750 mg/L para ambos herbicidas fue considerada inicial. A partir de ésta se observó un estímulo sobre la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en los cromosomas de los linfocitos (datos no publicados) provocado por los extractos de raíces.

El CPL de algunos de los cultivos de linfocitos humanos tratados con los extractos de las raíces, sometidas a las distintas concentraciones de metribuzina tuvieron diferencias significativas con respecto a los testigos (5-BrdU y fracción S10).

La activación metabólica de este herbicida también presentó irregularidades en la asociación de la concentración del herbicida con la frecuencia de células metafásicas de primera, segunda y tercera divisiones, sin embargo, se nota que desde la concentración de 750 hasta 480.000 mg/L las células metafásicas de tercera división elevaron sus frecuencias y la mayoría se observaron diferencias significativas con respecto a los testigos negativos (Fig. 10).

Existe una correlación negativa ( $r = -0.5358$ ) entre las concentraciones de metribuzina aplicadas a las raíces y el valor del IM de los linfocitos en cultivo. Es decir, conforme se incrementa la concentración va disminuyendo el valor del IM, no obstante, en 750 hasta 7000 mg/L no hay diferencias de significancia del IM con relación al testigo y a partir de 8000 hasta 480.000 mg/L sí presentan disminución en los valores del IM.

Los cultivos de linfocitos humanos sometidos a la aplicación de los extractos con las diferentes concentraciones de ametrina también mostraron diferencias significativas con relación a los testigos negativos (Tabla X).

Al igual que los cultivos tratados con los extractos sometidos a las diversas concentraciones de metribuzina, los de ametrina también tuvieron un comportamiento irregular en la frecuencia de las células metafásicas de primera, segunda y tercera divisiones. Existen diferencias significativas entre las células metafásicas de tercera división con las de los testigos negativos, debido al aumento de células de este tipo en todas las concentraciones (Fig. 11)

Los valores del IM tuvieron correlación negativa ( $r = -0.2323$ ) con la concentración aplicada, mostrando además una diferencia significativa con los testigos negativos. Es importante señalar que estos valores de los tratamientos fueron bajos con relación a los testigos en una tendencia a formar una asíntota y disminuyendo en la concentración de 490 000 mg/L. Los valores del IR de los tratamientos con activación vegetal no mostraron diferencia significativa con respecto a los testigos negativos (Tabla X)

Por otro lado, la relación de los testigos positivos con los negativos del presente trabajo fue la siguiente: se observó en los tratamientos directos con etanol un efecto ligero sobre las metafases de segunda y tercera divisiones en comparación con los tratamientos de metribuzina (Fig. 11)

El IR con respecto al testigo (cultivo de linfocitos humanos más 5-BrdU) así como el valor del IM del testigo positivo no tuvieron diferencias significativas con el testigo negativo y fue menor al IM de los tratamientos (Tabla IX)

Para los tratamientos directos con ametrina, el testigo positivo registró un efecto de aumento en las segundas divisiones y una disminución en las terceras divisiones, dando una diferencia significativa en estos niveles con los del testigo negativo (Fig. 9)

Los valores del IM e IR del etanol no tuvieron diferencias significativas con relación al testigo (Tabla IX). Sin embargo, el etanol más la fracción S10 (testigo positivo de la activación *in vivo*) sí tuvo efecto al disminuir los valores de las células metafásicas de primera división y estimular la frecuencia de células de tercera división presentando así una diferencia significativa con los testigos negativos (Figs. 10 y 11). En cambio los registros de los IR e IM no tuvieron diferencias significativas con estos últimos (Tabla X)

El testigo negativo (extractos de las raíces de *Vicia faba* sometidas sólo al agua destilada) utilizado para la activación metabólica *in vivo* de los dos herbicidas, no tuvo diferencias significativas sobre los tres criterios evaluados al ser cotejados con el testigo negativo (cultivo de linfocitos - 5-BrdU) (Tabla X)

#### *Resultados de la relación entre la concentración de metribuzina y ametrina y el efecto de ICH en las células meristemáticas de Vicia faba*

De acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba múltiple de Neuman-Keuls, los valores de ICH del tratamiento experimental y su replica de cada herbicida (Tabla XI) no mostraron estadísticamente diferencias significativas, por lo que se agruparon los datos de las 50 observaciones (Tabla XII). A partir de la concentración de 500 mg/L hasta la solución concentrada de cada uno de los herbicidas, la frecuencias de los ICH con relación al testigo negativo difirieron significativamente ( $F = 769.09$  con metribuzina y  $F = 556.11$  con ametrina en ambos el valor de  $p < 0.0001$ ) (Tabla XII)



Los valores de la frecuencia de ICH de las células radiculares de *Vicia faba* tuvieron correlación positiva con la concentración de los herbicidas (Figs. 6 y 7), esta relación fue más fuerte con los tratamientos con ametrina, ya que el incremento de ICH fue proporcional a la concentración de ametrina ( $r=0.8354$ ) no así para los tratamientos con metribuzina, en donde los valores tienden a comportarse en una asintota a partir de la concentración de 1000 mg/L ( $r=0.7951$ ) (Tabla XII)

## DISCUSIÓN

Los resultados de los tratamientos directos con concentraciones bajas de los herbicidas ametrina y metribuzina no indujeron ICH en los linfocitos humanos en cultivo. Estos herbicidas al aplicarlos por 48 horas sin activación metabólica no produjeron ICH. Sin embargo, la metribuzina fue capaz de ejercer un efecto citotóxico en concentraciones más bajas que la ametrina. Los cultivos de linfocitos tratados con 1.5 mg/L de metribuzina no presentaron células en división (Tablas II y IV)

Los datos de esta investigación y los reportados por Heredia *et al.* (1994) y Ribas *et al.* (1998) permitieron reconocer que los tratamientos directos de algunos miembros de las triazinas a bajas concentraciones no indujeron ICHs pero provocan efectos citotóxicos en linfocitos humanos en cultivo, por lo tanto estos compuestos podrían pertenecer al grupo de promutágenos (Plewa *et al.* 1988, Velemínský y Gichner 1988)

Por supuesto que existen algunas excepciones, por ejemplo, con relación al efecto genético de la atrazina, Brusick (1994) describe en varios sistemas de prueba efectos genéticos negativos y contradictorios. En tanto que Kuroda *et al.* (1992), mencionan que la simazina a bajas dosis induce ICH en células V79 de criceto chino.

En los resultados preliminares sobre la influencia del metabolismo vegetal, *in vivo* para los dos herbicidas a bajas concentraciones, no se observó efecto sobre el ICH, debido posiblemente a que las concentraciones usadas no fueron suficientes para inducir el fenómeno y aunque la capacidad de la planta para metabolizar los herbicidas es eficiente, aparentemente la cantidad de metabolitos producidos es aún insuficiente para estimular cambios en el ICH, además de que no se mostró daño morfológico en las raíces ni a escala

celular

En el presente trabajo se estableció como testigo positivo en la activación *in vivo* de ametrina y metribuzina al tratamiento de las raíces de *Vicia faba* con etanol a 3600 mg/L, cuyo resultado fue de  $9.1 \pm 0.16$  ICH/metafase (Tablas VII y VIII). Previamente Takehisa *et al.* (1982) demostraron que el acetaldehído incrementó la frecuencia de ICH por más del doble del testigo sin activación, por lo que concluyeron que el etanol fue metabolizado por las raíces de *Vicia faba* a acetaldehído, principalmente por la enzima citosólica alcohol deshidrogenasa, que necesita como cofactor a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Este metabolito provoca el aumento de ICHs en cultivo de linfocitos humanos *in vitro* (Obe *et al.* 1986). Por lo tanto, en esta investigación las condiciones experimentales para establecer la biotransformación de metribuzina y ametrina fueron eficientes, como se observa en la tabla VIII.

Los tratamientos con las distintas concentraciones de los herbicidas y del etanol activados por el metabolismo de *Vicia faba* mostraron un efecto significativo al compararlos con el testigo negativo sin activación, por lo que se concluye que estos herbicidas son mutágenos indirectos que se activan a través del metabolismo vegetal. Más aún, las diferencias en los resultados de CPL, el IM y el IR obtenidos en los extractos con etanol (Tabla X) y sin etanol no son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con relación al testigo, lo que concuerda con los datos de otros estudios para la activación metabólica de propoxur, molinate y butilate (Calderón-Segura 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999).

Los metabolitos de los herbicidas no ejercieron efectos citotóxicos sobre los linfocitos en cultivo, observando que la frecuencia de los ICHs se mantuvo asintóticamente hasta los

concentrados mayores de los herbicidas (Tabla VIII) Por lo tanto, estos herbicidas son citotóxicos por su compuesto original que tiene la capacidad de bloquear la división celular de los linfocitos en cultivo (Tabla II y IV).

La biotransformación de metribuzina y ametrina ha sido estudiada en microorganismos, plantas y animales. Sin embargo, un espectro general de los metabolitos y de sus efectos biológicos aún no se han descrito (Aizawa 1979, Frear *et al.* 1983, Gawronski 1983, Hatzios 1988, Means *et al.* 1988, Ducruet *et al.* 1993)

Estos herbicidas son rápidamente absorbidos por raíces y hojas y transportados por toda la planta, también son absorbidos en poco tiempo en los tejidos animales (Frear *et al.* 1983, Gawronski 1983)

Este estudio sugiere que *Vicia faba* al estar expuesta a concentraciones elevadas de los herbicidas podría establecer rutas de biotransformación como las propuestas por Fedtke (citado en Hatzios 1988) y Naylor (1979) Estos autores mencionan que las rutas de biotransformación de metribuzina y ametrina dependen de la concentración aplicada a las plantas, en donde, a concentraciones altas la conjugación del sulfóxido de metribuzina a homoglutationa parece ser la reacción predominante para desactivar a este herbicida, así mismo, y de acuerdo con Hatzios (1988), la ametrina es biotransformada por una reacción de *N*-desalquilación, que es una reacción oxidante, por lo que posiblemente los metabolitos que intervienen en algún momento para estimular la aceleración de la mitosis y la inducción de los ICHs son la "homoglutationa" para metribuzina y los compuestos "2-hidroxiamestrina para la ametrina

En este trabajo las raíces de *Vicia faba* en presencia de concentraciones elevadas de metribuzina y ametrina de acuerdo con la propuesta de Naylor (1979) y de Hatzios (1988)

pueden ser biotransformados en "homoglutationa" y un compuesto "2hidroxi" respectivamente cuando estos extractos se aplican por 48 horas. los nuevos compuestos son capaces de incrementar la frecuencia de ICH de las células de linfocitos humanos en cultivo (Tablas VII y VIII)

Sterling (1994) considera a las triazinas como herbicidas lipofílicos, cuyas moléculas atraviesan pasivamente a las células vegetales. Esta naturaleza lipofílica facilita la difusión rápida con el paso por la bicapa fosfolipídica de la membrana vegetal que baja así su gradiente de concentración para alcanzar el equilibrio entre la solución externa y la interna. Este investigador también menciona que la ametrina y la atrazina fueron rápidamente absorbidas por las raíces de plántulas de maíz y avena alcanzando el equilibrio en el lapso de 10 minutos y para salir de estas células solo bastaron 30 minutos, es decir que la membrana celular no es una barrera para las triazinas lipofílicas. Además aporta evidencias de que dichos compuestos lipofílicos (ametrina y metribuzina) tienen una correlación lineal positiva entre la concentración externa del herbicida y la absorbida por la planta, sugiriendo que la absorción no se satura a concentraciones altas. Sin embargo, si estos compuestos se llegaran a acumular en las células vegetales en concentraciones mayores que las establecidas en el equilibrio, lo realizarían por otros mecanismos como son la conversión a metabolitos no fitotóxicos y que el compuesto original o sus metabolitos se unan a constituyentes celulares o se acoplen en los lípidos

El metabolismo actúa como una poza para mantener un gradiente de concentración interna a partir de una absorción continua del herbicida durante el tiempo. Estos metabolitos del herbicida son más polares que la molécula original por lo que se acumulan en la célula debido a su reducida lipofílicidad y habilidad para atravesar la membrana. por lo tanto

permanecen dentro de ella, aunque los constituyentes celulares con los cuales se asocian son raramente identificados, pueden acumularse a concentraciones mayores que la de equilibrio, todo este proceso requiere de energía

Una concentración más elevada de los herbicidas dentro de las células posiblemente ya no permitiría, en algunos casos, que puedan descomponerse a niveles mayores, principalmente por los requerimientos de energía de la planta y la disposición de enzimas (punto de interés en la investigación de la selectividad de los herbicidas a los cultivos), esto provocaría una saturación enzimática en un punto de la vía de transformación de los herbicidas, como posiblemente suceda en este trabajo en la reacción oxidante (*N*-desalquilación) de la ametrina y de conjugación del sulfóxido de metribuzina, que como se mencionó antes, posiblemente son las reacciones predominantes para desactivar a estos herbicidas por *Vicia faba* para evitar el daño en las reacciones de la fotosíntesis

Es posible que el exceso de los herbicidas supere la formación de la fracción enzimática S10 en las raíces de *Vicia faba* (Tablas V y VI). La cantidad de proteínas totales determinadas por el método de Bradford está en un promedio de 14.6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para los testigos y para todas las concentraciones de los herbicidas aplicados a las raíces de *Vicia faba*, lo que hace suponer que la proporción de los metabolitos en la planta podría ser estable debido a la concentración casi constante de la fracción S10 en las células de las habas, por lo tanto en este estudio al aplicar 100  $\mu\text{l}$  de los extractos a los linfocitos en cultivo se están adicionando las mismas cantidades de metabolitos, lo que en cierta forma induce el ICH de manera similar en todos los casos. Sin embargo, es importante señalar que aunque no existe una correlación entre la concentración de los herbicidas y la frecuencia de ICH, los valores, tanto para los cultivos expuestos a los extractos de metribuzina como de ametrina no varían mucho

(Tabla VIII), siendo esto posiblemente el resultado de una saturación enzimática (por las causas que se mencionan referentes a la acumulación de los herbicidas en la planta) debido a la concentración de los herbicidas

Este efecto también es reportado por Calderón-Segura y Espinosa-Ramírez (1998) en tratamientos con activación *in vitro*, coincubando linfocitos humanos con la mezcla S10 más 100 y 200 mg/L del herbicida tiocarbámico molinate, donde el efecto sobre la frecuencia de ICH en estas concentraciones tiene un comportamiento asintótico, que disminuye a concentraciones más altas debido a la desnaturalización de las enzimas contenidas en la fracción S10, lo que evita el metabolismo. Sin embargo, en el presente trabajo no se observa dicha disminución de ICH en los cultivos de linfocitos expuestos a los tratamientos con concentraciones altas de metribuzina y ametrina activadas a través del metabolismo *in vivo* (Tablas VII y VIII).

La acción genotóxica de metribuzina y ametrina sobre los meristemos radiculares de *Vicia faba* se manifiesta al incrementarse la frecuencia de ICH (Tabla XII), estableciéndose además una correlación positiva de concentración-efecto (Figs. 6 y 7)

No hay una acción fitotóxica, esto se debe a que la planta tiene la capacidad de tolerar concentraciones muy altas de estos herbicidas (biotransformación). Los promedios 30.12 y 30.24 ICH/metafases en el testigo (raíces de *Vicia faba*, sin tratamiento), coinciden con los valores descritos por Kihlman y Andersson (1982, 1984), Calderón-Segura (1993) y Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrum (1995), para cromosomas cuyo DNA ha pasado por dos ciclos de replicación en presencia de la 5-BrdU. Por lo tanto, se reafirma una vez más que *Vicia faba* es un biomonitor capaz de detectar el daño genotóxico de metribuzina y ametrina como promutágenos, ya que se mostró una correlación positiva entre la concentración-efecto

sobre la frecuencia de ICH en la misma planta y solo el efecto en el incremento de ICH en células de linfocitos humanos en cultivo (activador mutagénico S10)

La capacidad de *Vicia faba* para sintetizar grandes cantidades de proteínas con y sin herbicidas durante el crecimiento inicial de la raíz (Tablas V y VI) juega un papel importante para la formación de ICH ( Sono y Sakaguchi 1986) que tanto en animales como en plantas puede ser igual ya que son dependientes de la síntesis de proteínas, aunque en las plantas no participa la polimerasa B, ya que no se sintetiza en sus células somáticas, pero existe una polimerasa de otro tipo que funciona en los procesos de recombinación y escisión que ocurre en la horquilla de replicación del DNA

Otros factores que incrementan la producción de ICH en *Vicia faba* y en mayor número que en las células humanas es su contenido de DNA en  $2n$ , por picogramo de DNA, además las diferencias de organización estructural del material genético para la acción de la BrdU, la cinética de replicación del DNA y el tiempo de replicación de los replicones propuesto por Painter (1980) (Dimitrov y Georgieva 1994)

En el análisis de la cinética de proliferación celular tanto en los tratamientos directos como con activación metabólica de metribuzina y ametrina por *Vicia faba in vivo* se nota un aumento en las metafases de tercera división del ciclo celular (Tablas IX y X) Este incremento sugiere que los herbicidas están provocando un estímulo, posiblemente debido a las propiedades químicas de su forma activa y a la transformación metabólica de su molécula por *Vicia faba*.

Este aumento de la frecuencia de metafases se pudo favorecer por la interferencia en una acción conjunta con la fitohemaglutinina o en la activación de enzimas u otros factores que aceleraron el proceso de la división de los linfocitos humanos



Ribas *et al.* (1998) reportan reducción en IR y el CPL en cultivo de linfocitos humanos expuestos a 50 µg/ml de atrazina por 48 horas. sin activación microsómica (S9), confirmando que esta triazina es capaz de ejercer efectos citotóxicos en células humanas y que por si mismos no parecen ser mutagénicos en mamíferos.

Los resultados obtenidos en el tratamiento directo con metribuzina y ametrina del presente trabajo (Tabla IX) no coinciden con los encontrados por Ribas *et al.* (1998), ya que el IR tiene poca variación y más bien muestra un comportamiento asintótico que al llegar a las concentraciones de 15 mg/L de metribuzina y 65 mg/L de ametrina éste baja drásticamente inhibiéndose la división celular (se observa que no existe una correlación positiva entre la concentración de los herbicidas y el IR) No obstante, la correspondencia de este trabajo con el de Ribas *et al.* (1998) se establece con base en la conclusión de que las triazinas a bajas concentraciones tienen efecto citotóxico en células humanas (Tabla IX) y que requieren ser activados para provocar efecto mutagénico

En los tratamientos directos con metribuzina se observa el aumento del IM que se mantiene en forma asintótica hasta la concentración de 1 mg/L, después de esta concentración ya no se encontraron núcleos estimulados

Para la ametrina aplicada de manera directa a los cultivos de los linfocitos, los valores del IM disminuyen y en la concentración de 6.5 mg/L ya no se observan núcleos estimulados. demostrándose así que la metribuzina es más citotóxica. ya que en la concentración de 15 mg/L. o sea a menor concentración que la ametrina no se observaron células estimuladas ni células en división. Esto implica que la forma activa de los herbicidas interviene en la disponibilidad de nutrientes y en la supresión de algunas enzimas relacionadas con la síntesis del DNA que afectan a los linfocitos en la continuación del

ciclo celular normal y a la supresión de la mitosis de los linfocitos (Tabla IX)

Los resultados obtenidos en los tratamientos de los extractos de *Vicia faba in vivo* tienen el mismo efecto de estímulo que cuando los dos herbicidas son agregados en forma directa, es decir, los metabolitos de los dos herbicidas aumentan la cantidad de células de tercera división en todos los tratamientos y se observa una disminución en las frecuencias de las células de primera división (Tabla X)

Posiblemente el compuesto activo y los metabolitos de cada uno de los herbicidas actúan para promover la aceleración de la división de las células de tercera división ya sea incrementando la disposición de nutrimento para las células en cultivo la activación de enzimas que intervienen en la citocinesis, estimulando la síntesis de proteínas o la participación conjunta con la fitohemaglutinina adicionada a los cultivos de linfocitos para activar su división

En la apreciación de las metafases de tercera división y de los IM de los tratamientos directos y con activación metabólica se observa que los metabolitos tienen un grado de citotoxicidad ligera con relación al compuesto activo de los dos herbicidas que a la concentración de 1.5 mg/L de metribuzina y a 6.5 mg/L de ametrina ya no se encuentran células estimuladas, en cambio los tratamientos experimentales de los dos herbicidas activados metabólicamente por *Vicia faba* llegan a ejercer todavía un incremento en la frecuencia de células de tercera división y una tendencia a la disminución del IM a concentraciones de 480 000 mg/L de metribuzina y 490 000 mg/L de ametrina. Además, los valores uniformes y muy similares del IR en los tratamientos directos y con la activación *in vivo* reafirman lo antes mencionado sobre el aumento del CPL. Estos valores no presentan diferencias significativas con los testigos negativos, además se observó la falta de

correlación positiva entre la concentración de los herbicidas y el IR

Una situación que se asemeja a la del presente trabajo es la descrita por Calderón-Segura y Espinosa-Ramírez (1998) con tratamientos directos de butilata y de molinate (4 horas) a los cultivos de linfocitos humanos y con activación metabólica *in vitro*, se acelera el ciclo celular mostrado por la mayor frecuencia de células metafásicas de tercera división, por lo tanto existe coincidencia en los dos trabajos de que las moléculas originales de cada plaguicida y sus productos metabólicos inducen a los linfocitos a dividirse a una tasa más rápida, lo cual se expresa en un alto porcentaje de metafases de tercera división que implica la activación del ciclo celular más corto con una fracción mayor de células cíclicas (3M).

Se corroboró la eficiencia de la activación metabólica de compuestos químicos por *Vicia faba in vivo* por el método empleado por Calderón-Segura (1993), Gómez -Arroyo *et al.* (1995) y Calderón-Segura *et al.* (1999)

Este trabajo coincide con el de los autores antes mencionados en el hecho de que la fracción S10 no causa efecto sobre la CPL, el IM y el IR de los cultivos de linfocitos humanos con relación al testigo negativo (cultivo de linfocitos + 5-BrdUrd), ya que no presentan diferencias significativas. en cambio si se observa un daño adicional por el etanol activado *in vivo* por las raíces de *Vicia faba* en las células de primera y tercera divisiones comparado con el testigo negativo (cultivo de linfocitos + extracto de *Vicia faba* sin tratamiento) (Tablas LX y X)

## CONCLUSIONES

Los herbicidas metribuzina y ametrina (triazinas) son mutágenos indirectos que se activan a través del metabolismo vegetal

La activación metabólica de *Vicia faba* para el etanol (testigo positivo) en estos experimentos comprueban que sí hay un efecto sobre la frecuencia de ICHs de los cultivos de linfocitos promovido por metabolitos de ametrina y metribuzina contenidos en los extractos de las raíces de esta planta.

Los compuestos químicos de los herbicidas en exposición directa a los linfocitos en cultivo, fueron más citotóxicos que sus metabolitos contenidos en el extracto de *Vicia faba*

En exposición directa la metribuzina fue más citotóxica a bajas concentraciones que la ametrina

Hay una correlación positiva entre la concentración de los herbicidas ametrina y metribuzina y la frecuencia de ICHs en las células meristemáticas de *Vicia faba*

La metribuzina estimula la división de los linfocitos, observándose el aumento tanto en la frecuencia de células de tercera división como del IM con respecto al testigo negativo, pero cuando se incremento la concentración estos valores disminuyen

Los linfocitos humanos expuestos en forma directa a la ametrina presentaron un aumento de células de tercera división, siendo más notable en concentraciones de 2.5 mg/L

Al exponerse los linfocitos directamente a concentraciones altas de ametrina sufren la disminución en el IM

La metribuzina y ametrina son transformadas por el metabolismo de *Vicia faba*, pues provocaron un efecto citotóxico.

Se sugiere de acuerdo con Fedtke (citado en Hatzios 1988) y Naylor (1979) que las

fases de transformación de metribuzina y ametrina llevadas a cabo por *Vicia faba* y que provocaron el daño son la conjugación y el proceso de N-desalquilación, respectivamente

Como conclusión general se considera que los herbicidas metribuzina y ametrina y sus metabolitos producen efectos citotóxicos sobre los linfocitos humanos en cultivo lo que podría representar un motivo para continuar los estudios de mutagenicidad y carcinogenicidad

## REFERENCIAS

- Ademola J.I., Sedik I. E., Wester R C y Maibach H I (1993) *In vitro* percutaneous absorption and metabolism in man of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamine-s-triazine (atrazine) Arch Toxicol. 67,85-91.
- Aizawa H. (1979) *Metabolic maps of pesticides* Academic Press, Nueva York, pp 195-201
- Ashton M F y Bayer E D 1979 Effects on solute transport and plant constituents En: *Herbicides, physiology, biochemistry, ecology* (J L Audus, Ed.) Academic Press, Londres, Vol 1, pp 220-250
- Arru G., Congiu A. M., Burdino E. y Ugazio G. (1997) Toxicity of atrazine and its metabolite deethylatrazine in *Thamnocephalus platyurus* y *Dugesia gonocephala*. G Ital Med Lav Ergon 19, 17-19
- Bayer A G. (1994) Tratamiento de la intoxicación por plaguicidas Guía para Médicos Sector Agrochemicals Crop Protection Business Group México, 81 pp
- Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal Biochem 72, 248-254
- Brian C R (1979) The history and classification of herbicides En *Herbicides, physiology, biochemistry, ecology* (J L Audus, Ed ). Academic Press, Londres, Vol 1, pp 1-54
- Brusick J D (1994) An assessment of the genetic toxicity of atrazine relevance to human health and environmental effects Mutat Res. 317, 133-144
- Calderón-Segura M E (1993) Intercambios de cromátidas hermanas inducidos por propoxur previa activación metabólica por *Vicia faba* Tesis de Maestría Facultad de Ciencias, UNAM México, D F

- Calderón-Segura M E y Espinosa-Ramírez M. (1998) Efecto de butylate y de molinate sobre La división de los linfocitos humanos en cultivo con y sin activación metabólica *in vivo* e *in vitro* por *Vicia faba* Rev Int Contam Ambient 14, 39-47
- Calderón-Segura M E , Gómez-Arroyo S , Villalobos-Pietrini R y Espinosa-Ramírez M. (1999). *In vivo* and *in vitro* promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures Mutat Res. 2, 81-88.
- Carrano A V y Thompson L H (1982). Sister chromatid exchange and single gen mutation En *Sister chromatid exchange*. Wiley, Nueva York, pp 59-86
- Chakrabarti S , Xiao-Xiang Z. y Claude-lise R (1997). Influence of duration of exposure to styrene oxide on sister chromatid exchanges and cell-cycle kinetics in cultured human blood lymphocytes *in vitro*. Mutat Res 395, 37-45
- CIBA-GEIGY MEXICANA (1996) Manual de protección de cultivos 3ª ed., Ciba Geigy, México, 334 pp
- 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 Marine and Freshwater Res. 45, 209-226
- Dimitrov B y Georgieva V (1994) Comparative analysis of sister-chromatid exchanges in plant and human chromosomes Mutat Res 304, 187-192
- Ducruet J M, Sixton H y Garcia-Baudin J M (1993) Using chlorophyll fluorescence induction for a quantitative detoxification assay with metribuzin and chlorotoluron in excised wheat (*Triticum aestivum* and *T. durum*) leaves Pest Sci. 38, 295-301

- Duke O S (1990) Overview of herbicide mechanisms of action Environ Health Perspect 87 263-271
- Dunkelberg H , Fuchs J , Hengstler J G , Klein E , Oesch F y Struder K (1994) Genotoxic effects of the herbicides alachlor, atrazine, pendimethaline, and simazine in mammalian cells Bull. Environ Contam Toxicol 4, 498-504
- Evans H J y Scott D (1964). Influences of DNA synthesis on the production of chromatid Aberrations by x-rays and maleic hidrazide in *Vicia faba*. Genetics 49, 17-33.
- Evans J H y O'Riordan M. L. (1975). Human peripheral blood lymphocytes for analysis of chromosome aberrations in mutagens test Mutat Res. 54, 20-30
- Fedtke C. (1983) Leaf peroxisomes deaminate as-triazinone herbicides Naturwissenschaften 70, 199
- Frear D S., Mansager E R , Swanson H. R y Tanaka F S (1983) Metribuzin metabolism in tomato isolation and identification of *N*-glucoside conjugates Pest Biochem Physiol 19, 270-281
- Frear D S , Swanson H.R y Mansager E R (1985) Alternate pathways of metribuzin metabolism in soybean formation of *N*-glucoside and homogluthathione conjugates Pestic Biochem Physiol 23, 56
- Gawronski W S (1983) Tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars to metribuzin Weed Sci 31, 525-527
- Gentile J M , Gentile G J , Bultman J , Sehriest R , Wagner E D. y Plewa M J (1982) An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation Mutat Res 101, 19-29



- Gentile J.M , Gentile G J y Piewa M J (1986) *In vitro* activation of chemicals by plants a comparison of techniques Mutat Res. 164, 53-58
- Ghiazza G , Zavarise G , Lanero M y Ferraro G (1984) Sister chromatid exchanges induced in human lymphocyte chromosomes by trifluralin, atrazine and simazine Boil Soc Ital Biol Sper. 60.2149-2153
- 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. Molec Mutagen 26, 324-330
- Gómez-Arroyo S y Villalobos-Pietrini R. (1995). Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants En *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change* (F M Butterworth, L D Corkum y J Guzmán-Rincón Eds.) Plenum Press, Nueva York, pp 95-113
- Guigas C , Pool-Zobel B L y Diehl J. F. (1993) The combination effects of quercetin with the herbicides atrazine, cyanazine and gesamprim in mutagenicity tests. Z Ernährungswiss 32, 131-138
- Hatzios K K. y Penner D. (1982) *Metabolism of herbicides in Higher plants* Burgess Publishing, Mineapolis
- Hatzios K K (1988) Biotransformations of herbicides in higher plants En *Environmental chemistry of herbicides* ( R. Grover y A J Cessna, Eds ) CRC Press, Boca Raton, Vol 2, pp 142-175

- Heindel J J , Chapin R E , Gulati D K , George J D , Price C J y Marr M C (1994)  
Assessment of the reproductive and developmental toxicity of pesticide/fertilizer  
mixtures based on confirmed pesticide contamination in California and Iowa  
groundwater *Fundamental Appl. Toxicol* 22, 605-621
- Heredia P , Viigagni F., Maffei F., Morotti M , Colacci A , Perocco P y Grilli S (1994)  
Genetic safety evaluation of pesticides in different short-term tests *Mutat Res* 321,  
219-228.
- Higashi K. (1988). Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes  
of higher plants *Mutat. Res* 197, 273-288
- Husgafvel-Pursiainen K (1987) Sister-chromatid exchange and cell proliferation in cultured  
lymphocytes of passively and actively smoking restaurant personnel. *Mutat. Res* 190,  
211-215
- Ikonen R , Kangas J y Savolainen H. (1988) Urinary atrazine metabolites as indicators for  
rat and human exposure to atrazine *Toxicol Lett* 44, 109-12
- Ioannidou E., Lialiaris T., Morelatos D y Dozi-Vassiliades J. (1989). Synergistic induction  
of cytogenetic damage by alkylating antineoplastics and 5-azacytidine in human  
lymphocytes *Environ Molec Mutagen* 14, 6-12
- Jasinska J , Steffen J A y Michalowski A (1977) Studies *in vitro* lymphocyte proliferation  
in cultures synchronized by inhibition of DNA synthesis II Kinetics of the initiation of  
the proliferation response *Exp Cell Res* 61, 33-341
- Johnson B J (1993). Sequential herbicide treatments for large crabgrass (*Digitaria*  
*sanguinalis*) and goosegrass (*Eleusine indica*) control in Bermudagrass (*Cynodon*  
*dactylon*) turf *Weed Technol* 7, 674-680

- Junnila S, Heinonen-Tanski H, Ervö L, R y Laitinen P (1993) Phytotoxic persistence and microbiological effects of metribuzin in different soils. *Weed Res.* 33, 213-223
- Kato H (1974) Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatid exchanges. *Nature* 252, 70-72
- Kato H. (1977) Spontaneous sister chromatid exchanges detected by BrdU-labelling method. *Nature* 251, 739-741.
- Kihlman B. A. y Andersson H. C. (1982) Sister-chromatid exchanges in plants. En. *Sister-chromatid exchanges* (S. Wolff, Ed.) Wiley, Nueva York, pp 243-256
- Kihlman B. A. y Andersson H. C. (1984). Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. En *Handbook of mutagenicity test procedures.* (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols y C. Ramel, Eds) 2ª ed., Elsevier, Amsterdam, pp 531-554
- Krishna G, Xu J., Nath J., Petersen M. y Ong T (1985) *In vivo* cytogenetic studies on mice exposed to ethylene dibromide. *Mutat Res* 158, 81-87
- Kross B. C., Vergara A. y Raue L. E. (1992) Toxicity assessment of atrazine, alachlor, and carbofuran and their respective environmental metabolites using microtox. *J. Toxicol Environ. Health* 37, 149-159
- Kruger E. L., Somasundaram L., Kanwar R. S. y Coats J. R. (1993) Persistence and degradation of (<sup>14</sup>C) deisopropylatrazina as affected by soil depth and moisture conditions. *Environ Toxicol. Chem* 12, 1959-1967
- Kulshrestha G., Yaduraju N. T. y Mani V. S. (1982) The relative toxicity of the S-triazine herbicides atrazine and simazine to crops. *J. Environ. Sci. Health* 4, 341-354

- Kuroda K, Yamaguchi Y y Endo G (1992). Mitotic toxicity, sister chromatid exchange, and rec assay of pesticides Arch Environ Contam Toxicol 23, 13-18
- Lanfranconi L E, Bellinder R R y Wallace R. W (1993) Grain rye residues and weed control strategies in reduced tillage potatoes. Weed Technol 7, 23-28
- Latt S A (1973) Microfluorometric detection of DNA replication in human metaphase chromosome. Proc Natl Acad Sci (USA) 70, 3395-3399
- Latt S A (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C Proc Natl Acad Sci (USA) 71, 3162-3166.
- LIOI M B., Scarfi M R., Santoro A., Barbiere R., Zeni O, Salvemini F, Di Berardino D y Ursini M V (1998) Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed *in vitro* to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636 Environ Mol. Mutagen 32, 39-46.
- Loosli R (1995) Epidemiology of atrazine Rev Environ. Contam Toxicol 143, 47-57
- Ma T. H. (1999). The role of plant systems for the detection of environmental mutagens and Carcinogens. Mutat Res 437, 97-100.
- Madrigal-Bujaidar E, Ibañez C J, Cassani M y Chamorro G (1997) Effect of furazolidone on sister-chromatid exchanges, cell proliferation kinetics, and mitotic index *in vivo* and *in vitro*. J Toxic Environ. Health 51, 89-96
- Mazur J B y Falco C S (1989) The development of herbicide resistant crops Ann Rev Plant Physiol Plant Molcc Biol 40, 441-470.
- Means C J, Plewa J. M y Gentile M J (1988). Assessment of the mutagenicity of fractions from s-triazine-treated *Zea mays* Mutat Res 197, 325-336

- Meisner L F, Reloff B D y Belluck D A (1993) *In vitro* effects of N-nitrosoatrazine on chromosome breakage Arch Environ Contam Toxicol 24, 108-112
- Meneses P M A (1987) Método para la elaboración de preparaciones citológicas permanentes empleando un equipo que congela con fluidos refrigerantes Memorias de la IV Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Genética México D F
- Milburn P., O'Neill H., Gartley C, Pollock T, Richards J E y Bailey H. (1991) Leaching of dinoseb and metribuzin from potato fields in New Brunswick Can Agricult Eng. 33, 197-204
- Murnik M R y Nash C L (1977) Mutagenicity of the triazine herbicides atrazine, cyanazine, and simazine in *Drosophila melanogaster* J Toxicol. Environ Health 4,691-707
- Naylor W A (1979) Herbicide metabolism in plants. En *Herbicides; physiology, biochemistry, ecology* (J L. Audus, Ed.) Academic Press, Londres, Vol 1, pp. 397-422
- Obe G, Jonas R y Schmidt S (1986) Metabolism of ethanol *in vitro* produces a compound which induces sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes *in vitro*: acetaldehyde not ethanol is mutagenic Mutat Res 174, 47-51
- Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W y Draetta P (1992) Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. EMBO J 11, 961-971
- Painter R B (1980) A replication model for sister-chromatid exchange Mutat Res 70, 337-341
- Perry P y Evans H J (1975) Cytological detection of mutagen, carcinogen exposure by chromatid exchange Nature 258, 121-124

- Perry P y Wolff S (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid exchange *Nature (Londres)* 251, 156-158
- Peterson H G , Boutin C , Martin P A , Freemark K E , Rueckrer N J y Moody M. J (1994) Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations *Aquatic Toxicol (Amsterdam)* 28, 275-292.
- Plewa J. M (1978). Activation of chemical into mutagen by green plants A preliminary discussion. *Environ Health Perspect* 27,45-50
- Plewa J M y Gentile M. J (1982) The activation of chemicals into mutagens by green plants En *Chemical mutagens: principles and methods for their detection* (A Hollaender, Ed.) Plenum Press, Nueva York, Vol 7, pp 401-420
- Plewa J. M , Wagner D. E , Gentile J G y Gentile M J (1984). An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation *Mutat Res* 136, 233-245
- Plewa J M , Wagner D.E. y Gentile M J (1988) The plant cell' microbe coinubation assay for the analysis of plant-activated promutagens. *Mutat Res* 197, 207-219
- Plewa J M y Wagner D E (1993) Activation of promutagens by green plants *Ann Rev Genet.* 27, 93-113
- Porter W P , Green S M , Debbink N L y Carlson I (1993) Groundwater pesticides interactive effects of low concentratios of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats *J Toxicol Environ Health* 1, 15-34

- Rasquinha A. I., Wildoman G. A. y Nazar N. R. (1988) Studies on the use of plant extracts in assessing the effects of plant metabolism on the mutagenicity and toxicity of pesticides. *Mutat Res* 197, 261-272
- Ribas G., Surrallés J., Carbonell E., Creus A., Xamena N. y Marcos R. (1998). Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* 416, 93-99
- Richard E. P. Jr y Griffin J. L. (1993) Johnsongrass (*Sorghum halepense*) control in sugarcane (*Saccharum sp*) with asulam applied alone and in mixtures. *Weed Technol* 7, 657-662
- Rodríguez- de la Torre M. (1990). *Control de plagas de plantas y animales. Plantas nocivas y como combatirlas*. Vol. 2, Ed. Limusa Noriega, pp 193-221
- Roloff B., Belluck D. y Meisner L. (1992a) Cytogenetic studies of herbicide interactions *in vitro* and *in vivo* using atrazine and linuron. *Arch Environ Contam Toxicol* 22, 267-271
- Roloff B., Belluck D. y Meiner L. (1992b) Cytogenetic effects of cyanazine and metolachlor on human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutat Res* 281, 295-298
- Rupa S. D., Reddy P. P. y Reddi S. O. (1989) Analysis of sister-chromatid exchanges, cell kinetic and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticide sprayers. *Mutat Res* 223, 253-258
- Rupa D. S., Reddy P. P., Sreemannarayana K. y Reddi S. O. (1991) Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. *Environ Molec Mutagen* 18, 136-138

- Sandermann H Jr (1988) Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes *Mutat Res* 197, 183-194
- Sathiakumar N y Delzell E (1997) A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer *Crit Rev Toxicol.* 6, 599-612
- Scorgie H R y Cooke A S. (1979) Effects of the triazine herbicide cyanatryn on aquatic animals *Bull Environ Contam. Toxicol* 22,135-142.
- Shaw D R y Hydrick D.E (1993) Effect of imazaquin and chlorimuron plus metribuzin on sicklepod (*Cassia obtusifolia*) seed production and germination *Weed Technol* 7, 681-685
- Smeda R J , Hasegawa P.M , Goldsbrough P B , Singh N K y Weller S C (1993) A serine-to-threonine substitution in the triazine herbicide-binding protein in potato cells results in atrazine resistance without impairing productivity *Plant Physiol* 103, 911-917.
- Smith E A (1988) Transformations in soil *En Environmental chemistry of herbicides* ( R Grover y A J Cessna, Eds.). CRC Press, Boca Raton, Vol 1, pp 171-200
- Sobti R C , Krishna A y Pfaffenberger C.D (1982) Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells *in vitro* organophosphates *Mutat Res* 102, 89-102
- Sono A y Sakaguchi K (1986) The influence of a protein synthesis inhibitor on sister-chromatid exchange in the plant *Vicia faba*. *Mutat. Res* 173, 257-261
- Sterling M T (1994) Mechanisms of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells *Weed Sci* 42,263-276
- Sujatha V I y Hegde J M (1998) C-mitotic effects of trichloroethylene (TCE) on bone marrow cells of mice *Mutat Res* 413, 151-158



- Taets C., Aref S. y Rayburn A. L. (1998) The clastogenic potential of triazine herbicide combinations found in potable water supplies. *Environ. Health Perspect.* *4*, 197-201
- 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., 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.
- Tice R. R. y Hollaender A. (Eds.) (1984). Sister chromatid exchanges. 25 years of experimental research. Part A. En: *The nature of SCEs*. Plenum Press, Nueva York.
- Tu C. M. (1992) Effect of some herbicides on activities of microorganisms and enzymes in soil. *J. Environ. Sci. Health.* *27*, 695-709
- Velemínský J. y Gichner T. (1988). Mutagenic activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. *Mutat. Res.* *197*, 221-242
- Venkatesh K., Levi P. E., Inman A. O., Monteiro-Riviere N. A., Misra R. y Hodgson E. (1992) Enzymatic and immunohistochemical studies on the role of cytochrome P450 and the flavin-containing monooxygenase of mouse skin in the metabolism of pesticides and other xenobiotics. *Pesticide Biochem. Physiol.* *43*, 53-66
- Vijayalaxmi, Reiter J. R., Leal Z. B. y Meltz L. M. (1996) Effect of melatonin on mitotic and proliferation indices, and sister chromatid exchange in human blood lymphocytes. *Mutat. Res.* *351*, 187-192
- Walsh J. D., Defelice M. S. y Sims B. D. (1993) Influence of tillage on soybean (*Glycine max*) herbicide carryover to grass and legume forage crops in Missouri. *Weed Sci.* *41*, 144-149

- Waters D M, Stack H F y Jackson A M (1999) Genetic toxicology in the evaluation of potential human environmental carcinogens *Mutat Res* 437, 21-49
- Willard T S y Griffin J L (1993). Soybean (*Glycine max*) yield and quality responses associated with wild posettia (*Euphorbia heterophylla*) control programs *Weed Technol* 7, 118-122
- Wolff S (1974). Sister chromatid exchanges the most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic, carcinogenic. *Expert. Conference Oslo, Noruega*, pp 11-13
- Wolff S (1982) Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and lesions that produce them En *Sister chromatid exchange* Wiley, Nueva York, pp 43-86
- Zhurkov V S y Yakovenko K N (1976) The culture of human lymphocytes as a test subject for evaluation of mutagenic activity of chemicals *Mutat. Res* 41, 107-112

TABLA I. INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR AMETRINA EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO.<sup>a</sup>

	Experimento I		Experimento II	
	$\bar{X}$	E E	$\bar{X}$	E E
Testigo negativo	3.9	0.51	3.8	0.43
Etanol 3600 mg/L	4.8	0.19	4.1	0.29
Cultivo de linfocitos				
Tratamientos directos				
Mg/L				
1.5	4.2	0.29	4.4	0.42
2.0	3.8	0.29	4.0	0.41
2.5	4.9	0.18	4.6	0.49
5.0	4.2	0.33	4.1	0.26
6.5	No se observaron células en división		No se observaron células en división	
12.5	..		..	
20.0	..		..	
30.0	..		..	
50.0 a 1000	..		..	

<sup>a</sup> Corresponder a un experimento y su réplica

<sup>b</sup> n=25 metafases

TABLA II. INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR AMETRINA EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO.<sup>a</sup>

	$\bar{X}^b$	E. E.
Testigo negativo	3.9	0.47
Etanol 3600 mg/L	4.4	0.24
Cultivo de linfocitos		
Tratamientos directos		
mg/L		
1.5	4.3	0.35
2.0	3.9	0.35
2.5	4.8	0.33
5.0	4.2	0.29
6.5	No se observaron células en división	
12.5		
20.0		..
30.0		..
50.0 a 1000		..

<sup>a</sup> Promedios de dos experimentos

<sup>b</sup> n = 50 metafases

No se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento por análisis de varianza F = 1.17, p > 0.001

TABLA III. INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR METRIBUZINA EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO.<sup>a</sup>

	Experimento I			Experimento II		
	$\bar{X}^b$	$\pm$	E E	$\bar{X}^b$	$\pm$	E E
Testigo negativo	3.9		0.51	3.8		0.43
Etanol 3600 mg/L	4.8		0.19	4.1		0.29
Cultivo de linfocitos						
Tratamientos directos						
mg/L						
0.3	4.6		0.43	3.9		0.34
0.4	3.7		0.35	4.0		0.36
0.5	4.8		0.28	4.1		0.25
1.0	3.9		0.19	3.8		0.14
1.5	No se observaron células en división			No se observaron células en división		
2.5	No se observaron células en división			No se observaron células en división		
4.0	No se observaron células en división			No se observaron células en división		
5.0	No se observaron células en división			No se observaron células en división		
50.0 a 1000	No se observaron células en división			No se observaron células en división		

<sup>a</sup> Corresponden a un experimento y su réplica

<sup>b</sup> n=25 metafases

TABLA IV. INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR METRIBUZINA EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO.<sup>a</sup>

	$\bar{X}^b$	E.E.
Testigo negativo	3.9	0.47
Etanol 3600 mg/L	4.4	0.24
Cultivo de linfocitos		
Tratamientos directos		
mg/L		
0.3	4.3	0.38
0.4	3.9	0.35
0.5	4.5	0.26
1.0	3.9	0.17
1.5	No se observaron células en división	
2.0		
20.0		
30.0		
50.0 a 1000		

<sup>a</sup> Promedios de dos experimentos

<sup>b</sup> n=50 metafases

No se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento por análisis de varianza F = 0.7297  $p > 0.001$

TABLA V. DETERMINACION DE PROTEINAS ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) POR EL METODO DE BRADFORD EN LOS EXTRACTOS DE LAS RAÍCES DE *Vicia faba* TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE METRIBUZINA.

	$\bar{X}^a$	E.E.
Testigo Negativo		
Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> sin tratamiento	14.8	0.68
Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con Etanol 3600 mg/L	14.9	0.96
Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con Metribuzina (mg/L)		
50	13.7	1.33
250	15.3	0.24
500	17.8	2.19
750	15.9	0.21
1000	14.9	0.54
2500	16.0	0.46
3000	13.8	1.21
5000	15.9	0.28
6000	16.5	0.13
7000	15.8	0.25
8000	15.2	0.79
12000	11.5	0.14
15000	11.1	0.20
20000	13.0	0.73
48000	12.6	0.84

<sup>a</sup> Promedios de cuatro experimentos.

\*Diferencias significativas de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls

F = 4.4, p = 0.05

TABLA VI DETERMINACION DE PROTEINAS ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) POR EL METODO DE BRADFORD EN LOS EXTRACTOS DE LAS RAICES DE *Vicia faba* TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AMETRINA.

	$\bar{X}^d$	$\pm$	E.E.
Testigo Negativo			
Extractos de raices de <i>Vicia faba</i> sin tratamiento	14.8		0.64
Extractos de raices de <i>Vicia faba</i> tratadas con Etanol 3600 mg/L	14.9		0.96
Extractos de raices de <i>Vicia faba</i> tratadas con Ametrina (mg/L)			
50	15.9		0.73
200	14.0		0.51
250	15.7		0.94
500	14.4		0.14
750	15.2		0.47
1000	15.3		1.16
2500	14.7		2.87
5000	14.7		0.35
6000	15.1		1.61
8000	14.4		0.76
30000	14.8		0.39
50000	15.1		0.66
190000	11.7		0.22

<sup>d</sup> Promedios de cuatro experimentos

No se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y las concentraciones al aplicar el analisis de varianza (ANOVA)  $F = 0.8198$   $p = 0.6445$



TABLA VII. INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR METRIBUZINA Y AMETRINA CON LA ACTIVACION METABÓLICA DE *Vicia faba* EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO<sup>a</sup>

	Experimento I			Experimento II		
	$\bar{x}^b$	=	E E	$\bar{x}^b$	=	E E
Testigo	5.6		0.32	5.8		0.30
Etarol 3600 mg/L	4.5		0.20	4.0		0.16
Testigo Negativo						
Cultivo de linfocitos + Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> sin tratamiento	6.8		0.24	6.9		0.30
Testigo Positivo						
Cultivo de linfocitos - Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con Etanol 3600 mg/L	9.0		0.23	9.2		0.23
Cultivo de linfocitos - Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con Metribuzina (mg/L)						
750	8.2		0.38	8.3		0.24
1000	9.6		0.21	9.7		0.22
2500	9.9		0.24	9.0		0.21
3000	8.8		0.21	9.0		0.17
6000	8.6		0.17	8.7		0.17
7000	8.8		0.21	8.8		0.17
7000	8.3		0.24	8.8		0.29
8000	8.7		0.29	8.6		0.32
12000	8.3		0.25	8.6		0.30
15000	8.0		0.27	8.2		0.25
20000	8.6		0.31	8.4		0.23
48000	8.8		0.21	9.1		0.21
Cultivo de linfocitos - Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con Ametrina mg/L						
750	8.0		0.3	8.2		0.31
2500	8.2		0.34	8.3		0.23
6000	8.3		0.26	8.7		0.16
8000	8.4		0.20	8.8		0.26
20000	9.1		0.39	8.6		0.30
50000	9.4		0.20	9.6		0.23
490000	8.1		0.23	8.5		0.30

<sup>a</sup> Corresponden a un experimento y sus réplicas, <sup>b</sup> 25 células

TABLE 1. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR METRIBUZINA Y AMETRINA CON LA ACTIVACION METABÓLICA DE *Vicia faba*. EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO <sup>a</sup>

	X <sup>b</sup>	EE
Testigo	5.7	0.22
Etanol 3600 mg/L	4.3	0.13
Testigo Negativo		
Cultivo de linfocitos - Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> sin tratamiento	6.8	0.18
Testigo Positivo		
Cultivo de linfocitos - Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con Etanol 3600 mg/L	9.1*	0.16
Cultivo de linfocitos - Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con Metrribuzina (mg/L)		
750	8.2*	0.22
1000	9.7*	0.15
2500	9.0*	0.15
3000	8.5*	0.17
5000	8.6*	0.12
6000	8.8*	0.13
7000	8.5*	0.19
8000	8.6*	0.21
12000	8.9*	0.20
15000	8.4*	0.18
20000	8.5*	0.19
480000	8.9*	0.15
Cultivo de linfocitos - Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con Ametrina mg/L		
750	8.1*	0.22
2500	8.3*	0.20
6000	8.5*	0.13
8000	8.6*	0.18
30000	8.8*	0.25
50000	9.5*	0.15
69000	8.3*	0.19

<sup>a</sup> Promedios de dos experimentos  $n = 50$  células.

<sup>b</sup> Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo experimental por análisis de varianza  $F_{V, 23, 110} = 60.056$   $F_{AMETRINA} = 69.886$ , el valor de  $p < 0.0001$  aplicando la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls,  $p < 0.001$ .

TABLA IX FRECUENCIAS DE CELULAS EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES  
 E INDICES DE REPLICACION (IR) Y MITOTICO (IM) DE LOS LINFOCITOS HUMANOS  
 EN CULTIVOS TRATADOS CON METRIBUZINA Y AMETRINA SIN LA ACTIVACION  
 METABOLICA DE *Vicia faba*<sup>d</sup>

	Tratamientos directos				
	M1	M2	M3	% IR <sup>b</sup>	% IM <sup>c</sup>
Testigo negativo	4 ± 0.7	41 ± 0.7	45 ± 4.2	23 ± 0.1	42 ± 0.4
Testigo positivo					
Etanol 3600 mg/L	9 ± 1.4	34 ± 3.0	57 ± 5.0	24 ± 0.2	32 ± 0.07
Metrubuzina (mg/L)					
0.3	6 ± 2.1	29 ± 0.0	65* ± 6.0	2.6 ± 0.1	64* ± 0.07
0.4	30* ± 5.0	15* ± 4.2	55 ± 4.0	2.2 ± 0.03	60* ± 0.1
0.5	12 ± 4.0	9* ± 1.4	79* ± 0.7	2.7 ± 0.01	60* ± 0.3
1.0	3* ± 1.4	48 ± 3.0	49 ± 1.4	2.5 ± 0.1	63* ± 0.2
1.5		No se observaron células estimuladas <sup>d</sup>			
2.5					
4.0					
5.0					
50.0 a 1000.0					
Testigo negativo	13 ± 0.0	39 ± 1.4	48 ± 3.0	23 ± 0.1	38 ± 0.5
Testigo positivo					
Etanol 3600 mg/L	13 ± 3.0	57* ± 1.4	30* ± 1.4	2.17 ± 0.05	3.4 ± 0.07
Ametrina (mg/L)					
1.5	3* ± 0.0	46 ± 0.7	51 ± 4.2	2.4 ± 0.1	66* ± 0.2
2.0	8 ± 1.4	29 ± 1.4	63* ± 7.0	2.5 ± 0.2	4.2 ± 0.07
2.5	2* ± 0.0	21* ± 2.1	77* ± 2.1	2.7 ± 0.1	2.1* ± 0.07
5.0	0* ± 0.0	37 ± 1.4	63* ± 1.4	2.6 ± 0.07	1.6* ± 0.4
6.5		No se observaron células estimuladas <sup>d</sup>			
12.5					
20.0					
30.0					
50.0 a 1000.0					

<sup>a</sup> Promedios de dos experimentos; <sup>b</sup> DS = Índice de Replicación = 1M1-2M2-3M3/100; <sup>c</sup> Índice Mitótico, n = 2000 células; <sup>d</sup> No se encontraron ningún tipo de célula mitótica.  
 \*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo experimental aplicando la prueba de X<sup>2</sup> en ambos casos p < 0.05

**TABLA X FRECUENCIAS DE CÉLULAS EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES  
 E INDICES DE REPLICACION (IR) Y MITOTICO (IM) DE LOS LINFOCITOS HUMANOS  
 EN CULTIVOS TRATADOS CON METRIBUZINA Y AMETRINA CON LA ACTIVACION  
 METABOLICA DE *Vicia faba*<sup>1</sup>**

	Tratamientos con el metabolismo <i>in vivo</i>				
	M1	M2	M3	% IR <sup>b</sup>	% IM <sup>c</sup>
Etanol 3600 mg/L	26 ± 4.9	37 ± 0.0	37 ± 5.4	21 ± 0.09	3.0 ± 0.2
Testigo positivo Etanol 3600 mg/L Mas la fraccion S10	18* ± 0.0	38 ± 7.7	44* ± 2.8	23 ± 0.1	4.3 ± 0.6
Testigo negativo Fraccion S10	31 ± 3.5	34 ± 3.5	35 ± 0.0	2.0 ± 0.03	4.9 ± 0.4
Testigo negativo	23 ± 0	36 ± 4.2	41 ± 4.2	2.1 ± 0.1	4.3 ± 0.4
Metrizuzina (mg/L)					
750	24 ± 2.8	35 ± 3.5	41 ± 0.7	2.1 ± 0.02	4.9 ± 0.3
1000	20* ± 1.4	32 ± 1.4	48* ± 2.8	2.2 ± 0.04	4.9 ± 0.5
2500	16* ± 0.0	33 ± 4.2	51* ± 3.5	2.3 ± 0.1	4.7 ± 0.2
5000	15* ± 4.2	24* ± 3.5	61* ± 0.7	2.4 ± 0.05	4.1 ± 0.1
6000	13* ± 2.1	24* ± 2.1	63* ± 0.0	2.5 ± 0.02	3.7 ± 0.3
7000	10* ± 2.8	36 ± 4.2	54* ± 7.0	2.4 ± 0.09	3.5 ± 0.3
8000	14* ± 4.2	20 ± 0.0	66* ± 6.3	2.5 ± 0.02	3.0* ± 0.3
15000	13* ± 3.5	25* ± 1.4	62* ± 5.0	2.5 ± 0.08	2.3* ± 0.4
20000	12* ± 3.5	21* ± 0.0	67* ± 0.0	2.7 ± 0.1	2.0* ± 0.07
480000	6* ± 2.1	20* ± 2.8	74* ± 5.0	2.6 ± 0.07	1.7* ± 0.6
Ametrina (mg/L)					
750	9* ± 1.4	33* ± 0.7	58* ± 2.1	2.5 ± 0.04	3.7 ± 0.6
2500	27 ± 0.7	19* ± 0.0*	44 ± 7.7	2.1 ± 0.07	3.9 ± 0.6
6000	25* ± 5.6	19* ± 0.0	56* ± 5.6	2.3 ± 0.11	3.7 ± 0.3
8000	20* ± 4.2	33 ± 2.1	47* ± 6.3	2.2 ± 0.1	3.0* ± 0.1
30000	12* ± 3.5	23* ± 0.0	65* ± 5.6	2.5 ± 0.02	3.1* ± 0.2
50000	17* ± 0.0	25* ± 1.4	58* ± 8.4	2.4 ± 0.2	3.1* ± 0.07
490000	19* ± 3.5	26* ± 7.7	55* ± 4.2	2.3 ± 0.007	2.4* ± 1.0

<sup>a</sup> Promedios de dos experimentos ± D.S. <sup>b</sup> Índice de Replicación =  $(M1 - 2M2 - M3) / 100$  <sup>c</sup> Índice Mitotico =  $2000 \text{ células}^{-1}$  \*Se observieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo experimental aplicando la prueba de  $\chi^2$  en ambos casos  $p < 0.05$

TABLA XI. INTERCAMBIO DE CRÓMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR METRIBUZINA Y AMETRINA EN *Vicia faba*.<sup>a</sup>

	Experimento I		Experimento II	
	$\bar{x}$ <sup>b</sup>	E.E.	$\bar{x}$ <sup>b</sup>	E.E.
Testigo negativo	28.6	0.47	31.6	0.58
Raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con				
Metríbuzina (mg/L)				
250	31.0	0.56	29.7	0.42
500	34.1	0.37	33.8	0.42
750	43.9	0.64	44.9	0.75
1000	51.6	0.68	50.6	0.66
3000	55.0	0.59	52.9	0.48
480000	57.0	0.47	56.0	0.56
Testigo negativo	32.2	0.66	28.3	0.41
Raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con				
Ametrina (mg/L)				
250	30.6	0.57	29.2	0.62
500	33.3	0.34	33.2	0.49
750	42.6	0.68	41.4	0.27
1000	44.7	0.60	46.5	0.39
3000	48.1	0.54	47.7	0.34
490000	52.7	0.44	52.5	0.67

<sup>a</sup>Corresponden a un experimento y su réplica <sup>b</sup>n= 25 células

ESTADO DE CONSERVACION DE LOS DOCUMENTOS DE LA INSTITUCION

TABLA XII. INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR METRIBUZINA Y AMETRINA EN *Vicia faba*<sup>a</sup>

	$\bar{X}^b$	E. E.
Testigo negativo	30.1	0.43
Raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con		
Metríbuzina (mg/L)		
250	30.3	0.36
500	33.9*	0.28
750	44.4*	0.49
1000	51.1*	0.47
3000	54.0*	0.41
480000	56.4*	0.37
Testigo negativo	30.2	0.47
Raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con		
Ametrina (mg/L)		
250	30.0	0.43
500	33.3*	0.30
750	42.0*	0.37
1000	45.6*	0.37
3000	47.9*	0.32
490000	52.6*	0.40

<sup>a</sup> Promedios de dos experimentos, <sup>b</sup> n= 50 células

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo experimental por análisis de varianza  $F_{METRIBUZINA}=769.09$ ,  $F_{AMETRINA}=556.11$ , el valor de  $p < 0.0001$ , aplicando la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls  $p < 0.001$

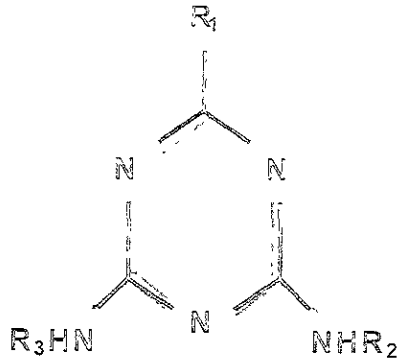


Fig. 1. Estructura química de los herbicidas S-triazina (Bayer 1994)

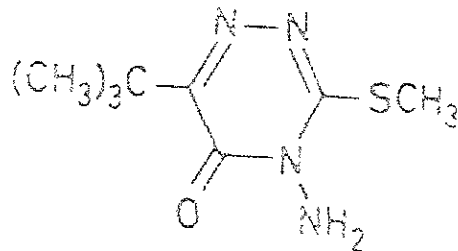


Fig. 2. Estructura química de metribuzina (sencor) (CIBA-GEIGY MEXICANA 1996)

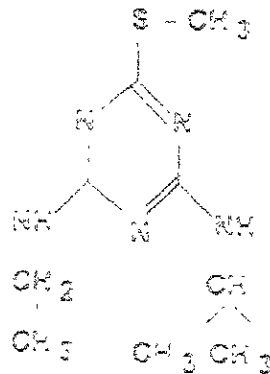


Fig.3 Estructura química de ametrina (gesapax) (CIBA-GEIGY MEXICANA 1996)

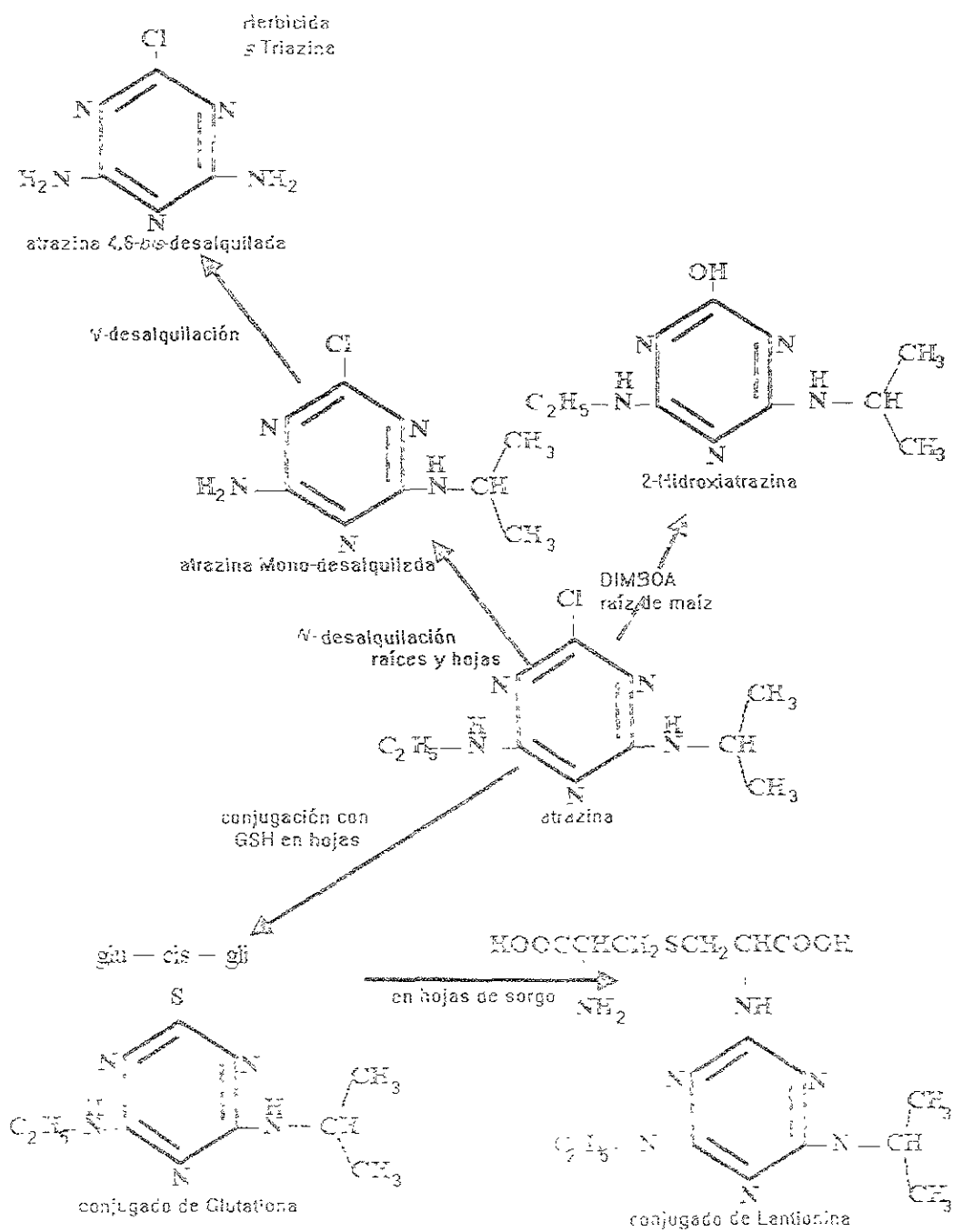


Fig 4. Vías metabólicas propuestas para la degradación de atrazina en plantas superiores (Hatzios y Penner 1982)



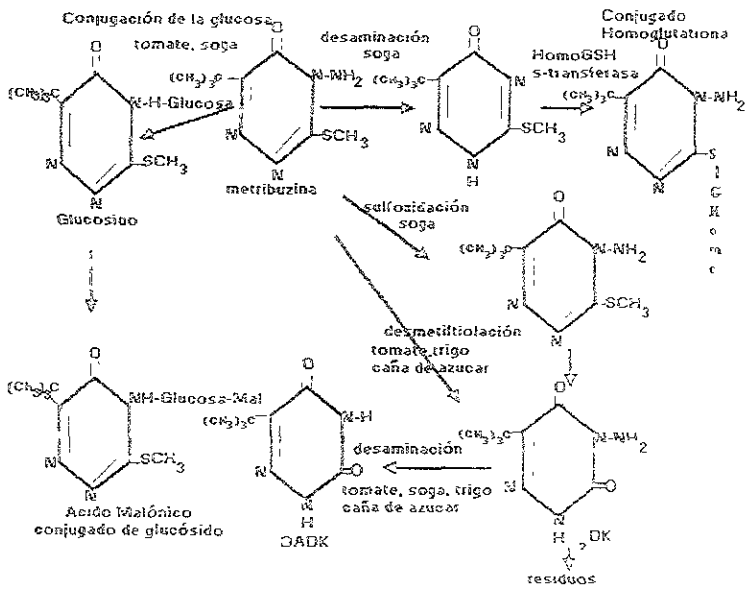


Fig. 5. Vía metabólica de sencor (metribuzina) en plantas superiores (Freat *et al* 1983, 1985, Fedtke 1983)

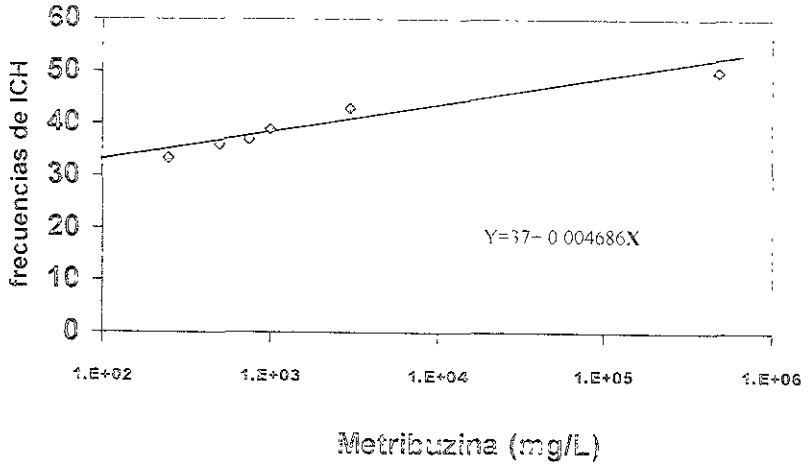


Fig. 6. Prueba de regresión lineal para las frecuencias de ICH inducidas por metribuzina en raíces de *Vicia faba* ( $r = 0.7951$ ,  $p < 0.005$ )

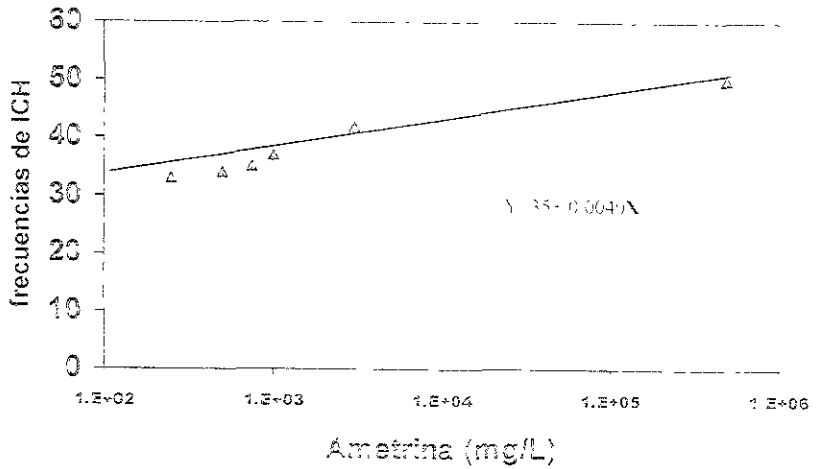


Fig. 7. Prueba de regresión lineal para las frecuencias de ICH inducidas por ametrina en raíces de *Vicia faba* ( $r = 0.8754$ ,  $p < 0.005$ )

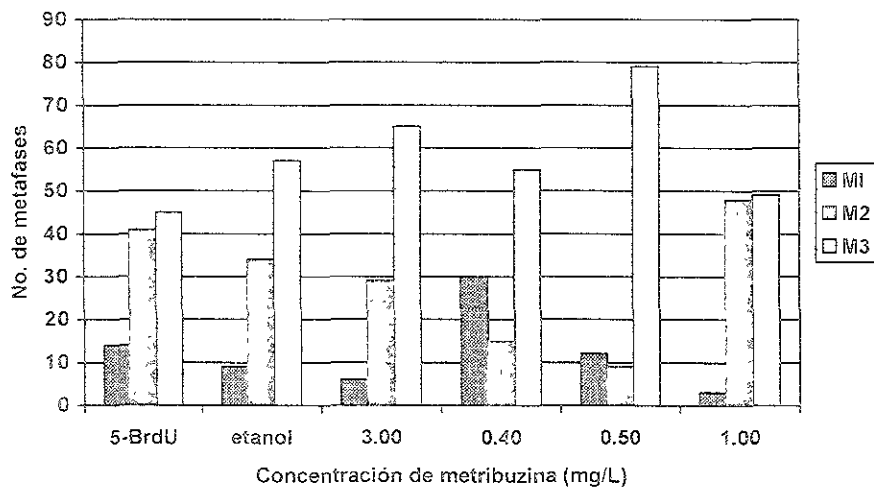


Fig. 8. Cinética de proliferación de linfocitos humanos expuestos a concentraciones directas de metribuzina

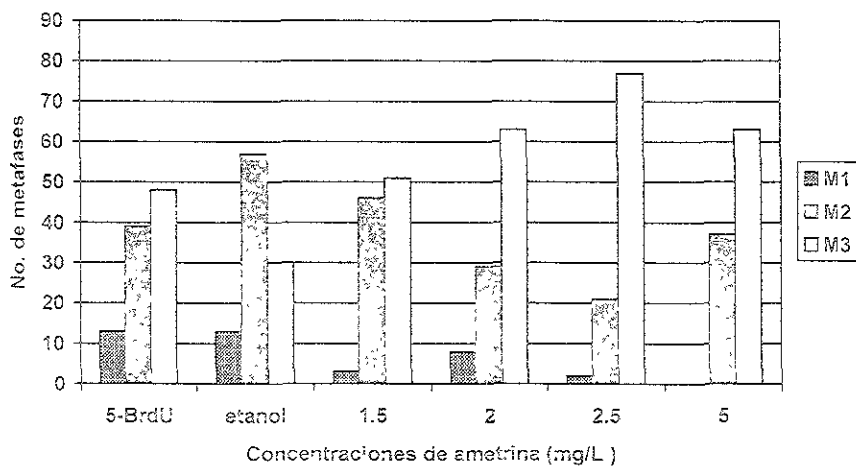


Fig. 9. Cinética de proliferación de linfocitos humanos expuestos a concentraciones directas de ametrina

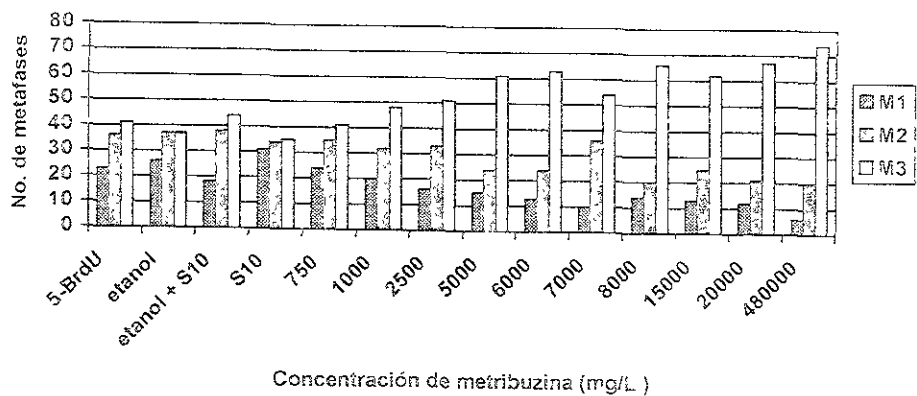


Fig. 10. Cinética de proliferación de linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de metribuzina con activación metabólica de *Vicia faba* (*in vivo*)

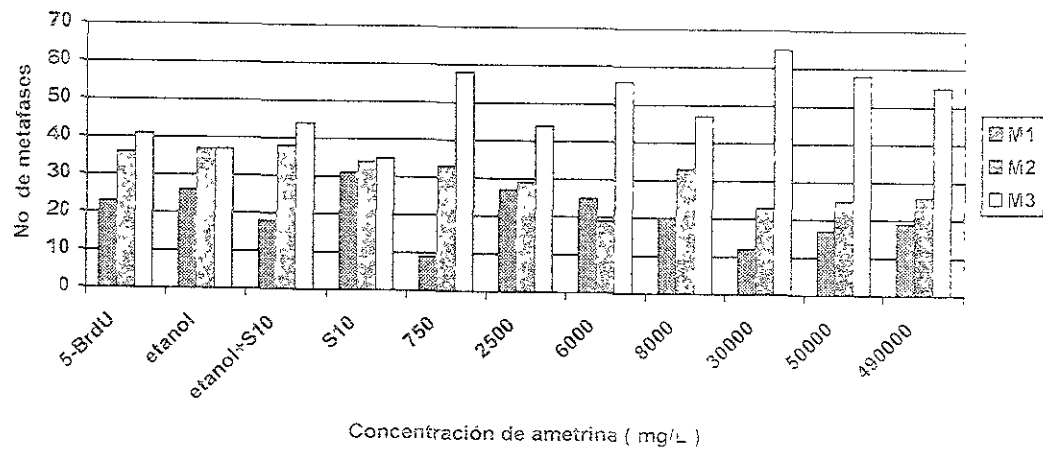


Fig. 11. Cinética de proliferación de linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de ametrina con activación metabólica de *Vicia faba* (*in vivo*)