

8

294303



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DEL INSECTICIDA ORGANOFOSFORADO METIL AZINFOS (GUSACIÓN) EN CULTIVO DE LINFOCITOS A TRAVÉS DEL METABOLISMO DE *Vicia faba*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
B I O L O G A
P R E S E N T A :
L I Z S E L E N E A N D R A D E M O R A L E S



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA IN
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Evaluación del efecto genotóxico del insecticida organofosforado metil azinfos (gusatión) en cultivo de linfocitos a través del metabolismo de Vicia faba."

realizado por Liz Selene Andrade Morales

con número de cuenta 9354892-6 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Propietario

Propietario Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Propietario Dra. María Elena Calderón Segura

Suplente M. en C. Josefina Cortés Eslava

Suplente Q.I. Omar Amador Muñoz

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A Dios, por todo lo que significa en mi vida y ser parte de mí.

A mi madre, por haberme dado la vida, por todo su apoyo y amor.

A mis hermanos, Alejandro y Rogelio "Jr." por darme ánimos y fuerzas para seguir adelante.

A mi abue "Toñita", porque siempre ha velado por nosotros.

A la memoria de mi Padre.

A Toño por todo su apoyo y amor.

A Lulú por ser mi "Angel".

A la Universidad por todo lo que me ha brindado.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo por su aceptación, dirección e invaluable ayuda para la realización de este trabajo, por su paciencia, apoyo y cariño brindado.

Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini por sus atinadas sugerencias en la revisión de este trabajo y por ser un ejemplo a seguir.

A la Dra. Ma. Elena Calderón Segura por haberme enseñado la parte técnica de los ensayos y por la revisión de este trabajo.

Al Q. I. Omar Amador Muñoz, por su asesoría técnica, por las observaciones acertadas en la revisión del trabajo, por todo su apoyo y amistad, y por haberme brindado su tiempo siempre que lo requerí.

A la M. en C. Josefina Cortés Eslava, por su asesoría técnica, y por sus sugerencias en la revisión del trabajo escrito.

A la Fundación UNAM, por el otorgamiento de la beca.

A la M. en C. Ana Rosa Flores, por su amistad.

Al M. en C. Fernando Angeles por su amistad y colaboración en el presente trabajo.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio, especialmente a Lety por su invaluable ayuda y amistad; a la Sra. Emma, a Luz María.

A mis maestros y amigos.

A todos ustedes ; ; G R A C I A S ! !

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN.....	2
1.0 INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Insecticidas organofosforados.....	6
1.2 Metil Azinfos.....	7
1.3 Activación metabólica en plantas.....	8
1.4 Metabolismo de insecticidas organofosforados.....	9
1.5 Activación de plaguicidas por plantas.....	17
1.6 Reacciones de oxidación o de fase I.....	18
1.7 Reacciones de conjugación o de fase II.....	20
1.8 Reacciones terciarias o de fase III.....	20
1.9 Sistema de prueba.....	21
1.10 Intercambio de cromátidas hermanas.....	22
1.11 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	24
1.12 HIPÓTESIS.....	25
2.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.1 Cultivo de linfocitos humanos.....	27
2.2 Activación metabólica <i>in vivo</i>	27
2.3 Activación metabólica <i>in vitro</i>	29
2.4 Tinción diferencial de las cromátidas hermanas.....	30
2.5 Cinética de proliferación celular e índice mitótico.....	31
2.6 Análisis estadístico.....	32
3.0 RESULTADOS.....	32
4.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	34
5.0 REFERENCIAS.....	37
5.1 Tablas y Figuras.....	48

RESUMEN

El uso de diversos agentes químicos afectan seriamente al ambiente, ya que son dispersados por vía aérea o acuática y se depositan en agua, suelo o aire. Entre ellos se encuentran los plaguicidas cuyo empleo es relevante para la agricultura.

Los insecticidas organofosforados forman un grupo importante dentro de estos, ya que se han difundido de manera sustancial para el control de plagas en el ámbito doméstico, agrícola y veterinario.

Se ha descrito la existencia de dos tipos de agentes mutagénicos, aquellos que inciden directamente sobre el ADN llamados de acción directa y los que requieren ser transformados a través del metabolismo y cuyo productos son los que ejercen su efecto en el ADN y se le denomina de acción indirecta o promutágenos.

En este trabajo se evaluó el papel del metabolismo de *Vicia faba* para biotransformar al insecticida organofosforado metil azinfos a través del análisis de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), utilizando como sistema de activación *in vivo* a las raíces del haba, que se expusieron al insecticida y el extracto fue aplicado a cultivos de linfocitos humanos. El sistema de activación *in vitro* consistió en la mezcla enzimática S10 de las raíces más las diferentes concentraciones del insecticida para determinar su efecto mediante la misma prueba citogenética.

Al comparar ambos sistemas de activación vegetal, la frecuencia de ICH fue asintótica tanto *in vivo* como *in vitro*. Lo que demuestra que el insecticida requiere ser metabolizado para producir daño en el ADN y que el sistema enzimático de la raíz de *Vicia faba* puede biotransformar al insecticida a productos metabólicamente activos.

Al agregar el insecticida organofosforado metil azinfos directamente al cultivo de linfocitos no indujo intercambio de cromátidas hermanas, mientras que en *Vicia faba* si lo provocó.

Además se evaluó la cinética de proliferación celular a través del índice de replicación (IR) y el mitótico (IM) para determinar el efecto citotóxico de dicho insecticida.

Al aplicar diferentes concentraciones del metil azinfos *in vivo* se observó que a partir de 20 ppm ($\mu\text{g/mL}$) se incrementó la frecuencia de ICH presentando un comportamiento asintótico.

En el caso de la cinética de proliferación celular se notó aumento en las células M1 y disminución de las M3 y en 30 y 40 ppm se presentó disminución de la mitosis, mientras que en el IM y el IR las diferencias no fueron significativas.

Cuando se hicieron los estudios *in vitro* las diferencias aparecieron con 8 ppm, notándose inhibición de la mitosis en 40 ppm. En 20 ppm, las células M1 y M3 presentan diferencias significativas con respecto a los testigos.

En 30 ppm no se completaron las metafases para obtener el índice mitótico e índice de replicación; encontrándose inhibición de la mitosis en 40 ppm.

En los experimentos *in vivo* e *in vitro* los valores de los testigos tanto positivos como negativos estuvieron en los niveles esperados.

1.0 INTRODUCCIÓN

En México, la agricultura es como para todos los países crucial para la alimentación y el desarrollo socioeconómico. Actualmente su función está siendo replanteada no sólo por su importancia económica, sino también por que es necesario proteger los ecosistemas y así garantizar el consumo de alimentos para las generaciones futuras (SEMARNAP 1997).

El deterioro ecológico-ambiental en el sector agropecuario en los últimos años, que se manifiesta esencialmente en la deforestación y la degradación del suelo, obedece a diversos factores. Entre ellos el cambio de uso de suelo para fines agropecuarios representa la pérdida mayor de la cubierta vegetal natural, el aprovechamiento intenso de la leña como combustible, la nula o escasa fertilización orgánica, el sobre-pastoreo, la reducción del tiempo de descanso de la tierra, las prácticas de cultivos forzosos en suelos frágiles y el intenso crecimiento demográfico son las causas de mayor daño a los ecosistemas del país.

En el caso de la degradación del suelo (erosión hídrica y eólica, salinización y degradación biológica, química y física) las estrategias de sustentabilidad y protección ambiental en el campo mexicano tienen que asumir con mayor determinación la minimización del uso de plaguicidas y fertilizantes y optar por alternativas sustentables como la labranza orgánica (SEMARNAP 1997).

La industria agroquímica genera dos tipos de productos: plaguicidas y fertilizantes, estos últimos son productos químicos que contienen nutrimentos esenciales para el crecimiento y/o desarrollo de las plantas, como nitrógeno, fósforo y potasio, mientras que los plaguicidas cuyos ingredientes son de diversa composición, se destinan a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten enfermedades humanas y de animales; son empleados en el campo para proteger los cultivos y el ganado y en las zonas urbanas en actividades de servicios como en jardines y hogares.

Del grupo de los cereales destacan el maíz, frijol y arroz; de los cultivos frutícolas: el aguacate, limón, mango, naranja y plátano, del grupo de las oleaginosas el ajonjolí, algodón y el cártamo (SEMARNAP 1997).

Datos de la Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes, señalan que en 1995 el volumen de plaguicidas utilizados ascendió a 54 678.96 toneladas, de las cuales una parte sustancial corresponde a insecticidas y herbicidas (47 y 29% del

total) (SEMARNAP 1997). Los cultivos respectivamente que utilizaron los mayores volúmenes de estos productos fueron maíz, hortalizas, algodón y frijol.

De acuerdo con la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST 1991) el registro de plaguicidas incluye 1,169 productos los cuales se distribuyen en plaguicidas de uso agrícola, pecuario, urbano, jardinería, domésticos e industriales, que son utilizados como insecticidas, herbicidas, fungicidas, fumigantes, rodenticidas, coadyuvantes, molusquicidas, nematocidas y mezclas.

Además de los beneficios que han aportado los plaguicidas a la sociedad, también se ha descubierto que pueden producir riesgos para la salud humana, los ecosistemas y los bienes, lo cual es motivo de preocupación debido a que altera las condiciones óptimas para tener una buena calidad de vida.

Entre los efectos potencialmente peligrosos que pueden provocar está el cáncer. Por tal motivo la acción mutagénica y genotóxica de numerosos plaguicidas han sido objeto de amplia investigación (Klopman *et al.* 1985); debido al valor predictivo que tienen en su potencia para causar cáncer (Ames *et al.* 1975).

Varios estudios epidemiológicos en agricultores expuestos a diversos plaguicidas indican un alto riesgo de desarrollo de cáncer en células sanguíneas y en el sistema inmune (Brown *et al.* 1990, Blair y Zahm 1995).

La acumulación de plaguicidas puede llevarse a cabo en diferentes tejidos de plantas, animales e incluso del hombre, produciendo alteraciones en el funcionamiento de diversos sistemas como el cardiovascular, el reproductor o inducir la formación precoz de tumores, cáncer y daño al material genético e incluso la muerte por intoxicación (Cooper 1991, Julli y Krasso 1995).

Debido a lo anterior es de suma importancia realizar estudios que evalúen el daño que provocan dichas sustancias para tener un mejor control en su uso (Ashby *et al.* 1993).

1.1 Insecticidas organofosforados

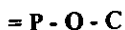
Los insecticidas organofosforados comienzan a producirse en Alemania en 1945, fueron sintetizados por Gerhard Schröder (Schröder 1963), la mayor parte son ésteres del ácido fosfórico y debido a su polaridad son muy solubles en disolventes orgánicos, actúan contra los insectos y los ácaros por contacto e ingestión; la mayoría de ellos son tóxicos a los peces, abejas y a la vida silvestre en general (CICOPLAFEST 1991).

Comparados con otras clases de pesticidas (Sultatos 1994) son muy peligrosos e incluso son considerados cuatro veces más tóxicos que los organoclorados, aunque menos persistentes (National Academy of Sciences USA 1980).

En los vertebrados, interrumpen el impulso en los sistemas nervioso central y periférico ocasionando alteraciones en el tracto respiratorio y en los músculos al inhibir a la acetilcolinesterasa, enzima que modula la cantidad de acetilcolina neurotransmisora (O'Brien 1967, Aldrige y Wright 1971, Sultatos 1994).

La acetilcolina actúa como neurotransmisor tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. En condiciones fisiológicas normales, la molécula de acetilcolina liberada en la terminal sináptica o en la placa neuromuscular se une a una molécula de acetilcolinesterasa formando un complejo colina-enzima acetilada, que después de sufrir hidrólisis libera la enzima regenerada más ácido acético. Si a la acetilcolinesterasa se le agrega un inhibidor, como el caso un organofosforado, se forma un complejo inactivo, quedando anulada la actividad enzimática y produciendo la acumulación de acetilcolina en los sitios de liberación, con la consiguiente expresión clínica. La actividad de la acetilcolinesterasa se recupera al originarse nuevas enzimas o al administrar regeneradores enzimáticos. El mecanismo de este bloqueo consiste en la fosforilación del grupo hidroxilo serina en el sitio activo de la enzima (Fest y Schmidt 1973).

La estructura básica de los insecticidas organofosforados es:



La presencia del fósforo y del carbono como sitios electrófilos proporciona la clave para entender las reacciones con los nucleófilos, los cuales pueden actuar preferentemente sobre el átomo de fósforo con la subsiguiente ruptura del enlace P-O y fosforilarse o atacar al átomo de carbono con la posterior ruptura del enlace C-O y su consecuente alquilación

(metilación o etilación). El ADN de una célula viva contiene muchos y muy diferentes sitios nucleofílicos susceptibles de experimentar ese tipo de ataque (Wild 1975).

La hidrólisis de dichos compuestos conduce a la formación de diésteres del ácido fosfórico, alcoholes, tioles y fenoles. Los diésteres pueden ser hidrolizados a monoésteres y eventualmente a fósforo inorgánico (Wild 1975).

La propiedad alquilante de este tipo de compuestos es importante (Preussman *et al.* 1969, Bedford y Robinson 1972, Wooder y Wright 1981) y consiste en el ataque de un grupo alquilo como CH_3 ó C_2H_5 , a un átomo de N en una de las bases nitrogenadas del ADN, este es uno de los mecanismos más comunes que conlleva a la mutación. También puede ocurrir O-alquilación debido al ataque de un metilo u otro grupo alquilo al átomo de oxígeno de la guanina (Wild 1975).

Las principales rutas primarias del metabolismo de los organofosforados son la oxidación y la hidrólisis (Fest y Schmidt 1973). Las reacciones de oxidación son activadas por desulfuración, sulfuro oxidación, N-desalquilación e inactivadas por O-desalquilación e hidrólisis de la unión ácido anhídrido (Shimabukuro *et al.* 1982).

La oxidación de insecticidas organofosforados a sus sulfóxidos y sulfonas es requerida para la actividad insecticida (O'Brien 1967, Bull *et al.* 1976). En las plantas los insecticidas organofosforados son transformados a metabolitos solubles en agua mediante hidrólisis y conjugación catalizados por oxidasas de función mixta (ofm) (McBain *et al.* 1970, Bull 1972, Narayan y Lichtenstein 1973, Bull *et al.* 1976).

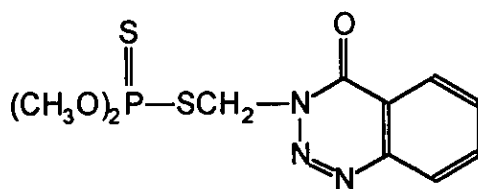
1.2 Metil azinfos

El metil azinfos fue sintetizado por Bayer en 1953, es un insecticida de gran toxicidad para mamíferos, tanto al contacto como por ingestión y con mayor actividad residual que la mayoría de los insecticidas organofosforados (Finlayson y MacCarthy 1973). Posee cerca de 35 sinónimos; entre los cuales están: carfeno, metil cotnión, cristión 2L, DBD, gotnión, gutián, metil gutián, metiltriazotián, entre otros (EPA 1998).

El gusatión es uno de los insecticidas organofosforados más tóxicos, obtenido de la N-clorometilbenzasimida por condensación del álcali o la sal de amonio ácido *o,o*-dimetil

fosforoditiico con un compuesto heterociclico clorometilo. Es de uso agrícola, doméstico e industrial (Cremlyn 1978).

Fórmula estructural:



Metil azinfos

1.3 Activación metabólica en plantas

Se ha demostrado que las plantas tienen la capacidad de transformar sustancias inocuas en mutágenos (Plewa y Gentile 1976).

En estudios que utilizan callos vegetales en condiciones estériles o cultivos celulares en suspensión se ha establecido la capacidad metabólica de las plantas (Sandermann 1982).

Las investigaciones sobre activación vegetal pueden realizarse *in vivo* o *in vitro*. En el primer caso, el agente que se estudia se aplica a una planta intacta, mientras que en el segundo, es agregado a un homogeneizado vegetal estéril o cocultivado con células indicadoras. En ambos métodos el extracto vegetal se prueba subsecuentemente junto con un microorganismo indicador o en cultivos celulares de mamíferos que muestran el efecto genotóxico (Plewa y Gentile 1982).

En la activación vegetal *in vitro* se exponen cultivos de células vegetales u homogeneizados celulares al agente químico y se evalúa la mutagenicidad en

microorganismos indicadores, en cultivos celulares o en tejidos de mamíferos (Plewa y Gentile 1982).

El hecho de que las plantas realicen la transformación metabólica de agentes xenobióticos, hace necesario profundizar los estudios a este respecto, ya que los plaguicidas son tomados por el hombre no solo directamente al ser aplicados sobre vegetales sino también a través de sus metabolitos, que tal vez puedan resultar más peligrosos. De modo que es necesario investigar más ampliamente el metabolismo y el destino de tales plaguicidas para saber la naturaleza y la cantidad de metabolitos que están presentes en la porción comestible de las cosechas, con la finalidad de aumentar la seguridad en el uso de los compuestos comerciales (Cortés-Eslava 1993).

Las vías metabólicas de vegetales y animales son muy diferentes y los productos del metabolismo también pueden cambiar (Sandermann 1988).

Para evaluar la genotoxicidad de los plaguicidas se deben tomar en cuenta los siguientes aspectos: acumulación o degradación química o biológica en el ambiente, metabolismo en los seres humanos, reactividad genética con macromoléculas celulares como el ADN causando mutaciones puntuales y/o aberraciones cromosómicas, además de otros factores que modifican las capacidades tóxicas de las sustancias (Shirasu *et al.* 1976).

1.4 Metabolismo de insecticidas organofosforados

Varios insecticidas organofosforados como el metil azinfos, producen síntomas neurotóxicos. El mecanismo de la acción neurotóxica de estos compuestos ha sido propuesta como una fosforilación inicial de una esterasa neurotóxica o neuropatía esterasa (NTE), por ejemplo desalquilación del NTE fosforilado (Johnson 1982).

Muchos de los insecticidas organofosforados contienen la unión P=S (llamada "tion") la cual es convertida a P=O (llamada "oxon") por un sistema de enzimas oxidantes (llamadas oxidasas de función mixta ó ofm) en la cual el citocromo p-450 juega un papel importante (Perry *et al.* 1998). En la mayoría de los casos la P=O derivada es mucho más inhibidora para la acetilcolinesterasa (AChE) que el compuesto P=S. Por ejemplo: el paraoxón y el malaoxón son más potentes que el paratión y el malatión, respectivamente de

manera que puede ocurrir una activación del compuesto, por la transformación del grupo, o una desintoxicación.

Los derivados "oxon" son más fáciles de romperse bajo las reacciones hidrolíticas para producir metabolitos menos tóxicos o no tóxicos los cuales son eliminados del cuerpo.

Otras enzimas como la glutatión transferasa, carboxiesterasas, carboxiamidasas, etc. también están involucradas en el metabolismo de los compuestos organofosforados (Perry *et al.* 1998).

Debido a que dichos agentes son muy reactivos, se encuentra una cantidad muy pequeña del compuesto sin reacción, lo cual explica que sea difícil de detectar residuos en alimentos, tejidos humanos y en orina de personas expuestas, excepto en casos de asesinato o suicidio por ingestión.

La velocidad metabólica es un importante factor que afecta la toxicidad en mamíferos, la eficacia del insecticida, la persistencia, la toxicidad selectiva y la resistencia (Perry *et al.* 1998).

1. Conversión de "tion" a "oxon". Las oxidasas de función mixta (ofm) catalizan la reacción, pero no sólo inducen al oxon (II), sino también a otros productos; por el intermediario oxitionato fosforado inestable (I).

El intermediario (I) es convertido a oxon (II) por liberación del radical sulfuro el cual se une a macromoléculas *in vitro* y es eventualmente excretado como ion sulfato *in vivo*.

Al mismo tiempo es hidrolizado para obtener un dialquil fosfato ácido (III) y el ácido tiofosfórico (IV), junto con el grupo saliente (V). El intermediario (I) también se rearregla a (VI), el cual además es producido por la combinación de (IV) y (V) (Nakatsugama y Dahm 1967, Mc Bain *et al.* 1971, Miyamoto y Yamamoto 1977).

2. Activación de fosforotiolatos. En general los fosforotiolatos de tipo $(RO)_2P(O)SZ$ (I) inhiben a la acetilcolinesterasa. Sin embargo, ciertos tiolatos como metamidofos, profenofos y protiofos oxon son débiles inhibidores de la AchE, pero fuertes insecticidas. Los omf los convierte a sulfóxidos, los cuales pueden inhibir la AchE o descomponerla dependiendo si su reacción es sobre el grupo alquil, o sobre el átomo de azufre (Eto *et al.* 1977, Wing *et al.* 1982, Kimura *et al.* 1984).

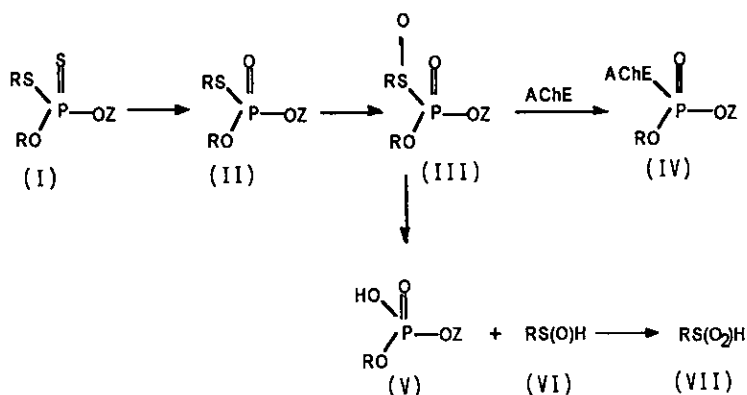


Figura 1.2. Activación de S-alkil fosforotiolatos.

3. Desalquilación de grupos O-alkilo y N-alkilo por oxidasas de función mixta.

El grupo O-alkilo (excepto metilo) es hidroxilado por ofm a alquilol (I), entonces son desalquilados.

De manera semejante que el grupo N-alkilo es hidroxilado por ofm a alquilol (II), probablemente vía N-óxido (III), entonces son desalquilados como se muestra en la figura 1.3.

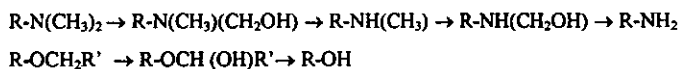
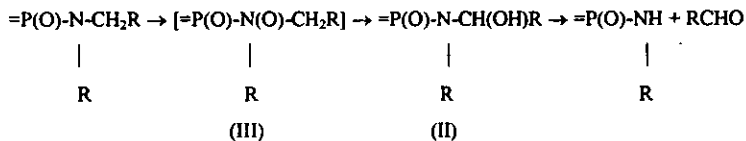
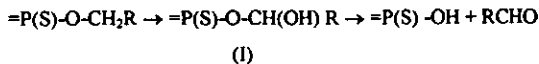
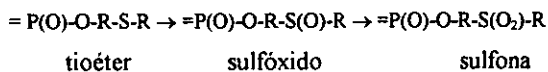


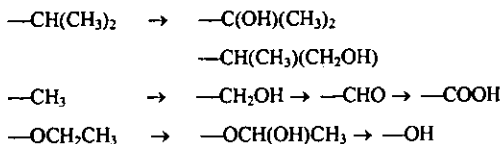
Figura 1.3. Desalquilación de compuestos O-alquilo y N-alquilo. 1. Grupo O-alquilo (excepto metilo) son hidroxilados por ofm a alquilol (I), 2. Grupo N-alquilo es hidroxilado por ofm a alquilol (II), 3. N-óxido (III).

4. Oxidación de tioéteres a sulfóxidos y sulfonas por ofm.



Estos productos son frecuentemente fuertes inhibidores de la AchE.

5. Hidroxilación de grupos laterales por ofm.



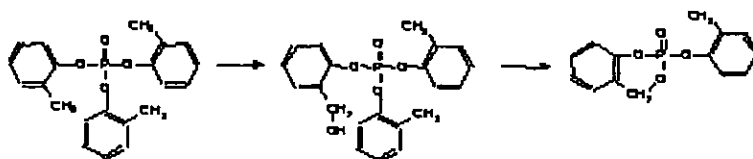
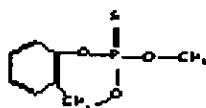


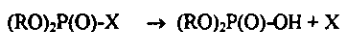
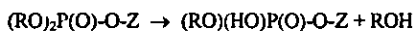
Figura 1.4. Conversión de trio-o-cresilfosfato a fosfato cíclico.

Esta reacción metabólica conduce a un metabolito fosfatado cíclico de mucha actividad anticolinesterasa, la cual retrasa la neurotoxicidad, pero no la función insecticida. La modificación del éster arilo a éster metilo resulta en la formación del insecticida salitió que es neurotóxico (Eto *et al.* 1962, 1963).



Salitió

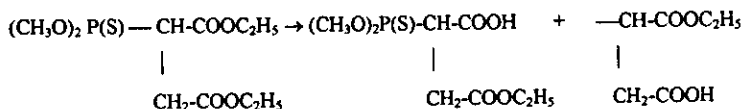
6. Hidrólisis de fosfatos y éster ácido fosforohalídico por esterases. Son comparados con fosforotioatos, estos últimos tienen preferencia por los fosfatos.



Donde: Z denota el grupo saliente y X un halógeno.

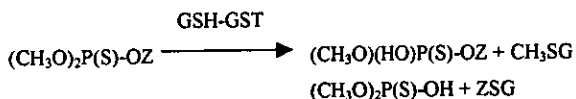
7. Hidrólisis de grupos éster en los residuales.

Un típico ejemplo es la hidrólisis del éster presente en el malatión por carboxiesterasas.



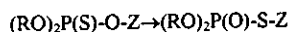
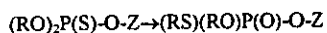
8. Degradación por Glutación-S-Transferasa.

El grupo metoxilo sobre el átomo de fósforo es desmetilado por el sistema glutatión-glutatión S-transferasa (GSH-GST), mientras los grupos alcoxilo más grandes son desalquilados por oxidación. También, los grupos salientes (Z) pueden ser conjugados con GSH.



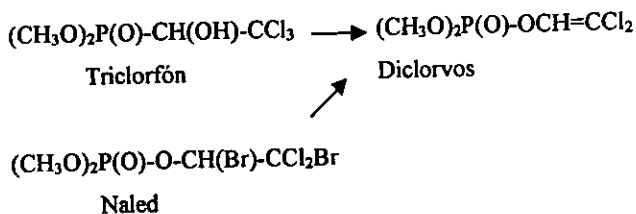
9. Isomerización de fosforotionatos a tiolatos.

Se lleva a cabo por luz, calor y metabolismo. Lo que conduce frecuentemente a productos muy tóxicos.



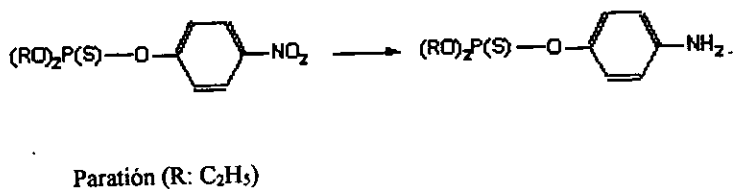
10. Varios

a) Conversión de triclorfón y naled a diclorvos:



Estos insecticidas tienen diferentes propiedades físicas: triclorfón muy soluble en agua, diclorvos muy volátil y naled no volátil.

b) Reducción del grupo nitro por nitrorreductasa:



La reducción *in vivo* del paratión, paraoxón, EPN y fenotrotión de los amino derivados es un paso importante en la desintoxicación en rumiantes, pero no en otros animales (Perry *et al.* 1998).

1.5 Activación de plaguicidas por plantas

Los plaguicidas entran a las plantas por diferentes vías metabólicas, de las que se pueden originar metabolitos primarios, secundarios y terciarios que posiblemente llegan a la cadena alimenticia de los animales incluyendo al hombre y que pueden inducir efectos citotóxicos, fisiológicos, mutagénicos y/o carcinogénicos (Calderón-Segura y Espinosa-Ramírez 1998).

En México, el 75% de los plaguicidas son de aplicación agrícola y el hecho de que las plantas los activen y ejerzan acción sobre el ciclo celular o sobre la respuesta inmunológica, se debe investigar ya que el mismo plaguicida, sus residuos y/o sus metabolitos almacenados, pueden presentar un riesgo para la salud humana y animal (Calderón-Segura y Espinosa-Ramírez 1998).

En un estudio realizado por Plewa y Gentile (1976) se comprobó que la actividad mutagénica en microorganismos por la atrazina se debía a la activación metabólica por las plantas. Otros herbicidas también transformados por los vegetales son la cianazina, la zimazina, la prociazina (Plewa *et al.* 1984), el alaclor, propaclor (Gentil *et al.* 1982), la metribuzina y ametrina (Flores-Maya 2000).

Los extractos principalmente utilizados para investigar la activación metabólica en plantas han sido los de trigo (Rasquinha *et al.* 1988), maíz (Plewa 1978, Plewa *et al.* 1983), *Tradescantia* (Scott *et al.* 1978), tubérculos de papa, tabaco (Gentile *et al.* 1982, 1985) y haba (Takehisa *et al.* 1982, 1988, Gómez-Arroyo *et al.* 1995). Esta última es sumamente sensible al efecto de plaguicidas (Gómez-Arroyo *et al.* 1988, 1992, Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1995) además de ser metabólicamente activa, ya que posee la fracción enzimática S10 (Takehisa *et al.* 1982, 1988, Takehisa y Kanaya 1983, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999).

Takehisa *et al.* (1988) demuestran que la activación *in vivo* e *in vitro* por *Vicia faba* incrementa la frecuencia de ICH en los tratamientos con ciclofosfamida (CP), anilina y alcohol etílico.

Gómez-Arroyo *et al.* (1995) observan una activación del insecticida propoxur *in vivo* por *Vicia faba* y sugieren la posibilidad de que los metabolitos obtenidos con tratamientos *in vivo* con la misma planta son capaces de inducir ICH en cultivo de

linfocitos humanos y Calderón-Segura *et al.* (1999) encontraron que los herbicidas tiocarbámicos butilate y molinate necesitan ser biotransformados para ejercer efecto en el ADN de los linfocitos humanos en cultivo por el mismo sistema metabolizador.

Por otra parte, los sitios de mayor absorción en plantas para los plaguicidas son las puntas de las raíces y las superficies de las hojas. La translocación y distribución de los plaguicidas se lleva a cabo en dos distintos sistemas vasculares (xilema y floema) (Crafts y Crisp 1971), por consiguiente la distribución puede no ser uniforme y variar de acuerdo al plaguicida y al sitio de penetración en la planta.

Los plaguicidas y otros xenobióticos parecen ser metabolizados en dos fases en los animales (Williams 1959). El metabolismo de fase I involucra reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y en el metabolismo de fase II, los productos de fase I son conjugados antes de la excreción.

En las plantas se incluye al metabolismo de los plaguicidas en las reacciones terciarias ó de fase III, exclusivo de los vegetales superiores (Shimabukuro *et al.* 1982).

1.6 Reacciones de oxidación o de fase I:

Las reacciones oxidantes de plaguicidas en plantas son frecuentemente primarias que resultan en desintoxicación o activación del compuesto original.

Estas reacciones dependen del sistema enzimático citocromo p-450 como oxidasas de función mixta (ofm) las cuales incluyen N-desalquilación, O-desalquilación, hidroxilación aromática, epoxidación, desulfuración, sulfuro oxidación, éster hidrólisis y oxidación de nitrógeno (Lamoureux y Frear 1979).

Estas enzimas intervienen en la desintoxicación de los xenobióticos que son localizadas principalmente en el reticulo endoplásmico y en la pared celular, requieren del oxígeno molecular y como sustratos secundarios o cofactores a la nicotinamina adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) ó nicotinamina adenina dinucleótido reducido (NADH), que son muy específicas e inducibles por sus sustratos (Higashi *et al.* 1981, Higashi 1988).

La activación en células de mamífero procede por oxidaciones de 1-2 electrones, por ejemplo mediante el sistema citocromo p-450 ó por prostanglandina H sintetasa. Los

intermedios reaccionantes son electrófilos, radicales o especies activas de oxígeno (Miller y Miller 1971, O'Brien 1985).

Mientras que los sistemas citocromo p-450 son de importancia central en el metabolismo y en la activación mutagénica de xenobióticos en los animales, las especies de citocromo p-450 en plantas parece que actúan solo en casos excepcionales (Sandermann *et al.* 1977, Dohn y Krieger 1981, Shimabukuro *et al.* 1982).

El citocromo p-450 en plantas puede ser caracterizado por un alto grado de especificidad del sustrato. En células animales, especialmente en hígado, el citocromo p-450 microsómico metaboliza gran variedad de compuestos extraños con diversas estructuras químicas. La baja especificidad de sustrato del citocromo p-450 de hígado es apropiado para la desintoxicación de numerosos xenobióticos (Higashi 1988).

El evento mutagénico puede consistir en la ligadura covalente de los intermedios reaccionantes al ADN en la fragmentación del mismo (Berlin y Haseltine 1981, Waring 1981, Singer y Kusmirek 1982, Ames 1983, Anders 1985, Schulte-Frohlinde y Sonntag 1985).

En plantas algunas reacciones de oxidación que se suponen son debidas a las ofm pueden ser catalizadas por peroxidasas y otras oxigenasas que intervienen en el metabolismo oxidante. En general, las peroxidasas de plantas catalizan dos tipos de reacciones:

- 1) La clásica reacción peroxidante que requiere peróxido de hidrógeno
- 2) La reacción oxidante que utiliza oxígeno molecular (Higashi 1988).

Las peroxidasas de plantas catalizan la oxidación de gran cantidad de distintas clases de sustratos endógenos y exógenos, condensaciones oxidantes de fenoles y aminas aromáticas, descarboxilaciones, oxidaciones azufre, N-desmetilaciones, hidroxilaciones y oxidaciones de grupos metilos aromáticos todas atribuidas a peroxidasas (Higashi 1988).

Las enzimas microsómicas, peroxidasas y especies activas de oxígeno parecen ser el mayor vehículo bioquímico para la activación. Además el metabolismo de las plantas para la activación mutagénica puede estar relacionada con reacciones de la planta al estrés y a la defensa (Sandermann 1988).

1.7 Reacciones de conjugación o de fase II:

En general la conjugación es considerada como una reacción de desactivación y desintoxicación que involucra la interacción de los metabolitos provenientes de la fase I (metabolitos del pesticida) con un sustrato endógeno para formar un nuevo compuesto de alto peso molecular (Shimabukuro *et al.* 1982). En plantas estos sustratos pueden ser glucósidos simples y complejos, glutatión conjugado y aminoácidos conjugados.

1.8 Reacciones terciarias o de fase III:

En este tipo de reacciones los conjugados usualmente persisten en la planta por intervalos de tiempo muy considerables y son compartimentalizados (Sandermann 1988).

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

El metabolito puede ser conjugado y almacenado en la planta hasta su liberación y llegar a ser activo en el consumo de las plantas por los animales o por el hombre. Esta situación puede ocurrir después de la aplicación de pesticidas a plantas comestibles (Sandermann 1988).

Los conjugados son fácilmente excretados en los animales, mientras que en las plantas no existen sistemas excretores y son polimerizados y así los productos iniciales, los intermedios y los finales pueden seguir varias rutas:

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

1.9 Sistema de prueba

Existen varios métodos para detectar el daño genético provocado por agentes químicos en células sanguíneas como lo es el análisis de aberraciones cromosómicas, la presencia de micronúcleos, la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) (Carrano y Natarajan 1988) y el ensayo de electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa (Ostling y Johanson 1984, Helma y Uhl 2000).

Cultivo de linfocitos humanos

El sistema de linfocitos de sangre periférica es un indicador extremadamente sensible tanto *in vitro* como *in vivo* para el análisis citogenético. En dichas células las primeras mitosis aparecen a las 36 h de haber iniciado el cultivo y a las 48 h ya hay presencia de metafases.

El cultivo de linfocitos humanos presenta las siguientes ventajas (Evans y O'Riordan 1975, Das 1988) se obtienen células en gran cantidad, ya que 1 ml de sangre puede contener de 1 a 3 millones de linfocitos. Generalmente permanecen en estado G0/G1 en la circulación periférica y normalmente no se dividen *in vivo*, así que las lesiones que se inducen permiten la formación de ICH ó de aberraciones que pueden permanecer en estas células por varios días o meses. Son fáciles de estimular para crecer en cultivo, agregando un mitógeno, como la fitohemaglutinina (FHA). Tienen una proporción baja de aberraciones cromosómicas y de ICH espontáneas.

Bajo ciertas condiciones carece de activación metabólica, sin embargo, se inducen agregándole la fracción S9 de mamíferos ó la S10 de plantas.

En experimentos *in vitro* se puede trabajar con un intervalo amplio de concentraciones de la sustancia a verificar y permite evaluar si se presenta una relación concentración-efecto.

1.10 Intercambios de cromátidas hermanas (ICH)

El ICH es una prueba citogenética rápida y sensible, puesto que se producen a concentraciones hasta diez veces menores que las requeridas para provocar aberraciones cromosómicas y ofrece un método adecuado para detectar un amplio espectro de mutágenos y/o carcinógenos ambientales (Kato 1974, 1977, Latt 1974, Perry y Evans 1975).

También se ha usado para corroborar y diferenciar gran cantidad de enfermedades caracterizadas por la fragilidad de cromosomas que predisponen a la neoplasia, especialmente en cultivos humanos de sangre periférica (Das 1988).

Un ICH representa el rompimiento de 4 hebras de ADN, es decir, de 2 dobles hélices de un solo cromosoma y el rearreglo de éstas hebras en una nueva localización; es importante conocer que dicho rompimiento y rearreglo del ADN son eventos que ocurren azarosamente sin producir modificación en el código genético (Carrano y Natarajan 1988).

La técnica utilizando linfocitos humanos periféricos generalmente es la más usada para detectar el efecto a nivel de los cromosomas (Perry y Wolff 1974).

Los ICH son transposiciones recíprocas de secuencias de ADN en un locus homólogo de dos cromátidas del mismo cromosoma durante la replicación del ADN. Este intercambio molecular se puede observar fácilmente en células en metafase mediante el método de fluorescencia más Giemsa (FPG), que consiste en dejar a las células durante dos ciclos de replicación en presencia de un análogo de la base timina la 5-bromodesoxiuridina (BrdU), obteniéndose diferenciación entre las cromátidas hermanas en los cromosomas metafásicos, de tal manera que los de la segunda mitosis poseen una cromátida sustituida por la 5-BrdU en cada cadena de ADN, mientras que su cromátida hermana es sustituida en sus dos cadenas y los ICH observados son la suma de todos los intercambios ocurridos en las dos divisiones celulares (Figura 1.5).

Las cromátidas hermanas sustituidas tiñen diferencialmente por combinación del fluorocromo Hoechst 33258 y el Giemsa (Perry y Wolff 1974). El fluorocromo actúa como fotosensibilizador (Scheid 1976) y la irradiación con luz ultravioleta de onda larga de las preparaciones celulares ocasiona desbrominación y eventualmente rompimientos de una sola hebra en las cadenas reemplazadas con la 5-BrdU (Lyon 1970). La incubación de las laminillas con un amortiguador a temperatura alta guía a la extracción preferencial de las

nucleoproteínas de las cromátidas que fueron sustituidas, finalmente son teñidas con el colorante resultando la tinción diferencial de la cromátida menos desorganizada que es la que contiene más timina (Schvartzman 1987).

Varios estudios han demostrado que la frecuencia de ICH aumenta dramáticamente cuando los cultivos de células o animales completos, incluyendo al hombre, se exponen a mutágenos y/o carcinógenos (Perry y Evans 1975, Latt *et al.* 1981, Lambert *et al.* 1982).

Diversos factores biológicos o físicos varían la frecuencia normal de ICH, algunos investigadores han comparado las frecuencias basales del ICH entre hombres y mujeres y no han observado diferencias significativas (Alhadeff y Cohen 1976, Crossen *et al.* 1977, Carrano y Moore 1982).

Existen varios modelos para explicar la formación de los ICH y su significado biológico. El más aceptado hasta el momento es el propuesto por Painter (1980) que considera que los ICH se presentan con mayor frecuencia en las zonas de unión entre grupos de replicones durante la replicación. Este principio está apoyado por la evidencia de que ciertas enzimas como las topoisomerasas I y II que están en las células de mamífero (Liu *et al.* 1980) inducen y reúnen los rompimientos.

Ocasionalmente, en lugar de una reunión normal, el rompimiento es sellado por la fusión de hebras hijas de una molécula duplicada a la molécula no duplicada. Por lo tanto, el ICH es iniciado cuando las hebras hijas nacientes de un grupo duplicado se combinan con hebras progenitoras de un grupo parcialmente duplicado y el ICH se termina de formar cuando estos últimos grupos completan la duplicación. Este intercambio requiere de un solo evento en el rompimiento de la doble hebra; esto es consistente con los datos que sugieren que la formación de los ICH está en función lineal con la dosis del agente (Perry y Evans 1975, Carrano *et al.* 1978).

1.11 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Al aplicar el insecticida organofosforado metil azinfos (gusatión) en el sistema de cultivo de linfocitos humanos, Gómez-Arroyo *et al.* (1987) observan una respuesta negativa (Tabla I), mientras que al probar estos mismos compuestos en *Vicia faba* (Tabla II) encuentran un aumento significativo de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (Gómez-Arroyo *et al.* 1988). Esto sugiere la existencia de algún mecanismo del metabolismo vegetal que activa a los insecticidas provocando el efecto, pero del cual carecen los linfocitos. Por ello y con este antecedente, en este trabajo se evalúo el potencial genotóxico de los metabolitos del insecticida utilizando como criterio de daño genético la inducción de ICH. Con esto se pretende contar con un sistema que permita conocer un aspecto importante como es el metabolismo de la planta *Vicia faba* mediante la acción directa (*in vivo*) y con la mezcla S10 (*in vitro*).

Objetivos Particulares

- Determinar si el insecticida actúa como promutágeno, a través de la activación metabólica de las raíces de *Vicia faba* (*in vivo*) en linfocitos humanos en cultivo.
- Comprobar la capacidad de biotransformación de las raíces de *Vicia faba*, por medio de la mezcla enzimática S10 (*in vitro*) utilizando diferentes concentraciones del metil azinfos o gusatión en linfocitos humanos en cultivo.
- Obtener la cinética de proliferación celular, así como los índices de replicación y mitótico, de cada uno de los ensayos probados.

1.12 HIPÓTESIS

Si el insecticida organofosforado metil azinfos (gusación) actúa como un mutágeno indirecto que requiere la activación metabólica vegetal (*Vicia faba*), entonces los metabolitos de dicha activación producirán cambios en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas y modificarán la cinética de proliferación celular y el índice mitótico en los linfocitos humanos en cultivo.

2.0 MATERIALES Y METODOS

El metil azinfos líquido a concentraciones mayores de 13.5% está clasificado como un pesticida de uso restringido por la Agencia de Protección Ambiental (EPA 1998).

Inhibe a la enzima acetil colinesterasa en varias especies incluyendo perros, conejos, ratas, ratones y gallinas y está clasificado dentro del grupo E de los insecticidas como probablemente carcinogénico en humanos por las rutas de exposición (EPA 1998).

Características físicas y químicas (CICOPLAFEST 1998).

Nombre químico: *o,o*-dimetil-S-(4-oxo-1,2,3-benzo-triazina-3(4H)-ylmetil) fosforoditioato

Fórmula molecular: $C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$

Peso molecular: 317.34 g

Punto de fusión: 72 – 74 °C

Peso específico: 1.44

Solubilidad: es ligeramente soluble en agua (28 ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$) a 20 °C) y muy soluble en disolventes orgánicos como acetona, tolueno, cloroformo, acetonitrilo, benceno, xileno y clorobenceno.

Cuando se calienta se descompone en gases tóxicos de POx, SOx, y NOx (Lewis 1991, EPA 1998). La categoría toxicológica de acuerdo con la CICOPLAFEST (1998) es de I.

Tipo de plaguicida: de contacto e ingestión

Ingesta diaria admisible: 0.005 mg/kg

Efectos adversos a la salud: tumorigénico, potencialmente teratogénico en humanos y en animales (CICOPLAFEST 1998). Es muy inflamable y explosivo; en caso de

1.12 HIPÓTESIS

Si el insecticida organofosforado metil azinfos (gusación) actúa como un mutágeno indirecto que requiere la activación metabólica vegetal (*Vicia faba*), entonces los metabolitos de dicha activación producirán cambios en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas y modificarán la cinética de proliferación celular y el índice mitótico en los linfocitos humanos en cultivo.

2.0 MATERIALES Y METODOS

El metil azinfos líquido a concentraciones mayores de 13.5% está clasificado como un pesticida de uso restringido por la Agencia de Protección Ambiental (EPA 1998).

Inhibe a la enzima acetil colinesterasa en varias especies incluyendo perros, conejos, ratas, ratones y gallinas y está clasificado dentro del grupo E de los insecticidas como probablemente carcinogénico en humanos por las rutas de exposición (EPA 1998).

Características físicas y químicas (CICOPLAFEST 1998).

Nombre químico: *o,o*-dimetil-S-(4-oxo-1,2,3-benzo-triazina-3(4H)-ylmetil) fosforoditioato

Fórmula molecular: $C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$

Peso molecular: 317.34 g

Punto de fusión: 72 – 74 °C

Peso específico: 1.44

Solubilidad: es ligeramente soluble en agua (28 ppm ($\mu\text{g/mL}$) a 20 °C) y muy soluble en disolventes orgánicos como acetona, tolueno, cloroformo, acetonitrilo, benceno, xileno y clorobenceno.

Cuando se calienta se descompone en gases tóxicos de POx, SOx, y NOx (Lewis 1991, EPA 1998). La categoría toxicológica de acuerdo con la CICOPLAFEST (1998) es de I.

Tipo de plaguicida: de contacto e ingestión

Ingesta diaria admisible: 0.005 mg/kg

Efectos adversos a la salud: tumorigénico, potencialmente teratogénico en humanos y en animales (CICOPLAFEST 1998). Es muy inflamable y explosivo; en caso de

intoxicación se recomienda administrar sulfato de Atropina y 2-PAM en dosis terapéuticas altas.

Uso autorizado en: alcachofa, alfalfa, algodón, almendro, apio, avena, berenjena, brócoli, caña de azúcar, cebada, cebolla, cerezas, chabacano, chile, ciruelo, cítricos, col, coliflor, durazno, espinaca, fresa, frijol, guayabo, jitomate, kiwi, limonero, mandarina, manzanas, melón, membrillo, naranjo, nogal, plantas ornamentales, papa, pastos, pepino, peras, sandía, soya, tabaco, tomate de cáscara, toronja, trigo, vid y zarzamoras (CICOPLAFEST 1998, EPA 1998).

No se debe usar sobre cultivos de invernadero ya que es ligeramente persistente. Las rutas de exposición son por inhalación y absorción a través de la piel. La ingestión en humanos de 1.5 mg/día puede causar severos síntomas como problemas en la vista, salivación, dificultad para respirar, náuseas, vómito, diarrea, calambres musculares, pérdida de la memoria, irritabilidad e incluso la muerte (CICOPLAFEST 1998, EPA 1998).

El riesgo de consumo de residuos de metil azinfos en alimentos básicamente en manzanas, duraznos, peras y leche es más dañino en niños; se ha estimado la tolerancia siendo de 2 ppm en frutas y de 0.04 ppm en leche (EPA 1998).

En un estudio en ratones tratados con 15 mg/kg por día por 80 semanas, y en otros tratados con 4.8 mg/kg por día por 2 años, no mostró evidencias de carcinogenicidad (EPA 1998).

Se observó una posible formación de tumores en la glándula tiroides y en páncreas en ratas macho tratadas con 7.8 mg/kg de metil azinfos por día por 80 semanas, sin embargo fue insuficiente para demostrar que el metil azinfos sea carcinogénico (EPA 1998).

En ensayos evaluando aberraciones cromosómicas en humanos y daño al ADN se ha demostrado una respuesta positiva (Sax y Lewis 1989). En cuanto a la teratogenicidad resultó positivo para ratas a dosis de 2 mg/kg.

Se ha reportado como moderadamente tóxico en aves, de moderado a muy tóxico en peces, dependiendo de la especie y muy tóxico para invertebrados acuáticos.

La LD₅₀ oral en ratas es de 31 mg/kg, en conejos LD₅₀ > 2000 mg/kg, la LD₅₀ por contacto dérmico es de 1,780 mg/kg en conejos. Por inhalación, la LD₅₀ en ratas es de 0.20 mg/L en machos y 0.169 mg/L en hembras (EPA 1998).

Acción en plantas: es absorbido a través de la raíz y translocado, es relativamente persistente en la superficie de las hojas y gradualmente degradado a metabolitos. A pesar de no ser tóxico para las plantas puede reducir el crecimiento en algunas especies (EPA 1986).

Efectos al ambiente: el metil azinfos es activo en el suelo, es absorbido por la materia orgánica y transformado por los microorganismos que se encuentran en el suelo, algunos metabolitos del insecticida en el suelo son: azinfos metil-oxón, benzasimida, mercaptometil benzasimida, hidroximetil benzasimida y sulfuro de bis-metil benzasimida (EPA 1986).

Además los insectos metabolizan el metil azinfos a su análogo fosforilado más tóxico, etil azinfos, que también se usa como insecticida (Cremllyn 1978).

En estudios de metabolismo en ratas, el metil azinfos es degradado y/o eliminado a las 72 h después de la dosificación y no se acumula en tejidos, involucra la acción de la glutatión-S-transferasa y de oxidasas de función mixta (EPA 1998).

2.1 Cultivo de linfocitos humanos

Se colocaron 4.5 mL de medio Gibco (RPMI 1640) en un tubo estéril complementado con 0.4 ml de fitohemaglutinina más 400 µl de sangre heparinizada de un donador sano, se incubaron por 72 horas a 37 °C y a las 24 h de iniciado el cultivo se agregaron 100 µl de 5-bromodesoxiuridina (5-BrUd). Después de la incubación de las células se llevó a cabo la aplicación de los tratamientos *in vivo* e *in vitro* en linfocitos humanos a través del metabolismo de *Vicia faba*.

2.2 Activación metabólica *in vivo*

Se germinaron 40 semillas de *Vicia faba* por cada grupo de tratamientos y testigos entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave, cuando las raíces alcanzaron una longitud entre 4 y 6 cm, se introdujeron en concentraciones de 5, 10, 20, 25, 30 y 40 ppm del insecticida metil azinfos o gusatión (Bayer) más agua destilada, manteniéndose 4 h en oscuridad a temperatura ambiente. Se empleó como testigo positivo al etanol 0.1 M (ETOH 98 % de pureza) que ha demostrado ser un promutágeno en esta planta al

incrementar la frecuencia de ICH en linfocitos humanos en cultivo (Takehisa *et al.* 1982, Calderón-Segura 1993).

Posteriormente se lavaron con agua de la llave tres veces y dos ocasiones más con agua destilada, se cortaron 2 cm de la raíz principal, se maceraron con amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.4 a temperatura entre 0-4 °C, y se homogeneizaron en un macerador de tejidos vegetales de 1 a 2 min.

La relación volumen de la solución amortiguadora (ml) con el peso fresco de los cortes de la raíz (g) fue de 1:1 (Takehisa *et al.* 1982).

El homogeneizado se centrifugó a 1500 rpm por 15 min a temperatura de 4 °C.

El sobrenadante en el cual se encontraron los metabolitos de las transformaciones del insecticida, así como la fracción enzimática S10 (testigo negativo) se filtraron en un ambiente estéril por filtración miliporo (0.45 µm) a las 24 h de iniciado el cultivo de linfocitos humanos (CLH) se agregaron 100 µl 5-BrdU más 100 µl del extracto de las raíces tratadas con el insecticida a 5, 10, 20, 25, 30 y 40 ppm (µg/ml).

Los testigos negativos consistieron de un CLH más 100 µl 5-BrdU, otro con 100 µl de los extractos de las raíces sin tratamiento (S10) más 100 µl 5-BrdU y uno más con 3.22 µl de etanol (1×10^{-1} M) 100 µl 5-BrdU.

El testigo positivo incluyó de 100 µl del extracto de las raíces tratadas con etanol a 3600 ppm (1×10^{-1} M) más 100 µl 5-BrdU.

A las 70 h se aplicaron 100 µl de colchicina al 0.05% (Merck), a las 72 h se centrifugaron por 10 min a 1,200 rpm, se desechó el sobrenadante, se agregaron 10 ml de KCl 0.075 M por 20 min, después se centrifugó por 10 min/1200 rpm, se tiró el sobrenadante y el botón se resuspendió con fijador metanol-ácido acético (Sigma) 3:1 dejándolos reposar por 20 min.

Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón con el fijador, repitiéndose esto tres veces.

Nuevamente se resuspendió el botón con 0.5 ml de fijador y se realizaron las laminillas por goteo (4 por cada tubo), que se dejaron secar verticalmente al aire.

Las preparaciones con metafases fueron reetiquetadas con clave desconocida, de manera que se eliminaron prejuicios al hacer la lectura. Después se prosiguió a teñir las preparaciones.

2.3 Activación metabólica *in vitro*

Con la finalidad de conocer si el insecticida metil azinfos o gusación (Bayer) tiene efecto indirecto sobre el ADN se evaluó la biotransformación de promutágenos a mutágenos a través del sistema metabolizador de la fracción S10 de *Vicia faba*. Primero se obtuvo la fracción enzimática a partir de las raíces de *Vicia faba*, por lo que se pusieron a germinar 40 semillas en oscuridad y cuando alcanzaron una longitud de 4 a 6 cm se cortaron 2 cm de las puntas de la raíz, obteniendo un peso de 2 g, se homogeneizaron con una solución de fosfatos 0.1 M a un pH de 7.4 conteniendo 1 mM de ditiotreitól, 1 mM de EDTA, 0.6 M de manitol y 0.4 % de albúmina sérica bovina en un macerador de tejidos a 4° C. El homogeneizado se centrifugó por 15 min a 11,500 rpm a 4°C, el sobrenadante se filtró en un ambiente estéril con miliporo (0.45 µm) (Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa *et al.* 1988).

Posteriormente, se preparó la mezcla enzimática S10 (1 mL), utilizando los siguientes cofactores: MgCl₂ 8 X 10⁻³ M (1 mL), KCl 3.3 X 10⁻² M (1 mL), Glucosa 6-fosfato 5 X 10⁻³ M (1 mL), NADP 4 X 10⁻³ M (1 mL), NAD 1 X 10⁻¹ M (1 mL) y se adicionó amortiguador de fosfatos de potasio (0.1 M, 7.4 pH) hasta obtener un volumen final de 10 mL (Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa *et al.* 1988, Gómez-Arroyo *et al.* 1995).

Se prosiguió a filtrar la mezcla con miliporo (0.45 µm) e inmediatamente después se utilizaron para los tratamientos.

A los cultivos de 24 h de incubación se adicionaron 100 µl de 5-BrdU (9 ng) y a las 48 h se aplicaron 500 µl de la mezcla S10 más las concentraciones de 2, 4, 8, 10, 20 y 30 ppm del gusación.

Los testigos negativos consistieron de 100 µl 5-BrdU, de 500 µl de la mezcla S10 y otro con 3.22 µl de etanol (1 x 10⁻¹M). El testigo positivo de 100 µl 5-BrdU + 500 µl de la mezcla S10 más etanol.

Los cultivos con los tratamientos se mantuvieron por 4 h en la incubadora a 37 °C, dos en reposo y dos en agitación.

Posteriormente se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después se extrajeron los tubos de la centrifuga, se desechó el sobrenadante, se agitó el botón y se agregaron 10 ml de suero fisiológico de NaCl (0.9%), se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. Repitiéndose el paso anterior (2 lavados).

Después se desechó el sobrenadante y se agregaron 4.5 mL de medio Gibco complementado con fitohemaglutinina y 100 µl de 5-BrdU. A las 70 h se les aplicaron 100 µl de colchicina y a las 71 h se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 5 ml de KCl (Merck) 0.075 M a 37 °C dejándose reposar durante 20 min en la incubadora.

Nuevamente se centrifugaron los tubos a 1200 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió con fijador metanol-ácido acético (Sigma) 3:1 dejándolos reposar por 20 min.

Se centrifugó otra vez a 1200 rpm durante 10 min y nuevamente se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón con el fijador, realizándose por triplicado.

Una vez resuspendido el botón celular en 0.5 ml de fijador se elaboraron las laminillas por goteo y se dejaron secar verticalmente al aire.

Las laminillas fueron reetiquetadas y se prosiguió a teñir las preparaciones.

2.4 Tinción diferencial de las cromátidas hermanas

Se realizó en los dos ensayos antes mencionados. Las preparaciones con metafases se sumergieron en el colorante fluorocromado Hoechst 33258 más agua destilada (1:9), que se mantuvieron en la oscuridad por 30 min en una caja de Koplín (Perry y Wolf 1974). Se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire verticalmente.

Posteriormente fueron colocadas en citrato de sodio salino (CSS, 0.03 M) y se irradiaron con luz ultravioleta durante una hora.

Se enjuagaron en agua corriente y se dejaron secar al aire verticalmente.

Posteriormente se colocaron en CSS, en baño María a 60 °C durante una hora. Nuevamente se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire verticalmente. Por último se analizaron al microscopio óptico las frecuencias y los tipos de intercambio de cromátidas hermanas.

2.5 Cinética de proliferación celular e índice mitótico

Para evaluar el posible daño citotóxico provocado por el insecticida metil azinfos a los linfocitos humanos en cultivo se analizó la cinética de proliferación celular por medio del índice de replicación.

El índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular también han sido propuestos como parámetros para la evaluación de actividad antineoplásica (Rojas *et al.* 1993). El IM indica la genotoxicidad de agentes químicos, en donde se pueden observar metafases de primera, segunda y tercera división celular.

El índice de replicación permite evaluar agentes genotóxicos que alteran la velocidad del ciclo de división, lo cual se refleja en las frecuencias de las metafases de primera, segunda y/o tercera divisiones celulares (Krishna *et al.* 1985).

2.6 Obtención del índice de replicación

$$IR = 1M1 + 2M2 + 3M3 / 100$$

Donde M1, M2 y M3 representan los porcentajes de metafases de primera, segunda y tercera divisiones celulares. Se consideraron M1 aquellas células cuyo ADN se replicó una vez después de la adición de la 5-BrdU; M2 a células cuyo ADN se duplicó dos veces en presencia de la 5-BrdU y M3 a los núcleos que presentaron mayor número de cromátidas bifilarmente incorporadas.

Obtención del índice mitótico

El índice mitótico se cuantificó como el número de metafases en 1000 células estimuladas, de modo que se puede expresar de la siguiente manera:

$$\text{IM} = \text{número de metafases} / 1000 \text{ células estimuladas}$$
$$\% \text{ IM} = \text{IM} \times 100$$

2.6 Análisis estadístico

Para cuantificar la frecuencia de ICH se registraron 25 metafases de segunda división para cada grupo (testigos y tratamientos). Para todos los casos se realizaron un experimento y su réplica, de manera que se pudieron comparar entre sí con una *t* de Student, al no haber diferencias significativas se promediaron los resultados y se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA), si el valor de *F* es significativo a $p < 0.001$ entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls a $p < 0.001$ entre las frecuencias del ICH del testigo y los de cada grupo de tratamiento. Se empleó la prueba de X^2 para los índices de replicación y mitótico.

3.0 RESULTADOS

En las tablas I y II se muestran los resultados obtenidos por Gómez-Arroyo *et al.* (1987, 1988). En la primera se observan las frecuencias de ICH al agregar el insecticida metil azinfos directamente a cultivos de linfocitos humanos en los cuales no se obtuvieron diferencias significativas al aplicar la prueba de "*t*" de Student entre los tratamientos y los testigos y en la segunda se presentan las frecuencias de ICH inducidos por el mismo insecticida pero en células meristemáticas de *Vicia faba* donde se nota el aumento considerable de ICH.

Al aplicar los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con las diferentes concentraciones del gusatión y etanol a los cultivos de linfocitos (*in vivo*), los valores evidencian un incremento en la frecuencia de ICH en los tratamientos con respecto a los testigos negativos, por lo que se aplicó un análisis de varianza y la prueba de comparación

Obtención del índice mitótico

El índice mitótico se cuantificó como el número de metafases en 1000 células estimuladas, de modo que se puede expresar de la siguiente manera:

$$\text{IM} = \text{número de metafases} / 1000 \text{ células estimuladas}$$

$$\% \text{ IM} = \text{IM} \times 100$$

2.6 Análisis estadístico

Para cuantificar la frecuencia de ICH se registraron 25 metafases de segunda división para cada grupo (testigos y tratamientos). Para todos los casos se realizaron un experimento y su réplica, de manera que se pudieron comparar entre sí con una *t* de Student, al no haber diferencias significativas se promediaron los resultados y se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA), si el valor de *F* es significativo a $p < 0.001$ entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls a $p < 0.001$ entre las frecuencias del ICH del testigo y los de cada grupo de tratamiento. Se empleó la prueba de X^2 para los índices de replicación y mitótico.

3.0 RESULTADOS

En las tablas I y II se muestran los resultados obtenidos por Gómez-Arroyo *et al.* (1987, 1988). En la primera se observan las frecuencias de ICH al agregar el insecticida metil azinfos directamente a cultivos de linfocitos humanos en los cuales no se obtuvieron diferencias significativas al aplicar la prueba de "t" de Student entre los tratamientos y los testigos y en la segunda se presentan las frecuencias de ICH inducidos por el mismo insecticida pero en células meristemáticas de *Vicia faba* donde se nota el aumento considerable de ICH.

Al aplicar los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con las diferentes concentraciones del gusatión y etanol a los cultivos de linfocitos (*in vivo*), los valores evidencian un incremento en la frecuencia de ICH en los tratamientos con respecto a los testigos negativos, por lo que se aplicó un análisis de varianza y la prueba de comparación

múltiple de Newman Keuls obteniéndose diferencias significativas para 20, 25 y 30 ppm, pues a 40 ppm se presentó la inhibición de la mitosis (Tabla III).

Cuando se incubaron las diferentes concentraciones del insecticida más la fracción S10 y los linfocitos (*in vitro*) se obtuvo respuesta positiva en la inducción de ICH con respecto a los valores obtenidos en los testigos observándose nuevamente inhibición del ciclo celular en 40 ppm (Tabla IV).

Con respecto a la cinética de proliferación celular, y a los índices mitótico y de replicación no hubo efecto, pues no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo testigo. Sin embargo, en las concentraciones más altas se inhibió la división celular, ya que se observaron muy pocas células estimuladas y metafases (Tabla V).

Los valores de IM e IR disminuyeron conforme se aumentó la concentración, encontrándose abatimiento de las mitosis en 30 ppm de tal manera que no se completaron las 100 células requeridas para su análisis. Mientras que en 40 ppm claramente se inhibe la división celular. inhibición de la mitosis en 30 y 40 ppm, ya que al igual que en el caso anterior había muy pocas células estimuladas y así como metafases, aunque en 30 ppm si se completaron las 50 metafases en los dos experimentos para analizar los ICH, sin embargo, no fue posible las 200 metafases por los dos experimentos para evaluar la cinética de proliferación celular, IM y el IR.

En las concentraciones menores se encontraron diferencias al aplicar la prueba de X^2 con un nivel de significancia del 95% (VI).

4.0 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Desde el punto de vista de la mutagénesis, los insecticidas organofosforados constituyen un grupo importante, ya que casi todos ellos son derivados del ácido fosfórico en cuya estructura general se presentan dos radicales que son generalmente grupos alquilo (en especial metilo o etilo), que atacan preferencialmente al átomo de carbono del ADN mediante la alquilación, y que en algunos casos ocurre en los sitios electrofílicos (Moutschen-Dahmen *et al.* 1984).

Dado que en nuestro país se emplean indiscriminadamente grandes cantidades de pesticidas sobre los cultivos en donde muchos de ellos permanecen de manera residual por largos períodos, pudiendo ser además metabolizados y convertidos en productos peligrosos para el hombre, es importante contar con sistemas biológicos de prueba que permitan detectar todos estos fenómenos (SEMARNAP 1997).

Con base en los antecedentes aportados por Gómez-Arroyo *et al.* (1987, 1988) sobre el efecto negativo del metil azinfos en la inducción de ICH en cultivo de linfocitos humanos (Tabla I) y el positivo en *Vicia faba* (Tabla II), en este trabajo se demostró que al aplicar a los linfocitos tanto los extractos tratados con el insecticida que contenían los metabolitos (*in vivo*) así como al coincubarlos con el insecticida y la fracción S10 (*in vitro*) se obtuvieron resultados positivos (Tablas III y IV), lo que sugiere que el metabolismo de *Vicia faba* está involucrado en la transformación del metil azinfos.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Herbold (1986) en linfocitos humanos *in vitro*, quién al aplicar el metil azinfos de manera directa la respuesta fue negativa mientras que al agregar la fracción S9 de hígado de rata, fue positiva. En *Salmonella typhimurium* con las cepas TA1535, TA1537, TA1538, TA98 y TA100 tanto en ausencia como en presencia de activación metabólica (fracción S9), el metil azinfos no mostró evidencia de mutagenicidad (Evenchik 1987).

En otros estudios sobre la genotoxicidad del mismo compuesto los resultados fueron negativos, en *Saccharomyces cerevisiae* (Riccio *et al.* 1981), en ratón (Jorgenson *et al.* 1976), en células de criceto dorado (Chen *et al.* 1982) y en el pez *Umbra limi* (Vigfusson *et al.* 1983). Sin embargo, en plantas tiene efecto c-mitótico (Grant 1973) e incrementa la recombinación mitótica en *S. cerevisiae* (Simmon *et al.* 1976).

Al comparar las frecuencias de ICH inducidas en los cultivos de linfocitos *in vivo*, se puede observar que los resultados fueron equivalentes a los tratados *in vitro*, lo que muestra la necesidad del metabolismo vegetal del metil azinfos para causar daño al ADN.

Aunque en el caso de la activación *in vitro* se utilizaron concentraciones más bajas, debido a que el metil azinfos se aplicó directamente con la fracción S10, cuando en las raíces tratadas se utilizaron concentraciones mayores, se notó que en el primer tipo de ensayo, a partir de 8 ppm del insecticida se empezó a manifestar la respuesta significativa, no obstante, en ambos tratamientos en 30 ppm las frecuencias fueron equivalentes, lo que implica que en los dos métodos de activación se forman los mismos metabolitos y posiblemente en la misma cantidad, por las reacciones de oxidación catalizadas por el sistema ofm.

Estos datos difieren de los obtenidos por Calderón-Segura *et al.* (1999), quienes describen mayor inducción de ICH en los tratamientos con los extractos que contenían los metabolitos (*in vivo*) que cuando se llevó a cabo el metabolismo *in vitro*.

Las plantas son metabólicamente activas lo que las hace capaces de biotransformar muchos de los agentes químicos con los que están en contacto, convirtiéndolos en sustancias tóxicas; tal es el caso de los plaguicidas, particularmente los insecticidas organofosforados.

Este mismo comportamiento ocurre en el caso del testigo positivo (etanol), ya que con el se obtienen frecuencias similares de ICH en ambos tipos de ensayos (Tablas III y IV).

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

El acetaldehído es el principal agente inductor de ICH en linfocitos humanos *in vitro* en presencia de la enzima ADH y del cofactor NAD (Obe *et al.* 1986).

Con relación a la cinética de proliferación celular de los linfocitos, en los tratamientos que contenían los metabolitos (*in vivo*) no se produjeron alteraciones, mientras que cuando se realizó el metabolismo del metil azinfos *in vitro*, se notó un retraso en la

progresión del ciclo celular, evidenciado por el aumento de células M1 y la disminución de M3, esta diferencia entre ambos ensayos, posiblemente fue causada por la acción directa del insecticida antes de que empezara a metabolizarse, ya que la diferencia con el caso anterior, es el hecho de que ya estaba transformado, lo que indica que probablemente las moléculas originales del insecticida interfirieron con el estímulo de la fitohemaglutinina, con la disponibilidad de los nutrientes o bien por otros factores que impidieron que las células continuaran su ciclo normal (Calderón-Segura 1998).

En cuanto al IR, no se encontraron diferencias significativas y tampoco en el IM, sin embargo en 30 ppm, en los ensayos *in vitro* se abatió la división celular y en 40 ppm se inhibió la mitosis, lo mismo ocurre en esta misma concentración en los tratamientos *in vivo*, por lo que se puede considerar que fue más citotóxico el metil azinfos en los tratamientos *in vitro*.

En el caso del etanol, en los experimentos *in vitro*, se nota el decremento de las células M1, datos que no concuerdan con los descritos por Calderón-Segura y Espinosa Ramírez (1998), quienes no detectaron cambios en la cinética de proliferación celular con este compuesto en ambos ensayos.

5.0 REFERENCIAS

- Aldridge M. F. y Wright A. S. (1971) Alkylation of DNA by organophosphorus pesticides. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **48**: 51 - 55.
- Alhadeff B. y Cohen M. M. (1976) Frequency and distribution of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes. *Isr. J. Med. Sci.* **12**: 1440 - 1447.
- Ames B. N., McCann J. y Yamasaki E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**: 347 - 364.
- Ames B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* **221**: 1256 - 1264.
- Anders M. W. (1985) *Bioactivation of foreign compounds*. Academic Press, Nueva York.
- Ashby J., Anwar W., Au W.W., Massoud A. y Gentile J.M. (1993) Genetic toxicology in developing countries: comments and recommendations. *Environ. Health Perspect.* **101**: 335 - 338.
- Bedford C. T. y Robinson J. (1972) The alkylating properties of organophosphorus. *Xenobiotica* **2**: 307 - 337.
- Berlin V. y Haseltine W. A. (1981) Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome p-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. *J. Biol. Chem.* **10**: 4747 - 4756.
- Blair A. y Zahm S. H. (1995) Agricultural exposures and cancer. *Environ. Health Perspect.* **103**: 205 - 208.
- Brown L. M., Blair A., Gibson R., Everett G. D., Cantor K. P., Schuman L. M., Burmeister S. F., Van Lier y Dick F. (1990) Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.* **50**: 6585 - 6591.
- Bull D. L. (1972) Metabolism of organophosphorus insecticides in animals and plants. *Res. Rev.* **43**: 1.
- Bull D. L., Whitten C. J. e Ivie G. W. (1976) Fate of *o*-ethyl-[4-(methylthio) phenyl]-S-propylphosphorodithioate (BAYNTN 9306) in cotton plants and soil. *J. Agric. Food Chem.* **24**: 691.

- 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.
- Calderón-Segura M. E. (1998) Evaluación del efecto genotóxico provocado por los herbicidas tiocarbámicos molinate y butilate en dos sistemas de prueba con la participación del metabolismo vegetal. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Calderón-Segura M. E. y Espinosa-Ramírez M. (1998) Efecto de butilate 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. 438: 81 - 88.
- Carrano A. V., Thompson L. H., Lindl P. A. y Minkler J. L. (1978) SCE as an indicator of mutagenesis. Nature 271: 551 - 552.
- Carrano A. V. y Moore D. H. (1982) The rationale and methodology for quantifying sister-chromatid exchange in humans. En: J. A. Heddle (Ed.) *Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology*. Academic Press, Nueva York, pp. 267 - 304.
- Carrano A. V. y Natarajan A. T. (1988) Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Mutat. Res. 204: 379 - 406.
- Chen H. H., Sirianni S. R. y Huang C. C. (1982) Sister-chromatid exchanges and cell-cycle delay in Chinese hamster V79 cells treated with 9 organophosphorus compounds (8 pesticides and 1 defoliant). Mutat. Res. 103: 307 - 313.
- CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas) (1991) Catálogo oficial de plaguicidas. SARH, SEDUE, SS, SCFI. México.
- CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas) (1998) Catálogo oficial de plaguicidas. SARH, SEDUE, SS, SCFI. México.

- Cooper I. P. (1991) Effects of pesticides on wild life. En: W. J. Hayes, J. R. Laws y E. R. Laws Jr. (Eds.) *Handbook of pesticides toxicology*. Academic Press, Nueva York, pp. 1347 - 1402.
- Cortés-Eslava J. (1993) Evaluación del daño mutagénico provocado por los insecticidas organofosforados foxim y metil azinfos en *Salmonella typhimurium* a través del metabolismo vegetal. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Crafts A.S. y Crisp C.E. (1971) *Phloem transport in plants*. En: W. H. Freeman (Ed.) San Francisco.
- Cremlyn R. (1978) *Pesticides preparation and mode of action*. Wiley, Nueva York, pp. 75 - 76.
- Crossen P. E., Drets M. E., Arrighi F. E. y Johnston D. A. (1977) Analysis of frequency and distribution of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Human Genet.* **35**: 345 - 352.
- Das B. C. (1988) Factors that influence formation of sister chromatid exchanges in human blood lymphocytes. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **19**: 43 - 86.
- Dohn D. R. y Krieger R. (1981) Oxidative metabolism of foreign compounds by higher plants. *Drug Metab. Rev.* **12**: 119 - 157.
- EPA (1986) U. S. Environmental Protection Agency. Pesticide Fact Sheet, Azinphos-methyl. www.epa.gov/pesticides/op/azinfos/azmol.pdf
- EPA (1998) U. S. Environmental Protection Agency. Pesticide Fact Sheet, Azinphos-methyl. www.epa.gov/pesticides/op/azinfos/azmol.pdf
- Eto M., Casida J. E. y Eto T. (1962) Hydroxylation and cyclization involved in the metabolism of tri-o-cresyl phosphate. *Biochem. Pharmacol.* **11**: 337 - 352.
- Eto M., Kinoshita Y., Kato I. y Oshiwa Y. (1963) Saligenin cyclic methyl phosphate and its thion analogue: new insecticide related to the active metabolite of tri-o-cresyl phosphate. *Nature* **200**: 171 - 172.
- Eto M., Okabe S., Ozoe Y. y Maekawa K. (1977) Oxidative activation of S-dimethyl phosphoramidothiolate. *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**: 367 - 377.
- Evans H. J. y O'Riordan M. L. (1975) Human peripheral blood lymphocyte for the analysis of chromosome aberrations in mutagen test. *Mutat. Res.* **31**: 135 - 148.

- Evenchik Z. (1987) Cotnion-M: assessment of mutagenic potencial in histidine auxotrophs of *Salmonella typhimurium* (the Ames test) LSRI Reporte No. MAK/141/AZN. Life Science Research Israel Ltd. En: EPA 1998.
- Fest C. y Schmidt K. J. (1973) *The chemistry of organophosphorus pesticides*. Springer-Verlag, Berlin.
- Finlayson D.G. y MacCarthy H.R. (1973) Pesticides residues in plants. En: C. A. Edwards (Ed.) *Environmental pollution by pesticides*. Plenum Press, Nueva York, p. 80.
- Flores-Maya S. (2000) Intercambio de cromátidas hermanas inducidos por dos herbicidas del grupo químico triazina en cultivo de linfocitos humanos previa activación metabólica por un biomonitor vegetal (*Vicia faba*). Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Gentile J. M., Gentile G. J., Bultman J., Sechrist R., Wagner E. D. y Plewa M. J. (1982) An evaluatign of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* 101: 19 – 29.
- Gentile J. M., Gentile G. J., Toesen S. y Plewa M. J. (1985) *In vitro* activation enhancement of the mutagenicity of 4-nitro-*o*-phenylenediamine by plant S9. *Environ. Mutagen.* 7: 73 - 85.
- Gómez-Arroyo S., Noriega-Aldana N., Juárez-Rodríguez D. y Villalobos-Pietrini R. (1987) Sister chromatid exchanges induced by the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, phoxim and methyl azinfos in cultured human lymphocytes. *Contam. Ambient.* 3: 63 - 70.
- Gómez-Arroyo S., Castillo-Ruiz P., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini R. (1988) *Vicia faba*-sister chromatid exchanges of the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, oxydemeton methyl, azinphos methyl and phoxim. *Cytologia* 53: 627 – 634.
- Gómez-Arroyo S., Rodríguez-Madrid L. y Villalobos-Pietrini R. (1992) Chromosomal alterations induced by the thiocarbamate herbicide molinate (Ordram) in *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient* 8: 77 – 80.
- Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M. y Villalobos-Pietrini R. (1995) Sister chromatid exchanges in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutagen.* 26: 324 - 330.

- Gómez-Arroyo S. y Villalobos-Pietrini R. (1995) Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. En: Butterworth F. M., Corkum L. D. y Guzmán-Rincón J. (Eds.) *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*. Plenum Press, Nueva York, pp. 95 – 113.
- Grant W. F. (1973) Cytological effects of environmental mutagen-pesticides. *Mutat. Res.* 21: 221 - 222.
- Helma C. y Uhl M. (2000) A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. *Mutat. Res.* 466: 9 – 15.
- Herbold B. (1986) Azinphos-methyl: cytogenetic study with human lymphocyte cultures in vitro to evaluate for harmful effect to on chromosomes. Reporte No. 94575. Bayer A.G.
- Higashi K., Nakashima K., Karasaki Y., Fukunaga M. y Mizugashi K. (1981) Activation of benzo(a)pyrene by microsomes of higher plant tissues and their mutagenicity. *Biochem. Int.* 2: 373 - 380.
- Higashi K. (1988) Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* 197: 273 – 288.
- Johnson M. K. (1982) The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological application. *Rev. Biochem. Toxicol.* 4: 141 – 212.
- Jorgenson T. A., Rushbrook C. J. y Newel G. W. (1976) *In vitro* mutagenesis investigations of ten commercial pesticides. *Toxicol. Pharmacol.* 37: 109.
- Julli M. y Krassoi R. (1995) Acute and chronic toxicity of the thiocarbamate herbicide, molinate, to the Cladoceran *Moina australiensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54: 690 – 694.
- Kato H. (1974) Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatid exchanges. *Nature* 252: 739 – 741.
- Kato H. (1977) Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BrdU-labelling method. *Nature* 251: 70 – 72.
- Kimura S., Toeda K., Miyamoto T. y Yamamoto I. (1984) Activation and detoxication of S-alkyl phosphonothiolate insecticides. *J. Pestic. Sci.* 9: 137 – 142.

- Klopman G., Contreras R., Rosenkranz H. S. y Waters M.D. (1985) Structure genotoxic activity relationships of pesticides: a comparison of the results of several short-term assays. *Mutat. Res.* **147**: 343 – 356.
- 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.
- Lambert B., Lindblad A., Holmberg L. y Francesconi D. (1982) The use of sister chromatid exchange to monitor human populations for exposure to toxicologically harmful agents. En: S. Wolf (Ed.) *Sister Chromatid Exchange*. Wiley, Nueva York, pp. 149 - 182.
- Lamoureux G. L. y Frear D. S. (1979) Pesticide metabolism in higher plants: *in vitro* enzyme studies. En: G. D. Paulson, D. S. Frear y E. P. Marks (Eds.) *Xenobiotic metabolism, in vitro methods*. ACS symposium series 97, American Chemical Society, Washington D. C., pp. 77 – 128.
- Latt S. A. (1974) Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**: 3162 - 3166.
- Latt S. A., Allen J., Bloom S. E., Carrano A., Falke E., Kram D., Schneider E., Schreck R., Tice R., Whitfield B. y Wolff S. (1981) Sister chromatid exchanges: a report of the Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* **87**: 17 – 62.
- Lewis R. J. Sr. (1991) *Hazardous chemicals desk reference*. 2nd. Ed., Van Nostrand Reinhold, Nueva York, p. 100, 101, 110.
- Liu L. F., Liu C. C. y Alberts B. A. (1980) Type II DNA topoisomerases: enzymes which unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double strands break. *Cell* **19**: 697 – 704.
- Lyon M. B. (1970) Search for a mechanism for the increased sensitivity of 5-bromouracil-substituted DNA of ultraviolet radiation. II. Single-strand breaks in the DNA of irradiated 5-bromouracil-substituted T3 coliphage. *Biochem. Biophys. Acta* **209**: 24 – 33.
- McBain J. B., Hoffman L. J. y Menn J. J. (1970) Metabolic degradation of *o*-ethyl S-phenyl ethylphosphonodithionate (dyfonate) in potato plants. *J. Agric. Food Chem.* **18**: 1139.

- McBain J. B., Yamamoto I. y Casida J. E. (1971) Mechanism of activation and deactivation of dyfonate (*o*-ethyl-S-phenyl ethylphosphonodithioate) by rat liver microsomes. *Life Sci.* 10: 947 - 954.
- Miller E. C. y Miller J. A. (1971) The mutagenicity of chemical carcinogens: correlations problems, and interpretations, En: A. Hollaender (Ed.) *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. Plenum Press, Nueva York, pp. 83 - 119.
- Miyamoto T. y Yamamoto I. (1977) Mechanism of phosphinyl disulfide formation from a phosphorodithionate ester. *J. Pestic. Sci.* 2: 303 - 310.
- Miyamoto T. y Yamamoto I. (1980) Reaction of phosphinyl and phosphinothioyl disulfides with diazomethane. *Agric. Biol. Chem.* 44: 2581 - 2586.
- Moutshen-Dahmen J., Moutshen-Dahmen M. y Degraeve N. (1984) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of insecticides En: M. Kirsch-Volders (Ed.) *Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of industrial pollutants*. Plenum Press, Nueva York, pp. 127 - 203.
- Nakatsugama T. y Dahm P. A. (1967) Microsomal metabolism of parathion. *Biochem. Pharmacol.* 16: 25 - 38.
- Narayan S. T. y Lichtenstein E. P. (1973) Influence of mineral nutrients on the penetration translocation and metabolism of (14 C) dyfonate in pea plants. *J. Agric. Food Chem.* 21: 351.
- National Academy of Sciences USA (1980) Control de plagas y animales. Manejo y control de plagas de insectos. Limusa, México.
- Obe G., Natarajan T., Meyers A. y Den Hertog A. (1979) Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood *in vitro*, and of SCE in bone-marrow cells of mice *in vivo* by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutat. Res.* 68: 291 - 294
- Obe G., Jonas R. y Schmith S. (1986) Metabolism of ethanol *in vitro* produces a compound which induces sister-chromatid exchange in human peripheral lymphocytes *in vitro*: acetaldehyde not ethanol is mutagenic. *Mutat. Res.* 174: 47 - 51
- O'Brien R. D. (1967) *Insecticides*. Academic Press, Nueva York.
- O'Brien R. D. (1985) Free-radical-mediated DNA binding. *Environ. Health Perspect.* 64: 219 - 232.

- Ostling O. y Johanson K. J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**: 291 - 298.
- Painter R. B. (1980) A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* **70**: 337 - 341.
- Perry P. y Wolff S. (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* **251**: 156 - 158.
- Perry P. y Evans H. J. (1975) Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* **258**: 121 - 122.
- Perry A. S., Yamamoto I., Ishaaya I. y Perry R. (1998) *Insecticides in agriculture and environment retrospects and prospects*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 52 - 65.
- Plewa M. J. y Gentile J. M. (1976) Mutagenicity of atrazine: a maize microbe bioassay. *Mutat. Res.* **38**: 287 - 292.
- Plewa M. J. (1978) Activation of chemical into mutagens by green plants. A preliminary discussion. *Environ. Health Perspect.* **27**: 45 - 50.
- Plewa M. J. y Gentile J. M. (1982) The activation of chemicals into mutagens by green plants. En: F. J. de Serres y A. Hollaender (Eds.) *Chemical mutagens, principles and methods for their detection*. Plenum Press, Nueva York, Vol. 7, pp. 401 - 420.
- Plewa M. J., Weaver D. L., Blair L. C. y Gentile J. M. (1983) The activation of 2-aminofluorene by cultured plant cells. *Science* **219**: 1427 - 1429.
- Plewa M. J., Wagner E. D., Gentile G. J. y Gentile J. M. (1984) An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* **136**: 233 - 245.
- Preussman R., Schneider H. y Epple F. (1969) Untersuchungen zur wachweis Alkylierender Agentien. *Arzneimittel Forschung* **19**: 1059 - 1073.
- Rasquinha I. A., Wildeman A. G. y Nazar R. N. (1988) Studies on the use of plant extracts in assessing the effects of plant metabolism on the mutagenicity and toxicity of pesticides. *Mutat. Res.* **197**: 261 - 272.
- Riccio E., Sheperd G., Pomeroy A., Mortelmans K. y Waters M. D. (1981) Comparative studies between the *S. cerevisiae* D3 and D7 assay of eleven pesticides. 12th Ann. Meeting Environ. Mutagen. Soc., p. 28.

- Rojas E., Herrera L. A., Sordo M., Gonsebatt M. E., Montero R., Rodriguez R. y Ostrosky-Wegman P. (1993) Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti. Cancer Drugs* 4: 637 - 640.
- Sandermann H., Diesperger H. y Scheel D. (1977) Metabolism of xenobiotics by plant cell cultures. En: W. Berz, E. Reinhold y M. H. Zenk (Eds.) *Proceedings in life sciences, plant tissue culture and its bio-technological application*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 178 - 196.
- Sandermann H. (1982) Metabolism of environmental chemicals: a comparison of plant and liver enzyme systems. En: E. J. Klekowski Jr. (Ed.) *Environmental, mutagenic, carcinogenic and plant biology*. Praeger Scientific, Nueva York, Vol 1, pp. 1 - 32.
- Sandermann H. (1988) Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.* 197: 183 - 194.
- Sandermann H., Arjmand M., Gennity Y. y Winkler R. (1990) Animal bioavailability of defined xenobiotic lignin metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1877 - 1880.
- Sandermann H. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* 17: 18 - 84.
- Sandermann H., Musick T. J. y Aschbacher P. W. (1992) Animal bioavailability of a 3,4-dichloroaniline-lignin metabolite fraction from wheat. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1877 - 1880.
- Sax N. I. y Lewis R. J. (1989) *Dangerous properties of industrial Materials*. Van Nostrand Reinhold, Melbourne.
- Scott B. R., Sparrow A. H., Schwemmer S. S. y Schairer L. A. (1978) Plant activation of 1,2-dibromoethane (EDB) to a mutagen of greater potency. *Mutat. Res.* 49: 203 - 212.
- Scheid W. (1976) Mechanism of differential staining of BrdU-substituted *Vicia faba* chromosomes. *Exp. Cell Res.* 101: 55 - 58.
- Schröder G. (1963) Die Entwicklung neuer insektizider phosphorsäure-ester. En: A. S. Perry, I. Yamamoto, I. Ishaaya y R. Perry (Eds.) *Insecticides in agriculture and environment retrospects and prospects*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 52 - 65.
- Schulte-Frohlinde D. y Sonntag C. V. (1985) Radiolysis of DNA and model systems in the presence of oxygen. En: H. Sies (Ed.) *Oxidative stress*. Academic Press, Nueva York, pp. 11 - 40.

- Schwartzman J. B. (1987) Sister chromatid exchanges in higher plant cells: past and perspectives. *Mutat. Res.* **181**: 127 - 147.
- SEMARNAP (Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca) (1997) Estadísticas del medio ambiente. México. Capítulo 3: 268 - 272, 312 - 319.
- Shimabukuro R. H., Lamoreux G. L. y Frear F. S. (1982) Pesticide metabolism in plants reactions and mechanisms. En: F. Matsumura y K. Murti (Eds.) *Biodegradation of pesticides*. Plenum Press, Nueva York, pp. 21 - 66.
- Shirasu Y., Moriya M., Kato K., Furuhashi A. y Kada T. (1976) Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutat. Res.* **40**: 19 - 30.
- Simmon V. F., Poole D. C. y Newel G.W. (1976) *In vitro* mutagenic studies of twenty pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **37**: 109.
- Singer B. y Kusmierek J. T. (1982) Chemical mutagenesis. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 655 - 693.
- Sultatos L. G. (1994) Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health* **43**: 271 - 289.
- Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. (1982) Induction of SCEs in CHO cells by extracts from *Vicia faba* roots exposed to ethanol. *Mutat. Res.* **105**: 169 - 174.
- Takehisa S. y Kanaya N. (1983) A comparison of *Vicia faba* roots S10 and rat liver S9 activation of ethanol, maleic hydrazide and cyclophosphamide as measured by sister chromatid exchange induction in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **124**: 145 - 151.
- Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. (1988) Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on the induction of sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **197**: 195 - 205.
- Vigfusson N. V., Vyse E. R., Pernsteiner C. A. y Dawson R. J. (1983) *In vitro* induction of sister-chromatid exchanges in *Umbra limi* by the insecticides endrin, chlordane, diazinon and guthion. *Mutat. Res.* **118**: 61 - 68.
- Waring M. J. (1981) DNA modification and cancer. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 159 - 192.
- Wild D. (1975) Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutat. Res.* **32**: 133 - 150.

- Williams R. T. (1959) Detoxication mechanism: the metabolism and detoxication of drugs.
En: *Toxic substances and other organic compounds*. Chapman y Hall, Londres.
- Wing K. D., Glickman A. H. y Casida J. E. (1982) Oxidative bioactivation of S- alkyl phosphonothiolate pesticides: stereospecificity of profenofos insecticide activation.
Science **219**: 63 – 65.
- Wooder M. F. y Wright A. S. (1981) Alkylation of DNA by organophosphorus pesticides.
Acta Pharmacol. Toxicol. **48**: 51 – 55.

TABLA I. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR METIL AZINFOS EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO SIN LA ACTIVACIÓN METABÓLICA DE *Vicia faba*^a.
(Tomado de Gómez-Arroyo *et al.* 1987)

	^b ± E. E. ^c
Testigo negativo	5.38 ± 0.18
Cultivo de linfocitos tratamientos directos con Metil Azinfos	
ppm	
2	6.28 ± 0.32
4	6.22 ± 0.27
8	7.00 ± 0.31
10	5.66 ± 0.21
20	6.24 ± 0.25
30	6.44 ± 0.24

^a Promedio de dos experimentos.

^b n = 50 metafases.

^c E. E. = Error estándar.

No se obtuvieron diferencias significativas al aplicar la "t" de Student, $p < 0.001$.

TABLA II. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR METIL AZINFOS EN *Vicia faba*^a.
(Tomado de Gómez-Arroyo *et al.* 1988)

	$\bar{x}^b \pm E. E.^c$
Testigo negativo	30.90 \pm 0.64
Tratamientos con Metil Azinfos (ppm)	
0.5	42.96* \pm 0.85
1.0	37.72* \pm 0.75
2.0	38.90* \pm 0.69

^a Promedio de dos experimentos.

^b n = 50 metafases.

^c E. E. = Error estándar.

*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamientos con la prueba de "t" de Student, $p < 0.001$.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

TABLA III. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR METIL AZINFOS EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO CON LA ACTIVACIÓN METABÓLICA DE *Vicia faba in vivo*^a.

	$\bar{x}^b \pm E. E.^c$
Testigo negativo	5.20 \pm 0.22
Etanol 3600 ppm (1 x 10 ⁻¹ M)	4.82 \pm 0.19
Testigo negativo cultivo de linfocitos + extractos de <i>Vicia faba</i> sin tratamientos	6.00 \pm 0.21
Testigo positivo cultivo de linfocitos + extractos de <i>Vicia faba</i> con Etanol 3600 ppm	9.00* \pm 0.37
Cultivo de linfocitos + extractos de <i>Vicia faba</i> y tratamientos <i>in vivo</i> con Metil Azinfos ppm	
10	6.18 \pm 0.25
20	9.50* \pm 0.30
25	10.24* \pm 0.33
30	9.04* \pm 0.40
40	Inhibición de la mitosis

^a Promedio de dos experimentos.

^b n = 50 metafases.

^c E. E. = Error estándar.

*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamientos con la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls F = 56.24, el valor de p < 0.0001.

TABLA IV. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR METIL AZINFOS EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO CON LA ACTIVACIÓN METABÓLICA DE *Vicia faba in vitro*^a.

	$\bar{x}^b \pm E. E.^c$
Testigo negativo	4.82 \pm 0.21
Etolol 3600 ppm (1 x 10 ⁻¹ M)	4.56 \pm 0.23
Testigo negativo cultivo de linfocitos + S10 de <i>Vicia faba</i> sin tratamientos	5.28 \pm 0.20
Testigo positivo cultivo de linfocitos + S10 de <i>Vicia faba</i> + Etolol 3600 ppm	9.12* \pm 0.35
Cultivo de linfocitos + S10 y tratamientos <i>in vitro</i> con Metil Azinfos ppm	
2	5.64 \pm 0.23
4	5.16 \pm 0.17
8	7.16* \pm 0.31
10	7.18* \pm 0.31
20	8.70* \pm 0.26
30	9.04* \pm 0.38
40	Inhibición de la mitosis

^a Promedio de dos experimentos.

^b n = 50 metafases.

^c E. E. = Error estándar.

*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamientos con la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls F = 41.72, el valor de p < 0.0001.

TABLA V. FRECUENCIA DE CÉLULAS DE PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES E INDICES DE REPLICACIÓN Y MITÓTICO DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO TRATADOS CON METIL AZINFOS CON LA ACTIVACIÓN METABÓLICA DE *Vicia faba in vivo*^a.

	M1	M2	M3	IR ^b	IM ^c
Testigo negativo	45	34	21	1.76	1.10
Etanol 3600 ppm (1 x 10 ⁻¹ M)	37	33	30	1.93	1.10
Testigo negativo cultivo de linfocitos+ extractos de <i>Vicia faba</i> sin tratamientos	43	33	24	1.82	1.10
Testigo positivo cultivo de linfocitos + extractos de <i>Vicia faba</i> con etanol 3600 ppm	33*	36	31	1.99	1.24
Cultivo de linfocitos tratamientos <i>in vivo</i> con Metil Azinfos					
ppm					
10	52	31	17	1.66	1.23
20	49	27	24	1.75	1.31
25	45	30	25	1.79	1.14
30	No se completaron las metafases				
40	Inhibición de la mitosis				

^a Promedio de dos experimentos.

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

^c Índice Mitótico, n = 2000 células.

* Se encontraron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento con la prueba de χ^2 , p < 0.05.

TABLA VI. FRECUENCIA DE CÉLULAS DE PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES E ÍNDICES DE REPLICACIÓN Y MITÓTICO DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO TRATADOS CON METIL AZINFOS CON LA ACTIVACIÓN METABÓLICA DE *Vicia faba in vitro*^a.

	M1	M2	M3	IR ^b	IM ^c
Testigo negativo	32	34	34	2.01	3.75
Etanol 3600 ppm (1 x 10 ⁻¹ M)	33	38	29	1.96	3.15
Testigo negativo cultivo de linfocitos + S10 de <i>Vicia faba</i> sin tratamientos	28	33	39	2.11	3.70
Testigo positivo cultivo de linfocitos + S10 de <i>Vicia faba</i> + etanol 3600 ppm	17*	38	45	2.28	3.35
Cultivo de linfocitos + S10 tratamientos <i>in vitro</i> con Metil Azinfos					
ppm					
2	36	28	36	2.00	3.10
4	43	35	22*	1.79	2.55
8	46*	30	24*	1.78	1.95
10	49*	30	21*	1.72	1.95
20	51*	28*	21*	1.70	1.45
30	No se completaron las metafases				
40	Inhibición de la mitosis				

^a Promedio de dos experimentos.

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

^c Índice Mitótico, n = 2000 células.

* Se encontraron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento con la prueba de χ^2 , p < 0.05.

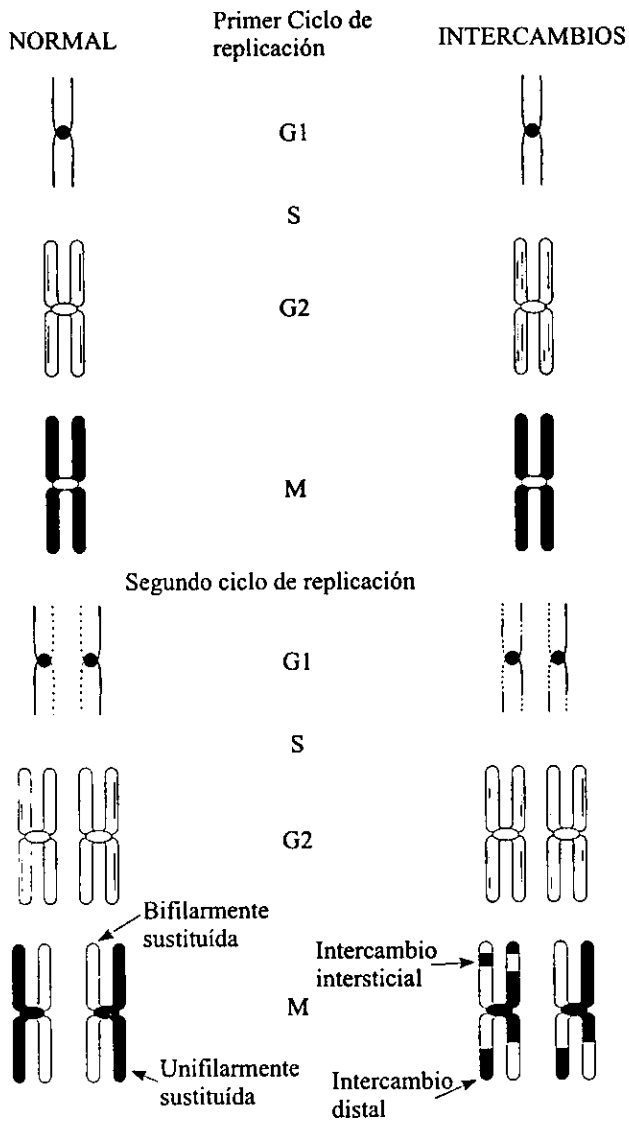


Figura 1.5. Mecanismo de la formación de intercambios de cromátidas hermanas incluyendo a la replicación cromosómica y a la incorporación de la 5-bromodesoxiuridina, durante dos ciclos de división celular.