

14 00381



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

*REGULACION DE LA ACTIVACION VEGETAL DE  
INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y AMINAS  
AROMATICAS EN PRESENCIA DE EXTRACTOS  
VEGETALES. Relación entre mutagenicidad y  
antimutagenicidad.*

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

**P R E S E N T A**

**JOSEFINA CORTES ESLAVA**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. SANDRA GOMEZ ARROYO**

**MEXICO, D. F.**

**2002**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

"La ambición verdadera es el deseo intenso de vivir  
útilmente"...

A mi esposo

Antonio Mata Mendoza

Por el amor manifestado, imprescindible para la  
conclusión de este trabajo

A la memoria de mi padre

Antonio Cortés Hernández†

Por el ejemplo de su empeño en aspirar siempre, a ser  
mejor en la vida

A mi madre

Ma. Guadalupe Eslava Romero

Por su dedicación, esfuerzo y amor para formar hijos útiles  
y felices

A mis hermanos

Rogelio  
Ubaldo Antonio  
Blanca Esthela  
Jorge  
Rodolfo  
Marco Antonio  
Javier  
Tomás

Por su apoyo incondicional en los momentos difíciles

A mis sobrinos (as ) y sobrinos(as) nietos(as)

Por la felicidad y esperanza que dan a mi vida

Este trabajo se realizó en

Laboratorio de Citogenética Ambiental  
del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM

con un soporte económico del Programa PADEP-TESIS DOCTORAL  
(003354)

y con apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico  
(DGAPA) con una beca otorgada durante el desarrollo de la investigación

Agradezco particularmente a la Universidad Nacional Autónoma de  
México, por la oportunidad de facilitarme una superación profesional  
continua

Un agradecimiento especial por todas las manifestaciones de amistad recibidas de parte de todo el personal de los Laboratorios de Citogenética y Mutagénesis Ambientales del Centro de Ciencias de la Atmósfera, en especial a Ana y Miguel y también a mis amigos que no laboran conmigo, pero que fueron un factor de apoyo y guía, en los momentos decisivos

Mi más sincero agradecimiento a la

Dra. Sandra Gómez Arroyo

por la dirección y el apoyo brindado durante la realización de esta  
investigación



Agradezco a mis sinodales por sus valiosas sugerencias en la revisión de este trabajo

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Dra Sandra Luz Gómez Arroyo

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Dr. Stefan Marijan Waliszewski Kubiak

Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón

Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana

# INDICE

	CONTENIDO	PAGINA
	<b>Resumen</b>	1
<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	4
<b>2.</b>	<b>Antecedentes</b>	7
2.1	Metabolismo vegetal de agentes xenobióticos	7
2.2	Mutagénesis y antimutagénesis	10
2.3	Actividad antimutagénica de la clorofilina y productos vegetales	13
2.4	Sistemas biológicos de prueba	14
	2.4.1 Ensayo de Ames	15
	2.4.2 Cocultivo célula vegetal/microorganismo	17
2.5	Plaguicidas	19
	2.5.1 Antecedentes históricos	19
	2.5.2 Toxicología	21
	2.5.3 Clasificación de insecticidas	22
	2.5.3.1 Efectos genotóxicos del Dimetoato (Folimat)	25
	2.5.3.2 Efectos genotóxicos del Paratión metílico (Folidol)	26
	2.5.3.3 Metabolismo de insecticidas	27
2.6	Aminas aromáticas	29
	2.6.1 Efectos genotóxicos de la 4-nitro- <i>o</i> -fenilendiamina (NOP)	30
	2.6.2 Efectos genotóxicos de la <i>m</i> -fenilendiamina ( <i>m</i> -PDA)	31
	2.6.3 Efectos genotóxicos del 2-aminofluoreno (2-AF)	33
<b>3.</b>	<b>Objetivos</b>	34
<b>4.</b>	<b>Hipótesis</b>	35
<b>5.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	36
5.1	Obtención de cultivos celulares de cilantro ( <i>Coriandrum sativum</i> )	36
5.2	Preparación de las bacterias y medios para tratamiento	36
5.3	Cocultivo-ensayo de mutagenicidad	37
5.4	Siembra en cajas	38
5.5	Cocultivo-ensayo de antimutagenicidad	38
5.6	Obtención de extractos	39
5.7	Determinación del contenido de proteínas por el método Bio-Rad	39
5.8	Determinación de actividad de peroxidasa	41
5.9	Inhibición de la actividad de peroxidasa	42
5.10	Inhibición de la mutagenicidad inducida por los metabolitos de la <i>m</i> PDA	42
5.11	Determinación del contenido de clorofila en los extractos vegeles	43

5.12	Evaluación de los datos	43
<b>6.</b>	<b>Resultados</b>	<b>44</b>
6.1	Obtención de cultivos celulares de cilantro	44
6.2	Cocultivo-ensayo de mutagenicidad	44
6.3	Cocultivo-ensayo de antimutagenicidad	45
6.4	Determinación del contenido de proteínas	47
6.5	Determinación de la actividad de peroxidasa	47
6.6	Determinación del contenido de clorofila	47
6.7	Inhibición de la actividad de peroxidasa	48
6.8	Inhibición de la mutagenicidad inducida por los metabolitos de la <i>m</i> PDA	48
<b>7.</b>	<b>Discusión</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>61</b>
<b>9.</b>	<b>Referencias</b>	<b>62</b>
<b>10.</b>	<b>Tablas</b>	<b>79</b>
<b>11</b>	<b>Figuras</b>	<b>89</b>

## RESUMEN

En este estudio se analizó la participación del metabolismo vegetal en la transformación de los insecticidas Dimetoato (Folimat) y Paratión metílico (Folidol) y de las aminas aromáticas 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP), *m*-fenilendiamina (*m*PDPA) y 2-aminofloreno (2AF) mediante el método de cocultivo, empleando a las células de cilantro (*Coriandrum sativum*) como sistema activador y a la bacteria *Salmonella typhimurium* cepa TA98 como organismo evaluador del efecto genético.

Para el cocultivo se agregaron a la suspensión con células de *Coriandrum*, concentraciones crecientes de los insecticidas o de las anilinas. Se colocó paralelamente un lote con medio de cultivo sin células en suspensión, otro con células muertas por calor y uno más con amortiguador de fosfatos, que fueron los testigos negativos. En 2 ml de agar de superficie se aplicaron 250 µl del contenido de cada uno de los frascos de cocultivo, se homogeneizaron con vórtex, se sembraron en cajas de agar mínimo y se analizó la reversión inducida.

Mediante la técnica del guayacol, se determinó la actividad de peroxidasa, previo análisis del contenido de proteínas de los cultivos celulares después de la incubación. Se evaluó la inhibición de la misma inducida por el dietilditiocarbamato (DEDTC) y la influencia de este inhibidor sobre la mutagenicidad inducida por los metabolitos de la anilina *m*-fenilendiamina (*m*PDPA).

Se analizó el efecto de extractos de cilantro crudo sobre la mutación revertante inducida por los metabolitos de los insecticidas y las aminas. Para este estudio de antimutagenicidad, se obtuvieron extractos acuosos de plantas frescas de cilantro y se agregaron volúmenes crecientes en cada frasco de cocultivo, como testigo positivo se empleó clorofilina, un antimutágeno conocido. También se probó el efecto de 1000  $\mu$ l/frasco de cocultivo del extracto, sobre la mutagenicidad inducida por los insecticidas Folimat y Folidol.

Los resultados muestran la capacidad de las células de cilantro en cultivo para disminuir la toxicidad de los insecticidas y expresar mutagenicidad con estos compuestos organofosforados en *S. typhimurium*. Asimismo, el metabolismo del cilantro fue capaz de metabolizar a las anilinas NOP, mPDA y 2-AF provocando un incremento significativo en la reversión espontánea de *Salmonella* conforme se elevó la concentración.

La actividad de peroxidasa de los cultivos celulares después de cocultivarlos con los insecticidas o con las aminas aromáticas, disminuyó en el caso de los primeros conforme aumentó la concentración, mientras que en las aminas, la actividad no sufre modificación aún en las concentraciones más altas. Al evaluar el DEDTC, disminuyó la actividad de peroxidasa conforme se incrementó la concentración y provocó un decremento hasta del 95% en la mutagenicidad inducida por los metabolitos de la mPDA.

Los extractos de cilantro no tuvieron efectos adversos sobre la viabilidad de las células bacterianas ni de las células vegetales, fueron capaces de disminuir la

mutagenicidad producida por los metabolitos de ambos insecticidas hasta valores cercanos al testigo. Cuando se probaron sobre la concentración mayor de las tres aminas metabolizadas, el efecto antimutagénico fue muy claro. Al aumentar el volumen de extracto agregado la mutagenicidad descendió, con la NOP hasta el 83.2 %, con la *m*PDAs 86.56 % y con el 2AF el 92.35 %. La clorofilina indujo una reducción del 91.7 %.

En los tratamientos con los insecticidas, la actividad de peroxidasa y el contenido de proteínas de los cultivos celulares, disminuyeron al final del cocultivo lo que explica la escasa activación metabólica y su consecuentemente bajo efecto mutagénico. En el caso de las anilinas, los extractos de cilantro, inhibieron la mutagenicidad sin alterar la actividad de la peroxidasa vegetal ni el contenido de proteínas, esto sugiere que el efecto antimutagénico no es por interferencia con el aparato enzimático sino más bien con los grupos activos de los compuestos o con sus metabolitos.

La correlación entre el efecto del extracto de cilantro como antimutágeno y el de la clorofilina frente a las aminas aromáticas permite inferir, que el mecanismo involucrado es similar.

## 1. INTRODUCCIÓN

La gran cantidad y la enorme variedad de sustancias de uso diario dispersas en el planeta como consecuencia de la actividad del ser humano y que se depositan en agua, suelo y aire afectan seriamente al ambiente. Muchos avances de la ciencia y de la tecnología que evidencian el progreso de la humanidad y que buscan mejorar la vida en todos los aspectos ya sea en el descubrimiento y la cura de enfermedades, en proporcionar un mayor confort, en incrementar la productividad, en mejorar la alimentación, la educación o la organización social o política, involucran en su proceso la generación de diversos productos químicos sintéticos que pasan a formar parte del ambiente y que pueden representar un riesgo potencial para la salud humana (Litterst y Lichtenstein 1971).

Diversas actividades cotidianas implican cierto riesgo para la salud por implicar el contacto con factores genotóxicos presentes en el aire que se respira, el agua que se bebe, los alimentos que se ingieren y que puedan estar contaminados con sustancias tóxicas, los fármacos administrados, los cosméticos, los productos de limpieza e higiene personal, etc. Independientemente, algunos factores propios del estilo de vida como: exposiciones laborales, forma de transportación, hábitos de fumar, de ingestión de bebidas alcohólicas, de comer grandes cantidades de grasas o alimentos industrializados, entre otros, representan en mayor o menor grado un factor de riesgo.

Ames (1983) ha planteado la posibilidad de que los cambios recientes en el estilo de vida y la contaminación en ciudades industrializadas constituyan riesgos de cáncer en el futuro y apunta que algunos elementos determinantes de los peligros comunes que están por descubrirse entre aspectos de nuestra forma de vida y que

tendrán que ser establecidos a largo plazo. Es importante evaluar el riesgo de las sustancias sintéticas frente a las que provienen de fuentes naturales para establecer prioridades (Ames 1989).

Los estudios epidemiológicos indican que las prácticas dietéticas constituyen una área muy prometedora para explorar, sugiriendo que sería recomendable incrementar el consumo general de cereales ricos en fibra, de vegetales y de frutas, así como disminuir la ingestión de productos ricos en grasas y alcoholes (Doll y Peto 1981).

Es poca la evidencia que existe sobre los componentes de la dieta que son críticos para el hombre y acerca también de sus mecanismos de acción. Los estudios de laboratorio referentes a productos embutidos y a comida cocinada han detectado una extraordinaria variedad de mutágenos y posibles carcinógenos pero también de antimutágenos y anticarcinógenos (Ames 1983).

Los vegetales en la naturaleza sintetizan sustancias tóxicas en grandes cantidades, aparentemente como una defensa primaria contra el ataque de bacterias, hongos, insectos y otros animales (Miller *et al.* 1979). Asimismo, los vegetales incrementan notablemente sus niveles naturales de toxinas frente a situaciones "estresantes" como el frío exagerado ("helada"), las "magulladuras" o "machucaduras" que sufren, etc. (Ames 1989). Las plantas que se incluyen en la dieta humana no son la excepción, la amplia variedad de agentes químicos tóxicos contenidos en ellas es tan importante que se han venido caracterizando por más de cien años y aún se siguen descubriendo nuevos compuestos, los estudios toxicológicos realizados abarcan a sólo un pequeño porcentaje de ellos.



La biomasa vegetal global es de aproximadamente el 95 % de la biota viva en el planeta (Woodwell *et al.* 1978), ésta puede servir como vertedero de los productos tóxicos ambientales. Así, las plantas pueden jugar un papel importante en la modificación, la distribución y la posible re-exposición a este tipo de compuestos. Las plantas pueden metabolizar muchos xenobióticos por oxidación y conjugación y compartimentalizar estos productos en sus tejidos. (Lamoreaux y Rusness 1986). El impacto ambiental de los metabolitos vegetales de xenobióticos y la función de la biomasa vegetal global como vertedero, puede tener importancia en la toxicología ambiental (Plewa y Gentile 1982, Sandermann *et al.* 1992).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Metabolismo vegetal de agentes xenobióticos

La capacidad de las plantas para metabolizar agentes químicos extraños, entre los que están incluidos los pesticidas, se ha demostrado hace años (Plewa y Gentile 1976). Desde entonces, este aspecto ha constituido un motivo de interés y de preocupación para numerosos investigadores, lo que es comprensible si se considera el amplio espectro de agentes químicos y la magnitud de su uso en la agricultura moderna, ellos al ponerse en contacto directo con las plantas pueden absorberse y modificarse metabólicamente, dando lugar en ocasiones a productos mutagénicos. Si estos compuestos son estables, posiblemente son incorporados a la dieta humana y pueden implicar un riesgo de daño genético (Gichner *et al.* 1993).

Existen algunas diferencias que deben considerarse al hacer estudios sobre el metabolismo de xenobióticos en plantas y en animales. La vía de administración de un agente químico ya sea oral o inyectado se puede controlar en los animales, mientras que en las plantas los tratamientos son por aplicación en hojas o raíz, éstas no poseen una circulación bien definida para distribuir los agentes químicos como sucede en el cuerpo de un animal. En las plantas no existe un órgano determinado que transforme metabólicamente a los xenobióticos como es el caso del hígado en los mamíferos. Finalmente, las plantas no tienen un sistema excretor establecido, la remoción de sustancias indeseables ocurre formando vacuolas o incorporándolas por biosíntesis en polímeros estructurales como la lignina (Higashi 1988).

En células de mamífero, salvo raras reacciones de conjugación, el metabolismo procede por oxidaciones catalizadas por uno o dos electrones, por

ejemplo: el sistema del citocromo P-450 ó de la prostaglandina H sintetasa. Los reactivos intermedios formados son electrófilos o radicales (especies reactivas de oxígeno) ( Sandermann 1988) (Fig. 1)

Mientras que en animales los sistemas del citocromo P-450 son de importancia central en el metabolismo y en la activación mutagénica de xenobióticos, las modalidades vegetales del citocromo P-450 parecen actuar sólo en casos excepcionales como el de algunos herbicidas uréicos (N,N-dimetil fenil urea) (Sandermann 1988). Las plantas superiores metabolizan los compuestos extraños por diversos mecanismos incluyendo oxidación, hidrólisis, conjugación y ocasionalmente reducción. Se han determinado algunos tipos de reacciones reductoras en el metabolismo de xenobióticos en plantas como la arilnitrorreducción dependiente de FAD- y NADP-. La hidrólisis, catalizada por varias hidroxilasas, estererasas, amidasas o-alquilhidroxilasas, etc., representa un mecanismo de degradación usual de xenobióticos en animales, microorganismos y plantas (Menn 1978, Shimabukuro *et al.* 1982). La hidrólisis, es el paso que determina la tasa de tolerancia selectiva de diferentes especies vegetales contra algunos tipos de herbicidas.

La conjugación es la reacción de sustratos endógenos con los productos del metabolismo de xenobióticos formados por los sistemas de fase I (Lamoreux y Rusness 1986), en el caso de xenobióticos no polares, este mecanismo conduce a la formación de productos hidrofílicos que son eliminados fácilmente de los organismos. En los vegetales, los productos más comunes de esta reacción son los glucósidos (conjugación con glucosa), conjugados de glutatión y conjugados de aminoácidos (Shimabukuro *et al.* 1982). Las especies conjugadas primariamente, facilitan su excreción en los animales y su inmovilización en las plantas.

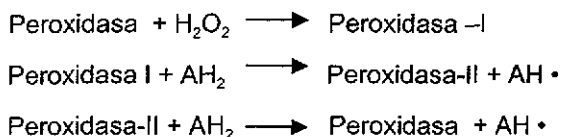
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Una reacción de desintoxicación importante en plantas es la conjugación con glutatión reducido (GSH) catalizada por las GSH transferasas. El glutatión forma conjugados con muchos tipos de pesticidas, por ejemplo la conjugación de atrazina con glutatión, parece ser el principal mecanismo de desintoxicación en especies resistentes como el maíz y el sorgo (Lamoreux y Rusness 1981, Shimabukuro *et al.* 1982).

A diferencia de los animales muchas de las enzimas que conducen a la transformación metabólica en vegetales se localizan fuera del núcleo ya sea en el citoplasma, en el retículo endoplásmico o en la pared celular (Higashi 1988) (Fig 2).

Puesto que las vías metabólicas de los vegetales son muy diferentes a las de los animales), pueden también cambiar los productos del metabolismo (Menn 1978) . Por ejemplo el fungicida tialbendazol, es convertido a 5-hidroxitialbendazol en animales mientras que en las plantas lo es a benzimidazol o benzimidazol-2-carboxamida (Sandermann 1988). El paratión, se transforma en paraoxón en presencia del citocromo P-450 de hígado de rata o conejo, en contraste cuando se aplica a las raíces de haba las cantidades de paraoxón son menores al 1 % de los niveles de paratión (Higashi 1988).

Las enzimas peroxidadas son ubicuas en el reino vegetal. Pueden catalizar reacciones de N- ó C-hidroxilación, N-sulfoxidación, N-acetilación, halogenación , deshalogenación o descarboxilación (Sandermann 1988). Las reacciones peroxidantes proceden normalmente como sigue:



2AH • → Productos

Donde la peroxidasa-I se designa con  $Fe O^{3*}$ , la peroxidasa-II como  $Fe O^{2*}$ , el  $H_2O_2$  como sustrato astringente para la peroxidasa y la  $AH_2$  es un sustrato no específico que funciona como donador de hidrógeno (Higashi 1988).

El dietil ditiocarbamato (DEDTC) ha sido utilizado como un excelente inhibidor de la activación del 2-aminofluoreno y de la m-fenilendiamina por células de tabaco (Wagner *et al.* 1989, 1990, Plewa *et al.* 1991). Este compuesto suprime la activación vegetal de diversos promutágenos por *Arabidopsis* y *Tradescantia* (Gichner y Veleminsky 1984, Gichner *et al.* 1988) El DEDTC es un agente quelante de metales, e inhibidor de la superóxido dismutasa (Heikkila 1985). Dependiendo de su mecanismo de acción, puede tener efecto tóxico o protector, también actúa como eficiente atrapador de radicales libres e inhibidor de la lipo-peroxidación (Lutz *et al.* 1973, Zanocco *et al.* 1989). Plewa *et al.* (1991) notaron la reducción significativa de la actividad de peroxidasa dependiente de la concentración de DEDTC agregado a homogeneizados de células TXI de tabaco, confirmando así que el éste pudo inhibir específicamente a las peroxidasas de las células TXI en condiciones *in vitro*.

## 2.2 Mutagénesis y antimutagénesis

Ames (1983) menciona que la dieta humana contiene gran cantidad de mutágenos y carcinógenos naturales, así como muchos antimutágenos y anticarcinógenos. Si a esta ingesta se le agrega la de productos que al ser transformados por las plantas se toman mutagénicos, el riesgo se incrementa. Así, la activación de promutágenos a mutágenos constituye un evento crítico en la mutagénesis ambiental

Es posible definir a un mutágeno ambiental como un agente físico o químico liberado al ambiente que puede alterar el genoma o sus propiedades funcionales. Un mutágeno directo es aquel que por sí mismo puede ser capaz de provocar alteraciones al material genético, mientras que un promutágeno o mutágeno indirecto es un agente químico que no siendo mutagénico, puede ser biotransformado a mutágeno (Plewa y Gentile 1982).

La mutagénesis es un fenómeno definido, mientras que la carcinogénesis es un proceso complejo de múltiples pasos, dentro del cual se pueden distinguir la iniciación y la promoción, la primera posiblemente sea sinónimo de mutación, pero la naturaleza de la promoción no está totalmente comprendida. Los inhibidores de la carcinogénesis involucrarían aquellos que actúan ya sea en la iniciación o en la promoción (Hayatsu *et al.* 1988). Muchos de los experimentos sobre antimutagénesis se han llevado a cabo en bacterias y obviamente hay un espacio grande entre estos hallazgos y su relevancia en la inhibición de la carcinogénesis.

Afortunadamente existen también en la naturaleza muchos mecanismos de protección contra mutágenos y carcinógenos, entre los que se encuentran el continuo desprendimiento de las células de la capa superficial de la piel, del estómago, de la córnea, de los intestinos y de colon. Entre las defensas más importantes pueden estar aquellas contra los radicales libres y la lipo-peroxidación que contribuyen al daño provocado en el ADN. Una gran variedad de pequeñas moléculas incluidas en la dieta humana son empleadas por el organismo en mecanismos antioxidantes y parecen tener actividad antimutagénica y anticarcinogénica por ejemplo: la vitamina E (tocoferol), el  $\beta$ -caroteno, el selenio, el glutatión, el ácido ascórbico, el ácido úrico, los fenoles (Ames 1983), la clorofila, las clorofilinas y otras proteínas con grupo hemo como la hemoglobina y las

peroxidasas, los pigmentos biliares bilirrubina y biliverdina, que son productos de degradación del grupo hemo, el complejo hemino y sus derivados, hemoproteínas como la mioglobina, hemoglobina y el citocromo C, el ácido oléico, la vitamina A, algunos taninos y flavonoides, otros compuestos fenólicos como el ácido gálico, aminas biológicas como la serotonina y la triptamina, etc. (Hayatsu *et al.* 1988).

Todos aquellos inhibidores dietéticos de mutagénesis son de importancia particular ya que pueden ser de utilidad en la prevención del cáncer. Diferentes inhibidores de mutaciones han mostrado serlo también de cáncer por ejemplo los ácidos elágico y palmitoléico y la N-acetil cisteína (Hayatsu *et al.* 1988). La acción antimutagénica de muchos agentes se ha detectado usando ensayos a corto plazo como es la prueba de Ames en *Salmonella*. Dichos sistemas *in vitro* son ideales para la elucidación de los mecanismos de inhibición (Hayatsu *et al.* 1988).

El termino antimutágeno es usado para describir un agente que reduce la cantidad de mutaciones espontáneas o inducidas generadas en circunstancias particulares (Bronzetti 1990). Los antimutágenos pueden clasificarse como desmutágenos y bio-antimutágenos, dependiendo de su mecanismo de acción (Kada *et al.* 1982). Los primeros exhiben su antimutagenicidad por inactivación de los mutágenos o de sus precursores, por inhibición de la actividad de las enzimas metabólicas, o evitando que el mutágeno final interactue con el ADN. En contraste, los últimos, reducen los efectos de los mutágenos por modulación de los cambios celulares involucrados en la reparación del daño al ADN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 2.3 Actividad antimutagénica de la clorofilina y otros productos vegetales

Entre los productos de origen vegetal que presentan actividad antimutagénica se encuentran las porfirinas, tanto la clorofila como su cromóforo la clorofilina (Hayatsu *et al.* 1988). Este compuesto es un derivado estable de la clorofila, de fácil manejo y de toxicidad baja o nula que posee capacidad antimutagénica contra *diversos compuestos mutágenos y carcinógenos tanto de acción directa como indirecta* (Ong *et al.* 1986). Su estructura química es un anillo tetrapirrólico que contiene puentes dobles conjugados y un metal en el centro (Newmark 1987) (Fig. 3). Es un pigmento semejante a la hemina, biliverdina y protoporfirina, incluso su estructura es similar a la del grupo hemo que tiene estructura de porfirina con un Mg al centro y una porción hidrofóbica. Estas sales de color verde-azul oscuro son muy solubles en agua y en alcohol. El espectro infrarrojo de la clorofilina muestra ausencia del grupo carbonilo y del anillo ciclopentano (presente en la clorofila), sin embargo, en el espectro de absorción visible se notan características en común con la clorofila (Oster *et al.* 1964). El alto grado de resonancia y la deslocalización de electrones en la molécula de clorofilina, sugieren que puede ser un capturador efectivo de radicales libres (Simic 1988).

Debido a que las plantas verdes contienen clorofila en grandes cantidades, el interés en estudiar su papel como un antimutágeno-anticarcinógeno potencial se ha estimulado en los últimos años. Lai *et al.* (1980) evidencian una correlación positiva entre el contenido de clorofila de ciertos vegetales y su actividad antimutagénica frente al 3-metil colantreno.



Diferentes autores describen la función protectora de la clorofilina contra la acción de algunos agentes químicos (cromo) en ratones albinos (Sarkar *et al.* 1993) y físicos (rayos gamma) en ratones (Morales-Ramírez y García-Rodríguez 1994).

Villaseñor y Edu (1993) extraen con etanol un principio antimutagénico de las hojas de *Carmona retusa* y muestran la reducción del 68.4% en la cantidad de eritrocitos policromáticos inducidos por tetraciclina en ratones albinos. Asimismo, se ha mencionado que la vitamina C administrada simultáneamente con pesticidas disminuye significativamente el daño clastogénico y los cambios que perturban la mitosis, inducidos por estos compuestos en células de médula ósea de ratón albino suizo. Morita *et al.* (1978) encontraron factores antimutagénicos en varias verduras y frutas. Grover y Bala (1993) demuestran que los extractos de guayaba son efectivos para inactivar la mutagenicidad de sustancias que actúan directamente como la 4-nitro-*o*-fenilendiamina, la azida de sodio y el 2-aminofluoreno, mutágeno dependiente de la activación por la S9 en *S. typhimurium*.

Estudios realizados por Lahiri *et al.* (1993) sugieren que el  $\beta$ -caroteno y el  $\alpha$ -tocoferol protegen contra el daño provocado por benzo(a)pireno en médula ósea de ratón, también se ha descrito efecto anticlastógeno del  $\beta$ -caroteno en células de hepatoma humano (Salvadori *et al.* 1993) y del daño causado por los rayos gamma en ratón albino suizo (Abraham *et al.* 1993).

## **2.4 Sistemas biológicos de prueba**

El daño que pueden producir diversas sustancias al material genético mediante la inducción de mutaciones, es uno de los riesgos toxicológicos que no se ha valorado suficientemente, a pesar de su repercusión en la salud de los individuos

afectados. En virtud de que es importante conocer el comportamiento de este tipo de compuestos y debido a que, por razones éticas no es posible realizar la experimentación directa con el hombre y en vista de que los bioensayos con mamíferos para demostrar genotoxicidad son sumamente caros (deKergommeaux *et al.* 1983), la posibilidad de detectar compuestos mutagénicos presentes en el ambiente se ha facilitado por el establecimiento de sistemas de prueba rápidos, tales como el bioensayo desarrollado por Ames *et al.* (1975). Éste tiene su propósito de semejar la biotransformación que puede ocurrir en animales cuando ingieren esos agentes químicos, incorporando un sistema *in vitro* de activación metabólica animal (S9) (Maron y Ames 1983).

Un interés particular con respecto al papel que el metabolismo vegetal puede tener en la mutagénesis ambiental, se debe a que muchos cultivos agrícolas son tratados con pesticidas y posteriormente son consumidos por el hombre.

#### **2.4.1 Ensayo de Ames**

Uno de los microorganismos más usados en ensayos de mutagenicidad es la bacteria *Salmonella typhimurium*, una cantidad importante de compuestos detectados como mutagénicos en este organismo, posteriormente han mostrado ser carcinogénicos en animales experimentales. En el ensayo de Ames, se utiliza un conjunto de cepas con requerimiento de histidina, además de que contienen otras mutaciones que incrementan su capacidad para detectar mutágenos. La mutación *rfa* altera la barrera de lipo-polisacáridos de la superficie bacteriana y aumenta su permeabilidad a moléculas grandes tales como el benzo(a)pireno que no penetra la pared normal de una célula (Ames *et al.* 1973). Otra mutación (*uvrB*) es la delección de un gen que codifica para el sistema de reparación del ADN por escisión,

resultando en una mayor sensibilidad para detectar gran cantidad de mutágenos (Ames 1971, Ames *et al.* 1973).

La cepa TA98, que fue la utilizada en este trabajo contiene el plásmido , pKM 101 con el factor-R que le confiere resistencia a la ampicilina y los genes *muc* que aumentan la frecuencia de mutación tanto espontánea como inducida al afectar el sistema de reparación "propenso al error" que está presente normalmente en estos organismos. Esta cepa detecta diversos mutágenos que producen corrimiento del mensaje que implica la inserción o la pérdida de pares de bases. Tales mutágenos pueden estabilizar el apareamiento cambiado que ocurre frecuentemente en secuencias repetidas o "puntos calientes" del ADN y en este caso la mutación de corrimiento del marco de lectura restablece la secuencia correcta para la síntesis de histidina (Maron y Ames 1983).

La reversión espontánea de las cepas de prueba con dependencia de histidina se mide rutinariamente en experimentos de mutagenicidad y se expresa como la cantidad de revertantes espontáneos por caja de medio mínimo. Las colonias revertantes que han recuperado la síntesis son claramente visibles sobre un fondo uniforme de bacterias auxotróficas. Cada cepa revierte espontáneamente con una frecuencia característica, Maron y Ames (1983) describen valores que van de 30 a 50 revertantes por caja para la cepa TA98 y mencionan que la tasa de revertantes espontáneos por caja en un margen de  $10^5$  a  $10^8$  células, es completamente independiente del número de bacterias sembradas. La cantidad de células auxotrofas (fondo de bacterias) no se cuenta pero se supone que su número no cambia ya que la concentración basal de histidina es constante. Sin embargo, hay cierta variabilidad de un experimento a otro y de una caja a otra por lo que es

aconsejable realizar por lo menos 3 réplicas por prueba en cada estudio de mutagenicidad (Maron y Ames 1983).

El ensayo de *Salmonella* de Ames ha sido cuestionado por varios autores debido a la carencia en las bacterias de los sistemas metabólicos de mamíferos que efectúen biotransformaciones sin embargo, este problema se ha resuelto agregando fracciones microsómicas del hígado de mamíferos (Maron y Ames 1983) o bien de las plantas (Plewa *et al.* 1984).

#### **2.4.2 Cocultivo célula vegetal/microorganismo**

Los procedimientos empleados para estudiar el efecto del metabolismo vegetal sobre la mutagenicidad han variado considerablemente. Algunos investigadores proliferan tejidos vegetales por tiempo largo en presencia del agente químico y observan las alteraciones citogenéticas en las células vegetales (Kallak y Vapper 1985). Otra manera es coincubando células vegetales con una cepa bacteriana indicadora, como *Salmonella. typhimurium*, o algunas levaduras (Plewa *et al.* 1985). Tales métodos dependen de que el agente químico penetre en la célula vegetal, de que sea metabolizado y de que los metabolitos regresen al medio donde actuarán sobre las bacterias. Una variante de este protocolo hace crecer plantas en presencia de un agente químico y después se emplean bacterias u otro sistema de prueba para evaluar el potencial mutagénico de un extracto preparado con las plantas (Plewa y Gentile 1976, Gentile *et al.* 1977). Una tercera opción se lleva a cabo con extractos vegetales liberados de las células para proveer las enzimas metabólicas (Wildeman y Nazar 1982).

En los estudios sobre activación vegetal, se utilizan procedimientos *in vivo* e *in vitro*. En el primero, el agente que se prueba se aplica a una planta viva intacta mientras que en el segundo se agrega a un homogeneizado vegetal estéril o se incuba con células vegetales en cultivo. En ambos métodos, el extracto vegetal se incuba posteriormente con un microorganismo indicador de genotoxicidad (Plewa y Gentile 1982).

Una ventaja de los métodos *in vivo* es que al usar plantas intactas, las condiciones son semejantes a las que ocurren en el campo, aunque pueden presentarse también algunos problemas de contaminación del material vegetal, artefactos inducidos por los nutrientes de las muestras en los ensayos con microorganismos. Además, problemas de dosimetría inherentes al hecho de que al tratar las plantas completas la concentración que entra puede ser muy diferente de la que se obtiene en los extractos finales y la posible modificación de los metabolitos o la inducción de reacciones químicas durante la homogeneización, la extracción o la concentración de las muestras, por lo que se deben tener todas las precauciones debidas al trabajar con extractos vegetales.

La investigación sobre la activación vegetal basada en el uso de homogeneizados celulares se ha descrito en diferentes sistemas, *Tradescantia* (Scott *et al.* 1978), tubérculos de papa (Loprieno *et al.* 1980) y plántulas de maíz (Plewa y Gentile 1976).

A pesar de que gran cantidad de agentes son activados tanto por plantas como por animales, algunos parecen serlo sólo por plantas. El desarrollo de protocolos usando activación tanto vegetal como animal puede proveer una amplia base de datos sobre la transformación biológica de promutágenos y una forma ideal

para hacer dicha comparación es con un ensayo *in vitro*. Otro aspecto importante que se puede estudiar, es la existencia de promutágenos que sólo son activados por vegetales y que son dependientes de la fotosíntesis (Day *et al.* 1989). Benigni *et al.* (1979) describen un método de activación vegetal *in vitro* empleando cultivos celulares de *Nicotiana glauca*. Los agentes que se van a probar, se cocultivan con *N. glauca*, se homogeneizan y los extractos se agregan a *Aspergillus nidulans* para observar su mutagenicidad.

El ensayo de cocultivo célula vegetal/microorganismo utiliza suspensiones de células vegetales cocultivadas como sistema activador y células bacterianas o levaduras como organismo indicador del daño genético. Después de cierto tiempo de tratamiento, los microorganismos son sembrados sobre medios selectivos. En esta forma los sistemas de activación y el indicador pueden ser estudiados independientemente. Además, es factible determinar la viabilidad de las células vegetales y de las células microbianas de manera independiente y de esta manera evaluar la toxicidad del agente que se prueba. Plewa (1989) ha empleado cultivos de células de tabaco, algodón, zanahoria, maíz y *Tradescantia* para estudiar la activación de diversos agentes y mezclas ambientales complejas. En investigación básica, este ensayo está siendo aplicado para dilucidar los mecanismos bioquímicos de la activación vegetal (Plewa 1989).

## **2.5 Plaguicidas**

### **2.5.1 Antecedentes históricos**

El uso de sustancias para el control de plagas y parásitos es muy antiguo. Los primeros son los arseniatos y más tarde se utilizan otros agentes de origen orgánico

extraídos de plantas como la rotenona que se obtiene de *Derris elliptica* y *D. Melacensis*. El piretrum que se produce a partir de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* o la nicotina que se emplea en Francia desde 1690 y que más tarde, en 1764, se aplica esta propiedad insecticida del tabaco (*Nicotiana tabacum*) en Inglaterra y desde 1814 en América (West *et al.* 1952).

El empleo de plaguicidas en México se inicia a finales del siglo antepasado. En 1898 ya se usaban treinta y ocho agentes químicos, entre ellos arseniato de plomo, arseniato blanco, ácido clorhídrico, ácido fénico, etc. (Restrepo 1992).

En la actualidad, una de las principales fuentes de agentes químicos ambientales son agroquímicos tales como los pesticidas, que son vertidos constantemente al ambiente natural por el hombre. La industria de agroquímicos produce cada año un volumen equivalente a medio kilo por habitante del planeta. Los principales exportadores a nivel mundial son Alemania, Estados Unidos de América, Inglaterra, Suiza, Francia, Japón e Italia, estos países surten virtualmente todas las importaciones del Tercer Mundo. En México, durante 1986 se aplicaron 750 g *per capita* (Restrepo 1992), algunos de ellos están prohibidos en muchos países por su comprobado daño a la salud y a los recursos naturales, no obstante aquí continúan utilizándose indiscriminadamente. Es importante examinar los efectos de estos productos sobre el ambiente y sobre la salud de la especie humana con el objeto de reunir elementos para pugnar por su regulación. Diversos investigadores han expuesto los daños que ocasionan los plaguicidas en las fábricas donde se elaboran y en las áreas donde se aplican, pero poco se ha descrito sobre su consumo y acerca de la influencia del metabolismo vegetal en su expresión mutagénica.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.5.2 Toxicología

En México, son diversos los informes sobre el uso anárquico y elevado de diferentes plaguicidas; en la Comarca Lagunera desde 1962 han sucedido numerosos casos de intoxicación y algunas defunciones provocadas en su mayoría por Mevidrín, Paratión, Sevín, Azodrin, Lannate y Gusatión. En Michoacán, en un estudio epidemiológico de 1962-1963 se registran más de 1000 casos, en el IMSS se atendieron intoxicados con las formuladoras que procesaban Paratión metílico y Paratión etílico. En la región norte de Tamaulipas en la época de auge del algodón hubo numerosos intoxicados, aunque no hay registro de los insecticidas que los causaron, algunos entrevistados mencionaron al Paratión y al Curacrón (Restrepo 1992).

En 1982, en Culiacán, Sinaloa, en clínicas del IMSS se recibían diariamente una a dos personas intoxicadas por plaguicidas, dos años después se atendieron diariamente de uno a cuatro casos y unos cuarenta urgentes durante la época de mayor aplicación de plaguicidas (enero a mayo). Datos proporcionados por el IMSS en Tapachula, Chis. Indican, que las intoxicaciones producidas por el uso de plaguicidas ocupan el tercer lugar con relación a otras intoxicaciones (Restrepo 1992).

El empleo intenso de plaguicidas, su toxicidad y su persistencia constituyen un peligro grave para lagos, esteros, lagunas y mares. Estos cuerpos son receptores de las aguas de escurrimiento de los campos agrícolas en donde se utilizan los pesticidas o de aquellos que se aplican directamente para el control de larvas de insectos y algas o bien los que resultan como consecuencia de las descargas industriales y domésticas. De esta manera, los contaminantes acceden a los



organismos del ecosistema que acumulan a veces estos compuestos en dosis subletales, en ellos pueden ser transformados metabólicamente en otros más o menos tóxicos e irse concentrando en la cadena trófica llegando a afectar al hombre a través de la ingestión (Restrepo 1992).

McDuffie *et al.* (1990) presentan evidencias suficientes para considerar que los residuos de pesticidas sean la principal causa prevenible de las enfermedades y muertes relacionadas con productos del tabaco para pipas y para mascar y cigarrillos y puros.

En EUA, el Paratión etílico fue prohibido a principios de los 90 Francis (1994) señala que a pesar de que el Paratión metílico no está permitido para uso en interiores, solo en 1992, más de 800 restaurantes en Chicago fueron tratados con este insecticida.

### **2.5.3 Clasificación de insecticidas**

Existen tres grandes grupos de insecticidas: organoclorados, organofosforados y carbámicos. Los primeros son en su mayoría insecticidas que en general tienen una elevada persistencia en el suelo y en los alimentos para consumo humano o animal y tienden a acumularse en los tejidos grasos. Algunos ejemplos son: Clordano, DDT, Endosulfán, Lindano, Toxafeno, etc. Estos insecticidas se absorben por la piel y los aparatos digestivo y respiratorio. La intoxicación aguda rara vez se presenta por exposición durante tiempos cortos, pero pueden acumularse en tejidos grasos y de esta manera manifestar su toxicidad a largo plazo. La intoxicación aguda por organoclorados se manifiesta por aprehensión, excitabilidad, mareo, dolor de cabeza, desorientación, espasmos musculares, temblor, convulsiones tónicas y

clónicas, frecuentemente epileptiformes, coma y a veces muerte(Moutschen-Dahmen *et al.* 1984)

Los compuestos organofosforados son los insecticidas de mayor uso en la agricultura en México, son derivados del ácido fosfórico, la mayoría son insecticidas y también acaricidas, en general actúan contra los insectos y ácaros por contacto y por ingestión. Son menos persistentes que los organoclorados en el suelo y en los alimentos, algunos de ellos son Azinfos metílico, Carbofentión, Clorpirifos, Dimetoato, Fosfamidón, Foxim, Malatión, Oxidemetón metil, Paratión metílico y etílico, Triazofos, Triclorfón, etc. Con pocas excepciones los compuestos organofosforados son muy tóxicos y todos inhiben a la colinesterasa interrumpiendo el impulso nervioso a nivel de sinapsis nerviosas de vertebrados (Fukuto 1971).

Los efectos sobre el sistema nervioso van desde patrones de habla ininteligible y pérdida de los reflejos, hasta convulsiones y estados de coma, puede también haber parálisis, siendo los músculos del sistema respiratorio los más afectados. Todos los insecticidas organofosforados se degradan por hidrólisis en el hígado y en otros tejidos, siendo en general estos productos de baja toxicidad, sin embargo algunos en compuestos intermedios son muy tóxicos.

Además de esto, presentan propiedades alquilantes (Preussman *et al.* 1969), su estructura fundamental es -P-O-C-. La presencia del fósforo y del carbono como sitios electrofílicos los hace susceptibles de reaccionar con nucleófilos. El ADN de cualquier célula posee muchos y muy diferentes sitios nucleofílicos susceptibles a ese tipo de reacción (Wild 1975). Por lo tanto, es importante evaluar el riesgo que puede representar el uso de tales sustancias en el material genético ya que numerosas enfermedades crónicas y con periodos de latencia largos, como el

cáncer, están entre los principales motivos de preocupación de la salud humana con relación a los plaguicidas (Moutschen-Dahmen *et al.* 1984)

El otro grupo de insecticidas, los carbámicos, son sustancias sintéticas derivadas del ácido carbámico. Estos son menos persistentes que los organofosforados, entre ellos están Aldicarb, Bendiocarb, Carbarilo, Metomilo, Propoxur, Tiodicarb, etc. Éstos al igual que los organofosforados inhiben a la acetilcolinesterasa. Sin embargo, con los carbamatos esta inhibición es rápida e ineludible, no persiste más de 8 h, por lo que el riesgo de intoxicación crónica no existe si la exposición es en cantidades menores a las requeridas para producir síntomas inmediatos. Los carbamatos son poco absorbidos por la piel, sin embargo, los vapores son captados rápidamente por la mucosa del aparato respiratorio. Aunque la mayoría son poco tóxicos, algunos son muy peligrosos por su alta toxicidad (Aldicarb, Carbofuran y Metomilo). Los síntomas de intoxicación por carbamatos y por organofosforados son idénticos (Moutchen-Dahmen *et al.* 1984).

En general, los insecticidas tienen importancia en el área de la mutagénesis ambiental no sólo debido a que son agentes muy tóxicos sino también a su amplio uso. Muchos de ellos se han descrito como mutagénicos, gran cantidad se han probado en bacterias y en plantas superiores, que también se han usado como sistemas biológicos de prueba. En estudios en *Vicia faba*, de Kergommeaux *et al.* (1983) demuestran diferentes grados de actividad clastogénica de 9 insecticidas comunes. Las pruebas de mutagenicidad de los insecticidas en mamíferos han sido contradictorias ya que han mostrado resultados tanto positivos como negativos. Este desacuerdo puede deberse a que muchos son citotóxicos en las concentraciones requeridas para causar daño cromosómico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Entre los insecticidas organofosforados los dos que son motivo de esta investigación, Folimat (Dimetoato) y Folidol (Paratión metílico) han sido poco estudiados desde el punto de vista de daño genético. Rehana *et al.* (1995) detectan entre otros pesticidas, concentraciones altas de Dimetoato y de Paratión metílico que van desde 0.4 a 0.56 ppb y 0.16 a 0.50 ppb respectivamente, en muestras de agua del Río Ganges mediante el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Extractos de la parte orgánica de dichas muestras manifiestan un marcado grado de mutagenicidad en el ensayo de Ames con las cepas TA97, TA98 y TA100 con un probable papel de la contaminación por pesticidas en el agua del río.

La susceptibilidad del cerebro ante estos insecticidas se incrementa conforme aumenta la exposición de una cepa de ratas por varias generaciones, como lo demuestran los experimentos realizados por diferentes autores (Institoris *et al.* 1995, Nehez y Desi 1996, Solecki *et al.* 1996,)

### **2.5.3.1 Efectos genotóxicos del Dimetoato (Folimat)**

El Folimat (Fig. 4) induce conversión génica en *Saccharomyces cerevisiae* (Moutchen-Dahmen *et al.* 1984), es positivo en la inducción de mutaciones en *E. coli* (Mohn 1973), mientras que en *Salmonella* y en *Bacillus subtilis* resulta negativo de acuerdo con los estudios de Shirasu *et al.* (1976). Gómez-Arroyo *et al.* (1988) describen incrementos de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en *Vicia faba* al aplicar este insecticida a los meristemas radiculares. En ratón causa letales dominantes (Gerstengarbe 1975) y efectos clastogénicos en médula ósea (Bhunya y Behera 1975),

Bianchi-Santamaría *et al* (1997) observan toxicidad débil del Dimetoato en la prueba de micronúcleos con linfocitos humanos en cultivo, al mezclarlo con otros fitoquímicos no hay efecto aditivo.

### **2.5.3.2 Efectos genotóxicos del Paratión metílico (Folidol)**

El Paratión metílico (Fig. 5) se menciona entre los insecticidas organofosforados persistentes en el suelo y en la vegetación (Anónimo 1995). Lo utilizan mucho los agricultores debido a que es extremadamente potente y destructor por contacto para los insectos, cuando se rocía sobre las hojas se mueve rápidamente hacia el tallo y el sistema radicular de la planta donde es almacenado en cantidades muy bajas a diferencia de los altos niveles que se presentan en las hojas. Cuando los tallos y las hojas rociados con este compuesto son empleados para manufacturar tabaco reconstituido para cigarrillos, tabaco para mascar y rapé, son tan fuertemente "saborizados" que no es posible detectar un leve sabor a paratión (Matthias y Abo-El-Seoud 1995). En un estudio toxicocinético en cabras lactantes realizado por Bowen y Baynes (1995), encuentran que éste va directo a la leche materna.

La toxicidad de pesticidas en organismos acuáticos, incluido el Paratión metílico está bien documentada. Los disturbios en los organismos pueden ser estructurales y funcionales a nivel celular y subcelular, la acción de las toxinas sobre el hígado y los riñones puede alterar la actividad enzimática. Los cambios histopatológicos están mayormente confinados a los órganos involucrados directamente en su metabolismo y desintoxicación (Jonnalagadda y Rao 1996). Produce toxicidad crónica en *Daphnia magna* con efectos sobre la sobrevivencia, la reproducción y el crecimiento (Fernández-Casalderrey *et al*. 1995)

El Paratión metílico resulta negativo en la inducción de conversión génica (Simmon *et al.* 1976), mientras que su metabolito el paranitrofenol es positivo (Fahrig 1974). En *E. coli* y *S. typhimurium*, Brusick *et al.* (1980) describen datos negativos. Se observa, por otro lado, efecto clastogénico en puntas de la raíz de *Allium cepa*, en yemas y en los meristemos de la raíz de *Vicia faba* y de *Gossypium barbadense* y en células madres del polen de *Vicia faba* (Singh *et al.* 1970, Ravindran 1971, Amer y Farah 1974). Gómez Arroyo *et al.* (1988) describen efecto positivo en la inducción de ICH en los meristemos de la raíz de *Vicia faba*.

### 2.5.3.3 Metabolismo de insecticidas

El papel que juega el metabolismo vegetal en la transformación de los insecticidas adquiere gran importancia si se considera que una enorme cantidad de cultivos agrícolas son tratados con dichos compuestos y posteriormente son consumidos por los animales o el hombre y al ser metabolizados por las plantas posiblemente originen compuestos con mayor grado de toxicidad o que puedan incrementar su efecto mutagénico

Para evaluar la influencia del metabolismo sobre la mutagenicidad y la toxicidad de los pesticidas, Wildeman y Nazar (1982) utilizan la fracción S9 del hígado de mamífero y homogeneizados enzimáticos vegetales como sistemas activadores en el bioensayo de *Salmonella*. En estos estudios los resultados sugieren que, a pesar de que tanto los homogeneizados vegetales como el sobrenadante S9 de hígado activan un compuesto, los mutágenos formados en los sistemas vegetal y animal resultan diferentes. Rasquinha *et al.* (1988) observan que el metabolismo vegetal puede alterar la mutagenicidad de diversos pesticidas y en varios casos dar lugar a metabolitos aparentemente distintos a los que se forman en

las células animales. El captan incrementa considerablemente su mutagenicidad en presencia de la fracción S14 vegetal, la actividad del trialato no es modificada, ni tampoco la del niclofen y del diquat, mientras que el pentac y el ziran llegan a duplicar su actividad.

Gómez-Arroyo *et al.* (en preparación) encuentran una respuesta mutagénica distinta en *S. typhimurium*, de dos insecticidas organofosforados (Foxim y Azinfos metílico) activados metabólicamente por *Nicotiana tabacum* (línea TX1). El primero, disminuye considerablemente su mutagenicidad hasta valores semejantes al testigo cuando se cocultiva con las células TX1, mientras que al aplicarlo directamente se eleva significativamente la frecuencia de reversión. El segundo aparentemente disminuye su toxicidad ya que al aplicarlo directamente resulta completamente tóxico, al grado de anular el crecimiento de bacterias, mientras que al incubarlo en presencia de células TX1 de tabaco a las mismas concentraciones no solo permite el crecimiento de las bacterias sino que eleva considerablemente su mutagenicidad.

Al aplicar diferentes concentraciones del insecticida carbámico Propoxur al cultivo de linfocitos humanos, Gómez-Arroyo *et al.* (1995) no observan elevación en la frecuencia de ICH, mientras que este mismo compuesto previamente activado con la fracción S10 de *V. faba* la incrementa significativamente, lo mismo ocurre con los herbicidas tiocarbámicos Molinate y Butilate (Calderón-Segura *et al.* 1999).

Se sabe poco sobre el metabolismo de los insecticidas empleados en este estudio. El Dimetoato, formado a partir de la desformilación del Formotión es hidroxilado en el grupo N-metil, oxidado a tiolato y descompuesto a metabolitos polares en plantas, como el frijol (*Phaseolus vulgaris*) y en animales como conejo y rata (Fig. 6).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El Paratión metílico, no obstante que su principal reacción de degradación procede por oxidación a oxón y por hidrólisis a p-nitrofenol, se ha observado en microsomas la reducción a amino-paratión y la oxidación a amino-paraoxón. El Paratión también es reducido exitosamente a amino-paratión via nitroso-paratión e hidroxí-amino paratión en plantas como la espinaca o en microsomas animales como conejo y rata (Fig. 7).

## 2.6 Aminas aromáticas

Históricamente, las aminas aromáticas representan una categoría de clásicos peligros ambientales y carcinógenos en humanos (Weisburger 1988). La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EUA designó a las fenilendiaminas como contaminantes ambientales ubicuos y fuertes candidatos a estar bajo control como sustancias tóxicas.

Las aminas aromáticas constituyen un grupo de compuestos cuyos efectos sobre la salud se han empezado a evaluar recientemente. El Comité Internacional de Agencias de Pruebas de Seguridad de Sustancias de Control Tóxico (ITC) de EUA ha recomendado específicamente que las fenilendiaminas, compuestos también utilizados en este estudio, deben ser evaluadas con pruebas de carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogenicidad debido a la amplia exposición humana, ya que forman parte de diversos tintes y colorantes de uso común, además de que algunas de ellas, así como sus derivados, son productos de degradación de numerosos pesticidas (Lamoureux y Frear 1979).

Los efectos fisiológicos y genéticos de estos agentes han sido investigados en detalle en modelos mamíferos (King *et al.* 1988). El estudio de la activación vegetal



de dichos contaminantes ambientales mundiales empezó hace casi tres décadas (Plewa *et al.* 1983). Las aminas aromáticas son activadas tanto por sistemas animales como vegetales.

En los mamíferos la mayoría de las enzimas que participan en la desulfuración oxidante, la desalquilación, la epoxidación o la hidroxilación aromática involucran monooxigenasas tipo citocromo P-450. Los citocromos P-450 vegetales tienen una capacidad de inducción limitada y un rango de sustrato estrecho, comparado con las monooxigenasas hepáticas (Higashi 1988). En contraste, las peroxidasas vegetales catalizan la oxidación de diversos tipos de xenobióticos, son ubicuas en vegetales, los datos disponibles muestran su participación en el metabolismo de compuestos extraños (Plewa *et al.* 1991, Stiborova y Anzenbacher 1991).

### **2.6.1 Efectos genotóxicos de la 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP)**

La 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP) (Fig. 8) y la *m*-fenilendiamina (*m*PDPA) han sido descritas como no carcinogénicas por el Instituto Nacional de Cáncer de EUA, así como por El Programa Nacional Toxicológico (Anónimo 1980). Sin embargo, otros estudios han mostrado que ambos compuestos son mutagénicos en la prueba de Ames con *Salmonella* de (Hawort *et al.* 1983, Prival *et al.* 1984, Durkel *et al.* 1985, Gentile *et al.* 1986, Natarajan y Obe 1986). Además, la NOP es genotóxica en la prueba de letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila* y en la de recombinación mitótica en levaduras (Natarajan y Obe 1986). También induce aberraciones cromosómicas en cultivo de células de mamífero (Perry y Searle 1977, Shelby y Stasiewicz 1984). Resulta negativa para inducir aberraciones cromosómicas en

linfocitos humanos (Searle *et al.* 1975) y en la inducción de micronúcleos en células de mamífero en cultivo (Natarajan y Obe 1986).

La NOP no incrementa la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en ratones (Niedziela *et al.* 1991). No obstante los resultados negativos obtenidos inicialmente se pueden considerar inconcluyentes debido a procedimientos de prueba inadecuados (Heddle *et al.* 1983). Natarajan y Obe (1986) por ejemplo, reportan respuesta negativa para inducir micronúcleos en médula ósea, pero positiva en hígado. Esta diferencia fué atribuida al hecho de que mutágenos como las aminas aromáticas, como la NOP, que requieren activación metabólica son fácilmente detectables en el ensayo de Ames con S9, mientras que algunas de ellas no pueden ser detectadas en la prueba de micronúcleos en médula ósea. Esto se debe posiblemente, a la incapacidad de los metabolitos activos de alcanzar las células blanco en la médula ósea, mientras que en el hígado, los hepatocitos están involucrados directamente en la activación de estos compuestos.

### **2.6.2 Efectos genotóxicos de la *m*-fenilendiamina (*m*-PDA)**

La *m*-fenilendiamina (Fig 9) es un contaminante ambiental ubicuo y un promutágeno activado por vegetales. Lhotka *et al.* (1987) demostraron que esta aril amina monocíclica es transformada a potente promutágeno de corrimiento del marco de lectura por cultivos de tabaco y células de algodón y zanahoria. Los promutágenos aril amino pueden ser activados a mutágenos estables de larga vida por células vegetales en cultivo, estos productos son retenidos por las membranas de ultrafiltración con un tamaño de exclusión de 300 kDa (Plewa *et al.* 1993, Seo *et al.* 1993, Wagner *et al.* 1994). La demostración de que las plantas son capaces de activar promutágenos a productos estables de alto peso molecular, produce la

inquietud de que puedan activar agentes ambientales en mutágenos que al ser introducidos en la cadena alimenticia humana constituyan un riesgo para la salud.

Seo *et al.* (1993) establecen un modelo para la activación de la *m*PDA por células TX1 de tabaco que consiste de siete componentes: 1. La *m*-PDA es transportada al interior de la célula vegetal (TX1), 2. La peroxidasa intracelular TX1 oxida a la molécula (R—NHOH), 3. El metabolito es conjugado a una macromolécula (R—NHOH—conjugado), 4. El conjugado-amino es secretado hacia el medio extracelular y el conjugado o un metabolito desconjugado, activado vegetalmente entra al microorganismo de prueba, *Salmonella*, 5. El producto N-hidroxilado, activado vegetalmente es acetilado (R—NHO—COCH<sub>3</sub>) y 6. desacetilado por la acetil-CoA: N-hidroxi aril amina O-acetiltransferasa bacteriana y 7. La desacetilación resulta en un ión nitrenio (R—NH<sup>+</sup>) muy reactivo el que se une al ADN (Fig. 10). Finalmente, el o los productos de la *m*-PDA activada vegetalmente también pueden ser metabolizados por la nitrato reductasa. El modelo predice que el producto activado vegetalmente funciona como mutágeno inmediato. La función del compuesto conjugado puede ser estabilizar y secuestrar al xenobiótico activo. Esto sirve como una vía de desintoxicación para la planta. Sin embargo, este producto estable de alto peso molecular posiblemente ejerce efectos mutagénicos sobre los organismos que lo consumen y metabolizan a una forma reactiva. Un probable peligro ambiental de estos agentes químicos activados vegetalmente, es su transporte a través de la cadena alimenticia y sus efectos genotóxicos en los animales consumidores.

### 2.6.3 Efectos genotóxicos del 2-aminofluoreno (2-AF)

El 2-aminofluoreno (2-AF) (Fig. 11) es una de las aminas aromáticas bien caracterizadas como promutágena y procarcinógena en mamíferos, ya que depende de la activación metabólica (Schutt y Thorgeirsson 1978, Miller *et al.* 1979, Brouns *et al.* 1981) y es una de las promutágenas activadas por vegetales, más ampliamente estudiada (Sandermann 1988, Wagner *et al.* 1989). Hace casi una década se descubre que el 2-aminofluoreno es activado a mutágeno por células vegetales en cultivo (Plewa *et al.* 1983, 1988), se comprueba que al incubarlo con células vegetales muertas por calor no induce mutación en *S. typhimurium* cepa TA98, es decir que es un promutágeno (Plewa *et al.* 1988).

### 3. OBJETIVOS

Evaluar la capacidad metabólica del cultivo celular de cilantro para verificar el efecto promutagénico de las anilinas 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP), *m*-fenilendiamina (*m*PDA) y 2-aminofluoreno (2AF) cuya mutagenicidad ha probado ser incrementada por el metabolismo vegetal, así como de los insecticidas organofosforados Folimat y Folidol utilizando como criterio de evaluación del efecto genético, la mutación revertante de la bacteria *Salmonella typhimurium* cepa TA98 mediante el método de cocultivo.

Analizar el efecto antimutagénico de extractos crudos de cilantro, con alto contenido de clorofila, en la mutación revertante de *Salmonella typhimurium* inducida por los metabolitos de las anilinas 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP), *m*-fenilendiamina (*m*PDA) y 2-aminofluoreno (2AF), así como de los insecticidas organofosforados Folimat y Folidol previa activación vegetal y comparar su comportamiento con el de la clorofilina

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que las células vegetales activan metabólicamente diversos promutágenos y se espera que las células de cilantro (*Coriandrum sativum*) en cultivo sean capaces de transformar metabólicamente los insecticidas organofosforados Dimetoato y Paratión metílico y las aminas aromáticas 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP), *m*-fenilendiamina (*m*PDPA) y 2-aminofluoreno (2AF) y expresar su efecto en la bacteria *Salmonella typhimurium*. Por otro lado se ha descrito, que muchos extractos vegetales, tienen efecto antimutagénico, adicionalmente se espera que los extractos crudos del cilantro, vegetal comestible con alto contenido de clorofila, que se consume mucho en México, disminuyan el efecto mutagénico de los insecticidas Dimetoato y Paratión metílico y de las anilinas NOP, *m*PDPA y 2AF al ser incubados mediante el ensayo de cocultivo microorganismo/célula vegetal.

## **5. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1 Obtención de cultivos celulares de cilantro (*Coriandrum sativum*)**

Las semillas de cilantro, se germinaron en condiciones de esterilidad, posteriormente las plántulas se sembraron en tierra esterilizada, cuando alcanzaron su crecimiento óptimo (15 a 20 cm) se realizaron cortes de hoja y de tallo, se esterilizaron y se colocaron sobre medios con diferentes concentraciones de nutrientes y hormonas para encontrar el medio adecuado para su desdiferenciación.

Se incubaron y posteriormente los que generaron un mejor "callo", que fueron los de tallo, se resembraron en medio de cultivo líquido de Murashige y Skoog (1962) (MS) modificado al agregarle ácido ascórbico 10 mg/l y ácido cítrico 10 mg/l como antioxidantes y la auxina ácido 2-(2-metil-4-clorofenoxipropiónico) 3 mg/l, así como la citocinina benzilamino parina en concentración de 0.3 mg/l. Se incubaron en suspensión haciendo resiembras consecutivas en medio de cultivo líquido y después de al menos tres resiembras, se incubaron para tener las células listas para su utilización en el cocultivo.

### **5.2 Preparación de las bacterias y medios para tratamiento**

A partir de cajas patrón de las cepas TA98 de *Salmonella typhimurium*, se sembró una porción de colonia en caldo líquido Luria (LB) para su proliferación y se colocó en agitación constante, en oscuridad y a 37° C durante toda la noche (16 horas).

Se cosecharon por centrifugación a 4000 xg durante 5 min a 0° C. Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en amortiguador de fosfato de potasio 100 µM a pH de 7.4 y se mantuvo en hielo. Se verificó la densidad de bacterias para ajustarla a  $1 \times 10^{10}$  células/ml como óptima de acuerdo con Maron y Ames (1983) para llevar a cabo la experimentación.

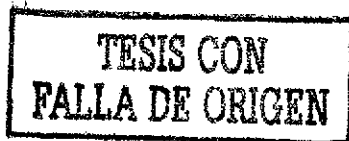
Se probó la presencia en las cepas, de marcadores genéticos, para la mutación rfa se utilizó la prueba de violeta cristal y para el factor-R de resistencia a la ampicilina, se empleó medio nutritivo suplementado con histidina y biotina al cual se agregó ampicilina.

### 5.3 Cocultivo-ensayo de mutagenicidad

En frascos de cocultivo se agregaron 2.25 ml de medio Myt con células de *Coriandrum sativum* en suspensión, de 7 días de crecimiento, en concentración de 100 mg/ml. Se adicionaron por separado las diferentes concentraciones de los insecticidas Folimat y Folidol (10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 y 500 ppm) y al final 0.225 ml de suspensión de bacterias, se mantuvieron en agitación constante a 125 rpm durante 2 horas. En otra parte del experimento, se añadieron concentraciones fijas de las aminas aromáticas (100 µg/frasco de cocultivo de 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP), 20 µg/frasco de cocultivo de 2-aminofluoreno (2-AF) y 500 µg/frasco de cocultivo de *m*-fenilendiamina (*m*PPDA) y al final nuevamente 0.225 ml de suspensión de bacterias.

Se colocó paralelamente la siguiente serie de testigos negativos:

- a) amortiguador de fosfatos
- b) medio MS





- c) medio MS más células de cilantro vivas
- d) medio MS más células muertas por calor

#### 5.4 Siembra en cajas

En tubos de ensaye con tapa que contienen 2 ml de agar de superficie estéril fundido y a 45°C, se aplicaron 250 µl de cada uno de los frascos de cocultivo. Se agitó cada tubo y se sembró por triplicado en cajas de agar mínimo. Se incubaron por 48 h a 37<sup>0</sup> C y se analizó la reversión inducida.

#### 5.5 Cocultivo-ensayo de antimutagenicidad

En frascos de cocultivo se agregaron 2.25 ml de medio MS con células de cilantro (*Coriandrum sativum*) en suspensión de 100 mg/ml con 7 días de crecimiento, se adicionaron 0.225 ml de suspensión de bacterias y las diferentes concentraciones de los insecticidas. Además se colocaron 250 µl del extracto de cilantro.

En el caso de las aminas aromáticas en los frascos de cocultivo se agregaron 2.25 ml de medio MS con células de cilantro (*Coriandrum sativum*) en suspensión de 100 mg/ml con 7 días de crecimiento, se adicionaron 0.225 ml de suspensión de bacterias y las aminas en las siguientes concentraciones constantes: 100 µg/frasco de cocultivo de 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP), 20 µg/frasco de cocultivo de 2-aminofluoreno (2-AF) y 500 µg/frasco de cocultivo de *m*-fenilendiamina (mPDA). Además, se añadieron volúmenes crecientes del extracto de cilantro (50, 100, 250, 500, 750 y 1000 µl/frasco de cocultivo). Paralelamente, se realizó el mismo diseño pero solo con la amina más mutagénica que fue la NOP, incubándola con las

siguientes concentraciones de clorofilina: 0.1, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 µg/frasco de cocultivo.

Se aplicaron 250 µl de cada uno de los frascos de cocultivo en tubos de ensaye con tapa con 2 ml de agar de superficie estéril fundido y a 45° C, se agitó cada tubo y se sembró por triplicado en cajas de agar mínimo. Se incubaron por 48 h a 37° C y se analizó la reversión inducida.

El porcentaje de inhibición en las pruebas de antimutagenicidad se calculó usando la formula:

$$PI=100 - \frac{\text{Número de revertantes/ caja en presencia del agente de prueba}}{\text{Número de revertantes/ caja en ausencia del agente de prueba}} \times 100$$

(Ong *et al.* 1986)

## 5.6 Obtención de extractos

A las plantas de cilantro, se les cortó la raíz para utilizar tallo y hojas, se lavaron muy bien con agua corriente y se enjuagaron con agua desionizada, se dejaron escurrir y se pasaron a través de un extractor de jugos casero. El jugo, se centrifugó a 10,000 x g durante 15 min a 0° C. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 22,000 xg, se extrajo el sobrenadante, se filtró con membranas miliporo de 0.45 µm y se conservó en hielo hasta su empleo.

## 5.7 Determinación del contenido de proteínas por el método Bio-Rad

Para la obtención de los homogeneizados de vegetales se siguió el protocolo publicado por Plewa *et al.* (1988). Las células se lavaron con medio MS\* modificado,

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

sin la hormona vegetal de crecimiento (ácido 2, 4-Diclorofenoxiacético), la suspensión de células de cilantro se tituló a una concentración de 100 mg/ml en medio MS<sup>2</sup>; se preparó un homogeneizado colocándola en hielo, se maceró con un homogeneizador manual por un minuto y se centrifugó a 15, 000 xg por 2 minutos. El sobrenadante se colocó en hielo e inmediatamente se analizó su contenido de proteínas por el método Bio-Rad (Bradford 1976), de la siguiente manera:

#### Reactivo de Bradford:

Se disolvieron 100 mg del colorante azul brillante (azul de Coomassie) G-250 85 % (Aldrich), en 50 ml de etanol (Sigma) 95 % de pureza y se aforó a un litro con ácido fosfórico (Aldrich) 85 % de pureza. Esta mezcla se agitó durante 12 h en la oscuridad, posteriormente se filtró con papel filtro (No. 1) y se colocó a 4° C en un frasco ámbar.

En tubos de ensaye se colocó 25 µl del homogeneizado de células de cilantro de los testigos y en otros, de los respectivos tratamientos con los insecticidas y con las aminas aromáticas más 75 µl de agua destilada y 5 ml del reactivo de Bradford, se agitaron en un vórtex y después de 2 minutos (antes de una hora), se realizaron las lecturas de la absorbencia en un espectrofotómetro de UV espectrofotómetro marca Jenway modelo 6300 a 595 nm.

Para el cálculo de la concentración de proteínas, se preparó una curva patrón con albúmina de suero bovino (BSA, Aldrich) (se pesó 10 mg de ASB y se agregó 10 ml de agua destilada para tener una concentración final de 1 mg /ml). Las concentraciones de la curva fueron 10, 20, 30, ...µl y ajustar a 100 ml con agua destilada. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

## 5.8 Determinación de la actividad de peroxidasa

Para la obtención de los homogeneizados de cilantro se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente. La actividad de peroxidasa de los cultivos de cilantro, se evaluó mediante la oxidación de guayacol a tetraguayacol monitoreando el cambio en la absorbencia a 470 nm. La actividad peroxidasa, se midió durante 5 min cada minuto, usando un espectrofotómetro Jenway modelo 6300. Se hicieron cinco repeticiones independientes para cada medición por cada experimento como lo describen Gentile y Gentile (1991). Esto se hizo al inicio y al término del cocultivo

La mezcla de reacción consistió de:

1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3 %

1 ml de guayacol al 1%

5-10 µl de homogeneizado de células de cilantro

Amortiguador de fosfato de potasio 100 mM a pH=7, en la cantidad necesaria para alcanzar un volumen final de 3 ml (este amortiguador fue usado también en los experimentos de mutagénesis y antimutagénesis).

Los componentes de la mezcla de reacción se combinaron agregando al final el guayacol y se determinó la absorbencia a 470 nm (Chance y Maehly 1955) en un espectrofotómetro de UV como una función del tiempo. La tasa de actividad peroxidasa, se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{tasa de reacción de la peroxidasa} = \frac{\left[ \left( \frac{A_{470}}{\epsilon_{470} \times l} \right) \frac{V}{P} \right]}{t_{min}}$$

donde: A<sub>470</sub> es la absorbencia a 470 nm

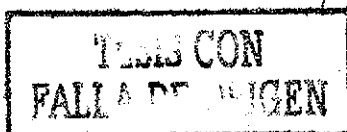
- $\epsilon_{470}$  es el coeficiente de extinción para el tetraguayacol ( $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )  
 $l$  es la longitud de trayectoria de la cubeta (1 cm)  
 $v$  es el volumen de reacción en litros  
 $\rho$  es el contenido de proteína en  $\mu\text{g}$   
 $t_{\text{min}}$  es el tiempo en minutos

## 5.9 Inhibición de la actividad de peroxidasa

Para la obtención de los homogeneizados vegetales se siguió el protocolo publicado por Plewa *et al.* (1988), como se describió antes, las células se lavaron, se titularon a una concentración de 100 mg/ml y se colocaron en los frascos de cocultivo en presencia de concentraciones de 0.025, 0.250, 0.750, 1.5 y 2.5 mM de dietilditiocarbamato (DEDTC) y se incubaron durante 1.5 h. Posteriormente, se preparó un homogeneizado de células de cilantro, la suspensión se colocó en hielo, se maceró con un homogeneizador manual por un minuto y se centrifugó a 15,000 xg por 2 minutos. El sobrenadante se colocó en hielo e inmediatamente se analizó su actividad peroxidasa, de acuerdo con el método de Plewa *et al.* (1991), mencionado anteriormente. Para el testigo y cada concentración de DEDTC, se hicieron tres repeticiones en dos experimentos.

## 5.10 Inhibición de la mutagenicidad inducida por los metabolitos de la mPDA

En otros experimentos, se probaron: 0.025, 0.25, 0.75, 1.5, 2.5, 5.0, 10.0 y 25 mM de DEDTC en presencia de 500  $\mu\text{g}$  por frasco de cocultivo de la anilina *m*-fenilendiamina y de la bacteria *Salmonella typhimurium* cepa TA98, en las mismas condiciones descritas anteriormente en los ensayos de cocultivo para observar la mutagenicidad de anilinas e insecticidas y la antimutagenicidad de los extractos de cilantro, para evaluar el efecto del inhibidor de la actividad peroxidasa (DEDTC) sobre la frecuencia de revertancia inducida por la anilina.



### **5.11 Determinación del contenido de clorofila en los extractos vegetales**

El contenido de clorofila se estableció usando el procedimiento descrito por Arnon (1949). Se determinó la concentración total de clorofila en un homogeneizado vegetal crudo completo y en una fracción de 9,000 xg midiendo la absorbencia de la clorofila total extraída con acetona al 80 % con un espectrofotómetro marca Jenway modelo 6300 a 652 nm. Cada muestra se midió tres veces y el promedio de absorbencias se usó para calcular la cantidad de clorofila.

### **5.12 Evaluación de los datos**

Se utilizó el análisis de varianza de una vía para evaluar estadísticamente los resultados obtenidos. En los experimentos que arrojaron un valor de F significativo, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey Kramer.

Se aplicó el análisis de regresión a los datos de antimutagenicidad inducida por los extractos de cilantro y por la clorofilina.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Obtención de cultivos celulares de cilantro**

Se hicieron ensayos con diferentes estructuras de la planta de cilantro para obtener callo y fue el tallo donde se tuvo mayor éxito, por lo que se eligieron éstos para la experimentación. Para evitar la oxidación de los cultivos en suspensión se adicionaron ácido ascórbico 10 mg/l y ácido cítrico 10 mg/l como antioxidantes además de la auxina ácido 2-(2-metil-4-clorofenoxipropiónico) 3 mg/l así como la citocinina benzilamino parina en concentración de 0.3 mg/l.

### **6.2 Cocultivo-ensayo de mutagenicidad**

En ninguna concentración de los insecticidas aplicados en forma directa hubo incremento de la reversión espontánea; en el caso del Dimetoato (Folimat), a partir de 45.0 µg/frasco de cocultivo se observó efecto tóxico que impidió el crecimiento de colonias revertantes y del fondo de bacterias auxotróficas (Tabla 1, Fig. 14). Sin embargo al cocultivar este insecticida con células de cilantro en suspensión, disminuyó la toxicidad, hubo crecimiento de colonias revertantes y del fondo y además se observó incremento de la mutagenicidad al triple del testigo en 33.75 µg/frasco de cocultivo (Tabla 1, Fig. 14). Al aumentar la concentración no hubo efecto y bajó la toxicidad, lo que permitió el crecimiento del fondo y de colonias revertantes incluso en la concentración de 112.5 µg/frasco de cocultivo que fue la más alta que se probó.

El Paratión metílico (Folidol) sin activación metabólica tampoco incrementó la reversión y produjo disminución significativa del crecimiento de bacterias en 22.5 y

33.75 µg/frasco de cocultivo y la desaparición del fondo de bacterias auxotróficas desde 45 µg/frasco de cocultivo (Tabla 1, Fig 14). No obstante, al cocultivarlo con células de cilantro también bajó la toxicidad, hubo crecimiento de colonias revertantes y del fondo y nuevamente se observó incremento de la mutagenicidad, en este caso mas del doble del testigo en 33.75 µg/frasco de cocultivo. Al continuar elevando la concentración del insecticida la frecuencia de reversión se abatió pero no se notó toxicidad ni en las concentraciones más altas utilizadas en este estudio (Tabla 1, Fig. 14)

Asimismo, al evaluar el potencial metabólico de los cultivos celulares de cilantro incubándolas en presencia de las aminas aromáticas: 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP), *m*-fenilendiamina (*m*PDA) y 2-aminofluoreno (2-AF) en concentraciones crecientes, que previamente probaron ser promutagénicas en otros sistemas de prueba, provocaron incremento notable en la reversión espontánea de *Salmonella typhimurium* comparado con el efecto directo de las aminas sin metabolismo (Tabla 2, Fig. 15, 16, 17).

### 6.3 Cocultivo-ensayo de antimutagenicidad

Para validar el análisis de la antimutagenicidad de los extractos de cilantro, se probó el posible efecto genotóxico de los mismos en la bacteria *S. typhimurium*, observando que no hubo efecto adverso en ningún caso en un intervalo de 50 a 1000 µl por frasco de cocultivo que fueron aplicados en este estudio (Tabla 3, Fig. 18).

Los experimentos de antimutagenicidad mostraron que los extractos obtenidos de hojas y tallo de cilantro crudo fueron capaces de disminuir la



mutagenicidad inducida por los metabolitos de los compuestos empleados. Para las aminas aromáticas, se realizaron tratando a los productos de la activación vegetal de 100  $\mu\text{g}$ /frasco de cocultivo de la NOP con volúmenes crecientes del extracto de cilantro crudo que fueron de 50 a 1000  $\mu\text{l}$ . Se observó una disminución notable con relación al volumen de extracto agregado, observándose un decremento de la mutagenicidad del 83.21 % con el más alto (Tabla 4, Fig. 19).

Al evaluar el efecto de los extractos de cilantro sobre la *m*-PDA y el 2AF metabolizados por las células vegetales, se observó también descenso del efecto mutagénico con relación a la cantidad de extracto añadido, en el caso de la *m*PDA fue hasta del 87.14 % (Tabla 5, Fig. 20) y en el del 2AF la reducción de la mutagenicidad fue del 92.43 % en el volumen mayor (Tabla 6, Fig. 21).

La actividad antimutagénica de los extractos de cilantro frente a la mutagénesis inducida por las aminas aromáticas (NOP, *m*PDA y 2AF), se demostró al comparar su efecto con el de la clorofilina, antimutágeno ampliamente reconocido ya que paralelamente, se agregaron a los metabolitos de la NOP, concentraciones desde 0.1 hasta 5.0  $\mu\text{g}$ /frasco de cocultivo de clorofilina, notando disminución de su mutagenicidad hasta del 87.71 % con el volumen más alto (Tabla 7, Fig. 22).

El análisis de la antimutagenicidad, del Folimat y del Paratión metílico produjeron frecuencias de reversión similares al testigo (Tabla 8, Fig. 23).

En experimentos preliminares se observó, que los extractos de cilantro al cabo de algunos minutos de ser obtenidos se oxidaron mostrando un color café oscuro a diferencia del verde original de los recién hechos. Los extractos oxidados produjeron un incremento notable en el número de revertantes espontáneos de *S.*

*typhimurium* y en la mutagenicidad de la NOP, por lo que en subsecuentes ensayos se cuidó de mantenerlos a temperatura baja (4° C) y se sellaron para evitar su contacto con el aire.

#### **6.4 Determinación del contenido de proteínas**

Las concentraciones de proteínas antes y después del cocultivo no fueron diferentes en presencia de las aminas aromáticas, pero cuando se incubó con los insecticidas, conforme se incrementó su concentración, la cantidad de proteínas disminuyó notablemente (Tabla 9).

#### **6.5 Determinación de la actividad de peroxidasa**

La actividad de peroxidasa en presencia de las aminas aromáticas, no se modificó de manera importante después del cocultivo con relación al inicio, pero cuando se incubó con los insecticidas, conforme se incrementó la concentración, la actividad de peroxidasa disminuyó considerablemente (Tabla 10).

#### **6.6 Determinación del contenido de clorofila**

La concentración de clorofila en los extractos de cilantro fue de 0.325 mg/ml. En los experimentos de antimutagenicidad, el volumen menor de extracto agregado por frasco de cocultivo fue de 50  $\mu$ l y el mayor de 1 ml, así las concentraciones mínima y máxima de clorofila por frasco de cocultivo fueron 0.01625 mg y 0.325 mg, respectivamente.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **6.7 Inhibición de la actividad de peroxidasa**

La inhibición de la actividad de peroxidasa causada por los tratamientos con el dietilditiocarbamato a las células de cilantro aumentó con el incremento en la concentración llegando hasta 69 % con 2.5 mM del DEDTC (Tabla 11, Fig. 24).

## **6.8 Inhibición de la mutagenicidad inducida por los metabolitos de la *m*PDA**

Cuando se incubaron 500  $\mu$ g de *m*-PDA por frasco de cocultivo con la bacteria *Salmonella typhimurium* cepa TA98 y las diferentes concentraciones de DEDTC, la inhibición de las colonias revertantes fue una función del incremento de la concentración del dietilditiocarbamato, se observó una inhibición hasta del 95 % en las dos concentraciones más altas que fueron 10 y 25 mM del inhibidor (Tabla 12).

## 7. DISCUSION

La activación vegetal de promutágenos a mutágenos fue reconocida por primera vez hace alrededor de 25 años. La evidencia directa de activación vegetal fue descrita por Plewa y Gentile (1975, 1976). Esta demostración puso de manifiesto la idea, de que las plantas podrían activar agentes ambientales e introducir mutágenos en la cadena alimenticia. La importancia de entender este proceso se justifica al considerar la enorme cantidad de agentes químicos a los que están expuestas las plantas (Toering *et al.* 1996).

El papel que juega el metabolismo vegetal en la transformación de los insecticidas, es de gran importancia si se considera, que una enorme variedad de cultivos agrícolas son tratados con dichos compuestos y posteriormente son consumidos por los animales o el hombre y si son metabolizados en las plantas, posiblemente originen compuestos con mayor grado de toxicidad o que puedan tener un efecto mutagénico de trascendencia.

Plewa (1978) y Plewa y Gentile (1982) entre otros, afirman que la activación vegetal, es el proceso por el cual un promutágeno se transforma en mutágeno en un sistema vegetal. Rasquinha *et al.* (1988) observaron que el metabolismo vegetal posiblemente altera la mutagenicidad de diversos pesticidas y puede, en varios casos, dar lugar a metabolitos aparentemente distintos a los que se forman en las células animales.

El uso de nuevas opciones de activación metabólica en ensayos de mutagenicidad a corto plazo, ha sido validado y recomendado con el propósito de reducir el uso de animales de laboratorio en pruebas toxicológicas (Rueff *et al.*

1996). Se han usado como indicadores de genotoxicidad, líneas celulares de diferentes plantas metabólicamente competentes.

En este trabajo, se empleó el método de cocultivo, desarrollado para analizar la activación de promutágenos por sistemas vegetales, para ello se utilizaron células de cilantro en suspensión como sistema activador y a la bacteria *S. typhimurium* cepa TA98 como indicador del daño genético. El éxito de este método depende de que el agente químico entre en la célula vegetal, de que sea metabolizado y de que los metabolitos regresen al medio, donde actuarán sobre las bacterias. Hay que tomar en cuenta que éstos deben atravesar la membrana plasmática y las membranas de organelos de la célula vegetal hasta alcanzar su sitio de acción donde la acumulación puede causar la fitotoxicidad. La entrada de diversos agentes a la célula puede ser en general por transporte activo o pasivo, en éstos, la estructura y la funcionalidad de la membrana celular juegan un papel fundamental (Sterling 1994).

En la primera parte de este trabajo, los resultados mostraron la capacidad de las células de cilantro en cultivo para metabolizar a los insecticidas Folimat y Folidol (Tabla 1, Fig. 14) así como a compuestos que han probado ser activados por otros sistemas vegetales como son las anilinas NOP, mPDA y 2AF (Tabla 2, Fig. 14), lo cual comprueba su eficiencia metabólica.

Cuando se analizó el efecto mutagénico directo de los insecticidas organofosforados Folimat y Folidol en el sistema de Ames, se obtuvieron resultados negativos y se observó acción tóxica que inhibió el crecimiento bacteriano en las concentraciones más altas. De acuerdo con De Flora *et al.* (1992), la desaparición del fondo de bacterias ("background"), es un índice de toxicidad. El incremento súbito

en la toxicidad bacteriana probablemente se debió a muerte celular, en estudios previos Gómez-Arroyo *et al.* (1988) observaron que el Dimetoato y el Paratión metílico dañaron los meristemas radiculares de *V. faba* y disminuyeron el índice mitótico, lo que impidió hacer el análisis de intercambios de cromátidas hermanas en las concentraciones más altas. Cuando ambos insecticidas fueron incubados en presencia de células vegetales, además de las bacterias, se disminuye la toxicidad, permitiendo el crecimiento de colonias y se observa un incremento de la mutagenicidad con relación a la concentración, lo que muestra un comportamiento promutagénico. La frecuencia de revertantes fue significativa a 45.00 µg/ frasco de cocultivo con el Dimetoato y a 22.50 y 33.75 µg/ frasco de cocultivo con el Paratión metílico. En las concentraciones más altas el efecto mutagénico no aparece, debido posiblemente a la inhibición de la actividad peroxidasa en los cultivos celulares de cilantro (Tabla 1, Fig. 14). Bianchi *et al.* (1994) describen la genotoxicidad del Folimat en *Sacharomyces cerevisiae* aplicado directamente y al agregar la fracción S9 de hígado se disminuye la actividad del compuesto solo y mezclado con Diazinona y Azinfos metílico. El Paratión metílico en este estudio, fue tóxico a partir de concentraciones menores que las de Folimat, esto es congruente con datos reportados previamente por Vijayaraghavan y Nagarayan (1994) que señalan al Paratión metílico como el más peligroso de tres insecticidas probados para evaluar genotoxicidad, expresada como aberraciones cromosómicas y micronúcleos en células de médula ósea y citotoxicidad, modificando el perfil enzimático de la arginasa en el hígado de ratas.

La activación vegetal de las aminas aromáticas ha sido estudiada previamente, el 2AF y la mPDA son transformadas por cultivos vegetales a potentes mutágenos que actúan por corrimiento del mensaje (Ames 1972, Fuchs *et al.* 1981, Plewa 1990). Smith *et al.* (1989) consideran, que las células de tabaco (*Nicotiana*

*tabacum*) activan al 2AF y a la *m*PDA por medio de vías metabólicas diferentes. En su estudio, establecen una curva de crecimiento de las células de tabaco encontrando que después de la fase "lag" de 3 a 4 días, éstas entran a la fase "log" y la fase estacionaria se alcanzó alrededor del día 7. Sin embargo, el contenido de proteínas, no siguió la curva de crecimiento, en vez de esto, mostró un pico justo antes de que las células entraran a la fase "log". Sus datos muestran que las células de la fase "lag" (3 a 4 días) activan al 2AF mejor que aquellas en fase "log" o fase estacionaria. Es decir que la máxima activación del 2AF coincide con el pico de contenido de proteína mientras que la *m*-fenilendiamina, fue activada mas eficientemente por las células de la fase tardía "log". En el presente trabajo, se observó en todos los experimentos una mayor activación del 2AF que de la *m*-PDA, coincidiendo con un alto contenido de proteínas en los cultivos celulares, lo que es congruente con lo mencionado antes. La *m*-PDA posiblemente se une a algunas proteínas como lo sugieren Seo *et al* (1993) o a sustancias pépticas. Gichner *et al*. (1994) describen un incremento significativo de la frecuencia de mutaciones rosa en pelos estaminales de *Tradescantia* clon 4430 por *m*-PDA en un intervalo de concentración de 100 a 300 mM.

La reacción de las anilinas con productos naturales y su enlace a bioplímeros, como almidón, lignina, pectina y humus ha sido revisada por Marco y Novak (1991). La NOP es un mutágeno conocido que actúa directamente y que puede incrementar su potencial mutagénico mediante el metabolismo de células vegetales en cultivo (Plewa *et al*. 1983, Gentile *et al*. 1986), así como por peroxidasas (Gentile *et al* 1985) como ocurrió en este estudio con las células de cilantro (Tabla 2. Fig. 15, 16, 17).

Con la finalidad de realizar una aproximación al mecanismo de acción por el que ocurre la bioactivación, en términos de las enzimas involucradas, otra parte de la investigación consistió en evaluar el comportamiento de la actividad de peroxidasa en los cultivos celulares del cilantro, así como de su contenido de proteínas. En estos estudios la actividad de peroxidasa no se modificó en presencia de las arilaminas y la activación de las aminas incrementó significativamente la mutación revertante, lo que sugirió que su activación fue por acción de peroxidasa. En presencia de ambos insecticidas, la actividad peroxidasa disminuyó significativamente y como consecuencia, la mutación revertante, no se incrementó como se esperaba (Tabla 10). Este comportamiento coincidió con el del contenido de proteínas, que permanecen sin cambio en la incubación con las aminas y disminuyeron notablemente con los insecticidas (Tabla 9).

La cantidad de información acerca del metabolismo de xenobióticos en plantas es menor que la de estudios en animales. Gentile *et al.* (1985,1986) sugirieron que la fracción S9 vegetal puede ser más efectiva en activar agentes químicos por acción de peroxidasa que por actividad de citocromo P450. Plewa *et al.* (1993) propusieron un modelo de activación vegetal de aminas aromáticas que incluye la oxidación de la amina por peroxidasa vegetales, su conjugación a una macromolécula, su transporte al interior de las células bacterianas y la acetilación/desacetilación por acetil CoA para producir un ión nitrenio, capaz de dañar al ADN.

El DEDTC empleado en este estudio como inhibidor de la actividad metabólica no es mutagénico para *Salmonella typhimurium* TA98 pero sí suprime la activación de aminas aromáticas por células TXI de tabaco (Plewa *et al.* 1991, 1993). Esto también ocurrió cuando se trataron los cultivos celulares de cilantro con DEDTC

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



y se determinó la actividad peroxidasa por la oxidación del guayacol a tetraguayacol (Tabla 11, Fig. 24).

Cuando las células de cilantro se coincubaron con TA98 y *m*-PDA y se agregaron concentraciones crecientes de DEDTC, la frecuencia de revertantes disminuyó significativamente (Tabla 12), corroborando que la inhibición de la activación por células de cilantro del Dimetoato y del Paratión metílico, ocurre por inhibición de las peroxidases intracelulares. Ellos pueden considerarse como promutágenos débiles, debido a que sólo en dos concentraciones del Dimetoato y una del Paratión metílico, las frecuencias de revertantes fueron el doble del testigo. Sin embargo, el hecho de que los valores obtenidos fueron diferentes significativamente a los testigos y que se observó una relación concentración-respuesta, les da relevancia biológica a los datos.

Wagner *et al.* (1989, 1990) y Plewa *et al.* (1991), demuestran que el dietil ditiocarbamato (DEDTC) inhibe tanto la activación vegetal del 2-aminofluoreno y de la *m*-PDA como la actividad peroxidasa de las células vegetales en forma no competitiva, concluyendo que la activación vegetal de estos promutágenos aril amino requieren de la acción de peroxidases vegetales.

El impacto del metabolismo de agentes químicos por plantas puede tener serias consecuencias en la salud pública. En adición a esto, las plantas verdes contienen clorofila en grandes cantidades y dada la riqueza de evidencia que indica la fuerte acción antimutagénica de la clorofila y de la clorofilina (Terwell y van der Hoeven 1985, Ong *et al.* 1986, 1989, Whong *et al.* 1988, Negishi *et al.* 1989), los hallazgos de activación promutagénica e incremento de la mutagenicidad por extractos vegetales o células vegetales en cultivo, genera cuestiones sobre cuales

pueden ser los factores que juegan un papel importante en el balance entre la activación de promutágenos, el aumento de la mutagenicidad y la inhibición de la mutagenicidad por homogeneizados de tejidos de plantas (Gentile y Gentile 1991).

En este trabajo, los experimentos con extractos de cilantro crudo produjeron una disminución notable de la mutagenicidad en este sistema con relación al volumen de extracto agregado a los productos del metabolismo de las aminas aromáticas y en el caso de los insecticidas produjeron frecuencias similares al testigo. El mecanismo de acción de los extractos no se puede establecer por ahora, sin embargo el hecho de que no inhiben la actividad de peroxidasa de los cultivos celulares, constituye una evidencia de que la interferencia debe suceder con los grupos activos de los compuestos (insecticidas y aminas) o con sus metabolitos activados más que con el sistema enzimático involucrado.

Todos los inhibidores dietéticos de mutagénesis y carcinogénesis son de importancia particular ya que pueden ser de utilidad en la prevención del cáncer (Hayatsu *et al.* 1988). El consumo de vegetales, específicamente crucíferas, reduce el riesgo de desarrollar cáncer, a pesar de que el mecanismo de esta protección no es claro, la ingesta de verduras induce enzimas del metabolismo de xenobióticos y por lo tanto acelera la eliminación metabólica de ellos (Zhang *et al.* 1992).

En el presente estudio, el efecto protector de la clorofilina frente a la NOP (Tabla 7, Fig. 22), es claro y puede considerarse que fue un testigo positivo de antimutagenicidad muy efectivo como previamente se ha descrito en la literatura (Hayatsu *et al.* 1988). La clorofilina, es un derivado estable de la clorofila, de fácil manejo y de toxicidad baja o nula que posee capacidad antimutagénica contra diversos compuestos mutagénicos y carcinogénicos tanto de acción directa como

indirecta (Ong *et al.* 1986). Se ha identificado como el factor activo en los extractos de diferentes plantas y como el responsable de la inhibición de la mutagenicidad de numerosos agentes químicos (Lai 1979, Arimoto *et al.* 1980, Lai *et al.* 1980, Kim *et al.* 1982, Gentile y Gentile 1991).

El mecanismo de acción antimutagénica de la clorofilina es complejo y parece variar dependiendo del agente mutagénico, sistema de prueba, dosis, ensayo *in vivo* o *in vitro*, etc. En esta investigación la clorofilina, igual que los extractos de cilantro, no modificaron la actividad de peroxidasa en el cultivo celular ni su contenido de proteínas, por lo que fue posible demostrar que no se inhibió la función de las enzimas de activación metabólica, sino que por el hecho de ser oxidante, la clorofilina puede interactuar con los grupos activos o con los radicales de los mutágenos como se ha descrito anteriormente (Sato *et al.* 1984, Troll y Weisner 1985, Ong *et al.* 1986, 1989, Bronzetti *et al.* 1990) o dada la estructura química de su molécula, la clorofilina puede con facilidad formar complejos por la unión de los mutágenos a su anillo tetrapirrólico (Morita *et al.* 1978, Newmak 1987, Negishi *et al.* 1989, Bronzetti *et al.* 1990, Dashwood *et al.* 1991, Dashwood y Liew 1992, Arimoto *et al.* 1993, Okai *et al.* 1996). Debido al comportamiento tan parecido de los extractos de cilantro con el de la clorofilina, ambos pueden tener un mecanismo de acción semejante

También se observó en esta investigación un claro efecto antimutagénico de los extractos de cilantro frente a los metabolitos de las tres anilinas probadas (Tablas 10, 11 y 12, Fig. 15, 16, 17) y desintoxicante con ambos insecticidas analizados. Dada la similitud del comportamiento de los extractos respecto a las tres anilinas y el de la clorofilina con relación a la NOP, además de que en este caso tampoco se

inhibe la actividad peroxidasa de los cultivos celulares, se infiere que puede estar involucrado un mecanismo de acción semejante.

Hayatsu *et al.* (1988), mencionan que hay dos vías posibles por las que los inhibidores de la mutagénesis pueden actuar: i) inhibición de las interacciones de los genes y los agentes mutagénicos químicamente reactivos y ii) inhibición de la activación metabólica de los mutágenos, éste mecanismo incluye: a) la inactivación de las enzimas metabolizadoras y b) la interacción con los promutágenos haciéndolos indisponibles para el proceso enzimático. Kada *et al.* (1982) postulan que los antimutágenos pueden actuar como desmutágenos o como bioantimutágenos. Los desmutágenos inactivan a los mutágenos por interacción química antes de que ellos ataquen a los genes. Los bioantimutágenos, suprimen el proceso de fijación de la mutación después de que los genes son dañados. Los extractos del cilantro con base en las determinaciones realizadas en este estudio, posiblemente pertenecen al primer grupo descrito por Hayatsu *et al.* (1988) y el de los desmutágenos postulado por Kada *et al.* (1982) al interactuar químicamente con los mutágenos formando complejos e inactivándolos.

Los resultados obtenidos en esta investigación aportan datos del riesgo potencial que representan por un lado, ambos insecticidas y por el otro las dos aminas aromáticas, que no elevan la frecuencia de reversión al aplicarlos directamente, sin embargo su efecto se modifica mediante la activación vegetal. Por esto, además de evaluar la presencia de insecticidas en productos agrícolas para su control de calidad y normas para el consumo humano y de las anilinas que se utilizan en diversas actividades humanas cotidianas, es necesario monitorear la presencia de metabolitos que, como en este estudio, pueden resultar mutagénicos mientras que el compuesto por si mismo no lo es.

Debido a la correlación encontrada entre el efecto del extracto de cilantro como antimutágeno y la clorofilina, se puede inferir que el efecto del extracto de cilantro se debe, en gran medida, a su contenido de pigmentos clorofilicos

La clorofila es abundante en la alimentación humana, en las plantas verdes, llega a ser 1 % de su peso seco (Chipchase 1961); en los extractos de cilantro empleados en este trabajo está presente en una concentración de 0.325 mg/ml. Es también un antimutágeno eficiente, de ahí la relevancia de estudios como éste, sobre el papel protector de los alimentos que la contienen.

La importancia de controlar los tiempos de tratamiento, las condiciones de temperatura, pH, oscuridad, agitación rotatoria, etc. fue importante durante la experimentación para lograr los resultados, ya que se sabe, que la absorción y la acumulación de xenobióticos en la célula vegetal es controlada por las características fisicoquímicas del compuesto incluyendo lipofilicidad y acidez, condiciones de las membranas celulares y el potencial electroquímico en la célula vegetal (Sterling 1994). Con relación al mecanismo de entrada de insecticidas a las células vegetales no hay trabajos descritos, se sabe que la lipofilicidad de muchos pesticidas hace que las membranas, ricas en lípidos sean un blanco plausible para la interacción, únicamente se ha sugerido que la entrada de herbicidas a la célula vegetal, es mediante el involucramiento de un sistema redox en la membrana plasmática (Anthelme y Marigo 1998) o bien a través de transportadores de fosfato en contra de un gradiente de concentración (Morin *et al.* 1997).

El metabolismo, como otros aspectos de la vida, involucra ventajas y desventajas. Los productos oxidados del metabolismo normal causan daño al ADN, proteínas y lípidos. Este daño (parecido al que produce la radiación), parece ser el

principal contribuyente al envejecimiento y a las enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardio vasculares, cataratas, declinación del sistema inmune y disfunciones del cerebro. Las defensas antioxidantes contra este daño incluyen el ascorbato (vitamina C), el tocoferol (vitamina E), las clorofilinas y los carotenoides, las principales fuentes dietéticas son asociadas con la ingesta de frutas y verduras. Cuando esta es baja se duplica el riesgo de muchos tipos de cáncer en comparación con la ingesta alta y puede también incrementar marcadamente el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cataratas (Ames 1995). Todo esto da una idea de la importancia de realizar los estudios sobre las propiedades de los productos de origen vegetal.

Es necesario desarrollar estudios sobre la mutagenicidad de los extractos vegetales y la activación de mutágenos, así como acerca del potencial mutagénico de algunos productos vegetales (Gentile y Gentile 1991). En los experimentos preliminares del presente trabajo, se encontró que los extractos oxidados de cilantro producen incremento notable de la mutagenicidad de la NOP, por lo que en ensayos subsecuentes se mantuvieron a temperatura baja (4° C) y se sellaron para evitar su exposición al aire, de manera que es necesario estudiar las diferentes respuestas dependiendo de las condiciones de experimentación. Solamente así será posible conocer el riesgo-beneficio, asociado a los diferentes productos alimenticios, incluidos en la dieta humana para recomendar o no su consumo como agentes protectores contra la agresión de mutágenos ambientales.

El estudio de los mecanismos de antimutagénesis de este tipo de compuestos aporta mayor conocimiento a nivel molecular acerca de procesos de mutagénesis y antimutagénesis y a largo plazo puede facilitar el aislamiento de los principios activos

e incluso su síntesis para incluirlos en la dieta y prevenir o proteger a los individuos del riesgo de diversas enfermedades.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir lo siguiente:

Se demuestra la sensibilidad del método de cocultivo para detectar fácilmente el efecto de mutágenos en bajas concentraciones.

Las células de cilantro (*Coriandrum sativum*) en cultivo son capaces de activar eficientemente a los insecticidas y a las aminas aromáticas probadas en compuestos mutagénicos en *S. typhimurium* cepa TA98.

El metabolismo de la células de cilantro disminuye la toxicidad de los insecticidas y permite el crecimiento de colonias revertantes aún en las concentraciones mas altas.

Los insecticidas probados requieren de activación metabólica vegetal para inducir los efectos mutagénicos.

Los extractos obtenidos de hojas y tallo de cilantro no resultaron mutagénicos en *S. typhimurium* cepa TA98 y son capaces de disminuir la mutagenicidad inducida por los metabolitos de ambos insecticidas y de las tres aminas aromáticas.

La capacidad antimutagénica de los extractos del cilantro se comprueba, comparando su comportamiento con el de la clorofilina, conocido testigo positivo para antimutagenicidad.

La determinación del contenido de proteínas y de la actividad peroxidasa de los cultivos vegetales, contribuyeron a establecer la hipótesis de que la actividad peroxidasa de las células de cilantro juega un papel importante en la transformación metabólica de las anilinas probadas

Los extractos de cilantro inhiben la actividad peroxidasa de los cultivos celulares en una manera semejante a la provocada por el DEDTC, lo que permite concluir que también pueden estar inactivando a los mutágenos por un mecanismo similar de inhibición de la actividad peroxidasa.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## 9. REFERENCIAS

- Abraham S.K., Sharma L. y Kesevan P.C. (1993). Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and  $\beta$ -carotene against  $\gamma$ -radiation-induced *in vivo* chromosomal damage. *Mutat. Res.* 303, 109-112.
- Amer S. y Farah O. (1974). Cytological effects of pesticides. VI. Effect of the insecticide "rogor" on the mitosis of *Vicia faba* and *Gossypium barbadense*. *Cytologia* 39, 507-514.
- Ames B.N. (1971). The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. En: *Chemical mutagens: principles and methods for their detection*. Hollaender A. (Ed.). Plenum Press, Nueva York, Vol. 1, pp. 267-282.
- Ames B.N. (1972). A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens. En: *Mutagenic effects of environmental contaminants*. Sutton H. E. y Harris M.I. (Eds.), Academic Press, Nueva York, pp. 57-66.
- Ames B.N., Lee F.D. y Durston W.E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 70, 782-786.
- 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.
- Ames B.N. (1989). Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. *Environ. Molec. Mutagen.* 14, 66-77.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Ames B.N. (1995). Foreword En: *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Sami (Ed.) Copiado por Chapman Hall International Publishing Editores, México D.F., pp. XIX y XX.
- Anónimo (1980). Sixth report of the Interagency Testing Committee to the Administrator, Environmental Protection Agency, Receipt of the report and request for comments regarding priority list of chemicals, Federal Register 45, 35897-35910.
- Anónimo (1995). Insecticide residues in agricultural crops: organophosphorus residues. Gout Reports Announcements and Index, Issue 07
- Anthelme F. y Marigo G. (1998). Glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells: involvement of a plasma membrane redox system? *Pest. Biochem. Physiol.* 62, 73-86.
- Arimoto S., Negishi T. y Hayatsu H. (1980). Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Lett.* 11, 29-33.
- Arimoto S., Fukuoka S., Itome Ch., Nakano H., Rai H. y Hayatsu H. (1993). Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. *Mutat. Res.* 287, 293-305.
- Arnon D.I. (1949). Copper anzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1-15.
- Benigni R., Bignami M., Carere A. Conti G., Iacheta R., Morpurgo G. y Ortali A. (1979). A new *in vitro* method for testing plant metabolism in mutagenicity studies. *J. Toxicol. Environ. Health* 5, 809-819.
- Bhunya S. y Behera J. (1975). Centromeric activity of mouse chromosomes to the systemic insecticide dimethoate (rogor). *Curr. Sci.* 44, 859-860.
- Bianchi L., Zannoli A., Pizzala R., Stivala L.A. y Chiesara E. (1994). Genotoxicity assay of five pesticides and their mixtures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 321, 203-211.

- Bianchi-Santamaría A., Gobbi M., Cembran M. y Arnaboldi A. (1997). Human lymphocyte micronucleus genotoxicity test with mixtures of phytochemicals in environmental concentrations. *Mutat. Res.* 388, 27-32.
- Bowen J.M. y Baynes R.E. (1995). Toxicokinetics of methyl parathion in lactating goats. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1598.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bronzetti G., Galli A. y Della Croce C. (1990). Antimutagenic effects of chlorophyllin. En: *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanism II*. Kuroda Y., Shankel D. y Waters M. (Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 463-468.
- Brouns R.M.E., Van Doorn R., Mulleners L.J.S. y Henderson P.Th. (1981). Metabolic activation of 2-aminofluorene by isolated rat liver cells through different pathways leading to hepato cellular DNA-repair and bacterial mutagenesis. *Toxicology* 19, 67-75.
- Brusick D., Simmon V., Rosenkranz H., Ray H. y Stafford R. (1980). An evaluation of the *E. coli* WP2 and WP2 uvr. A reverse mutation assay. *Mutat. Res* 76, 169-190.
- Calderón-Segura M-E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietriní R. y Espinosa-Ramírez M. (1999). *In vivo* and *in vitro* promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicidas molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures *Mutat. Res.* 438, 81-88.
- Chance B. y Maehly A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. En: Colowick S., Kaplan N. (Eds.). *Methods in enzymology* Vol 2, Academic Press, Nueva Yorkm pp. 764-775.
- Chipchase M-I.H. (1961). Chemical components in plant tissues. En: *Biochemist's handbook*. Long C (Ed.), Spon, Londres, pp. 1032-1033.

- Day J., Gentile G.J. y Gentile J.M. (1989). The role of photosynthesis in promutagen activation by plant systems. *Environ. Mutagen. Soc. Abstracts*, 165.
- Dashwood R., Brinholt V. y Bailey G. (1991). Chemoprotective properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) -DNA binding *in vivo* and antimutagenic activity against AFB<sub>1</sub> and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Carcinogenesis* 13, 113-118.
- Dashwood R. y Liew Ch. (1992). Chlorophyllin-enhanced excretion of urinary and fecal mutagens in rats given 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline. *Environ. Molec. Mutagen.* 20, 199-205.
- deKergommeaux D.J., Grant W.F. y Sandhu S.S. (1983). Clastogenic and physiological response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba in vivo* root tip assay system. *Mutat. Res.* 124, 69-84.
- De Flora S., Camoirano A., D'Agostini F., Balansky R.(1992)). Modulation of the mutagenic response in prokaryotes. *Mutat. Res.* 267, 183-192.
- Doll R. y Peto R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 1191-1308.
- Durkel V., Zeiger E., Brusick D., McCoy E. y Simmon V. (1985). Reproducibility of microbial mutagenicity and non carcinogens in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Environ. Mutagen.* 7, 1-248.
- Fahrig R. (1974). Comparative mutagenicity studies with pesticides. *IARC Sci. Publ.* 10, 161-181.
- Fernández-Casalderrey A., Ferrando M.D. y Andeu-Moliner E. (1995) Chronic toxicity of methyl parathion to *Daphnia magna*: effects on survival, reproduction and growth. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 43-49.
- Francis B.M. (1994). "*Toxic substances in the environment*". Nueva York, Wiley-Interscience, pp. 181-192.

- Fuchs R.P.P., Shwartz N. y Daune M.P. (1981). Hot spots of frameshifts mutations induced by the ultimate carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene. *Nature (Londres)* 294, 657-659.
- Fukuto T. R. (1971). Relationship between the structure of organophosphorus compounds and their activity as acetylcholinesterase inhibitors. *Bull WHO* 44, 31.
- Gentile J.M., Wagner E.D. y Plewa M.J. (1977). The detection of weak recombinogenic activities in the herbicides alachlor and propachlor using a plant-activation assay. *Mutat. Res.* 48, 113-116
- Gentile J.M., Gentile G.J., Townsend S. y Plewa M.J. (1985). *In vitro* enhancement of the mutagenicity of 4-nitro-o-phenylenediamine by plant S-9. *Environ. Mutagen.* 7, 73-85.
- Gentile J.M., Gentile G.J. y Plewa M.J. (1986). *In vitro* activation of chemicals by plants: a comparison of techniques. *Mutat. Res.* 164, 53-58.
- Gentile J.M. y Gentile G.J. (1991) The metabolic activation of 4-nitro-o-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts: the relationship between mutagenicity and antimutagenicity. *Mutat. Res.* 250, 79-86.
- Gerstengarbe S. (1975). Die mutagenität von dimethoat-nachgewiesen mit dem dominanten letaltest an der hausmaus (*Mus musculus L.*) *Wiss. Z. Martin-Luther-Univ. (Halle-Wittenber) Math. Naturwiss. Reihe* 24, 87-88.
- Gichner T. y Velemínský (1984). Inhibition of dimethyl-nitrosamine-induced mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* by diethyldithiocarbamate and carbon monoxide. *Mutat. Res.* 139, 29-33.
- Gichner T., Velemínský J. Y Rieger R. (1988). Antimutagenic effects of diethyldithiocarbamate towards maleic hydrazide- and N-nitrosodiethylamine-induced mutagenicity in the *Tradescantia* mutagenicity assay. *Biol Plant.* 30, 14-19.

- Gichner T., Wagner E.D. y Plewa M.J. (1993). Differential responses of N-nitrosamines and aromatic amines in the plant cell-microbe coincubation assay. *Biol. Plant.* 35, 401-406.
- Gichner T., Cabrera L.G., Wagner E.D. y Plewa M.J. (1994) Induction of somatic mutations in *Tradescantia* clone 4430 by three phenylenediamine isomers and the antimutagenic mechanisms of diethylditiocarbamate and ammonium metavanadate. *Mutat. Res.* 306, 16-172.
- 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, oxidemeton methyl, azinphos methyl and phoxim. *Cytologia* 53, 627-634.
- Gómez-Arroyo S., Cortés-Eslava J. y Villalobos Pietrini R. Differential mutagenic response of *Salmonella typhimurium* to the organophosphorus insecticides phoxim and azinphos methyl through the metabolic activation plant. *Mutat. Res.* (en preparación).
- Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M.E. y Villalobos-Pietrini R.(1995). Sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures induced by propoxur through metabolic plant-activation by *Vicia faba*. *Environ. Molec. Mutagen.* 26, 324-330.
- Grover I.S. y Bala S. (1993). Studies on antimutagenic effects of guava (*Psidium guajava*) in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 300, 1-3.
- Hawort S., Lawlor T., Mortelmans K., Speck W. y Zeiger E. (1983). *Salmonella* mutagenicity results for 250 chemicals. *Environ. Mutagen* 5, 3-142.
- Hayatsu H., Arimoto S. y Negishi T. (1988). Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202, 429-446.
- Heddle J.A., Hite M., Kirkhart B., Mavourmin K., MacGregor J.T., Newell G.W. y Salamone M.F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of

- genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 123, 61-118.
- Heikkila R.E. (1985). Inactivation of superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate. En: *Handbook of methods for oxygen radical research*. Greenwald R.A. (Ed.), CRC Press, Boca Raton FL., pp. 387-390.
- Higashi K. (1988). Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* 197, 273-288.
- Instititoris L, Siroki O. y Desi I. (1995). Immunotoxicology study of repeated small doses of dimethoate and methyl parathion administered to rats over three generations. *Human Exp. Toxicol.* 14, 879.
- Jonnalagadda P.R.y Rao B.P.M. (1996). Histopatological changes induced by specific pesticides on some tissues of the fresh water snail *Bellamya disimilis* Mueller. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 648-654.
- Kada T., Inoue T. y Namiki M. (1982). Environmental desmutagens and antimutagens. En: *Environmental mutagenesis, carcinogenesis and plant biology*. Klekowski (Ed.), Praeger, Nueva York, pp. 133-152.
- Kallak H.I. y Vapper M.A. (1985). Plant tissue culture as a model system for mutagenicity testing of chemicals. *Mutat. Res.* 147, 51-57.
- Kim S., Tchai B., Park S. y Jikang S. (1982). Antimutagenic activity of chlorophyll to direct and indirect-acting mutagens and its contents in vegetables. *Korean J. Biochem.* 14, 1-7.
- King C.M., Romano L.J. y Schuetzle D. (Eds.). (1988) *Carcinogenic and mutagenic responses to aromatic amines and nitroarenes*, Elsevier, Nueva York.
- Lai C. (1979). Chlorophyll: the active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens *in vitro*. *Nutrition and Cancer* 1, 19-21.
- Lai C., Butler M. y Matnet T. (1980). Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutat. Res.* 77, 245-250.

- Lahiri M., Maru G.B. y Bhide S.V. (1993). Effect of plant phenols,  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocoferol on benzo (a) pyrene-induced DNA damage in the mouse forestomach mucosa (target organ) and bone marrow polychromatic erythrocytes (non target organ). *Mutat. Res.* 303, 97-100
- Lamoureux G.L. y Frear D.S. (1979). Pesticide metabolism in higher plants: *in vitro* enzyme studies. En: *Xenobiotic metabolism: in vitro methods*. American Chemical Society, Washington D.C., pp. 77-128.
- Lamoureux G.L. y Rusness D.G. (1981). Catabolism of glutathione conjugates of pesticides in higher plants. En: *Sulfur chemistry and biochemistry in relation to pesticide metabolism and action*. Rosen J.D., Magee P.S. y Casida J.E. (Eds.). American Chemical Society, Washington D.C. Vol. 158, pp. 153-164.
- Lamoureux G.L. y Rusness D.G. (1981). Xenobiotic conjugation in higher plants. En: *Xenobiotic conjugation chemistry*. Paulson G.D., Caldwell J., Hutson D.H. y Menn J.J. (Eds.). ACS Symp. Series, 299, 62-107.
- Lamoreux G.L. y Rusness D.G. (1986). Xenobiotic conjugation in higher plants En: *Xenobiotic Conjugation Chemistry*. Paulson G.D., Caldwell J., Hutson J.D. y Menn J.J. (Eds.). American Chemical Society, Washington D.C., Vol 229, pp. 62-107.
- Litterst Ch.L. y Lichtenstein E.P. (1971). Effects and interactions of environmental chemicals on human cells in tissue culture. *Arch. Environ. Health* 22, 454-459.
- Lhotka M.A., Plewa M.J y Gentile J.M. (1987). Plant activation of m-phenylenediamine by tobacco, cotton and carrot cell suspension cultures. *Environ. Molec. Mutagen.* 10, 79-88.
- Loprieno N., Barale R., Mariani L., Presciuttini S., Rossi A.M., Sbrana I., Zaccaro L., Abbondandolo A. y Bonatti S. (1980). Results of mutagenicity tests on the herbicide atrazine. *Mutat. Res.* 74, 250.





- Lutz L.M., Glende E.A. y Recknagel R.O. (1973). Protection by diethyldithiocarbamate against carbón tetrachloride lethality in rats and against carbon tetrachloride induced lipid peroxidation in vitro, *Biochem Pharmacol.* 22, 1729-1734.
- Marco G.J. y Novak R.A. (1991). Natural product interactions during aniline metabolism including their incorporation in biopolymers. *J. Agric. Food. Chem.* 39, 2101-2111.
- Maron D.M. y Ames B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.
- Matthias F. y Abo-El-Seoud M.A. (1995). Penetrating movement and translocation of c-parathion in plants. *Int. J. Environ. Studies* 47, 37.
- McDuffie H.H., Klaasen D.J. y Dosman J.A. (1990). Is pesticide use related to the risk of primary lung cancer in saskatchewan? *J. Occup. Med.* 32, 1003.
- Menn J.J. (1978). Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. *Environ. Health Perspect.* 27, 113-124.
- Miller E.C., Miller J.A., Hirono I., Sugimura T. y Takayama S. (Eds.) (1979). *Naturally occurring carcinogens-mutagens and modulators of carcinogenesis*. Japan Scientific Societies Press y University Park Press, Tokio y Baltimore.
- Mohn G. (1973). Comparison of the mutagenicity activity of eight organophosphorus insecticides. *Mutat. Res.* 20, 7-15.
- Morales-Ramírez P. y García-Rodríguez M.C. (1994). *In vivo* effect of chlorophyllin on  $\gamma$ -ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells. *Mutat. Res.* 30, 329-334.
- Morin F., Vera V., Nurit F., Tissut M. y Marigo G. (1997) Glyphosate uptake in *Catharantus roseus* cells: role of a phosphate transporter. *Pest. Biochem. Physiol.* 58, 13-122.

- Morita K., Hara M. y Kada T. (1978). Studies on natural desmutagens: screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.* 42, 1235-1238.
- Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen M. y Degraeve N. (1984). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of insecticides. En: *Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of industrial pollutants*. Kirsch-Volders (Ed.). Plenum Press, Nueva York, pp. 127-203.
- Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Natarajan A.T. y Obe G. (1986). How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* assays in their ability to detect mutagens. *Mutat. Res.* 167, 189-201
- Negishi T., Arimoto S., Nishizaki C. y Hayatsu H. (1989). Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole (trp-p-2). *Carcinogenesis* 10, 145-149.
- Negishi T., Rai H. Y Hayatsu H. (1997). Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutat. Res.* 376, 97-100.
- Nehez M. y Desi I. (1996). The effect of dimethoate on bone marrow cell chromosome of rats in subchronic four-generation experiments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 103.
- Newmark H. (1987) Phenolics as inhibitors of mutational and precarcinogenic events. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 461-466.
- Niedziela L.S., Shi X., Nath J. y Ong T. (1991). Studies on three structurally related phenylenediamines with the mouse micronucleous assay system. *Mutat. Res.* 259, 43-48.
- Okai Y., Higashi-Okai K., Yano Y. y Brockman H.E. (1996). Suppressive effects of chlorophyllin on antimutagen-induced *umu* C gene expression in *Salmonella*

- typhimurium* (TA 1535/pSK 1002) and tumor promoter-dependent ornithine decarboxylase induction in BALB/c3T3 fibroblast cells. *Mutat. Res.* 370, 11-17.
- Ong T. M., Whong W. Z., Stewart J. y Brockman E. (1986). Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutat. Res.* 173, 111-115.
- Ong T., Whong W., Stewart J. y Brockman H.E. (1989). Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutat. Res.* 222, 19-25.
- Oster G., Broyde S. y Bellin J. (1964). Spectral properties of chlorophyllin a. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1309-1313.
- Perry P. y Searle C. (1977). Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by the hair-dye constituents 2-nitro-o-phenylenediamine and 4-nitro-o-phenylenediamine. *Mutat. Res.* 56, 207-210.
- Plewa M.J. y Gentile J.M. (1975). A maize-microbe bioassay for detection of proximal mutagenicity of agricultural chemicals. *Maize Genet. Corp. News Lett.* 49, 40-43.
- 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 chemicals 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: *Chemical mutagens, principles and methods for their detection*. de Serres F.J. y Hollaender A. (Eds.). Plenum Press, Nueva York, Vol. 7, pp 401-420.

- Plewa M.J., Weaver D.L. 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.
- Plewa M.J., Blair L.C. y Gentile J.M. (1985). A preincubation procedure for the plant cell-microbe coinubation assay for the detection of plant activated promutagens. *Environ. Mutagen.* 7, 40.
- Plewa M.J., Wagner E.D. y Gentile J.M. (1988). The plant cell/microbe coinubation assay for the analysis of plant-activated promutagens. *Mutat. Res.* 187, 207-219.
- Plewa M.J. (1989). The activation of promutagens by plant cell systems. *Environ. Mutagen Soc. Abstracts* 447.
- Plewa M.J. (1990). Activation of promutagens by plant cell systems. En: *Mutation and the environmental genotoxicity, risk and modulation*. Mendelshon M.L. y Albertini R.J. (Eds.), Wiley-Liss, Nueva York, pp.
- Plewa M.J., Smith S.R. y Wagner E.D. (1991). Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutat. Res.* 247, 47-64.
- Plewa M.J., Gichner T., Xin H., Seo K.Y., Smith S.R. y Wagner E.D. (1993). Biochemical and mutagenic characterization of plant-activated aromatic amines. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1353-1363.
- Preussman R., Schneider H. y Epple F. (1969). Untersuchungen sur wachweis alkylierender agentien. *Arzneimittel Forschung* 19, 1059-1073.

- Prival M.J., Bell S.J., Mitchell V.D., Peiperl M.D. y Vaughn V.L. (1984). Mutagenicity of benzidine and benzidine-cogener dyes and selected monoazo dyes in a modified *Salmonella* assay. *Mutat. Res.* 136, 33-47.
- 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.* 147, 51-57.
- Ravindran P. (1971). Cytological effects of Folidol. *Cytologia* 36, 504-508.
- Rehana Z., Malik A. y Ahmad M. (1995). Mutagenic activity of the Ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj (U.P), India. *Mutat. Res.* 343, 35-44.
- Restrepo I. (1992). Algunos impactos de los plaguicidas en el ser humano y el ambiente. En: *Los plaguicidas en México*. Comisión Nacional de Derechos Humanos, México D.F. pp. 35-74.
- Rueff J., Chiapella C., Chipman J.K., Darrondi F., Silva I.D., Duverger van Bogaert M., Fonti E., Glatt H.R., Isern P., Laires A., Leonard A., Llagostera M., Mossesso P., Natarajan A.T., Palitti F., Rodríguez A.S., Schinoppi A., Turchi G., Werle-schneider G. (1996). Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays. *Mutat. Res.* 353, 151-175.
- Salvadori D. M. F., Ribeiro L. R. y Natarajan A.T. (1993). The anticlastogenicity of  $\beta$ -carotene evaluated on hepatoma cells. *Mutat. Res.* 303, 151-156.
- Sandermann H. Jr. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.* 197, 183-194.
- Sandermann H. Jr., Musick T.J. y Aschbacher P.W. (1992). Animal bioavailability of a 3, 4-dichloroaniline-lignin metabolite fraction from wheat. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2001-2007.

- Sarkar D., Sharma A. y Talukder G. (1993). Differential protection of chlorophyllin against clastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow *in vivo*. *Mutat. Res.* 301, 33-38.
- Sato F., Imai K., Kimura R. y Murata T. (1984). Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VI Effect of its administration on mitochondria and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Mutat. Res.* 301, 33-38.
- Schutt H.A. y Thorgeirsson J. (1978). *In vitro* metabolism and mutagenic activation of 2-acetylaminofluorene by subcellular liver fractions from rats. *Cancer Res.* 38, 2501-2507.
- Scott B.R., Sparrow A.H., Schwemmer S.S. y Schairer L.A. (1978). Plant metabolic activation of 1,2-dibromoethane (EDB) to a mutagen of greater potency. *Mutat. Res.* 49, 203-212.
- Searle C.D., Harnden D., Venitt S. y Gyde O. (1975). Carcinogenicity and mutagenicity tests of some hair colourants and constituents. *Nature (Londres)* 255, 506-507.
- Seo K.Y., Riley J., Cortez D., Wagner E.D. y Plewa M.J. (1993). Characterization of stable high molecular weight mutagenic product(s) of plant-activated *m*-phenylenediamine. *Mutat. Res.* 299, 11-120.
- Shelby M.D. y Stasiewicz (1984). Chemicals showing no evidence of carcinogenicity in long-term, two species rodent studies: the need for short-term test data. *Environ. Mutagen* 6, 871-878.
- Shimabukuro R.H., Lamoureux G.L. y Frear D.S. (1982). Pesticide metabolism in plants reactions and mechanisms. En: *Biodegradation of pesticides*. Matsumura y Krishna Murti C.R. (Eds.), Plenum Press, Nueva York, pp. 21-66.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Shirasu Y., Moriya M., Kato K., Furumashi A. y Kada T. (1976). Mutagenicity screening of pesticides in microbial system. *Mutat. Res.* 40, 19-30.
- Schutt H.A.J. y Thorgeirsson S.S. (1978) *In vitro* metabolism and mutagenic activation of 2-acetylaminofluorene by subcellular liver fractions from rats. *Cancer Res.* 38, 2501-2507.
- Simic M. (1988). Mechanism of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202, 377-386.
- Simmon V., Poole L. y Newell G. (1976). *In vitro* Toxicol. *Appl. Pharmacol.* 37, 109.
- Singh B., Singh R., Singh Y. y Singh J. (1970). Effect of insecticides on germination, early growth and cytogenetic behaviour of barley *Hordeum vulgare*. *Environ. Exp. Bot.* 19, 127-132.
- Smith S.R., Verdier M.M., Wagner E.D. y Plewa M.J. (1989). Protein content of tobacco cells in relation to the plant activation of m-phenylenediamine and 2-aminofluorene. *Environ. Mutagen Soc. Abstracts*, 547.
- Solecki R., Fagi A.S. y Hibig V. (1996). Effects of methyl parathion on reproduction in the Japanese quail. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 902.
- Sterling T.M. (1994). Mechanisms of herbicide accumulation across plant membranes and accumulation in plant cells. *Weed Sci.* 42, 263-276.
- Stiborova M. y Anzenbacher (1991). What are the principal enzymes oxidizing the xenobiotics in plants: cytochromes P-450 or peroxidases? (a hypothesis). *Gen. Physiol. Biophys.* 10, 209-216.
- Terwell L. y vander Hoeven C.M. (1985). Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo(a)pyrene in *Salmonella* / microsome assay. *Mutat. Res.* 152,1-4
- Toering S.J., Gentile G. J. y Gentile J. M. (1996). Mechanism of antimutagenic action of (+)- catechin against the plant-activated aromatic amine 4-nitro-o-phenylenediamine. *Mutat. Res.* 361, 81-87.

- Troll W. y Weisner R. (1985). The role of oxygen radicals as possible mechanism of tumor promotion. *Ann. Rev. Pharmacol.* 25, 509-528.
- Vijayaraghavan M. y Nagarayan B. (1994). Mutagenic potential of acute exposure to organophosphorus and organochlorine compounds. *Mutat. Res.* 321, 103-111.
- Villaseñor I.M. y Edu D.A. (1993). Antimutagen from leaves of *Carmona retusa* (Vahl.) Masam. *Mutat. Res.* 298, 1215-1218.
- Wagner E.D., Gentile J.M. y Plewa M.J. (1989). Effect of specific monooxygenases and oxidase inhibitors on the activation of 2-aminofluorene by plant cells. *Mutat. Res.* 216, 163-178.
- Wagner E.D., Verdier M.M. y Plewa M.J. (1990). The biochemical mechanisms of the plant activation of promutagenic aromatic amines. *Environ. Molec. Mutagen.* 15, 236-244.
- Wagner E.D., Smith S.R., Xin H. y Plewa M.J. (1994). Comparative mutagenicity of plant-activated aromatic amines using *Salmonella* strains with different acetyltransferase activities. *Environ. Molec. Mutagen.* 23, 64-69.
- Weisburger J.H. (1988). Past, present and future role of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human cancer causation. En: *Carcinogenic and mutagenic responses to aromatic amines and nitroarenes*. C.M. King., Romano L.J. y Scuetzle (Eds.). Elsevier, Nueva York, pp. 3-19.
- West T. F., Hardy J. E. y Ford J. H. (1952). *Chemical control of insect*. Wiley, Gran Bretaña.
- Whong W.Z., Stewart J., Brockman H.E. y Ong T. (1988). Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B<sub>1</sub>-induced reversión in *Salmonella typhimurium* strain TA98, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 8, 215-224.
- Wild D. (1975). Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutat. Res.* 32, 133-150.



- Wildeman A.G. y Nazar R.N. (1982). Significance of plant metabolism in the mutagenicity and toxicity of pesticides. *Can. J. Genet. Cytol.* 24, 437-449.
- Woodwell G.M., Wittaker R.H., Reiners W.A., Likens G.E., Delwiche C.C. y Botkin D.B. (1978). The biota and carbon bud get. *Science* 199, 141-146.
- Zanocco A.L. Pavez R., Videla L.A. y Lissi E.A. (1989). Antioxidant capacity of diethyldithiocarbamate in a metal independent lipid peroxidative process, *Free Radical Biology and Medicine* 7, 151-156.
- Zhang Y., Talalay P., Cho C.G. y Posner G.H. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89, 2399-2403.

**10. TABLAS**

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**Tabla 1. Mutagenicidad inducida por insecticidas en *Salmonella typhimurium* cepa TA98 con y sin activación metabólica por células de cilantro (*Coriandrum sativum*)**

Testigos negativos	Revertantes por caja <sup>a</sup>	
	Sin metabolismo	Con metabolismo
Amortiguador de fosfatos	29 ± 1	29 ± 1
Medio MS	30 ± 2	30 ± 2
Medio MS + células muertas por calor	32 ± 1	33 ± 1
<b>Tratamientos (µg/frasco de cocultivo)</b>		
<b>Dimetoato</b>		
0 (testigos)	30 ± 2	30 ± 1
2.25	35 ± 2	33 ± 2
5.62	31 ± 2	41 ± 1 *
11.25	27 ± 1	51 ± 3 *
22.50	28 ± 2	57 ± 1 *
33.75	32 ± 2	94 ± 3 *
45.00	0	59 ± 3 *
67.50	0	29 ± 2
90.00	0	30 ± 1
112.50	0	22 ± 2
<b>Paratión metílico</b>		
0 (testigos)	30 ± 2	30 ± 1
2.25	32 ± 1	41 ± 1
5.62	37 ± 2	47 ± 2 *
11.25	34 ± 2	59 ± 1 *
22.50	18 ± 2	65 ± 2 *
33.75	13 ± 1	75 ± 2 *
45.00	0	40 ± 2
67.50	0	27 ± 2
90.00	0	25 ± 2
112.50	0	25 ± 2

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza.

$F_{\text{Dimetoato sin metabolismo}} = 2.794$ ,  $F_{\text{Dimetoato con metabolismo}} = 135.42$ ,  $F_{\text{Paratión metílico sin metabolismo}} = 24.43$ ,  $F_{\text{Paratión metílico con metabolismo}} = 55.586$  y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer,  $P < 0.001$

<sup>a</sup> Promedio de tres experimentos ± error estándar

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**Tabla 2. Mutagenicidad inducida por aminas aromáticas activadas por células de cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98**

Testigos negativos	Revertantes por caja <sup>a</sup>	
	Sin metabolismo <sup>a</sup>	Con metabolismo <sup>a</sup>
Amortiguador de fosfatos	29 ± 2	31 ± 2
Medio MS	31 ± 2	30 ± 2
Medio MS <sup>a</sup> + células muertas por calor	31 ± 1	33 ± 1
<b>Tratamientos (µg/frasco de cocultivo)</b>		
<b>NOP<sup>b</sup></b>		
0 (testigos)	30 ± 2	30 ± 1
1	54 ± 1	54 ± 1
10	94 ± 2 *	193 ± 3 *
100	323 ± 10 *	1077 ± 22 *
<b>m-PDA<sup>c</sup></b>		
0 (testigos)	30 ± 2	30 ± 1
50	36 ± 2	203 ± 3 *
100	40 ± 1	337 ± 8 *
500	37 ± 1	429 ± 14 *
<b>2AF<sup>d</sup></b>		
0 (testigos)	30 ± 1	30 ± 1
1	37 ± 1	106 ± 1 *
5	44 ± 1	288 ± 2 *
20	45 ± 1	583 ± 10 *

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza,  $F_{\text{sin metabolismo}} = 4.808$ ;  $F_{\text{con metabolismo}} = 1432.6$  y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer,  $P < 0.001$

<sup>a</sup> Promedio de tres experimentos ± error estándar.

<sup>b</sup> NOP, 4-nitro-*o*-fenilendiamina

<sup>c</sup> m-PDA, *m*-fenilendiamina

<sup>d</sup> 2AF, 2 aminofluoreno

<sup>e</sup> MS, medio Murashige y Skoog (1962) modificado

<sup>f</sup> células de cilantro en cultivo

**Tabla 3. Efecto de extractos de cilantro sobre la reversión espontánea de *Salmonella typhimurium* cepa TA98**

Testigo negativo	Revertantes por caja <sup>a</sup>
Amortiguador de fosfato	31 ± 2
<b>Extractos de cilantro</b> (μl/frasco de cocultivo)	
0	29 ± 1 N.S.
50	27 ± 2 N.S.
100	26 ± 1 N.S.
250	33 ± 1 N.S.
500	36 ± 2 N.S.
750	36 ± 1 N.S.
1000	37 ± 1 N.S.

N.S. No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza

<sup>a</sup> Promedio de tres experimentos ± error estándar

**Tabla 4. Efecto de extractos de cilantro sobre la mutagénesis inducida por 100 µg/frasco de cocultivo de NOP metabolizado por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98**

Concentración de clorofila en el extracto agregado (µg/ frasco de cocultivo)	Revertantes por caja <sup>a</sup>	Disminución de la Mutagenicidad (%)
0	1038 ± 10	0
16.25	996 ± 16 *	4.09
32.5	813 ± 19 *	21.69
81.25	468 ± 18 *	54.88
162.5	393 ± 9 *	62.18
243.75	320 ± 11 *	69.21
325.0	174 ± 7 *	83.21

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza, F = 640.26 y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, P < 0.001

<sup>a</sup> Promedio de tres experimentos ± error estándar

**Tabla 5. Efecto de extractos de cilantro frente a la mutagénesis inducida por 500 µg/frasco de mPDA metabolizado por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98**

Volumen de extracto de cilantro agregado (µl/ frasco de cocultivo)	Revertantes por caja <sup>a</sup>	Disminución de la Mutagenicidad (%)
0	429 ± 14	0
50	343 ± 15 *	20.04
100	281 ± 15 *	34.53
250	192 ± 8 *	55.16
500	142 ± 6 *	67.01
750	121 ± 6 *	71.83
1000	55 ± 6 *	87.14

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza, F= 148.47 y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, P < 0.001

<sup>a</sup> Promedio de tres experimentos ± error estándar

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**Tabla 6. Efecto de extractos de cilantro frente a la mutagénesis inducida por 20 µg/frasco de 2AF metabolizado por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98**

Volumen de extracto de cilantro agregado (µl/ frasco de cocultivo)	Revertantes por caja <sup>a</sup>	Disminución de la Mutagenicidad (%)
0	582 ± 19	0
50	468 ± 12 *	36.65
100	283 ± 6 *	51.41
250	182 ± 4 *	68.78
500	124 ± 9 *	78.84
750	113 ± 4 *	80.59
1000	44 ± 2 *	92.43

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza F= 379.10 y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, P < 0.001.

<sup>a</sup> Promedio de tres experimentos ± error estándar

**Tabla 7. Efecto de la clorofilina frente a la mutagénesis inducida por 100 µg/frasco de NOP metabolizado por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98**

Clorofilina (µg/ frasco de cocultivo)	Revertantes por caja <sup>a</sup>	Disminución de la mutagenicidad (%)
0	1034 ± 19	0
0.1	840 ± 43 *	18.80
1.0	610 ± 22 *	41.01
2.0	236 ± 10 *	77.13
3.0	223 ± 6 *	78.31
4.0	185 ± 5 *	82.48
5.0	127 ± 3 *	87.71

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza F= 323.94 y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, P < 0.001.

<sup>a</sup> Promedio de tres experimentos ± error estándar

**Tabla 8. Efecto de extractos de cilantro sobre la mutación revertante inducida por los insecticidas Dimetoato (Folimat) y Paratión metílico (Folidol) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98 activados metabólicamente por células de cilantro (*Coriandrum sativum*)**

Testigos negativos	Revertantes por caja <sup>a</sup>	
	(Con metabolismo)	(Con metabolismo) + extracto de cilantro
Tratamientos (µg/frasco de cocultivo)		
<b>Dimetoato</b>		
0 (X testigos)	32 ± 2	32 ± 1
2.25	33 ± 2	27 ± 2
5.62	41 ± 1 *	26 ± 2
11.25	51 ± 2 *	32 ± 1
22.50	57 ± 1 *	24 ± 2
33.75	94 ± 3 *	32 ± 2
45.00	59 ± 2 *	33 ± 3
67.50	29 ± 2	27 ± 2
90.00	30 ± 1	27 ± 2
112.5	22 ± 2	26 ± 2
<b>Paratión metílico</b>		
0 (X testigos)		
2.25	32 ± 2	32 ± 2
5.62	41 ± 1	25 ± 2
11.25	47 ± 3 *	26 ± 2
22.5	59 ± 1 *	31 ± 1
33.75	65 ± 2 *	28 ± 2
45.0	75 ± 5 *	27 ± 2
67.5	40 ± 2	29 ± 2
90.0	27 ± 2	26 ± 1
112.5	25 ± 2	32 ± 1
	22 ± 2	29 ± 1

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza  
 $F_{\text{Dimetoato con metabolismo sin extracto de cilantro}} = 2.794$ ,  $F_{\text{Dimetoato con metabolismo + extracto de cilantro}} = 135.42$ ;  $F_{\text{Paratión metílico con metabolismo}} = 55.586$ ,  
 $F_{\text{Paratión metílico sin metabolismo + extracto de cilantro}} = 24.43$  y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer,  $P < 0.001$

<sup>a</sup> Promedio de tres experimentos ± error estándar



**Tabla 9. Contenido de proteínas en el cultivo de células de cilantro (*Coriandrum sativum*) después del tratamiento con insecticidas y aminos aromáticas**

Tratamientos ( $\mu\text{g}/\text{frasco}$ de cocultivo)	Proteínas <sup>a</sup>	
	( $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ )	(%)
<b>Dimetoato</b>		
0 (Testigo, cultivo de cilantro)	36.0 $\pm$ 0.17	100
2.25	33.2 $\pm$ 0.13	92
45.00	29.5 $\pm$ 0.77 *	54
112.25	5.6 $\pm$ 0.11 *	15
<b>Paratión metílico</b>		
0 (Testigo, cultivo de cilantro)	36.0 $\pm$ 0.17	100
2.25	33.6 $\pm$ 0.22 *	93
45.00	18.3 $\pm$ 0.11 *	50
112.25	3.5 $\pm$ 0.07 *	10
<b>NOP<sup>b</sup></b>		
0 (Testigo, cultivo de cilantro)	36.0 $\pm$ 0.17	100
100	35.1 $\pm$ 0.25	97
<b>mPDA<sup>c</sup></b>		
0 (Testigo, cultivo de cilantro)	36.0 $\pm$ 0.17	100
500	34.6 $\pm$ 0.40	96
<b>2AF<sup>d</sup></b>		
0 (Testigo, cultivo de cilantro)	36.0 $\pm$ 0.17	100
20	34.9 $\pm$ 0.36	96

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza  $F = 1469$  y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer,  $P < 0.001$

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos  $\pm$  error estándar

<sup>b</sup> NOP, 4-nitro-*o*-fenilendiamina

<sup>c</sup> m-PDA, *m*-fenilendiamina

<sup>d</sup> 2AF, 2 aminofluoreno

**Tabla 10. Actividad de peroxidasa en los cultivos celulares de cilantro (*Coriandrum sativum*) antes y después del tratamiento con insecticidas y aminos aromáticas**

Tratamientos ( $\mu\text{g}/\text{frasco de cocultivo}$ )	Actividad de peroxidasa <sup>a</sup> (nmoles de tetraguayacol/min/ $\mu\text{g}$ de proteína) (%)	
<b>Dimetoato</b>		
0 (Testigo, cultivo de cilantro)	0.234 $\pm$ 0.004	100
2.25	0.227 $\pm$ 0.002	97
45.00	0.160 $\pm$ 0.002 *	68
112.25	0.085 $\pm$ 0.010 *	36
<b>Paratión metílico</b>		
0 (Testigo, cultivo de cilantro)	0.234 $\pm$ 0.004	100
2.25	0.225 $\pm$ 0.001	96
45.00	0.220 $\pm$ 0.001	94
112.25	0.151 $\pm$ 0.003 *	65
<b>NOP<sup>b</sup></b>		
0 (Testigo, cultivo de cilantro)	0.234 $\pm$ 0.004	100
100	0.221 $\pm$ 0.001	94
<b>MPDA<sup>c</sup></b>		
0 (Testigo, cultivo de cilantro)	0.234 $\pm$ 0.004	100
500	0.225 $\pm$ 0.002	96
<b>2AF<sup>d</sup></b>		
0 (Testigo, cultivo de cilantro)	0.234 $\pm$ 0.004	100
20	0.222 $\pm$ 0.001	94

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza  $F = 319.3$  y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer,  $P < 0.001$

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos  $\pm$  error estándar

<sup>b</sup> NOP, 4-nitro-*o*-fenilendiamina

<sup>c</sup> *m*-PDA, *m*-fenilendiamina

<sup>d</sup> 2AF, 2 aminofluoreno

**Tabla 11. Inhibición de la actividad de peroxidasa en cultivos celulares de cilantro (*Coriandrum sativum*) tratados con dietilditiocarbamato (DEDTC)**

Tratamientos	Actividad de peroxidasa (nmoles de tetraguayacol/min por µg de proteína) <sup>a</sup>	% inhibición
DEDTC (mM)		
0	0.238 ± 0.004	0
0.025	0.227 ± 0.004	5
0.250	0.194 ± 0.008 *	19
0.750	0.176 ± 0.004 *	26
1.5	0.124 ± 0.007 *	48
2.5	0.076 ± 0.004 *	69

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza  $F = 85.58$  y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer,  $P < 0.001$

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos ± error estándar

**Tabla 12. Inhibición inducida por el dietilditiocarbamato (DEDTC) de la activación de la *m*-PDA por células de cilantro (*Coriandrum sativum*)**

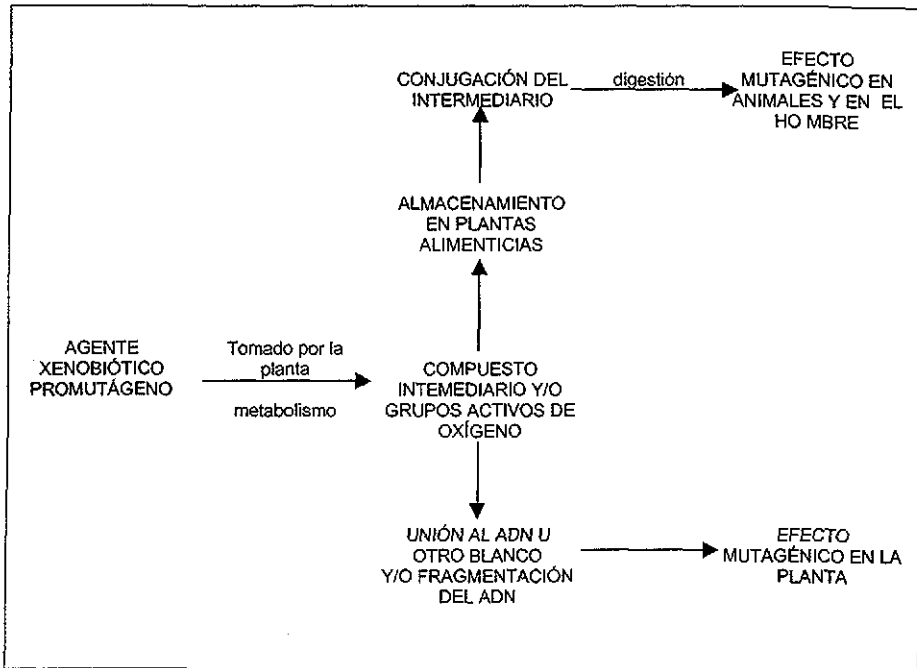
Frasco de cocultivo No	<i>m</i> PDA	DEDTC	Revertantes por caja <sup>a</sup>	% inhibición
1 Amortiguador de fosfatos	0	0	34 ± 3	-
2 DEDTC 10 mM	0	0	33 ± 2	-
3 <i>m</i> -PDA	500	0	430 ± 8	0
4	500	0.025	421 ± 19 *	33
5	500	0.25	327 ± 13 *	47
6	500	0.75	186 ± 35 *	70
7	500	1.5	157 ± 21 *	75
8	500	2.5	76 ± 5 *	88
9	500	5.0	58 ± 12	91
10	500	10.0	33 ± 8	95
11	500	25.0	30 ± 4	95

\* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza  $F = 107.2$  y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer,  $P < 0.001$ .

<sup>a</sup> promedio de dos experimentos ± error estándar

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## 11 FIGURAS



**Fig. 1 Vías metabólicas de agentes xenobióticos en las plantas, los animales y el hombre (Sandermann 1988)**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

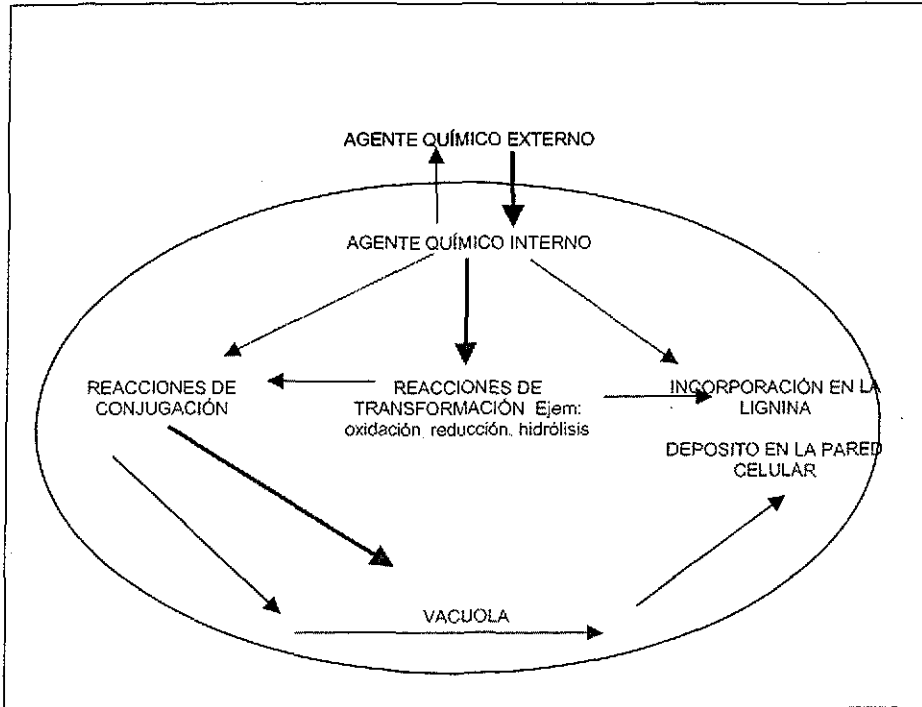
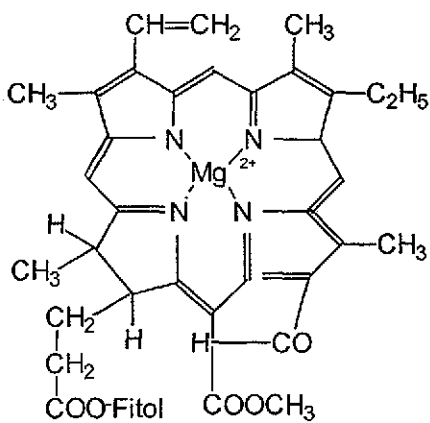
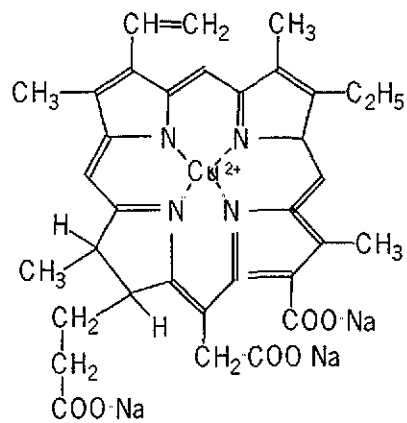


Fig. 2 Esquema propuesto para el metabolismo y la "excreción local" de agentes químicos ambientales en células vegetales (Higashi 1988).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

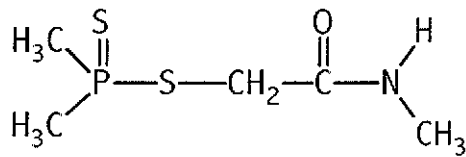


CLOROFILA a

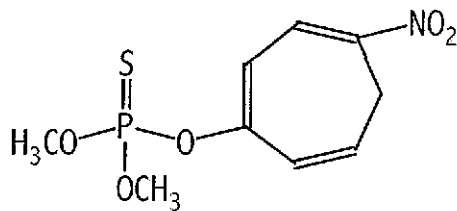


CLOROFILINA

Fig. 3 Fórmula química de la clorofila a y de la clorofilina

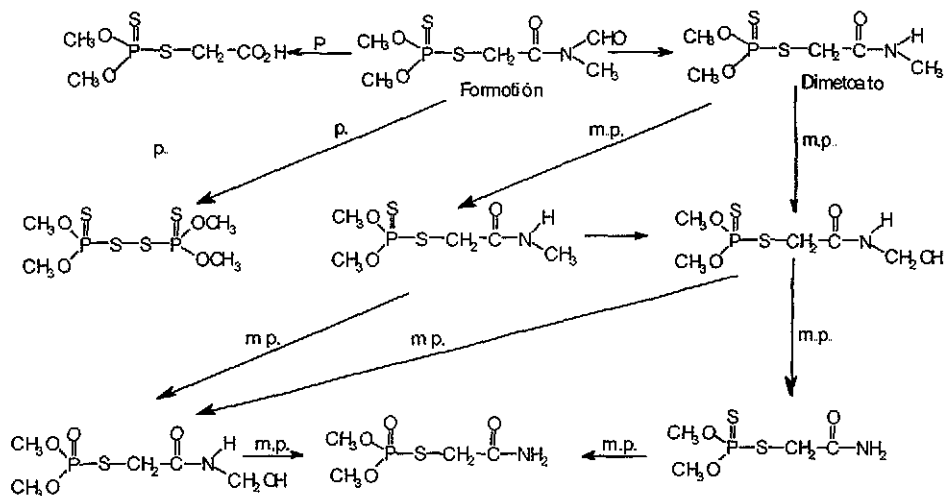


**Fig. 4** Fórmula química del Dimetoato (Folimat)



**Fig. 5** Fórmula química del Paratión metílico (Folidol)

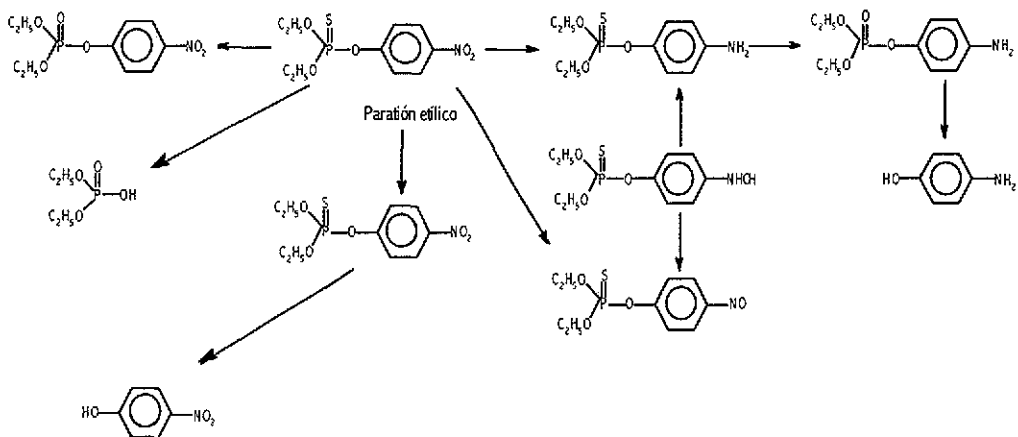




m Microsomas de hígado de conejo y rata  
 p Plantas (frijol, Phaseolus vulgaris L. y P. vulgaris var. Ohnegleichen)

Fig. 6 Vías metabólicas del Dimetoato (Folimat)

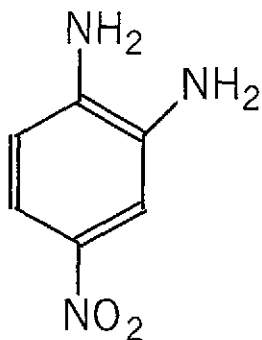
TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



m microsomas de células de hígado de rata albina y subfracción mitocondrial de hígado de rata

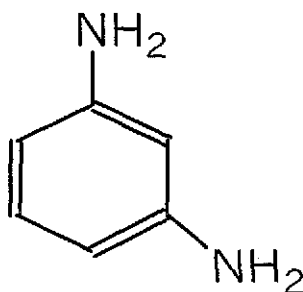
p homogeneizado de espinaca

**Fig. 7 Vías metabólicas del Paratión metílico (Folidol)**



4-Nitro-o-fenilediamina

Fig. 8 Fórmula química de la anilina 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP)



m-Fenilediamina

Fig. 9 Fórmula química de la anilina *m*-fenilendiamina (*m*-PDA)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

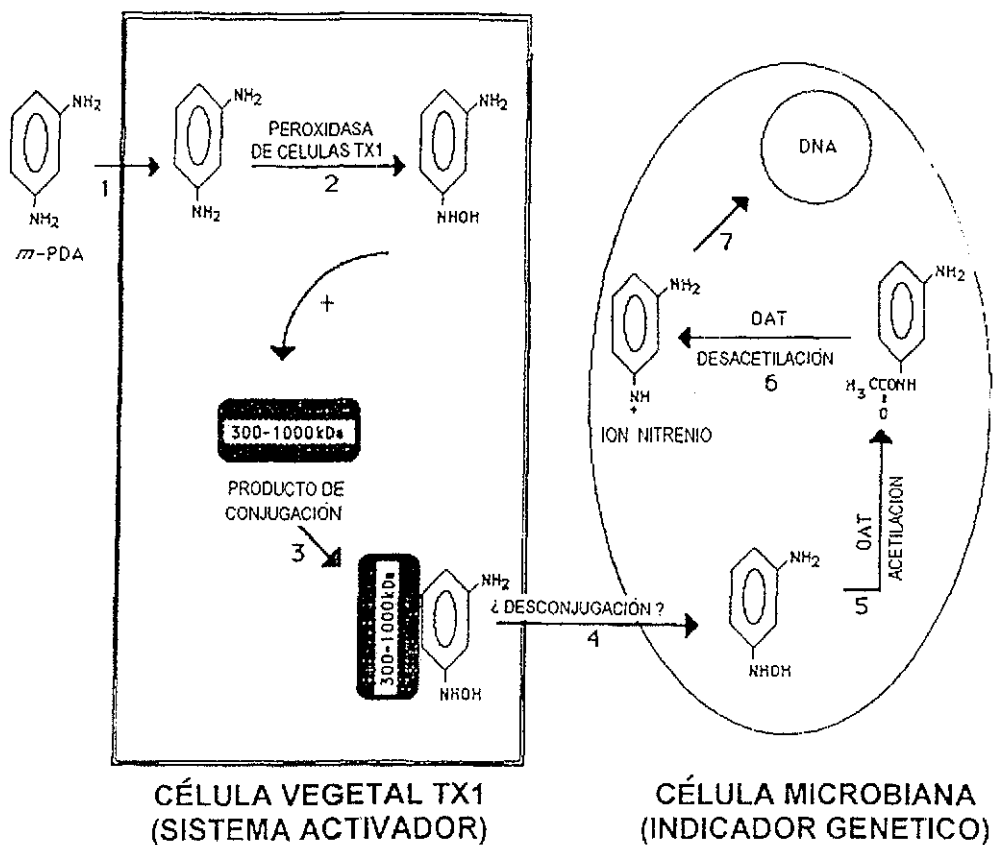


Fig. 10 Modelo común para la activación vegetal de la amina aromática, *m*-fenilendiamina (*m*-PDA) ( Plewa et al. 1993)

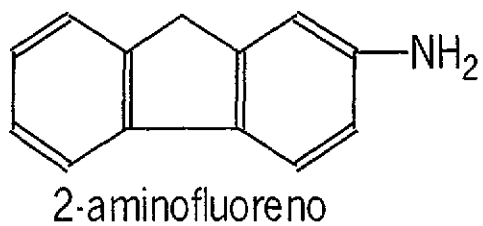


Fig . 11 Fórmula química de la amina aromática 2-amino fluoreno (2-AF)

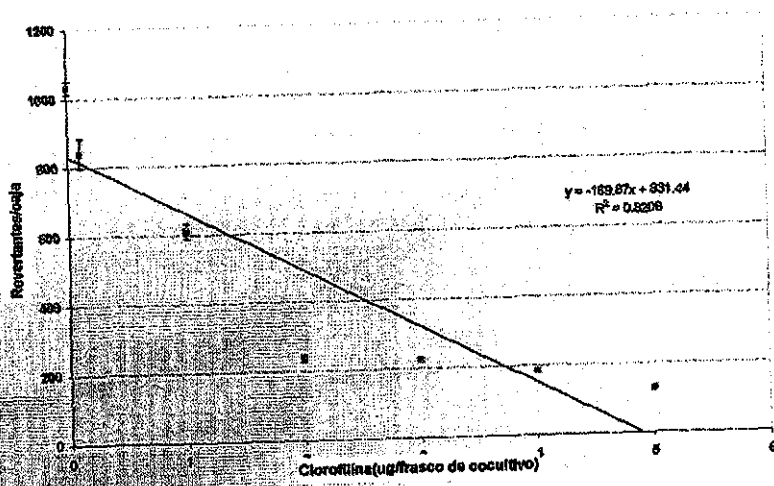


Fig. 12 Efecto de la clorofitina frente a la mutagénesis inducida por 100 ug/frasco de NOP metabolizada por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98

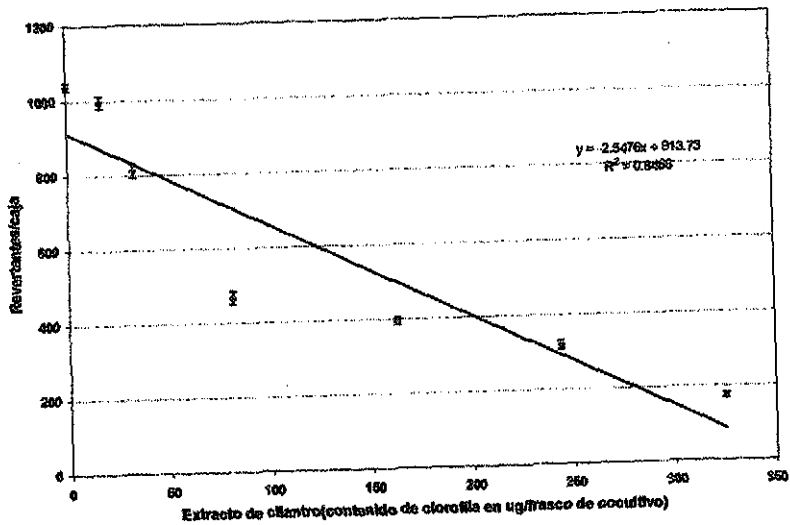


Fig. 13 Efecto de extractos de cilantro sobre la mutagénesis inducida por 100 ug/frasco de NOP metabolizado por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

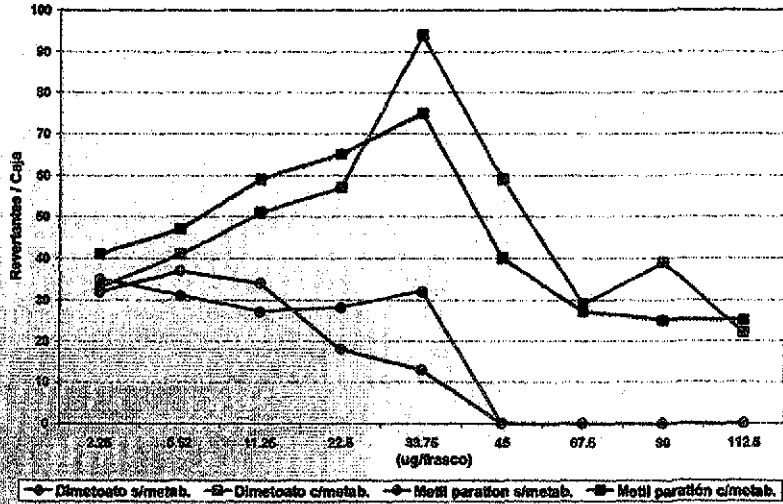


Fig. 14 Mutagenicidad Inducida por insecticidas en *Salmonella Typhimurium* cepa TA98 con y sin Activación Metabólica por Cilantro (*Coriandrum sativum*)

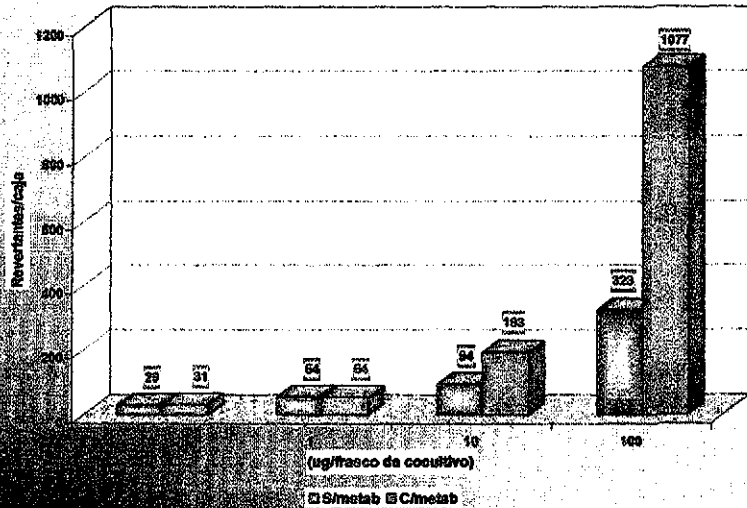
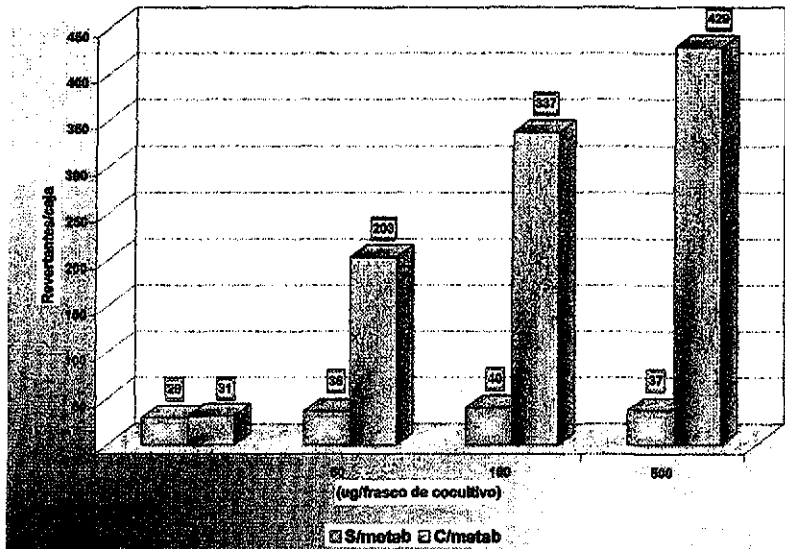
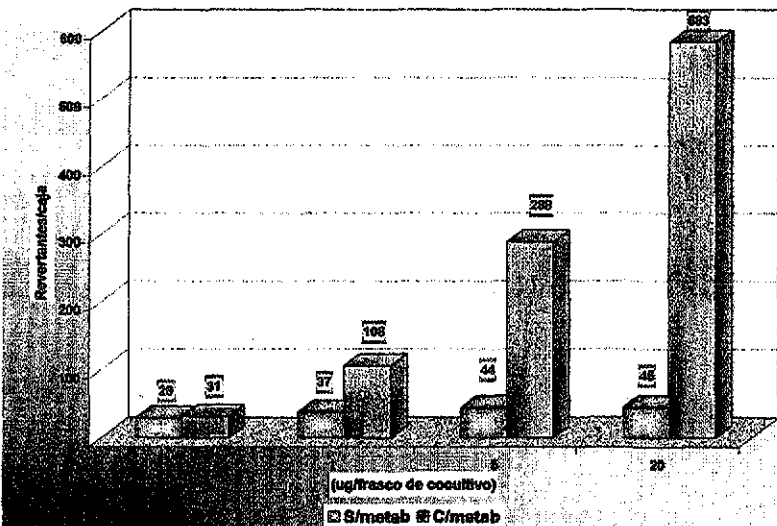


Fig. 15 Mutagenicidad Inducida por NOP activada por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

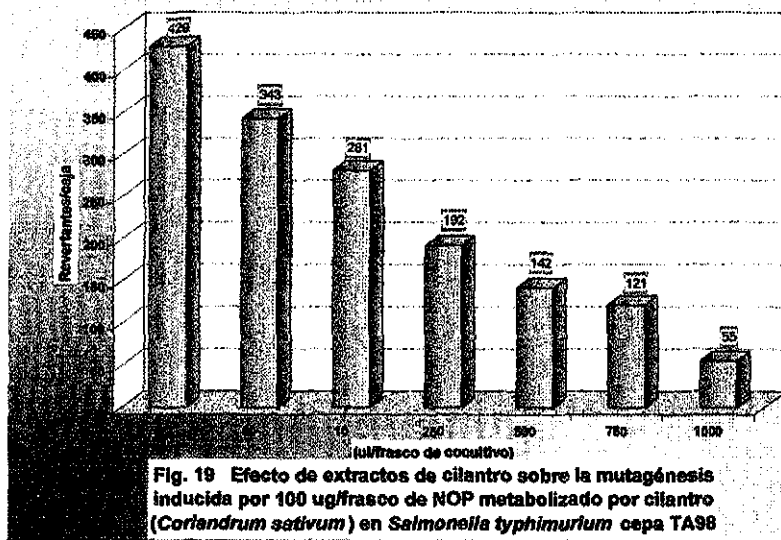
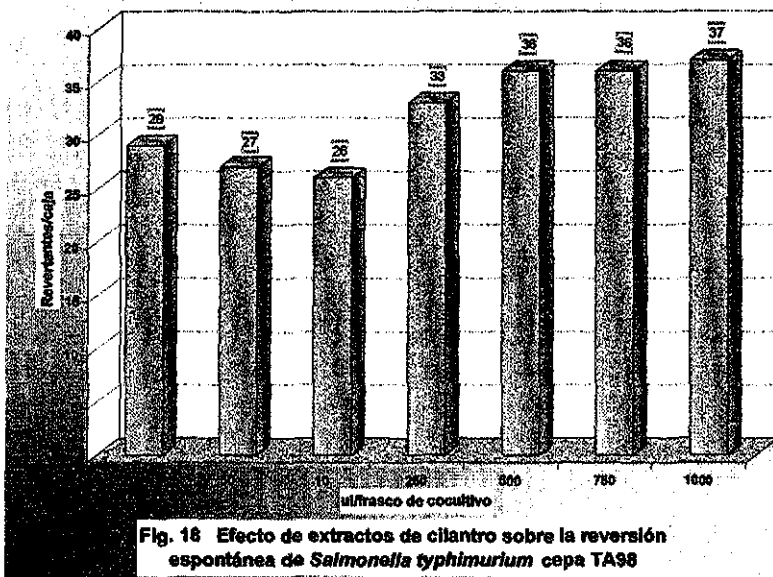


**Fig. 16** Mutagenicidad inducida por *m*-PDA activada por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98

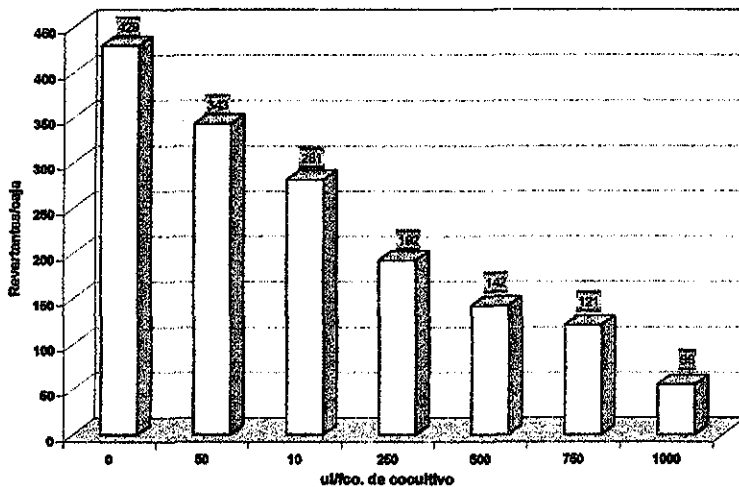


**Fig. 17** Mutagenicidad inducida por 2AF metabolizado por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98

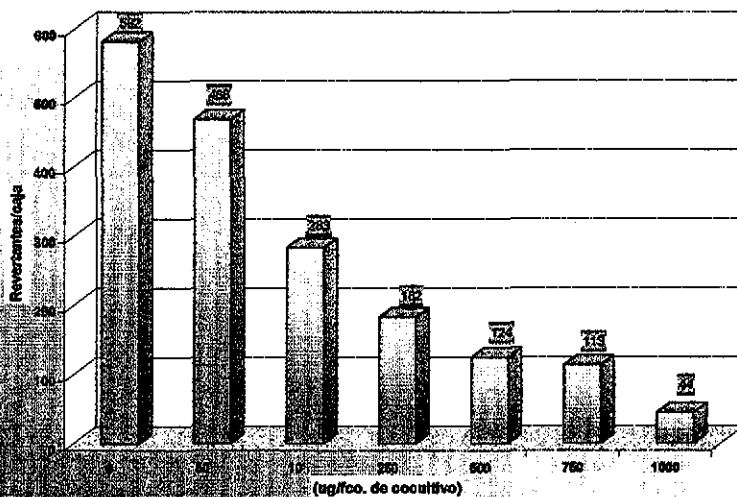




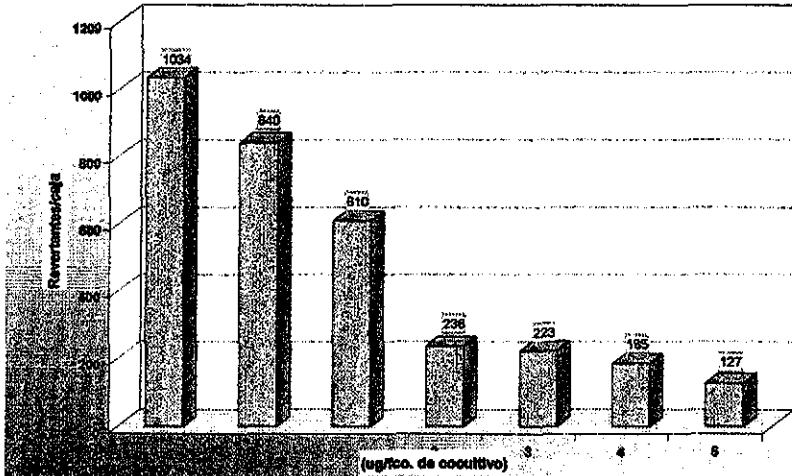
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



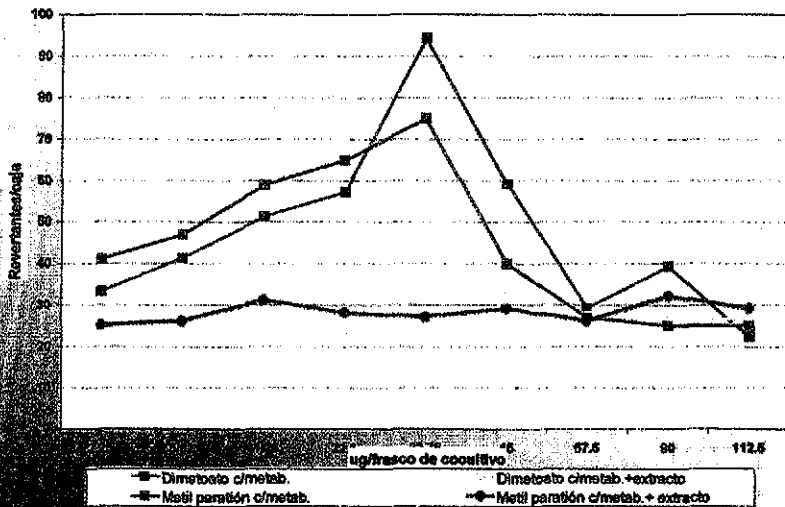
**Fig. 20** Efecto de extractos de cilantro sobre la mutagenicidad inducida por 500 ug/frasco de mPDA metabolizado por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98



**Fig. 21** Efecto de extractos de cilantro frente a la mutagénesis inducida por 20 ug/frasco de 2AF metabolizado por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98



**Fig. 22** Efecto de la clorofilina frente a la mutagénesis inducida por 100 ug/frasco de NOP metabolizado por cilantro (*Coriandrum sativum*) en *Salmonella typhimurium* cepa TA98



**Fig 23** Efecto de extractos de cilantro sobre la mutación revertante inducida por los insecticidas dimetoato y paratión metílico en *S. typhimurium* cepa TA98 activados por células de cilantro (*C. sativum*)

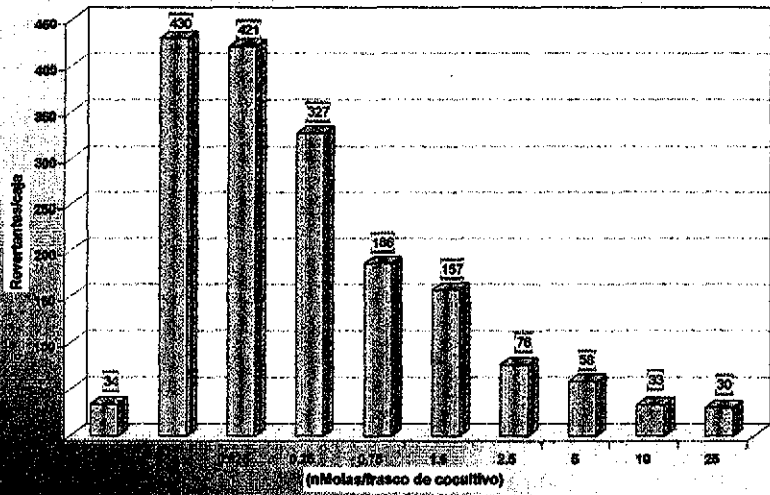


Fig 24 Inhibición inducida por el dietilditiocarbamato (DEDTC) de la activación de la mPDA por células de cilantro (*Coriandrum sativum*)