

00322

173



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DEL DAÑO AL ADN EN LINFOCITOS HUMANOS A TRAVES DEL ENSAYO DE ELECTROFORESIS UNICELULAR ALCALINA PROVOCADO POR EL HERBICIDA ASULAM ACTIVADO METABOLICAMENTE POR *Vicia faba*



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
IVONNE ROMERO MARTINEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO



MEXICO, D.F.



2003

1.A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
AZÚCAR
MEXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ivonne Romero Martínez

FECHA: 9 Septiembre - 2003

FIRMA: José Romero

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Evaluación del daño al ADN en linfocitos humanos a través del ensayo de electroforesis unicelular alcalina provocado por el herbicida asulam activado metabólicamente por Vicia faba.

realizado por Ivonne Romero Martínez

con número de cuenta 9424427-4 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Propietario

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Propietario

Dra. Ma. del Carmen Leticia Calderón Ezquerro

Suplente

Dra. Josefina Cortés Eslava

Suplente

M. en C. Ana Rosa Flores Márquez

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

L.B

AGRADECIMIENTOS

A la clase obrera y campesina de México, pues gracias a su arduo trabajo y luchas emprendidas, tuve la oportunidad de acceder y desarrollarme en las instituciones de educación básica y superior.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias y Centro de Ciencias de la Atmósfera por todas las herramientas teóricas y técnicas brindadas para mi formación profesional.

Con gran aprecio y admiración a mi directora de tesis, la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, por permitirme trabajar en sus proyectos y por ende, obtener importantes experiencias científicas y humanas.

A las doctoras Josefina Cortés Eslava y María Elena Calderón Segura por su invaluable asesoría en el campo de la Genotoxicología.

A la doctora María del Carmen Calderón Ezquerro por compartir conmigo su amplia experiencia académica y personal.

Un agradecimiento muy especial a la M. en C. Ana Rosa Flores Márquez por sus valiosas observaciones y sugerencias tanto teóricas como técnicas, así como por su amistad.

Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini por sus estimables aportaciones en la revisión de mi trabajo.

Al M. en C. Omar Amador Muñoz por su apoyo técnico en el procesamiento de los datos.

Al Dr. José Luis Bravo por sus útiles sugerencias en el manejo de los datos.

Al Biol. César Guerrero Guerra por su paciente enseñanza y ayuda en el uso adecuado de los programas estadísticos y de imágenes.

Con cariño a todos mis compañeros y amigos (as) del laboratorio de Citogenética por brindarme su apoyo y estímulo en este trabajo: Selene, Lety, Tere, Lucina, Susana, Luzma, Emma, Erika, Carolina, Eréndira, Martha, Vianey, Julia, María Esther, María del Carmen, Carmen (de los Mochis), Toño, Rodrigo, Emanuel, Leonel, Alejandro y el Profr. Miguel Ángel Meneses. A los compañeros del área de cómputo: Rosa María y Carlos. Asimismo, a todas mis amigas (os) y compañeros (as) de ayer, hoy y siempre.

Mi más profundo agradecimiento y amor a toda mi familia, pero especialmente a dos grandes mujeres a quienes debo en buena parte lo que soy y lo que he logrado, dos amigas que siempre han estado conmigo incondicionalmente tanto en lo próspero como en lo adverso: mi abuelita Cecilia Coss y mi tía Guadalupe Romero (Lupe).

ÍNDICE

CONTENIDO	Página
I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCIÓN	4
III. ANTECEDENTES	7
III.1 Breve historia de los plaguicidas	7
III.2 Los plaguicidas en México	9
III.3 Metabolismo vegetal	16
III.4 Carbamatos	21
III.5 Descripción, modo de acción y metabolismo del asulam	23
III.6 El ensayo cometa	28
IV. OBJETIVOS	34
V. HIPÓTESIS	35
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	36
VII. RESULTADOS	45
VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	47
IX. REFERENCIAS	53
X. TABLAS	59
XI. FIGURAS	60

I. RESUMEN

Actualmente los pesticidas agrícolas ocupan un papel fundamental para contrarrestar la amplia gama de plagas, evitando así importantes pérdidas económicas e inclusive disminuyendo agentes causales de enfermedades como la malaria. No obstante sus beneficios, también han producido fuertes consecuencias a la salud y al ambiente, pues la contaminación por este tipo de compuestos se ha convertido en una inminente amenaza para los ecosistemas, razón por la que se han realizado diversos estudios en los que se mencionan los daños que dichos agentes químicos provocan al material genético, ya sea de manera directa, o bien, indirectamente a través del metabolismo animal o vegetal. El presente estudio utiliza el metabolismo vegetal *in vivo* de *Vicia faba*, ya que a diferencia de los animales, las plantas almacenan los productos de la biotransformación del agroquímico e inciden sustancialmente en el flujo de energía, ya que al ser digeridas por los animales e incluso por el hombre, a la larga puede tener efectos genotóxicos considerables que posiblemente favorezcan la iniciación de procesos cancerígenos. Es por esto, que se decidió probar la influencia del metabolismo vegetal sobre el herbicida asulam con el fin de evaluar el efecto adverso que tienen sus metabolitos sobre el ADN.

Uno de los procedimientos generales para los estudios de biomonitoreo citogenético, que se emplea como sistema evaluador del daño al ADN es la electroforesis unicelular (también denominada ensayo cometa) en las células linfocitarias humanas; en este trabajo esta técnica fue elegida en su modalidad de electroforesis unicelular alcalina, con base en su alta sensibilidad, relativa rapidez y reproducibilidad para detectar rompimientos de una hebra de ADN en los sitios alcalinos lábiles y en eventos de reparación por escisión incompleta.

Los resultados obtenidos con este ensayo muestran que efectivamente hubo un efecto genotóxico en los linfocitos tratados con las diferentes concentraciones del extracto vegetal que contenía los metabolitos del asulam, con diferencias significativas de los testigos negativos (uno con la fracción enzimática de *Vicia faba* y el otro sólo con medio además de células) con los lotes experimentales. Se demuestra que el asulam es un mutágeno indirecto que requiere del metabolismo vegetal, aunque no se encontró un comportamiento lineal del efecto con respecto al aumento en la concentración, excepto en los dos primeros tratamientos, lo que indica que en las concentraciones más altas se sobrepasó el límite de saturación del conjunto enzimático, conduciendo a una fitotoxicidad parcial de las raíces de la planta. Asimismo, a pesar del daño inducido, también se observó que después de cierto tiempo hubo un proceso de reparación en el material genético, suceso que abre la vía a futuras investigaciones en cuanto a la capacidad de la célula para revertir el deterioro provocado por distintos contaminantes.

II. INTRODUCCIÓN

El gran desarrollo industrial ha permitido al ser humano una vida más cómoda y hasta cierto punto afable para su propia supervivencia, no obstante, hoy en día la mayor parte de los recursos naturales que sostienen el progreso, están seriamente amenazados por diversos tipos de contaminantes, entre los cuales destacan los plaguicidas, agentes químicos que son utilizados como inhibidores y destructores de poblaciones biológicas (fundamentalmente insectos, hongos, algunos vertebrados y malezas) que impiden el crecimiento adecuado y el desarrollo de plantas económicamente importantes (Cunningham y Saigo 1997). En el ser humano la contaminación por agentes químicos agrícolas repercute no sólo a nivel fisiológico sino que puede alcanzar hasta la molécula de ADN, en cuyo daño están implicados factores tanto de tipo endógeno como exógeno (físicos y químicos); en el primer caso se sabe que las células de los mamíferos, en promedio, presentan cerca de 10,000 eventos de modificación en su material genético por célula cada hora (Moustacchi 2000), de modo que mantener los genes sin alteraciones importantes, es todo un reto para las células y de hecho se lleva a cabo, mediante varios sistemas de reparación enzimáticos. No obstante, la frecuente exposición de los individuos a los contaminantes ambientales (tipo exógeno), entre ellos los agroquímicos, hace que en ciertas ocasiones sea más difícil la restauración genética que después de cierto tiempo, da como resultado no sólo algunos tipos de cáncer, sino también alteraciones congénitas y severos problemas de intoxicación –principalmente en los niños de las comunidades indígenas- como ya han reportado los centros de salud ubicados en las zonas rurales del norte y occidente de la República, en donde se observan con mayor incidencia estos padecimientos (DGEIE 1995). Evidentemente, es el atraso socioeconómico de México el que justamente impide que se implemente alta tecnología en las faenas del campo, de manera que muchas de las labores siguen haciéndose manualmente, y por supuesto

quienes las llevan a cabo y los más afectados, son los trabajadores(as) agrícolas y sus familias, ya que son los encargados directos de la preparación y la aplicación de los compuestos sin que las empresas les otorguen algún tipo de protección como las normas de manejo de estos productos lo establecen (OMS 1990). Aunado a lo anterior, la afectación de los recursos y en particular del agua, hace posible que se presenten frecuentes episodios de intoxicación por la ingesta de alimentos contaminados, que afectan con más fuerza a los menores de edad provenientes de este sector social (OMS 1990).

El enfoque del presente estudio se restringe al comportamiento genotóxico del herbicida asulam, clasificado en el grupo de los carbámicos, que son ampliamente utilizados en los campos de cultivo en el norte de la República Mexicana (DGEIE 1995) sin protección para quienes los manipulan, además de que el deterioro que causan al medio ha conducido a que algunos de ellos sean proscritos, o bien que se les apliquen fuertes restricciones por sus efectos nocivos para la salud y el ambiente (Yin-Tak 1983).

Por esto, se requiere imprescindiblemente la realización de investigaciones que impliquen pruebas en plantas como la activación metabólica *in vivo* y de carácter genotoxicológico, enfocadas a la prevención de patologías provocadas en las personas por este tipo de agentes químicos y que además sirvan como base para la búsqueda de alternativas de control de plagas compatibles con el medio natural, tratando de evitar hasta donde sea posible, la perturbación de la dinámica normal de los agrosistemas.

Los efectos genotóxico y citotóxico del herbicida asulam, ya han sido probados mediante técnicas como el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) que permite la identificación de daño a

través de los cambios producidos entre determinados segmentos de las dos cromátidas que integran al cromosoma, lo cual puede visualizarse claramente gracias a la tinción diferencial previamente aplicada al cromosoma. En comparación con el ensayo cometa, el ICH requiere de mayor inversión de tiempo en cuanto a que es necesario estimular a los linfocitos para su proliferación y dejar pasar dos ciclos de replicación del material genético para conseguir el efecto óptico deseado. De modo que si la técnica del ensayo cometa ofrece una sensibilidad alta, relativa rapidez y reproducibilidad para detectar rompimientos de una o doble hebra de ADN en células individuales, entonces el presente estudio permitirá verificar las ventajas de este método en los estudios de biomonitorio citogenético de contaminantes ambientales.

III. ANTECEDENTES

III.1 Breve historia de los plaguicidas

Aunque el auge de los plaguicidas se haya dado hace algunas décadas, lo cierto es que su aplicación para controlar distintos tipos de plagas en los campos de cultivo se remonta a la época antigua; la cultura romana ya utilizaba azufre inflamable para eliminar a los insectos y sal para modular las poblaciones de malezas. En el siglo IX los chinos empleaban arsénico mezclado con agua contra los insectos, posteriormente en los inicios del siglo XIX la piretrina y la rotenona fueron descubiertas para ser aplicadas como insecticidas. En 1865 se comenzó a fabricar el verde Paris, una mezcla de cobre y arsénico que subsecuentemente, se usó para controlar a un tipo de escarabajo depredador de la papa. En 1882, se elaboró un fungicida conocido como mezcla Bordeaux, formada por la combinación de cal con sulfato de cobre, la cual fue aplicada para reducir la población de una determinada especie de hongo en las plantaciones de uva. El polvo de mercurio fue desarrollado en 1890 como un tratamiento para semillas, años más tarde, en 1915, el líquido de mercurio fue utilizado como un tratamiento para proteger a éstas contra diversas enfermedades ocasionadas por hongos (Bohomont 1990).

Una de las poblaciones biológicas que frecuentemente ocasiona más problemas a los cultivos son las malezas, que en varias ocasiones crecen antes que la planta deseada y además, si los recursos de espacio y nutrición llegan a ser limitados, entonces ocurre una ardua competencia entre las especies (Cobb 1992). Es por esto, que a principios de la década de los 30 del siglo veinte, comenzaron a impulsarse y a utilizarse en los países más avanzados (principalmente europeos) los modernos

herbicidas sintéticos (Cobb 1992), que permitieron reducir sustancialmente las pérdidas en las cosechas y por ende, las ganancias para los productores, aunque Bohomont (1990) reporta que ya desde la primera década del siglo XX se descubrieron y sintetizaron los primeros herbicidas e insecticidas orgánicos que precedieron a cientos de productos comercializables en los 40, como los hidrocarburos clorados, los fosfatos orgánicos y carbámicos en los 50, en los 60 se desarrollaron pesticidas más específicos, biológicamente muy activos y que se aplicaban en dosis de gramos u onzas por acre, los cuales incluían piretroides, sulfonilureas e imidazolinonas. Fue tal el furor de estos productos en la primera mitad del siglo pasado que se sabe que en los Estados Unidos de América por ejemplo, cada dólar que se invertía en pesticidas, era recuperado en una ganancia de 4 dólares; de manera similar en el Reino Unido, una libra empleada en la compra de agroquímicos generaba 5 libras adicionales (Green *et al.* 1987). De este modo, se suscitó un aprovechamiento económico y eficiente en el combate de malezas y también se logró disminuir en cierta medida las enfermedades transmitidas por insectos vectores, tales como la malaria que antes del uso intenso de pesticidas se calcula que 500 millones de personas padecían esta enfermedad, en comparación con los últimos años en los que se estima que alrededor de 2 millones de personas mueren cada año (Cunningham y Saigo 1997).

III.2 Los plaguicidas en México

El empleo de los plaguicidas en la agricultura mexicana, se inicia a finales del siglo XIX. En 1898, ya se utilizaban 38 compuestos químicos; entre ellos se encuentran el arseniato de plomo, arsénico blanco, ácido cianhídrico, aceto-arsenito de cobre (verde París), ácido carbónico, ácido fénico y sulfato de cobre con cal viva (mezcla de Burdeos). Éstos se consideraban como "insecticidas de patente", pero como no todos eran seguros, muchos agricultores prefirieron elaborar sus propios remedios (Restrepo 1992).

La creciente industrialización en las primeras décadas del siglo XX no sólo influyó en las zonas urbanas, sino también en el campo, aunque en menor grado; desde entonces el combate de plagas se ha convertido en la acción estratégica de primer orden para obtener altas cosechas y ventajas económicas para los productores. Esto facilitó la introducción de cantidades crecientes de plaguicidas a partir de la década de los 40, con una fuerte importación de tales insumos y también se impulsó a nivel local la fabricación y formulación de numerosos compuestos para su uso generalizado tanto en extensas regiones de agricultura comercial como en las de temporal. Su empleo intenso se dió primeramente en los campos algodonereros por la alta demanda que tenía en el exterior. Gradualmente, se fueron aplicando a los cultivos destinados al mercado nacional. En forma paralela, algunos agroquímicos se utilizaron para controlar los vectores asociados a enfermedades endémicas y para combatir diversas plagas domésticas. Hasta ahora, se tienen detectadas seis regiones de la República Mexicana en las que por ser emporios agrícolas, se ha abusado ampliamente de los agroquímicos: la Comarca Lagunera (formada por nueve municipios de los estados de Coahuila y Durango), las zonas norte y sur de Sonora, el

Soconusco (Chiapas), el norte de Tamaulipas, Tierra Caliente en Michoacán y Sinaloa (Valle Culiacán y Valle del Fuerte) (Restrepo 1992).

En el agro mexicano, aproximadamente el 70% de las aplicaciones de plaguicidas se realiza por vía aérea; el resto es terrestre, con tractores, mochilas portátiles y bombas de mano. Para efectuar los vuelos se cuenta principalmente con la Federación de Asociaciones de Pilotos y Propietarios de Aviones Agrícolas de la República Mexicana, con el fin de mantener los monopolios locales y evitar la competencia y traslado de las unidades de una zona a otra. La aplicación aérea tiene la ventaja de la rapidez y la relativa precisión sobre los cultivos, pero puede ocasionar considerable contaminación al ambiente y problemas de intoxicación severos a los pilotos y trabajadores agrícolas migratorios. La aplicación terrestre, ocupa un porcentaje menor, pero tiene también ventajas y desventajas. Con ésta, es posible reducir la contaminación generalizada, los daños a otros cultivos próximos y el desperdicio de plaguicida, además de que es menos costosa que la aérea. Se aplica generalmente a los cultivos de hortalizas donde las plantas son pequeñas y la aspersión es directa, pero en cambio es un grave riesgo para la salud y la seguridad de quienes intervienen en dicha operación (Restrepo 1992).

Una buena parte de la propiedad agrícola en México pertenece a la iniciativa privada y por tanto, requieren de mano de obra barata siendo los trabajadores agrícolas adultos, adolescentes y niños el sector que padece con mayor frecuencia las intoxicaciones por plaguicidas, debido a la carencia de lo más indispensable para la realización de su trabajo y por si fuera poco, recibiendo salarios miserables. Por ejemplo, en los campos de tabaco en Nayarit se comprobó que los aplicadores manuales carecen de cualquier equipo protector, incluso de paliacates para cubrir la nariz y la boca. En otros lugares como el valle de Culiacán, los jornaleros aplican el agroquímico sin camisa y con la cabeza y la boca solamente

cubiertas con pañuelos. Algunos con las piernas y los pies al descubierto, de modo que al fumigar quedan bañados con el herbicida. Muchos de los trabajadores desconocen lo que aplican ya sea porque no saben leer, los envases de los productos no están etiquetados, o bien por no ser instruidos previamente (Restrepo 1992).

Así pues, el riesgo de envenenamiento se presenta principalmente en los peones o jornaleros que se ocupan de la aspersión manual o mecánica y quienes efectúan el bandereo (personas que guían desde tierra a los aviones fumigadores). Otros trabajadores que conforman un grupo de alto riesgo son aquellos que laboran en las plantas formuladoras, que presentan condiciones deplorables: poca ventilación, los productos utilizados (principalmente polvos) se encuentran tirados en el piso y forman una nube cuando no funciona la planta (Restrepo 1992) y peor aún, como es de esperarse en el marco del capitalismo: las empresas no dan ninguna protección física ni prestaciones sociales a los obreros de esta rama productora y desde luego, esta no es una situación particular para México. Por ejemplo, recientemente se hizo público el caso de uno de los grandes consorcios fruteros en Ecuador, Bonita Banana, el cual hace amplio uso de la mano de obra infantil con jornadas extenuantes de hasta 12 horas, manipulando toda una serie de pesticidas sin los instrumentos más elementales de protección y además, la única agua disponible viene de pozos muy contaminados, causando fuertes padecimientos gastrointestinales (Grupo Internacionalista 2003).

Ciertamente, aunque se sabe por investigaciones de profesionales y por los periódicos, que los casos de intoxicación en los obreros relacionados de alguna manera con los agroquímicos han sido numerosos, son relativamente pocos los que llegan a registrarse en los centros de salud, ya que la

mayoría de los afectados no mueren en los centros hospitalarios sino en sus hogares, desconociendo los familiares la causa real del deceso.

Entre los problemas de salud más graves a largo plazo en relación con los plaguicidas está el cáncer en diferentes modalidades como la anemia aplásica, la leucemia, entre otras, así como las anomalías físicas en los neonatos. Por otra parte, existen patologías en las que se presentan síntomas indicadores del comienzo de posibles intoxicaciones como la enteritis, los padecimientos diarreicos, irritaciones en la piel y las enfermedades respiratorias. Pese a que estas manifestaciones son síntomas de alarma para los trabajadores, muchos de ellos prefieren resistirlos y no exponerlos por temor a perder su trabajo.

En México, se tienen registros insuficientes no sólo con respecto a los daños a la salud humana, sino también en cuanto a los efectos al ambiente, pues se desconoce con precisión la magnitud real y potencial de los desajustes ambientales al agua, suelo y aire y sus consecuencias directas sobre la fauna y la flora de una determinada región. En 1982, se dió a conocer que en cualquier mercado del D.F. es posible comprar pescados de agua dulce con concentraciones de plaguicidas hasta cien veces más altas que las consideradas como máximas aceptables. La leche de vaca y sus derivados (queso, crema, mantequilla) exceden en varias regiones del país los niveles de tolerancia establecidos por las normas internacionales en cuanto al contenido de agroquímicos, en tanto que la leche materna puede alcanzar hasta diez clases de contaminantes, entre ellos DDT, DDE, epóxido de heptacloro, dieldrín, BHC, algunos de los cuales en la década de los 80 dieron a México el primer sitio en el mundo por tan altas concentraciones (Albert 1981). Estudios más recientes realizados por Waliszewski *et al.* (2002), durante el período 1997-1999 en el estado de Veracruz, siguen revelando la presencia de plaguicidas,

sobre todo de DDT en suero sanguíneo (ng/ml), tejido adiposo (mg/kg en base lipídica) y leche materna (mg/kg en base lipídica), pero en comparación con otros países tropicales como Brasil, Nicaragua, Kenia e India, los pobladores de las zonas tropicales de México no difieren significativamente en sus niveles de contaminación (10.5 ng/ml en suero). Los análisis de la leche materna han conducido a que este alimento sea considerado como una muestra adecuada para medir el nivel de contaminación humana en los estudios epidemiológicos, ya que para la producción de leche el organismo utiliza principalmente las grasas endógenas a las que se adhieren compuestos muy lipofílicos y persistentes como es el caso del DDT, que posteriormente es liberado durante la lactancia, constituyendo así una importante vía de descontaminación materna (Waliszewski *et al.* 2002).

La contaminación del agua, básicamente en mantos acuíferos, lagos, esteros, lagunas y mares, constituye un riesgo constante y en algunas ocasiones una realidad sumamente nociva para los animales y las comunidades humanas. Estudios realizados en uno de los emporios agrícolas más importantes en el país, como es la Comarca Lagunera, en donde fluyen los ríos Nazas y Aguanaval, se ha detectado una fuerte contaminación por compuestos organoclorados provenientes de tierras tratadas con plaguicidas. El efecto de estos compuestos en los ríos es notorio, pero sólo se informa de ello cuando ocurre mortandad de peces y de aves. Sin embargo, los insectos, crustáceos y zooplancton mueren también en grandes cantidades (Restrepo 1992).

Dependiendo del tipo de plaguicida aplicado a un terreno de cultivo determinado, en múltiples ocasiones el suelo absorbe una buena parte de éste, que puede llegar a niveles muy profundos como son los mantos acuíferos, lo que implica un considerable riesgo ya que de esta fuente se extrae una gran cantidad de agua para beber y en las labores domésticas.

Las regiones principales en las que se ha denunciado la presencia de plaguicidas son las lagunas del Golfo de México y de la costa del Pacífico. Otro buen ejemplo lo constituyen las lagunas y las bahías de Sonora y Sinaloa. En la primera, las más importantes económicamente son Bahía de Lobos, Bahía de Tóvari y el complejo Yavaros, que se integra con las lagunas Yavaros, Moroncarit y Etchoropo y constituyen la desembocadura del río Mayo. En Sinaloa, la Bahía de Altata-Ensenada del Pabellón, donde desemboca el río Culiacán, y la Huizacha-Caimanero, receptora de los ríos Presidio y Baluarte. Se trata de las zonas de mayor explotación del camarón, la especie pesquera más importante para exportación. Existen otras también comerciales: la lisa, la caballa, la platija, la mojarra, el róbalo, la almeja, que son todas muy susceptibles a los plaguicidas y pueden acumular sus residuos a través de la cadena alimenticia, lo que significa un peligro para la salud de los depredadores y por ende del hombre.

Otra de las pesquerías que tiene México es la del ostión, que es afectada por la gran contaminación de los esteros donde se cultiva, lo que provoca la reducción de su crecimiento, del tamaño de su concha y lo más grave, en vista de que el ostión es un organismo filtrador que capta su alimento del agua, que puede estar contaminada con insecticidas no solubles como ocurre con los organoclorados, se acumulan en dosis subletales que pueden afectar a otros animales.

El efecto en el fitoplancton es también muy importante, porque constituye la base de la cadena trófica en los sistemas acuáticos y es más susceptible de recibir la acción negativa de los plaguicidas. Entre los efectos adversos que muestra el fitoplancton están: la inhibición del crecimiento y de la respiración, la reducción de la fotosíntesis, la inhibición de la utilización de carbono en la fotosíntesis (Batra 1982).

Con respecto a la contaminación de los alimentos, en varias ocasiones se han rechazado los productos agrícolas en el mercado internacional, sobre todo por los Estados Unidos de América, cuyas autoridades sanitarias han encontrado residuos considerables de plaguicidas. En algunos de los casos más prominentes de pérdidas económicas por esta causa, los productores argumentan que en buena medida la instancia responsable de estas devoluciones de exportación es BANRURAL, que en ocasiones recomienda "incorrectamente" la aplicación de plaguicidas muy persistentes y pese a que no se aconseja el consumo de los productos agrícolas analizados, éstos vuelven a ser comercializados en toda la República (Restrepo 1992).

El uso de productos químicos en la agricultura, la ganadería y la industria, origina problemas de contaminación en las ramas alimenticia, textil, cosmético-farmacéutica, vitivinícola, etc. Entre los más susceptibles de contaminación figuran cremas emolientes, lubricantes, cremas faciales y para manos, medicamentos oleosos para el cabello y pericráneo, aceites laxantes, pomadas, aceites vitamínicos, diversos cosméticos, alimentos enlatados, jaleas, aceites comestibles de cártamo, de oliva, de coco y algodón. Por supuesto, también las verduras, los cereales, las harinas y, en consecuencia, el pan y la tortilla. Otro alimento que entra en este conjunto y que es considerado como básico es el huevo. Si bien estos productos no alcanzan aún niveles alarmantes, se sabe muy poco sobre las consecuencias presentes y futuras que tienen sobre la salud de la población. (Restrepo 1992).

III.3 Metabolismo vegetal

A pesar del gran avance que significó la implementación de pesticidas para optimizar y reducir los costos de producción en la agricultura, por mucho tiempo se desconocieron los efectos de éstos hacia los propios cultivos, en el sentido de que las plantas poseen sistemas enzimáticos que permiten realizar su transformación metabólica en compuestos genotóxicos.

Plewa (1978) desarrolló un método para evaluar las respuestas mutagénicas de varios pesticidas en presencia de un sistema enzimático vegetal y acuñó el término de "activación vegetal" para definir el proceso por el cual un promutágeno es activado en un mutágeno por algún tipo de acción biológica a través de un sistema vegetal (Plewa y Gentile 1982). Los agentes químicos que no son mutagénicos por sí mismos, pero que necesitan de la activación metabólica previa (ya sea de plantas o animales) para producir tal efecto, son denominados promutágenos o mutágenos de acción indirecta (Plewa 1978, Plewa y Gentile, 1982). La activación metabólica en animales fue primeramente conocida con la fracción microsómica S9 generada por las células hepáticas de los mamíferos, la cual es capaz de convertir al agente químico en un compuesto genotóxico que, sin embargo, puede desecharse mediante los sistemas de excreción que poseen a diferencia de lo que ocurre en las plantas, que cuales almacenan sus metabolitos, incidiendo sustancialmente en el flujo de energía, ya que al ser digeridas por los animales e incluso por el hombre, a la larga puede tener efectos genotóxicos considerables que posiblemente favorezcan la iniciación de procesos cancerígenos (Calderón-Segura 1993).

Los productos tóxicos que se generan en las plantas a partir de este proceso, dependen de factores como el tipo de compuesto, las propiedades físico-químicas de éste, la concentración aplicada,

las rutas metabólicas, entre los principales. Incluso, la toxicidad puede incrementarse, disminuir o bien no afectarse después de la activación (Zilkah y Gressel 1977, Hess 1985, 1987, Sterling 1994).

Los métodos que se han desarrollado para el estudio de la activación promutagénica vegetal son fundamentalmente dos: *in vivo* e *in vitro*. En el primer caso, el agente químico es introducido a una planta viva intacta, simulando las condiciones de un campo agrícola y cuyos extractos son después agregados a un cultivo celular; en la segunda situación, el plaguicida es coincubado con un homogeneizado vegetal o un cultivo de células vegetales con o sin cofactores, y finalmente se lleva a cabo el análisis bioquímico y genético de los metabolitos a partir de los tejidos vegetales o cultivos celulares (Plewa *et al.* 1978, 1984, 1988, Wildeman y Nazar 1982). En ambos métodos, la acción del metabolismo vegetal sobre un mutágeno potencial puede ser evaluada con microorganismos indicadores como *Salmonella typhimurium* (Plewa *et al.* 1988), *Escherichia coli*, *Aspergillus nidulans* (Scott *et al.* 1978), *Saccharomyces cerevisiae* (Loprieno y Adler 1980), o bien, células de mamífero, a fin de analizar su actividad genética y sus propiedades genotóxicas. Con estos procedimientos varios pesticidas como aldrín, dialato, 2-aminofluoreno, fenil urea, etc., pueden ser activados por los sistemas enzimáticos de las plantas a compuestos mutagénicos específicos utilizando extractos y/o homogeneizados de plántulas de soya, maíz y cebada, raíces de haba y cebolla, bulbos de tulipán y callos de tabaco como metabolizadores (Plewa 1978, Scott *et al.* 1978, Constantin y Nilan 1982, Takehisa *et al.* 1982, Wildeman y Nazar 1982, Takehisa y Kanaya 1983, Higashi *et al.* 1985, Takehisa 1986, Seo *et al.* 1993).

Uno de los sistemas biológicos de prueba más sensibles al efecto de los plaguicidas (Gómez-Arroyo *et al.* 1992, 1995, Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1995) es *Vicia faba*, considerada como

metabólicamente activa debido a que contiene la fracción enzimática S10 (Takehisa *et al.* 1982, 1988; Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa 1986, Gómez-Arroyo *et al.* 1995). Takehisa *et al.* (1988) fueron de los primeros en utilizar extractos preparados a partir de las raíces tratadas con promutágenos en *Vicia faba*, sobre células ováricas de criceto chino en las que evaluó el daño al material genético aplicando la técnica de intercambio de cromátidas hermanas (ICH). Encontraron que la ciclofosfamida y el etileno fueron activados por *Vicia faba* resultando en un aumento de ICH, incluso con efecto dos veces mayor que el testigo negativo. El etanol es un promutágeno que primero se metaboliza a acetaldehído por la acción de la enzima citosólica alcohol deshidrogenasa (ADH), que depende de la nicotinamida adenin dinucleótido (NAD) como cofactor; se ha detectado que esta reacción ocurre principalmente en las mitocondrias y en el citoplasma y que es justo el acetaldehído el principal inductor del daño genético en linfocitos humanos *in vitro*.

Para que la biotransformación de los plaguicidas pueda llevarse a cabo en las plantas superiores, se requieren básicamente reacciones primarias (fase I), secundarias (fase II) y terciarias (fase III). Las primeras incluyen aquellas que involucran procesos degradadores y que pueden activar o desactivar al compuesto original; tales como la oxidación, la reducción y la hidrólisis; en tanto que las segundas son sintéticas y dan lugar a la formación de productos conjugados con nula o baja fitotoxicidad, pero con alta polaridad y por ende muy solubles en agua, con movilidad limitada y predispuestos a la acción enzimática de las reacciones de fase III. En éstas últimas, los intermediarios son evidentemente, conjugados primarios o secundarios de residuos insolubles en agua, que pueden ser incorporados a los organelos celulares, ubicarse en el citoplasma o adherirse a biopolímeros de lignina. Es posible que no sean fitotóxicos pero de cualquier forma se desconocen su destino final y su actividad tóxica (Shimabukuro *et al.* 1981, 1982).

Tanto en plantas como en animales, muchas de las enzimas involucradas en el metabolismo de los xenobióticos se localizan en el retículo endoplásmico (Menn 1978), sin embargo las enzimas vegetales también han sido detectadas en el citoplasma y en ciertas regiones de la pared celular (Sandermann 1988).

Las reacciones del metabolismo oxidante son catalizadas por las oxigenasas de función mixta (OFM) que insertan un átomo de oxígeno a partir del O_2 para producir agua. Estas enzimas son la P-450 (cyt P-450), que pertenecen a una familia de citocromos denominada así porque los complejos que forman con CO exógeno tienen un máximo de absorción espectrofotométrico a 450 nm (Stryer 1995). El citocromo P-450 es el componente terminal de una cadena transportadora de electrones que se ha localizado en las mitocondrias de las células de la corteza suprarrenal y en los microsomas hepáticos de los animales (Stryer 1995), mientras que en las plantas se ha detectado su actividad en los microsomas de más de 30 especies vegetales (Higashi *et al.* 1983, 1985). Aunque es una molécula análoga a la P-450 de los mamíferos, en los vegetales presenta una mayor especificidad a los sustratos y en los mamíferos es más heterogénea. Asimismo, ha estado implicada en la inducción de metabolitos secundarios que fueron mutagénicos y originados a partir de un promutágeno. La enzima requiere como sustrato esencial al oxígeno molecular y como sustratos secundarios o cofactores, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) o la nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), que constituyen la mejor fuente de electrones; mientras que en los animales es el NAD (Frear *et al.* 1969, Higashi *et al.* 1981).

Otras de las enzimas que intervienen en el metabolismo primario de algunos agentes químicos son las peroxidasas, cuya actividad provoca la formación de radicales libres como el peróxido de

hidrógeno y el oxígeno molecular, que contribuyen a incrementar la mutagenicidad, ya que los intermediarios que se generan interactúan directamente con el ADN (Yamasaki 1974, Lamoureux y Frear 1979, Donh y Krieger 1981, Plewa *et al.* 1991). La hidrólisis es catalizada por algunas hidrolasas, esterasas, amidasas, O-alquilhidrolasas, etc. y representan mecanismos de degradación general de compuestos xenobióticos en animales, microorganismos y plantas (Menn 1978, Shimabukuro *et al.* 1981, 1982).

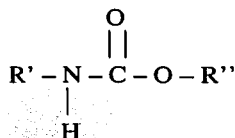
En el metabolismo de los compuestos xenobióticos en plantas, la conjugación representa una reacción de desactivación y de desintoxicación e involucra la interacción de los sustratos endógenos con los productos derivados de las reacciones de fase I. Los sustratos endógenos pueden ser los glucósidos (conjugación con la glucosa), el glutatión (o hemoglutación de ciertas leguminosas), el ácido malónico D-glucosa, los aminoácidos (Shimabukuro *et al.* 1982, Lamoureux y Rusness 1987), la lignina (Sandermann *et al.* 1983), las pectinas u otros polisacáridos (Langenbách *et al.* 1986), activando así a los promutágenos (Shimabukuro *et al.* 1982).

El último paso de la biotransformación molecular tanto en animales como en plantas, es la conjugación (Higashi 1988). No obstante, en los vegetales los conjugados son polimerizados y/o incorporados a sus componentes estructurales, puesto que no cuentan con sistemas excretores para su eliminación, abriendo la posibilidad de causar daño a la propia planta, o bien sólo almacenarlos hasta que al ser digeridas por los animales se liberen en el tracto gastrointestinal o en los órganos de los mismos. Los productos primarios y/o secundarios pueden ser compartimentalizados en vacuolas, transferidos al espacio extracelular o a la pared celular, en donde pueden unirse a ligninas, taninos, pectinas, polisacáridos (celulosa, almidón) y algunos polipéptidos (globulinas) (Sandermann *et al.*

1990, Sandermann 1992).

III. 4 Carbamatos

En condiciones naturales, los carbamatos son compuestos que provienen de uno de los principales alcaloides –la fisostigmina- de una planta denominada *Physostigma venenosum*, que es un inhibidor de la acetilcolinesterasa. Con base en la dilucidación de la estructura química de este alcaloide, tiempo después se pudo sintetizar industrialmente partiendo del esqueleto básico del ácido carbámico del dióxido de carbono ($\text{NH}_2\text{-COOH}$). La estructura química general de los carbamatos es como sigue:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El grupo sustituyente R' simboliza el radical alquilo (metil, butil, etilisopropil, etc.); el R'' es un radical arilo (fenol, naftaleno u otro anillo cíclico o heterocíclico). El ácido carbámico es una molécula muy inestable que se descompone fácilmente en dióxido de carbono y amoníaco. El reemplazamiento de uno de los protones asociados con el nitrógeno que contiene un grupo metilo, resulta en la formación de ácidos monoacetil carbámicos (Ecobichon y Joy 1984) y se estabiliza por la adición de un grupo alquilo (Barberá 1975).

Con respecto a sus propiedades físicas y químicas, los plaguicidas carbámicos pueden ser obtenidos como sólidos cristalinos puros, lo que coadyuva considerablemente a los estudios químicos y

biológicos; en virtud de que son ligeramente solubles en agua pueden diluirse en una gran variedad de disolventes. Son sensibles a la luz, al calor y a la oxidación, razón por la que se consideraba que no representaban mucho riesgo al ambiente (Moutschen-Dahmen *et al.* 1984); debido a su baja toxicidad, vida residual relativamente corta en el suelo y su rápida degradación por organismos no blanco. Sin embargo, después de la Segunda Guerra Mundial llegaron a tener un papel relevante (Audus 1976) sin hacer mucho hincapié en las consecuencias para la salud y el medio. Los primeros experimentos de metabolismo vegetal realizados con este tipo de agroquímicos datan de finales de la década de los 60 en el siglo pasado (Prendeville *et al.* 1968). En éstos se comienza a dilucidar que en ciertas porciones (raíces, tallos y hojas) de las plantas alimenticias, se acumulan productos generados del propio metabolismo vegetal, siendo las moléculas acumuladas derivados polares y residuos sólidos insolubles. La técnica de detección de éstas se hizo a través del marcaje radioactivo de los herbicidas con ^{14}C . Se demostró que tanto la raíz como los tejidos de los brotes tienen la capacidad de generar estos conjugados.

En México, este tipo de plaguicidas son de los más empleados en la agricultura (de granos básicos, hortalizas, frutales e industriales), preferentemente para eliminar insectos, nemátodos, hongos y malezas; de igual forma se aplican en zonas comerciales, el hogar y para el control de vectores en salud pública (Environmental Health Criteria 1988).

El transporte de los pesticidas en las plantas es dictado principalmente por la velocidad a la cual los compuestos son capaces de cruzar las membranas que rodean los tejidos de transporte (xilema y floema). Este proceso parece estar determinado primordialmente por la lipofilicidad de los agentes químicos más que cualquier propiedad específica de la molécula tal como la forma o la presencia de

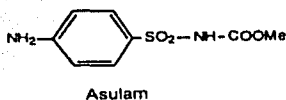
grupos funcionales particulares. La lipofilicidad es evaluada utilizando el coeficiente de partición K_{ow} . Para estos compuestos, el rango de $\log K_{ow}$ es de 2.5 a 4.2, excepto para carbetamida y carbutilate, que son más polares ($\log K_{ow}=1$). El profam y el clorofam son aplicados en el suelo para ser tomados por las raíces y translocados hacia los brotes. Los coleóptilos pueden ser afectados directamente, ya que ambos compuestos son muy volátiles y una proporción ascendente puede ocurrir vía la fase de vapor. Los otros carbamatos son menos volátiles y son aplicados postemergentemente a las hojas de las malezas excepto para el carbutilate, que se aplica al suelo para el control residual de la vegetación (Kirkwood 1991).

III.5 Descripción, modo de acción y metabolismo del asulam

El asulam o asulox es un buen representante de los herbicidas carbámicos sintéticos. Es un compuesto sistémico post-emergente de uso agrícola y urbano, que se aplica por vía aérea o superficial, fundamentalmente en cultivos de caña de azúcar, amapolas de semilla oleosa, espinacas, alfalfa, turbas, plátanos, café, cítricos, cocos, cocoa, caucho, avena, linaza, áreas de reforestación, plantaciones de árboles de Navidad, en tierras no cultivadas, en *Pteridium aquillinum* en pastura, así como también en campos en donde se trabajan las plantas ornamentales. Algunos autores como Worthing y Walter (1991) recomiendan que para la utilización de este agroquímico es preferible no mezclarlo con otros plaguicidas, pero Tomlin (1994) menciona que es compatible con varios herbicidas como: atrazinas, dalaponsodio, diuron, ioxinil, paraquat, MCPA y mecoprop; asimismo se recomienda no sembrar otros cultivos en áreas tratadas donde se cultiva la caña de azúcar, ni utilizar después a ésta como forraje para ganado, pues está documentado que al absorberse a nivel de raíz, provoca clorosis en sus plantas blanco (malezas de hoja amplia, pastos perennes, así como una variedad de plantas sin flores) e interfiere en la

división y en la elongación celulares (Worthing y Walter 1991), de modo que puede ejercer el mismo efecto en los cultivos. Ciertamente, las zonas de absorción más alta en la planta son las raíces, las hojas y los brotes, a partir de los cuales se transporta por vía del xilema y floema (ya sea por la ruta de simplasto o apoplasto) a otras regiones del organismo, interfiriendo en los procesos de división celular y crecimiento tisular (Worthing y Walter 1991).

Desde el punto de vista químico, el asulam presenta la siguiente estructura molecular:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En su forma comercial la formulación contiene 36.2% de asulam y 63.8% de ingredientes inertes y en solución acuosa se encuentra en combinación con sales de sodio. Con relación a los efectos ambientales, éstos se resumen en la **Tabla I** de acuerdo con el sistema natural de que se trate:

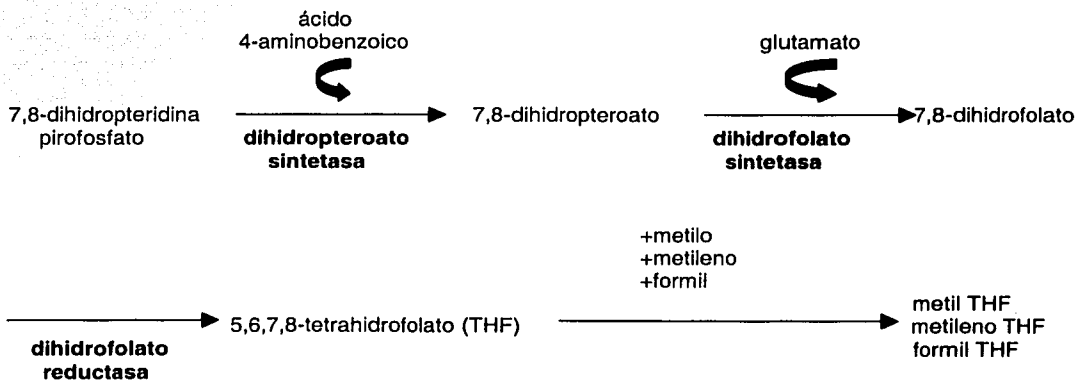
TABLA I. COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO DEL HERBICIDA ASULAM EN LOS DISTINTOS SISTEMAS NATURALES.

Suelo	Agua	Aire
<ul style="list-style-type: none"> - El asulam no se absorbe favorablemente como tal, pero los compuestos que son producto de la degradación bacteriana sí, principalmente en suelos con alto contenido de materia orgánica. - En condiciones inundables, la tasa de degradación es baja, por lo que en épocas de secas y en las más frías, es menos persistente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se disuelve pobremente en el agua, pero con las sales de sodio lo hace muy bien. - Muy movable en suelos arenosos y arcillosos, por lo que tiene un fuerte potencial para contaminar los mantos freáticos. - Debido a su solubilidad y movilidad en los suelos, puede también contaminar los cuerpos de agua superficiales. 	<ul style="list-style-type: none"> - El producto comercial no se evapora fácilmente.

* Información obtenida de <http://infoventures.com/e-hlth/pesticide/asulam.html>

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

El ácido fólico es uno de los elementos que juega un papel central en el metabolismo de las moléculas monocarbonadas y está directa o indirectamente involucrado en la biosíntesis de las bases nitrogenadas y de los aminoácidos (Cossins 1987). En las plantas y los microorganismos, los diversos derivados del folato involucrados en el metabolismo de los monocarbonos, se originan a partir de los derivados de la dihidropteridina, mediante la acción de las enzimas 7,8-dihidropteroato y dihidrofolato sintetasa. Una vez que ya se formó la molécula de 7,8-dihidrofolato, sufre reducción a 5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF), que puede llegar a ser substituida con formil, metileno o grupos metilo (formil THF, metil THF ó metileno THF) para que posteriormente pueda ser utilizada en reacciones donadoras de moléculas monocarbonadas como las ya mencionadas (Kirkwood 1991). A continuación se presenta un esquema del proceso de síntesis de folatos en plantas:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En cuanto al modo de acción de este herbicida sobre sus plantas blanco, originalmente se realizaron experimentos en células meristemáticas de cebolla tratadas con asulam, el resultado fue la detención de éstas en metafase, lo que sugirió la participación del herbicida en la interferencia con el ensamblaje de los microtúbulos para concluir la mitosis (Skerrett y Fretz 1975, citado por Kirkwood 1991).

Asimismo, el asulam presenta gran parecido estructural con el ácido 4-aminobenzoico -uno de los substratos de la 7,8-dihidropteroato sintetasa- y con ello se establece una fuerte competencia entre éstos, lo cual llevó a reportar, que el asulam interfiere con la síntesis de los derivados de folatos en plantas; sin embargo, el proceso de inhibición de crecimiento en plantas se revierte completa o parcialmente, en presencia de ácido fólico y del ácido 4-aminobenzoico en cultivos celulares anteriormente tratados con asulam (Killmer *et al.* 1980, Stephen *et al.* 1980, Veerasekaran *et al.* 1981, Hewertson y Collin 1984, citados por Kirkwood 1991). El asulam también tiene gran semejanza estructural con las drogas sulfanilamidas, de las que se sabe, inhiben a la enzima 7,8-dihidropteroato sintetasa a través del sustrato sobre la que ésta actúa, un ejemplo de esto se ha demostrado en extractos celulares de plántulas de trigo, en los cuales el asulam y la sulfanilamida provocaron la inhibición de la síntesis de 7,8-dihidropteroato (Okinaya e Iwai, 1970, Miller *et al.* 1972, citados por Kirkwood 1991). De esta manera, los estudios de inhibición competitiva constituyeron una evidencia importante de que el asulam es un herbicida relacionado con la supresión directa de la síntesis de folatos. Por tanto, parece que el blanco de la acción fitotóxica del asulam es interferir en la síntesis de 7,8-dihidropteroato o ácido dihidropteroico, que es una molécula precursora de los folatos. La interferencia mitótica así como el decremento observado en la síntesis de proteínas y de RNA, son consecuencias de la inhibición en la síntesis de 7,8-dihidropteroato, un producto de gran relevancia en la generación de nucleótidos y

aminoácidos (Skerrett y Fretz 1975, Veerasekaran *et al.* 1977, citados por Kirkwood 1991). Existen reportes que apoyan lo anterior, puesto que se han probado sustancias que funcionan como inhibidores de la dihidrofolato reductasa, dando como resultado interferencias en el proceso de mitosis (Rudenberg *et al.* 1955, citado por Kirkwood 1991).

La acción inhibitoria del asulam en la biosíntesis de folatos puede ser revertida por la aplicación exógena de ácido fólico y ácido p-aminobenzoico; este fenómeno ha sido demostrado por gran número de investigadores, sobre todo en estudios realizados sobre extractos celulares de trigo, avena silvestre y zanahorias (Hendley *et al.* 1985, Smith 1985, Gerwick *et al.* 1988, Wink y Luley 1988, citados por Kirkwood 1991).

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

En cuanto al metabolismo de degradación del asulam, se han realizado estudios en diferentes tipos de cultivos como sorgo, caña de azúcar, maíz, frijol, entre otros, en los cuales mediante técnicas de marcaje con isótopos radioactivos (principalmente ^{14}C) se ha logrado detectar a sus principales productos metabólicos. En particular en la planta de sorgo (*Sorghum halepense*) se ha logrado detectar actividad metabólica alta que se manifiesta en la producción de cuatro metabolitos: asulam intacto, acetil asulam, sulfanilamida y ácido sulfanílico, así como un elemento aún no identificado (Díaz *et al.* 1998). De igual forma, estas moléculas son las que más comúnmente se identifican en otras especies, aunque en distintas proporciones, que se almacenan primordialmente en las raíces y los tallos, así como

en menor grado en las hojas (Díaz *et al.* 1998). En plantas vasculares sencillas como es el caso de *Equisetum arvense*, se ha encontrado que el principal producto del metabolismo es la sulfanilamida, resultado de una reacción de hidrólisis, aunque de igual forma el asulam intacto en menor proporción. Además, se ha revelado que las propiedades herbicidas de los productos metabólicos suelen ser inferiores al herbicida originalmente aplicado, muy posiblemente debido a la ineficiente absorción y translocación del sistema bioquímico de la planta (Marshall *et al.* 1987).

III.6 El ensayo cometa

La electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa, es un procedimiento utilizado para detectar el daño primario al ADN en células individuales (pueden ser somáticas o germinales) de mamífero (Fig. 1). El tipo celular seleccionado se monta en geles de agarosa sobre portaobjetos esmerilados y las células son sometidas a solución de lisis, desenrollamiento de ADN y electroforesis a pH alto; posteriormente, el ADN es teñido con un colorante fluorescente (bromuro de etidio) y las células cuyo material genético sufrió daño durante un tratamiento previo, muestran la migración de los fragmentos de ADN a partir de un núcleo base (Fig. 2). Este daño es cuantificado midiendo el desplazamiento entre el material genético del núcleo ('cabeza del cometa') y el extremo distal de la cauda resultante. Además de la longitud, existe el parámetro denominado momento de la cauda que se refiere básicamente a la cantidad relativa del ADN presente en ella; se calcula obteniendo el producto de su longitud y la intensidad de la misma. La principal ventaja de estos parámetros es que los resultados pueden ser representados por un solo número (Rojas *et al.* 1999).

La primera medición puede hacerse tanto manualmente como por medio de un análisis de imágenes computarizado y el segundo sólo por el analizador de imágenes.

Esta técnica de electroforesis unicelular alcalina fue por primera vez realizada por Rydber y Johanson (1978) con células embebidas en agarosa, posada sobre portaobjetos comunes y posteriormente lisadas bajo condiciones alcalinas. Después de la neutralización, las células se tiñeron con un fluorocromo denominado naranja de acridina y el grado de daño en el ADN fue cuantificado midiendo el radio de fluorescencia de verde (indica el rompimiento de doble cadena) a rojo (indica rompimiento de una sola cadena) haciendo uso de un fotómetro.

Posteriormente, Ostling y Johanson (1984), implementaron un procedimiento microelectroforético para la visualización directa del daño en el ADN de células individuales. Las células de mamífero fueron suspendidas en una delgada capa de agarosa sobre un portaobjetos normal, en el cual se lisaron por detergentes y altas concentraciones de sales, para luego ser electroforizadas bajo condiciones neutras y finalmente teñidas con un colorante fluorescente de rápida reacción con el ADN. Durante la electroforesis, los fragmentos de ADN migraron más allá del núcleo hacia el ánodo. Las imágenes resultantes, que fueron subsecuentemente nombradas por su apariencia como *cometas*, fueron medidas para determinar la extensión del ADN. Este método de electroforesis neutra original parecía ser bastante sensible a los cambios en el superdesenrollamiento del ADN, que resultó con rompimientos de doble cadena, aunque las condiciones de lisis fueron poco efectivas para remover todas las proteínas.

Tiempo después, Sing *et al.* (1988) adaptaron este procedimiento bajo condiciones alcalinas, lo que les permitió detectar rompimientos de una sola hebra y observar formas semejantes a un cometa en el microscopio de fluorescencia; las modificaciones que estos investigadores hicieron a la técnica fueron con relación al cambio del pH en la solución de lisis, el pH en el amortiguador de electroforesis y el tiempo de desenrollamiento de las cadenas de ADN. De tal suerte que, esta metodología es ahora utilizada para detectar rompimientos de una cadena, sitios álcali lábiles y sitios retardados de reparación del ADN en células individuales, así como también es posible medir parámetros densitométricos y geométricos con los modernos sistemas computarizados.

En ese mismo año, Henderson citado por Soto Reyes (2002), reportó que el ensayo cometa es capaz de detectar daño en el ADN, el cual ha sido inducido por agentes alquilantes, agentes intercalantes y daño oxidante.

Posteriormente, Olive *et al.* (1990) hicieron modificaciones a la técnica de Ostling y Johanson (1984), que consistieron básicamente en utilizar una solución de lisis alcalina seguida por electroforesis, ya sea en condiciones neutras, en las que se observaron rompimientos de doble cadena o en condiciones no tan alcalinas como a pH 12.1 ó 12.3, en las cuales se registraron rompimientos de cadena sencilla y sitios retardados de reparación (Rojas *et al.* 1999).

El ensayo cometa se ha implementado en diferentes áreas de la biología, tales como en estudios clínicos, de monitoreo humano, en biología de la radiación, toxicología genética y ecotoxicología genética. Justo en este campo, se han llevado a cabo experimentos con células provenientes de diferentes organismos: plantas, anélidos, moluscos, peces, anfibios y más comúnmente mamíferos

(Cotelle y Férard 1999).

El daño al ADN es considerado como uno de los principales eventos de iniciación para trastornos graves en la salud humana. Dicho efecto es provocado tanto por factores químicos como físicos, que se pueden manifestar fenotípicamente por letalidad en las células, tener un efecto hereditario adverso y cáncer, pero las modificaciones genéticas tienen una base en la estructura química del ADN como pueden ser cambios de sitio de una base o pérdida de éstas (con la producción de sitiosapurínicos y apirimídicos), cruzamientos de cadenas de ADN en un mismo núcleo, cruzamientos de proteínas y ADN, ó bien rompimientos de una o dos hebras. Sin embargo, las células también tienen la capacidad de reparación, que depende de la estructura precisa del daño y su relativa abundancia en el genoma. En términos generales, los rompimientos de una sola cadena son hasta cierto punto más fáciles de arreglar en comparación con los que se dan en ambas cadenas, pues en el primer caso, se cuenta con una hebra de secuencia correcta que sirve como molde para la nueva síntesis, en tanto que en el segundo caso no es así (Moustacchi 2000).

Es bien conocido que los procesos de reparación del ADN, son controlados genéticamente y son comunes a todos los organismos que van desde las bacterias hasta el hombre. Aunque también se ha descubierto que en el caso de las células eucarióticas, la respuesta final a un daño en particular, no sólo estará determinado por los procesos de reparación, sino también por otras funciones celulares que optimizan la restauración celular, como cuando la célula queda detenida en alguna etapa de su ciclo que da tiempo para llevar a cabo su reparación; también conviene señalar aquí la importancia que juega la proteína p53 como promotora de una vía que conduce a la eliminación apoptótica de un conjunto de células dañadas, esta es una de las razones por las que también se le conoce como proteína supresora de

tumores, además de que forma parte de una de las vías alternas para la reparación genética (Moustacchi 2000).

Los mecanismos de reparación van desde los más simples hasta los más complejos; los primeros implican la reversión del daño con sólo llevar a cabo una reacción química y los otros, que son la mayoría, requieren de la acción concertada de varias enzimas que generalmente forman complejos proteínicos que interactúan con moléculas muy específicas. Otra forma de clasificar a tales procesos es con base en la eficacia de los mismos, de modo que existen reparaciones libres de error y a prueba de error (Moustacchi 2000).

Como ya se explicó, la integridad del genoma permanentemente es alterada por la agresión de agentes tanto exógenos como endógenos (Lhomme *et al.* 1990) y posiblemente las lesiones más comunes sean las de los sitios abásicos (apurínicos y/o apirimídicos, AP).

Estas lesiones son resultado de huecos producidos en la hebra del ADN y pueden darse de manera espontánea. La generación de los sitios abásicos se incrementan dentro del proceso de reparación de bases nucleícas dañadas. La reparación por escisión de bases es una vía en la cual están envueltas tanto endonucleasas apirimídicas como las HAP1 y APE1, entre otras, ADN ligasas y glicosilasas específicas que remueven las bases nucleícas modificadas o anormales, generando así sitios abásicos que forman parte de un proceso intermedio en la reparación por escisión de bases (Kolaczowski *et al.* 2001). Se estima que aproximadamente 10,000 sitios AP son generados diariamente en una célula bajo condiciones fisiológicas normales (Nickoloff y Hoekstra 1998).

Los sitios abásicos son el resultado de un hueco hidrolítico de los puentes N-glicosílicos. Este proceso puede incrementarse por factores exógenos, tales como agentes oxidantes que dañen las bases, formando así los sitios AP. Las desoxipurinas se encuentran en mayor cantidad que las desoxipirimidinas, siendo las desoxiguaninas los nucleótidos más lábiles (Lhomme *et al.* 1999).

Los sitios abásicos de tipo aldehídos son muy sensibles a condiciones alcalinas, que inducen rompimientos en las hebras del ADN y pueden ser estimadas por sedimentación de gradiente de sacarosa, elusión alcalina y la electroforesis unicelular entre otras (Lhomme *et al.* 1999, Rojas *et al.* 1999).

IV. OBJETIVOS

- 1) Evaluar el daño genotóxico de los productos metabólicos obtenidos a partir de las raíces de *Vicia faba* previamente tratadas con el herbicida asulam, a través de la electroforesis unicelular alcalina y utilizando como sistema biológico de prueba linfocitos humanos.

- 2) Estimar la magnitud del daño producido al ADN por los metabolitos del herbicida asulam, en concentraciones crecientes, mediante el análisis de la migración de la cauda.

V. HIPÓTESIS

- El plaguicida asulam ha mostrado ser un promutágeno activado por *Vicia faba* al provocar intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y citotoxicidad sobre los linfocitos humanos en cultivo (Luna 2000), por lo que se espera que este mismo efecto se evidenciará a través de la inducción de rompimiento del ADN en linfocitos aislados.
- A medida que aumente la concentración de asulam metabolizado en extracto, se incrementará concomitantemente la frecuencia de cometas y la longitud de la cauda.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de la parte experimental, el agroquímico probado fue el herbicida asulam cuya descripción se presenta en la **Tabla II**.

TABLA II. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL HERBICIDA ASULAM*

NOMBRE COMÚN DEL HERBICIDA:	ASULAM (Laboratorio Rhône-Poulenc, recientemente fusionado con Bayer).
TIPO DE HERBICIDA:	Carbámico sistémico postemergente.
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS:	En estado sólido, se describe como cristales incoloros, con punto de fusión 143-144°C; presión de vapor < 1 mPa (20°C); soluble en agua 5 g/l (20-25°C); soluble en otras sustancias como: dimetilformamido > 800, acetona 340, metanol 280, metiletilcetona 280, etanol 120, hidrocarburos e hidrocarburos clorados < 20 (todas en g/l a 20-25°C). Tiene una estabilidad ≥ 6 h en agua hirviendo; pKa 4.82, formando sales solubles en agua.
CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA:	CL ₅₀ oral (rata) > 5 000 mg/kg, CL ₅₀ dérmica > 2 000 mg/kg.
USO:	Agricultura y jardinería.
COMPATIBILIDAD:	Compatible con otros herbicidas: atrazinas, dalaponsodio, diurón, ioxinil, paraquat, MCPA y mecoprop.
PERSISTENCIA:	Moderada.
EFFECTOS ADVERSOS AL MEDIO:	Muy tóxico para los peces; no tóxico a las abejas.
EFFECTOS A LA SALUD:	Carcinogénico y teratogénico.
PRECAUCIONES:	Las generales para el manejo de plaguicidas.
CULTIVOS EN LOS QUE SE APLICA:	Caña de azúcar, turbas, áreas de reforestación, plantaciones de árboles de Navidad, en tierras no cultivadas, en cultivos de plátanos, café, cítricos y cocos, así como también en campos en donde se trabajan plantas ornamentales.
MALEZAS QUE COMBATE:	Malezas de hoja ancha y varios tipos de pastos perennes y anuales como el zacate (pinto, privilegio, pelón, cadillo, cola de zorra, cuerdilla, cardo santo, chilillo, lengua de vaca, rabanillo).

* La información fue tomada de: Tomlin 1994 y Luna 2000

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El estudio se realizó en ensayos llevados a cabo en condiciones de laboratorio empleando como organismo metabolizador del herbicida a la planta *Vicia faba* y como sistema evaluador del daño genotóxico la técnica de electroforesis unicelular alcalina en linfocitos humanos, procedentes de sangre periférica.

1) Activación metabólica *in vivo*

Las semillas de *Vicia faba* (var. minor) se lavaron bien con agua corriente para luego someterlas a imbibición durante 24 horas, con la finalidad de hidratarlas y conseguir una germinación más rápida. Se procuró que el lugar en donde germinaran las semillas estuviera lo más limpio posible. Después se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave; cuando las raíces alcanzaron una longitud entre 4 a 6 cm, se introdujeron (40 semillas por cada tratamiento) en cristalizadores con solución a distinta concentración del herbicida (50, 100, 200, 300 y 400 ppm) y cubiertos con papel aluminio anteriormente perforado para introducir las raíces. El tratamiento tuvo una duración de 4 horas en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Para tener la certeza de la capacidad metabólica de *Vicia faba*, se utilizó como testigo positivo al etanol puro, el cual ha demostrado ser un promutágeno activado por esta planta, ya que los extractos que contienen sus metabolitos incrementan la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en células de criceto dorado, tanto *in vivo* como *in vitro* (Takehisa y Kanaya 1982) y en linfocitos humanos en cultivo (Calderón-Segura 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999). El testigo negativo sólo contuvo agua destilada y ambos estuvieron bajo las mismas condiciones experimentales. Transcurrido este lapso, las raíces de las habas fueron lavadas con agua de la llave tres veces y en dos ocasiones con agua destilada para proceder a cortar 2 cm de la punta de la raíz, se colocaron en

pequeñas cajas de Petri y se pesaron en una balanza analítica para conocer el volumen de una solución amortiguadora (fosfato de sodio monobásico y dibásico 0.1 M, pH 7.4) que se agregaría a las raíces, en una proporción de 1:1 con respecto al peso fresco de éstas (Takehisa y Kanaya 1982). La solución amortiguadora final se preparó mezclando una solución de fosfato de sodio monobásico 0.1 M y otra de fosfato de sodio dibásico 0.1 M, una vez hecho esto, se ajustó a pH 7.4.

Ulteriormente, las raíces fueron maceradas con el amortiguador de fosfatos en un mortero a temperatura entre 0-4 °C, después se homogeneizaron en un macerador especial de tejidos vegetales de 1 a 2 minutos. Todos los homogeneizados se transfirieron a tubos de centrifuga, se equilibraron en una balanza granataria de dos platillos y se centrifugaron (centrifuga GS-15R Beckman) por 30 min a 11 500 rpm a 4 °C. En el sobrenadante de cada tubo, donde se encuentran los productos genotóxicos de los plaguicidas y del etanol, así como la fracción enzimática S10 (testigo negativo), fué posteriormente esterilizado por filtración (filtro miliporo 0.45 µm) y organizado en alícuotas, para ser inmediatamente introducidas en nitrógeno líquido y más tarde utilizadas en los tratamientos con los linfocitos.

2) Aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica

Esta parte fue realizada en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar VECO. Primero, se extrajeron 10 mL de sangre periférica por punción con una jeringa preparada previamente con 0.1 mL de heparina, de donadores relativamente sanos y jóvenes (Fig. 3), después la sangre fue centrifugada (centrifuga Solbat) a 2,500 rpm por 25 minutos, transfiriendo posteriormente la fase intermedia a un tubo con 3 mL de solución de Hank (Gibco), ésta se mezcló y se pasó a tubos con 5 mL ficol (Gibco) para centrifugarse a 1,500 rpm durante 25 minutos, se aisló nuevamente la fase

intermedia blanca con los linfocitos, que fueron lavados dos veces con 5 mL de solución de Hank, centrifugándose a 1,500 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 5 mL de medio RPMI 1640 (Gibco) mas 5 μ L de antibiótico (1%) para incubarse a 37 °C; inmediatamente se apartó alrededor de 100 μ L de la muestra con los linfocitos, para determinar el número de éstos disueltos por mL de medio RPMI 1640.

3) Cuantificación de linfocitos por mL de medio RPMI 1640

La cuantificación se realizó tomando 10 μ L de la submuestra de 100 μ L con una micropipeta lab systems y se virtió el contenido completo en una de las superficies cuadrículadas de una cámara de Neubauer. Se contó el número total de células de los cuatro cuadrantes principales y se aplicó la siguiente fórmula para determinar la cantidad de linfocitos por mL de medio RPMI 1640:

$$\text{Cantidad de linfocitos/mL} = \frac{(\text{Cantidad de linfocitos de los 4 cuadrantes}) (2) (10\ 000)}{4}$$

La finalidad de esta determinación cuantitativa, fue conocer el volumen de muestra celular con un contenido de aproximadamente 250,000 linfocitos, que se requirieron para cada microtubo en la fase de tratamiento.

4) Prueba de viabilidad linfocitaria por el método de azul tripano

Antes de someter las células a tratamiento, se evaluó el índice de viabilidad de la muestra de linfocitos aislados mediante la técnica del colorante azul de tripano, que consistió en preparar una mezcla de 10 μL de este colorante mas 10 μL del botón celular, de la cual se colocaron 10 μL de ésta en una cámara de Neubauer para su observación en un microscopio óptico convencional Zeiss, usando el objetivo de 40X. La determinación de la viabilidad se hizo evaluando 100 células de la muestra para así obtener un porcentaje de la viabilidad.

5) Exposición de los linfocitos humanos a los extractos de raíces de *Vicia faba* tratadas previamente con diversas concentraciones de asulam

Esta etapa consistió en someter las células humanas a la acción de los extractos de *Vicia faba*, los cuales fueron descongelados paulatinamente, horas antes de ser agregados a los linfocitos. Los tratamientos y los testigos fueron realizados por duplicado en una serie de 16 viales estériles (cada uno etiquetado con su respectiva concentración poco antes de ser utilizado).

Los viales destinados para los tratamientos fueron llenados en el siguiente orden: primero a cada tubo eppendorf se le agregó 20 μL del extracto con la concentración correspondiente, después el medio RPMI 1640 (Gibco) y finalmente 25×10^4 linfocitos con viabilidad entre 90 y 95 % hasta llegar a un volumen final de 500 μL . Al testigo positivo con su duplicado también se les agregó 20 μL del extracto de raíz tratado previamente con etanol (12,500 ppm), el medio RPMI 1640 y 25×10^4 células

hasta alcanzar 500 μL . De la misma forma se procedió con los testigos negativos a los que se adicionó la fracción enzimática S10, en cuanto a las cantidades de extracto, medio RPMI 1640 y células; otro lote de testigos negativos se preparó sólo con medio RPMI 1640 más 25×10^4 células hasta completar 500 μL . Una vez hecho lo anterior, tanto los tratamientos como los testigos se introdujeron en la incubadora a 37 °C por 2 h.

6) Procesamiento de las muestras después del tratamiento

Después del tratamiento, cada lote experimental se centrifugó (centrífuga 5415D) a 4,000 rpm durante 5 minutos, se eliminaron 450 μL del sobrenadante, se resuspendieron bien y de los 50 μL que quedaron, 20 μL se transfirieron a otro tubo eppendorf etiquetado. Se agregaron 75 μL de LMPA (agarosa de bajo punto de fusión y a 37 °C), se mezclaron rápidamente, se tomaron 75 μL de la mezcla para verterlos a gotas en un cubreobjetos y sobre éste se colocó un portaobjetos esmerilado (anteriormente etiquetado) cubierto con una monocapa de agarosa con punto de fusión normal (NMA). Las laminillas se acomodaron en una charola fría en el refrigerador por 3 a 5 minutos, se retiró el cubreobjetos, nuevamente se agregaron 75 μL de LMPA y se repitió el paso anterior. Para terminar, se sumergieron en una solución de lisis final en vasos Koplín a 8°C (las preparaciones no pueden permanecer en la solución más de 5 días, ya que se corre el riesgo de que la solución remueva el material genético de los geles). La solución de lisis fue preparada con los siguientes elementos: 2.5 M de cloruro de sodio (NaCl), 100 mM de ácido etilendiamintetracético con dihidrato de sodio ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 10 mM de hidroximetil-amino-metano [TRIS (Base)] y 200 mM de hidróxido de sodio (NaOH) disueltos en un volumen determinado de agua desionizada, finalmente se ajustó a pH de

10.0; una hora antes de terminado el tratamiento, se agregó 1% de Tritón-X y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO).

7) Electroforesis unicelular alcalina

Los geles se sumergieron en un amortiguador de electroforesis con pH de 13.0 (300 mM NaOH/1mM EDTA) por 20 min para desenrollar primero el ADN, en condiciones de oscuridad y a temperatura de 4 °C. Posteriormente, se hizo el corrimiento con una cámara electroforética horizontal a 25 volts y 300 mA por 20 min, cuidando que no bajara el voltaje y en total oscuridad (Fig. 3), ya que el material genético es fotosensible.

8) Neutralización y fijación

Cuando terminó el corrimiento, los geles fueron lavados 3 veces con amortiguador neutralizante (Tris 0.4 M, pH= 7.5) con una duración de 5 min en cada lavado; después se fijaron las preparaciones en metanol puro frío durante 5 minutos y se dejaron secar durante algunos minutos. Una vez secas, se guardaron en una caja de plástico con ranuras hasta el momento conveniente de la tinción. En estos dos últimos pasos, también se trabajó en oscuridad pero bajo luz amarilla para una mejor manipulación de las muestras.

9) Tinción

Debido a que la luz inactiva al fluorocromo utilizado –bromuro de etidio–, esta parte también fue realizada en condiciones de oscuridad a excepción del foco de luz amarilla. Primero, se preparó una solución de bromuro de etidio (10X Stock - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al 0.02 % y a partir de ésta, se hizo una dilución final 1X stock (1 mL en 9 mL dH_2O). En el momento de la tinción, se colocó sobre la base de una caja de Petri uno o varios cubreobjetos (dependiendo de las laminillas que se desean observar en ese momento) a los que se aplicó a gotas con una pipeta de plástico de 1 mL, un poco de agua desionizada y en seguida, 50 μL de la solución 1X stock con una micropipeta labsystems, después se adhirió la laminilla correspondiente. Una vez realizada esta operación, las laminillas fueron guardadas en una cámara húmeda (con agua desionizada) para evitar su desecación.

10) Evaluación del daño al ADN de los linfocitos humanos

La observación y valoración del daño al ADN se realizó en 50 núcleos consecutivos de cada laminilla, mediante los objetivos 16X y 40X de un microscopio de fluorescencia Zeiss, equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Los parámetros obtenidos por este medio, fueron la frecuencia de núcleos con y sin cometas (Fig. 2) y la longitud (en μm) de su cauda (ADN que migró).

11) Análisis estadístico de los datos

Una vez obtenidos los datos, se les aplicó una prueba estadística con la finalidad de verificar la validez del estudio, en este caso se aplicó la prueba U de Mann-Whitney, que permitió conocer la comparación cuantitativa entre el testigo negativo y los tratamientos.

Con ayuda del paquete STATISTICA, se obtuvieron los histogramas de frecuencias para cada concentración, con la finalidad de analizar el comportamiento de los datos entre los tratamientos y establecer si realmente éstos presentaban una correlación gradual y directa en función de su concentración.

VII. RESULTADOS

Los resultados obtenidos corresponden a tres experimentos distintos y al no haber diferencias entre ellos se promediaron y se presentan en la **tabla III** y en las **figuras 4 y 5**, lo que permite una apreciación mejor del comportamiento de los datos con la concentración. En la **tabla III**, se comparan los niveles de migración de ADN (μm) y la frecuencia de cometas (%) en términos numéricos; en ambos parámetros la migración alta (que ocurre entre 50 y 300 ppm) coincide con las frecuencias mayores en este rango de concentración, excepto con la concentración más elevada de 400 ppm cuya baja migración también es compatible con su menor frecuencia, lo que conduce a suponer un deterioro en la capacidad metabólica de las raíces.

Gráficamente, los promedios de migración muestran un comportamiento asintótico entre 50 y 300 ppm y después un descenso súbito como exhibe la **figura 4**; sin embargo, en comparación con los tratamientos, tanto el testigo positivo como los testigos negativos presentan el efecto esperado: el etanol con el nivel más alto y los negativos con los niveles más bajos de migración. El mismo comportamiento se observa en la **figura 5** en que las barras de frecuencias de cometas en las concentraciones de 50 a 300 ppm es más uniforme, no así en 400 ppm donde también se nota el nivel más bajo y en los testigos el comportamiento esperado. En ambas figuras el punto análogo es la concentración más alta (400 ppm) en la que se suponía el mayor efecto.

En la **figura 6** se muestran una serie de gráficas con los intervalos de clase que corresponden a la distribución de los datos por concentración, en cuanto a la migración de los cometas de ADN.

En las **figuras 6a-6c** se percibe una tendencia sesgada hacia la derecha del intervalo de clase con mayor frecuencia, por lo menos en las tres primeras concentraciones, pues en las dos últimas no hay un recorrimiento mayor en el mismo sentido que indique una relación directa entre la concentración agregada y el efecto producido. En la menor concentración (50 ppm) la mayor frecuencia se presenta en el intervalo de 60-80 μm , lo que implica que más cometas migraron poca distancia, es decir que el daño al ADN fue menor en esa concentración (Fig. 6a). Mientras que en las concentraciones de 100 ppm y 200 ppm (Fig. 6b, c), se aprecia el sesgo de valores hacia la derecha con un pico de migración entre 120 y 140 μm , mientras que con 300 ppm de asulam la mayor frecuencia se traslada nuevamente hacia la porción izquierda de la gráfica como sucedió con la **figura 6a**, mientras que con 400 ppm (Fig. 6e), las frecuencias tienden a hacerse asintóticas sin rebasar el nivel de 25 cometas.

En cuanto al comportamiento de los datos, manejado mediante el programa STATISTICA, se expresa en cada gráfica una curva que indica la distribución normal esperada y mediante la prueba estadística de Anderson-Darling, se comprobó que ninguna concentración muestra distribución normal, ya que la $p > 0.05$, por ello se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que afirma que los datos no se ajustan a una distribución normal. En función del análisis anterior, se aplicó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, que permite hacer comparación sólo entre dos grupos, que pueden contener una o más variables y se pudo comprobar la validez de los experimentos al obtenerse claras diferencias significativas entre el testigo negativo con la fracción enzimática S10 (Fig. 6g) y los grupos tratados, con una $p < 0.001$. De igual forma ocurrió con el testigo negativo con medio + linfocitos (Fig. 6h), que sirvieron para verificar que esas sustancias utilizadas en los experimentos no provocaron cometas.

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El conocimiento del metabolismo vegetal de los agroquímicos ha sido un componente esencial, para conocer las rutas bioquímicas y hasta ecológicas que pueden seguir éstos y por ende, sus implicaciones en la salud humana, de ahí la importancia de conocer el efecto genotóxico del herbicida asulam previamente biotransformado por la planta *Vicia faba*.

El análisis del metabolismo catabólico del asulam en diversas plantas vasculares superiores con cierta importancia económica, ha mostrado que los principales productos de este herbicida son el asulam intacto, acetil asulam, sulfanilamida y ácido sulfanílico (Díaz *et al.* 1998), todos son agentes alquilantes que presentan gran afinidad para reaccionar con el ADN de los linfocitos humanos aislados (Luna 2000). Sin embargo, en plantas vasculares menos complejas y en peligro de extinción como *Equisetum arvense* se ha encontrado que el principal producto es la sulfanilamida y en menor cantidad el asulam intacto (Marshall *et al.* 1987). Consecuentemente, en el presente estudio se decidió trabajar con un organismo vegetal de fácil obtención, actividad metabólica alta y de importancia alimenticia y económica para la población humana, como es el haba (*Vicia faba*). Asimismo, en otros estudios de evaluación genotóxica, esta planta ha demostrado ser un sistema biológico de prueba muy sensible a la contaminación por agentes químicos, que transforma en compuestos capaces de alterar la integridad del genoma. De modo que, en virtud de la obtención de respuesta positiva tanto en los tratamientos como en el testigo positivo del presente trabajo, nuevamente se confirma la utilidad de *Vicia faba* como sistema biológico para el monitoreo de diversos agentes peligrosos para el ambiente y riesgosos para la salud humana.

Con la finalidad verificar la capacidad metabólica de esta planta, se utilizó como testigo positivo al etanol (12,750 ppm), que como era de esperarse produce frecuencia alta de cometas (97 %, Tabla III). La activación de este alcohol por *Vicia faba*, consiste en su transformación a acetaldehído, molécula responsable del daño genético en los linfocitos humanos *in vitro* (Takehisa *et al.* 1988) e *in vivo* (Tabla III y Fig 6f). Esta reacción involucra la participación de la enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de la nicotinamida adenin dinucleótido (NAD) como cofactor y se lleva a cabo en las mitocondrias y/o en el citoplasma. La frecuencia elevada de cometas obtenida en estos experimentos, confirma lo descrito por Takehisa y Kanaya (1983), en cuanto a que el etanol constituye un potente promutágeno activado por *Vicia faba* e inductor de ICH en células de criceto chino y en células linfocitarias humanas (Gómez Arroyo *et al.* 1995), sólo que en este caso se estudió la inducción de cometas en los núcleos.

Con respecto al asulam, Luna (2000) demostró previamente que éste se comporta como promutágeno activado por el metabolismo de la planta en cuestión, al producir ICH en células linfocitarias estimuladas cuando se cocultivó el herbicida con la mezcla enzimática S10. Lo anterior, vuelve a presentarse pero aplicando directamente soluciones de asulam a las plántulas de haba (Fig. 6a-e). De este modo, se demuestra el efecto genotóxico en los linfocitos por la acción del extracto de *Vicia faba* que contenfa los metabolitos del herbicida asulam, después de haber sido transformado por esta planta, corroborando que dicho agroquímico efectivamente es un promutágeno y tiene propiedades genotóxicas sobre las células humanas aisladas o en cultivo.

En el presente estudio, sólo se realizó la evaluación de tratamientos con activación metabólica *in vivo*, en virtud de que el trabajo de Luna (2000), establece un precedente en la elaboración de experimentos directos y con activación metabólica *in vitro* del herbicida asulam, de modo que fue

necesario evaluar la respuesta genotóxica cuando el herbicida se aplica directamente a las plantas, es decir *in vivo*.

Los promedios de la longitud de migración del ADN y las frecuencias obtenidas a partir de tres experimentos (Tabla III), ciertamente no muestran un comportamiento de aumento gradual con respecto a la concentración, de modo que no existen diferencias significativas entre los tratamientos a excepción de 400 ppm (Tabla III y Fig. 6), sin embargo, ocurren entre los tratados y los testigos ($p < 0.001$), lo que contribuye a dar confiabilidad a los resultados obtenidos en los lotes experimentales. Otros elementos para tomar en consideración, son la viabilidad celular y el uso de dos testigos negativos (uno con la fracción S10 y otro sólo con medio RPMI 1640). En el primer caso, antes de someter las células al tratamiento con los extractos vegetales, se midió su viabilidad con la técnica de azul tripano, obteniendo porcentajes que oscilan entre 95 y 98%; lo anterior es muy importante, ya que si la mayor parte de las células estuvieran muertas, no se podría determinar si la ausencia de cometas fue debida a que no hubo efecto del asulam. Con relación a los dos tipos de testigos negativos, ambos presentan el comportamiento esperado de frecuencias sumamente bajas de linfocitos con daño (Fig. 5, 6g y 6h), indicando que efectivamente fue provocado por la acción de los extractos, mientras que el testigo con medio confirma la funcionalidad de los extractos y el óptimo desarrollo de la técnica de electroforesis.

Con relación al comportamiento que presentan las concentraciones entre 50 a 300 ppm plasmado en las **figuras 4 y 5**, puede advertirse que no hay diferencias substanciales, por el contrario son muy semejantes entre sí, lo que lleva a suponer una explicación basada en la cinética de la enzima de acuerdo con el modelo de Michaelis-Menten. Cuando una enzima (E) se combina con el sustrato (S) para formar un complejo ES con una constante de velocidad k_1 , el complejo ES tiene dos alternativas

posibles: puede disociarse hasta E y S con una constante de velocidad k_2 , ó continuar hasta formar un producto P con una constante de velocidad k_3 (Stryer 1995). Para el presente caso, el sustrato es el asulam y la enzima es la fracción S10, que al momento de llegar a su velocidad máxima de reacción, la mayor parte de sus sitios activos quedan saturados y cataliza la formación de los metabolitos genotóxicos; al llegar la enzima a la velocidad máxima la cantidad de producto tiende a mantenerse constante independientemente de la concentración de herbicida aplicado. De modo que, posiblemente a 50 ppm la fracción S10 estaba comenzando a llegar a su velocidad máxima y en las tres concentraciones siguientes la cantidad de producto seguía manteniéndose, por tal motivo el efecto de daño al ADN se manifiesta sin variaciones significativas entre sí.

Una buena parte de los estudios de biomonitoreo citogenético de diversos contaminantes ambientales establecen curvas lineales ascendentes de dosis-respuesta de un mutágeno en particular, y generalmente, se obtiene un modelo lineal de comportamiento que permite deducir fehacientemente la genotoxicidad o citotoxicidad del compuesto en cuestión a distintas concentraciones (Brusick 1987). Sin embargo, lo anterior no siempre se cumple (Fig. 4 y 5) como en el presente trabajo, en el que los resultados no muestran un comportamiento lineal a medida que aumenta la concentración del herbicida, lo que quizá puede llevar a suponer la intervención de otros factores ajenos a los metabolitos del asulam que también se encuentren en el extracto. Pero este no es el caso para los resultados aquí expuestos, ya que Luna (2000) al trabajar con el mismo agroquímico, considera que son sus metabolitos los causantes del daño al ADN, puesto que al coincubar el herbicida con la fracción S10 obtuvo una correlación positiva que consistió en un claro incremento de ICH a medida que aumentó la concentración.

Las frecuencias obtenidas están muy cercanas entre sí como se expresa en la **tabla III** y la **figura 5**, a excepción de la última concentración (400 ppm) y de los testigos negativos. En el caso de asulam 400 ppm, la frecuencia obtenida fue de 69.5 % a diferencia de lo que se esperaba por ser la concentración más alta, pero justo por esta razón, las raíces de *Vicia faba* sufrieron cierto grado de necrosis, por lo que la biotransformación del herbicida posiblemente no pudo llevarse a cabo en toda su magnitud, debido a la fitotoxicidad causada en las raíces que condujo a la muerte de la mayor parte de éstas, como ya se ha reportado con otros plaguicidas (Calderón-Segura *et al.* 1999). En el trabajo anterior, se probaron los herbicidas molinate y butilate; en el primer caso, se observó dicho efecto fitotóxico que inhibió la respuesta genotóxica y citotóxica en las células que se trataron a partir de las 400 ppm en adelante; en el caso del butilate no se observó fitotoxicidad a partir de esta concentración, no obstante se reportó citotoxicidad. Asimismo, Gómez-Arroyo *et al.* (1995) describieron un comportamiento similar con el insecticida propoxur a 2,000 ppm, cuyo extracto de raíz de *Vicia faba* no incrementó la frecuencia de ICH en linfocitos humanos por daño a las células de la planta.

Una observación que refuerza el fenómeno anterior, es el aspecto macroscópico de la mayor parte de las raíces necrosadas de *Vicia faba* después de las 4 horas de tratamiento: presentaron tonalidades de color café oscuro y al tacto se percibieron muy blandas, en comparación con las raíces expuestas en las concentraciones anteriores que mantuvieron su aspecto natural.

En comparación con otras técnicas de biomonitoreo citogenético, el ensayo cometa permite la detección del daño al ADN de forma relativamente más rápida. Sin embargo, el ensayo cometa es sumamente sensible, de modo que cualquier alteración en el control de las variables (temperatura, pH,

voltaje y luz, entre las principales) por mínima que sea, provoca frecuencias elevadas de cometas en los testigos negativos y por ende, la anulación completa del experimento.

Finalmente, en términos generales las diferentes pruebas realizadas con extractos vegetales de asulam, muestran efectos genotóxicos en las células seleccionadas, lo que indica que el herbicida representa ciertamente un peligro potencial para los consumidores de los cultivos, no obstante conviene aclarar que la manifestación del daño al ADN en los individuos dependerá de la convergencia de toda una serie de factores tanto endógenos (características intrínsecas de los individuos) como exógenos (exposición a radiaciones ionizantes, microorganismos patógenos y toda una gama de agentes químicos).

IX. REFERENCIAS

- Albert L. 1981. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche materna y riesgo para la salud. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 9: 15-29.
- Audus L. J. 1976. *Herbicides. Physiology, biochemistry, ecology*. Vol. 1., 2ª ed., Academic Press, Londres, 608 p.
- Barberá C. 1975. *Pesticidas agrícolas*. Omega, Barcelona. 425 p.
- Batra S. W. T. 1982. Biological control in agrosystems. Science Vol. 215
- Bohomont B. L. 1990. *The standard pesticide user's guide: revised and enlarge*. Prentice Hall, Nueva Jersey, 498 p.
- Brusick D. 1987. *Principles of genetic toxicology*. 2ª. ed. Plenum Press, Nueva York, 284 p.
- Calderón-Segura M. E. 1993. Intercambio de cromátidas hermanas inducido por propoxur en cultivo de linfocitos humanos previa activación metabólica por *Vicia faba*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Calderón-Segura M. E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Ramírez M. 1999. *In vitro* and *in vivo* promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchange in human lymphocyte cultures. Mutation Research. 438: 81-88.
- Cobb A. 1992. *Herbicides and plant physiology*. Chapman y Hall, London, 175 p.
- Constantin M. J. y Nilan R. A. 1982. Arylamine N-oxidation by microsomal fraction of germinating pea seedling (*Pisum sativum*). J. Agric. Food Chem. 31: 1276-1282.
- Cotelle S. y Férard J. F. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. Environ. Mol. Mutat. 34: 246-255.
- Cossins E. A. 1987. Biochemistry of metabolism. En: *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise* (Davies, D. D., Ed.) Vol. 11. Academic Press, Nueva York, 318 p.
- Cunningham W. P. y Saigo B. W. 1997. *Environmental science. A global concern*. 4ª ed. W. C. Brown Publishers, Dubuque, IA., 634 p.
- DGEIE (Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación). 1995. *Informe Anual Agrícola*. México, D.F.

- Díaz B., Marrero A. y Ribot A. 1998. Absorción, translocación y metabolismo del asulam en *Sorghum halepense* (L.) Pers. y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). II. Metabolismo. Rev. Protección Veg. Vol. 13: 19-23.
- Donh D. R. y Krieger R. I. 1981. Oxidative metabolism of foreign compounds by higher plants. Drug Metab. Rev. 12: 119-157.
- Duke O. S. 1990. Overview of herbicide mechanism of action. Environ. Health Perspect. 87: 263-271.
- Ecobichon D. F. y Joy R. 1984. *Pesticides and neurological disease*. CRC Press, Boca Ratón, pp. 285-310.
- Environmental Health Criteria. 1988. *Thiocarbamate pesticides. A general introduction*. World Health Organization, Ginebra.
- Frear D. S., Swanson H. R. y Tanaka F. S. 1969. N-demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas: isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. Phytochem. 8: 2157-2169.
- Gómez-Arroyo S., Rodríguez-Madrid L. y Villalobos-Pietrini R. 1992. Chromosomal alterations induced by the thiocarbamate herbicide molinate (Ordran) in *Vicia faba*. Rev. Int. Contam. Amb. 8: 77-80.
- Gómez-Arroyo S. y Villalobos-Pietrini R. 1995. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. En: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change* (Butterworth, F.M., Corkum L.K. y Guzmán-Rincón, J., Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 95-113.
- Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M. E. y Villalobos-Pietrini R. 1995. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. Environ. Mol. Mutagen. 26: 324-330.
- Green M. B., Hartley G. S. y West, T. F. 1987. *Chemicals for crop improvement and pest management*, 3a. ed. Oxford, Pergamon.
- Grupo Internacionalista 2003. Ecuador: trabajo infantil y represión antisindical. El Internacionalista 3: 45-47.
- Hess F. 1985. Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerances and susceptibility. En: *Weed physiology*. Vol 2. *Herbicide physiology* (Duke, S.O., Ed.). CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 191-214.
- Hess F. 1987. Herbicide effects on the cell cycle meristematic plant cells. Rev. Weed Sci. 3: 183-203.

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

Higashi K., Ikeuchi K., Karasaki Y. y Obara M. 1983. Isolation of immunochemically distinct form of cytochrome from microsomes of tulip bulbs. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 115: 46-52.

Higashi K., Ikeuchi K., Obara M., Karasaki H., Hirano H., Gotoh S. y Koga Y. 1985. Purification of a single major form of microsomal cytochrome P-450 from tulips bulbs (*Tulipa gesneriana L.*). *Agric. Biol. Chem.* 49: 2399-2405.

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

Kassie F., Parzefall W. y Knasmüller S. 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 463: 13-31.

Kirkwood R. C. 1991. *Target sites for herbicide action. Topics in applied chemistry.* Plenum Press, Nueva York, 339 p.

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

Kolaczowski S. V., Perry A., Mckenzie A., Johnson F., Budil D. E. y Strauss P. R. 2001. A spin-labeled abasic DNA substrate for AP endonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 722-726.

Lamoureux G. L. y Frear D. S. 1979. Pesticide metabolism in higher plants. *In vitro enzymes studies.* En: *Xenobiotic metabolism: In vitro methods* (Paulson, G.D., Frear, D.S. y Marks, E.P., Eds.). Symp. Series 97. American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 77-128.

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

Langenbach R., Leavitt S., Hix C., Sharief Y. y Allen J. W. 1986. Rat and hamster hepatocytes mediated induction of SCEs and mutation in V79 cells and mutation of *Salmonella* by aminofluorene and dimethylnitrosamine. *Mutat. Res.* 161: 29-37.

Lhomme J., Constant J. F. y Demeunynck M. 1999. Abasic DNA structure, reactivity, and recognition. *Biopolymers* 52: 65-83.

Loprieno N. y Adler I. D. 1980. Cooperative programme of the EEC on short-term assays for mutagenicity. En: *Molecular and cellular aspects of carcinogen screening tests* (Montesano, R., Bartsch, H. y Tomatis, Eds.). IARC Publ. No.27, Lyon, pp. 331-341.

Luna J. J. 2000. Evaluación genotóxica de los plaguicidas eptam y asulam con y sin activación metabólica por la fracción enzimática S10 de la raíz de *Vicia faba* en cultivo de linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México.

Marshall G., Kirkwood R. y Martin D. J. 1987. Studies on the mode of action of asulam, aminotriazole and glyphosate en *Equisetum arvense* L. (field horsetail). II: The metabolism of [¹⁴C]asulam, [¹⁴C]aminotriazole and [¹⁴C]glyphosate. Pestic. Sci. 18: 65-77.

Menn J. J. 1978. Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. Environ. Health Perspect. 27: 113-12

Moustacchi E. 2000. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. Mutat. Res. 464: 35-40.

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

Nickoloff J. A. y Hoekstra M. F. 1998. *DNA damage and repair*. Humana Press. Totowa, N. J. U.S.A. 626 p.

Olive P. L., Banáth J. P. y Durand R. E. 1990. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individuals Chinese hamster cells. J. Natl. Cancer Inst. 82: 779-783.

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

Ostling O. y Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 123: 291-298.

Plewa M. J. 1978. Activation of chemical into mutagen 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* (Hollaender, A., Ed.). Vol 7. Plenum Press, Nueva York, pp. 401-420.

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., Wagner E. D. y Gentile J. M. 1988. The plant cell/microbe coinubation assay for the analysis of plant-activated promutagens. Mutat. Res. 197: 207-219.

Plewa M. J., Smith S. R. y Wagner E. D. 1991. Diethyldithiocarbamate supress the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutat. Res. 247: 57-64.

- Prendeville G. N., Eshel Y., James C. S., Warren G. F. y Schreiber M. M. 1968. Movement and metabolism of CIPC in resistant and susceptible species. *Weed Sci.* 16: 432-435.
- Restrepo I. 1992. *Los plaguicidas en México*. Comisión Nacional de Derechos Humanos. 2ª ed. México, D.F. 296 p.
- Rojas E., López M. C. y Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B* 727: 225-254.
- Rydber B. y Johanson K. J. 1978. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. En: *DNA repair mechanisms* (Hanawalt, P., Friedberg, E. y Fox, C., Eds.). Academic Press, Nueva York, pp 465-468.
- Sandermann H., Scheel D. y Trenck T. V. D. 1983. Metabolism of environmental chemicals by plants-copolymerization into lignin. *J. Appl. Polymer Sci. Appl. Polymer Symp.* 37: 407-420.
- Sandermann H. Jr. 1988. Mutagenic activation of xenobiotic by plants enzymes. *Mutat. Res.* 197: 183-194.
- Sandermann H. Jr., Arjmad M., Gennity I. y Winkler R. 1990. Animal bioavailability of defined xenobiotic lignin metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1877-1880.
- Sandermann H. Jr. 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* 17: 82-84.
- Scott B. R., Sparrow S., Schwemmer y Schairer L. A. 1978. Plant metabolic activation of 1,2-dibromoetano (DBE) to a mutagen of greater potency. *Mutat. Res.* 49: 203-212.
- Seo K., 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: 111-120.
- Shimabukuro R. H., Lamoureux G. L. y Frear F. S. 1981. Pesticide metabolism in plants: principles and mechanism. En: *Biological degradation of pesticides* (Matsumura, F., Ed.). Plenum Press, Nueva York, pp. 123-145.
- Shimabukuro R. H., Lamoureux G. L. y Frear F. 1982. *Pesticide Metabolism in Plants Reaction and Mechanism. Biodegradation of Pesticides*. Plenum Press, Nueva York, pp. 21-66.
- Sing N. P., McCoy M. T., Tice R. R. y Schneider E. L. 1988. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Soto E. 2002. Efecto genotóxico producido por los metabolitos trivalentes del arsénico en linfocitos humanos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México.

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

Stryer L. 1995 *Bioquímica. Tomo II.* 4ª. ed. Editorial Reverté. Bilbao, 127 p.

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

Takeisha S. y Kanaya N. 1983. A comparison of *Vicia faba*-root S10 and rat-liver S9 activation of ethanol, maleic hydrazide and cyclophosphamide as measured by sister-chromatid exchange induction in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 124: 145-151.

Takeisha S. 1986. Pro-mutagen activation by *Vicia faba*: measurement with SCE induction in CHO cells. *Biol. Zbl.* 105: 37-40.

Takeisha S., Kanaya N. y Rieger R. 1988. Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 197: 195-205.

Tomlin C. 1994. *A World Compendium. The pesticide manual incorporating the agrochemicals handbook.* 10ª ed. British Crop Protection Council. The Royal Society of Chemistry.

Waliszewski S. M., Bermúdez M. T. e Infanzón R. M. 2002. Niveles de DDT en tejido adiposo materno, suero sanguíneo y leche de madres residentes en Veracruz, México. Estudio 1997-1999. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 18: 17-25.

Wildeman A. y Nazar R. N. 1982. Significance of plant metabolism in the mutagenicity and toxicity of pesticides. *Can. J. Gen. Cytol.* 24: 473-449.

Worthing R. C. y Walter R. J. 1991. *The british crop protection council.* 336 p.

Yamasaki I. 1974. *Peroxidase.* En: *Molecular mechanism of oxigen activation* (Hayaish, O., Ed.). Academic Press, Nueva York, pp. 5335-5558.

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

Zilkah S. y Gressel J. 1977. Cell cultures vs. whole plants for measuring phytotoxicity. III. Correlations between phytotoxicity en cell suspension cultures and seedling. *Plant Cell Physiol.* 18: 815-820.

X. TABLAS

TABLA III. MIGRACIÓN DEL DNA Y FRECUENCIA DE COMETAS EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA TRATADOS CON ASULAM A TRAVÉS DEL METABOLISMO DE *Vicia faba*.^a

CONCENTRACIÓN (ppm)	MIGRACIÓN DEL DNA (μm)			FRECUENCIAS DE COMETAS (%)
	\bar{X}	\pm	EE	
50	111.75*	\pm	3.07	96.66
100	114.64*	\pm	2.74	96.66
200	107.23*	\pm	2.96	97.50
300	103.70*	\pm	2.59	97.00
400	77.84*	\pm	4.64	69.50
Testigo positivo (etanol 12,750 ppm)	121.88*	\pm	4.99	97.00
Testigo negativo (fracción S10)	2.60	\pm	1.02	3.50
Testigo negativo (células + medio de cultivo)	2.17	\pm	0.89	3.00

^a Promedio de tres experimentos

*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamientos con la prueba de U de Mann-Whitney, con $p < 0.001$.

TESIS COMPLETA
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

XI. FIGURAS

Estatus clínico, estilo de vida,
dieta, exposición ocupacional,
contaminación ambiental



TESIS CON
PALLA DE CASCEN

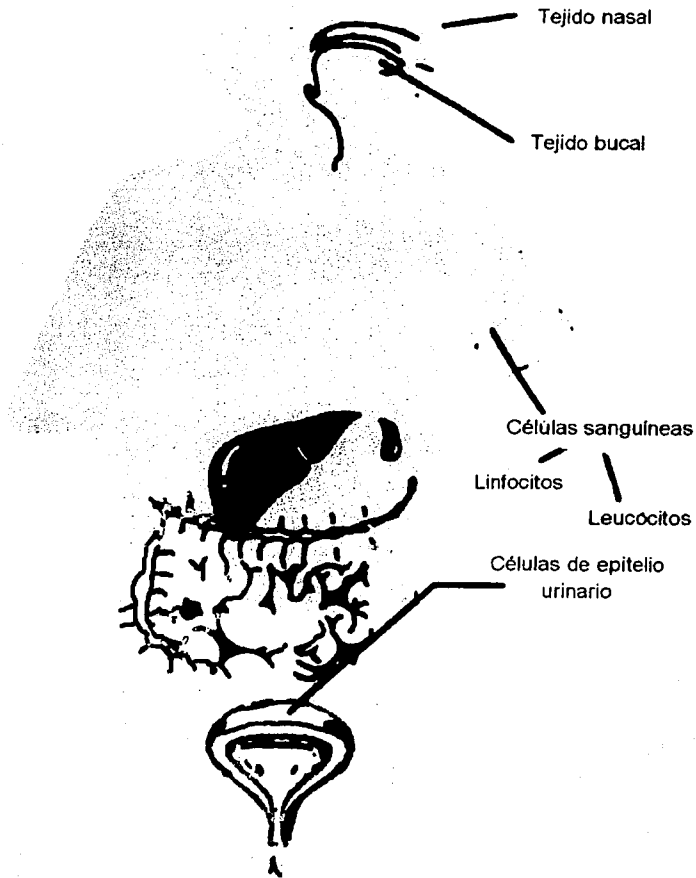


Figura I. Tejidos humanos a partir de los cuales pueden obtenerse las muestras celulares para los estudios de biomonitorio con ensayo cometa (tomada de Kassie *et al.* 2000).

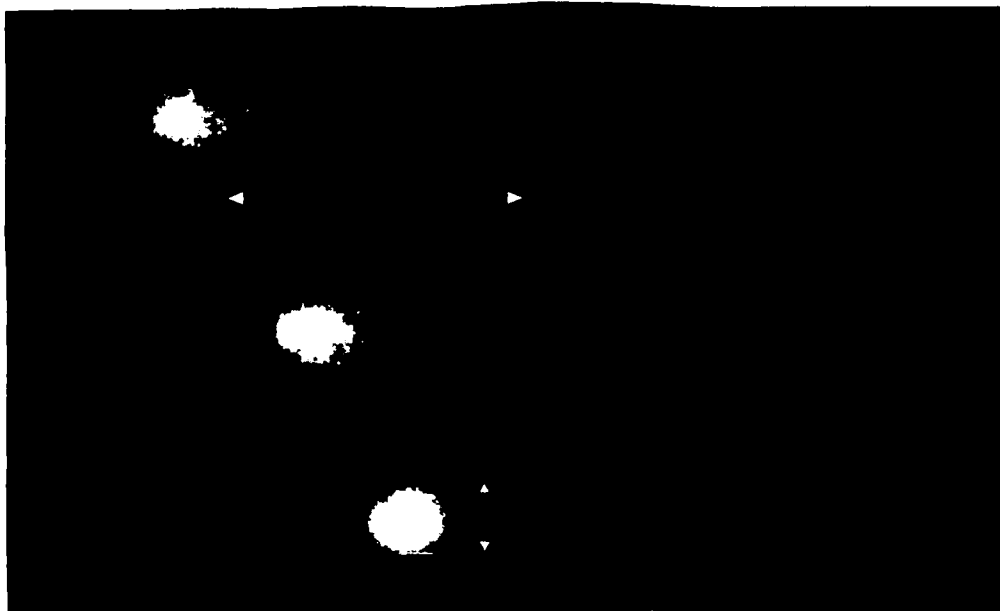


Figura 2. Núcleos linfocitarios observados a través de microscopía de fluorescencia. Nótese que los dos núcleos de arriba son los que presentan el daño expresado con una cauda delimitada por el segmento y la flecha (longitud en μm); el núcleo de abajo no presenta cauda y por lo tanto no tiene daño (tomada de www.cometassay.com).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

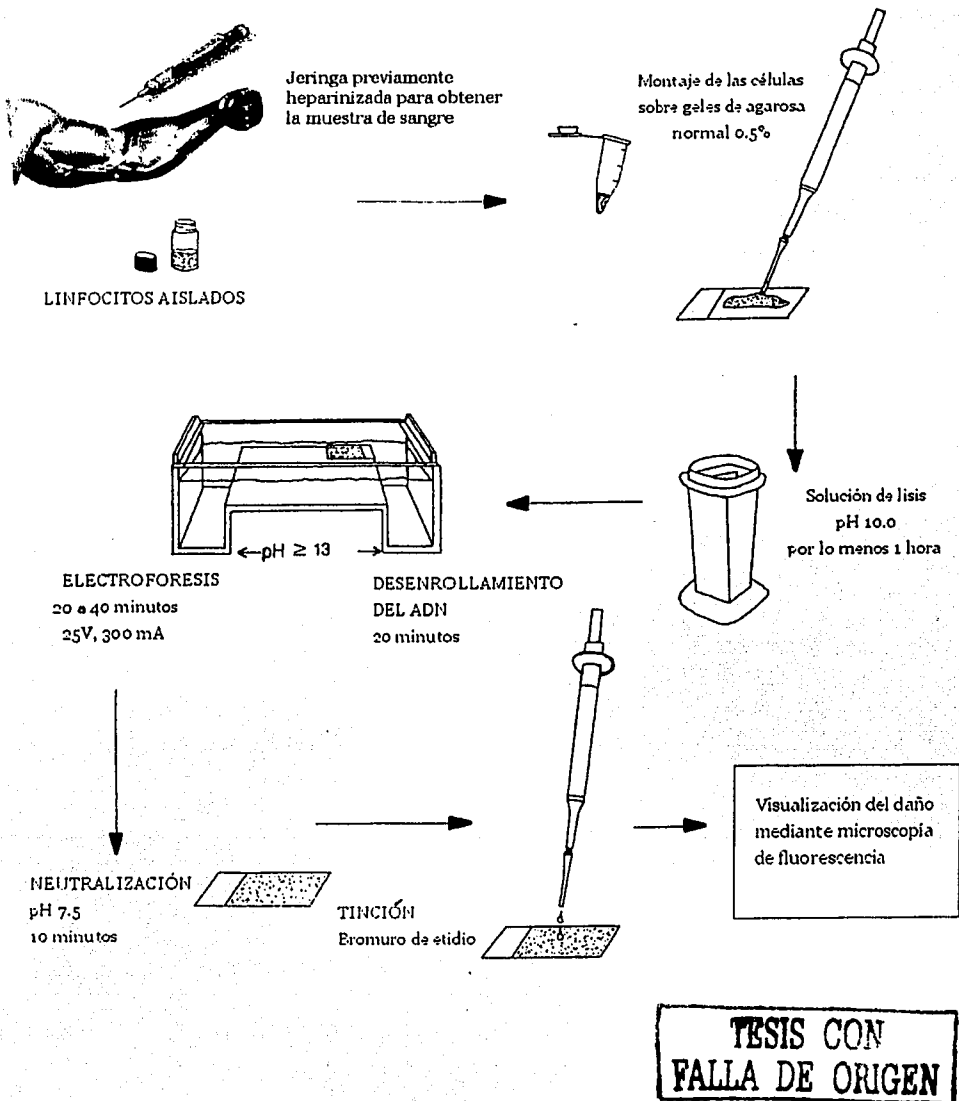


Figura 3. Metodología básica de la electroforesis unicelular alcalina (tomada de Rojas *et al.* 1999, con algunas modificaciones).

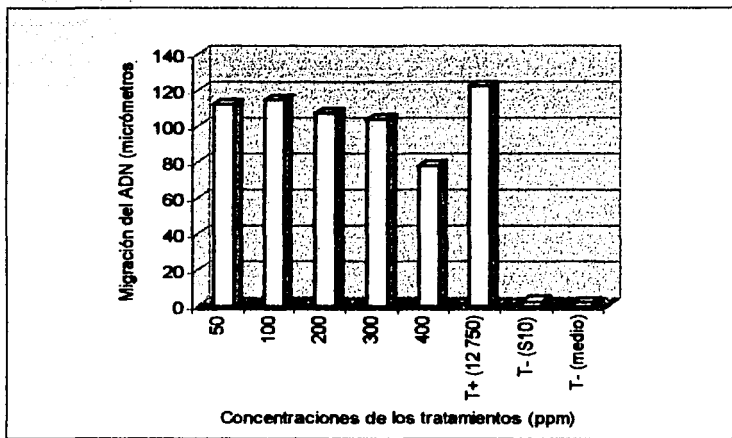


Figura 4. Niveles de migración del ADN (μm) a concentraciones diferentes del extracto de asulam (ppm), del testigo positivo (etanol) y de los testigos negativos (fracción S10 y medio).

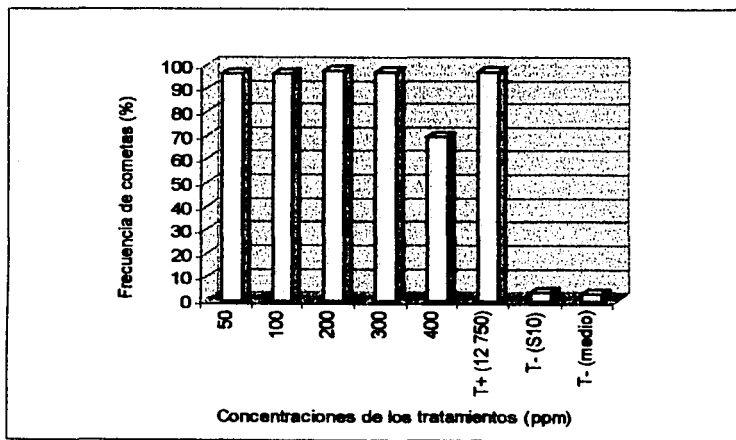
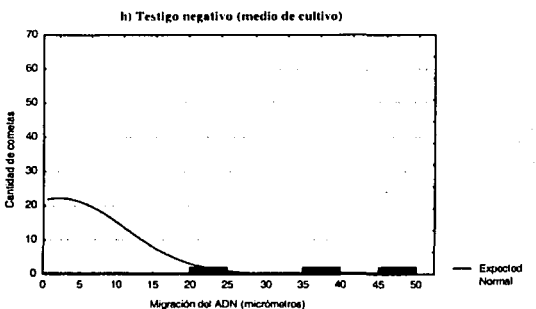
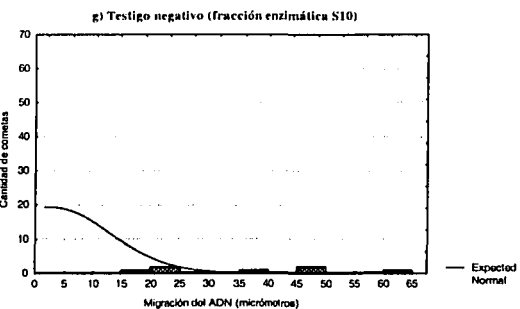
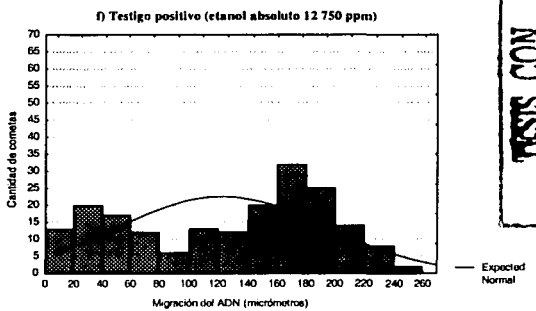
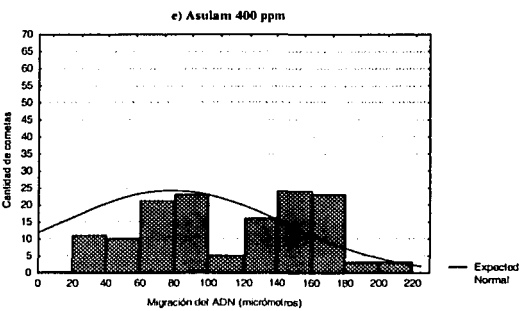
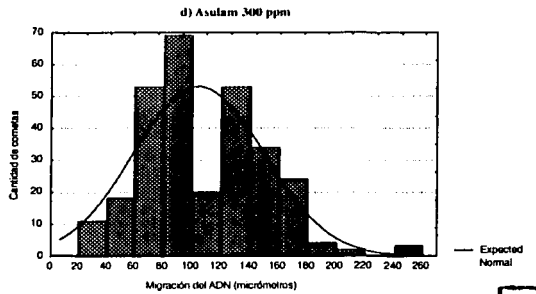
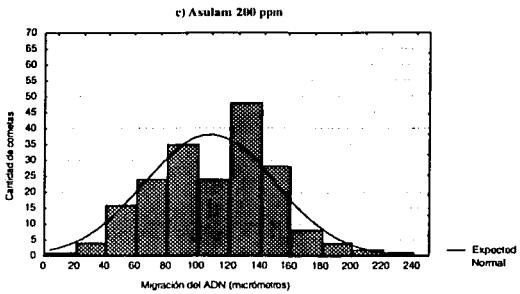
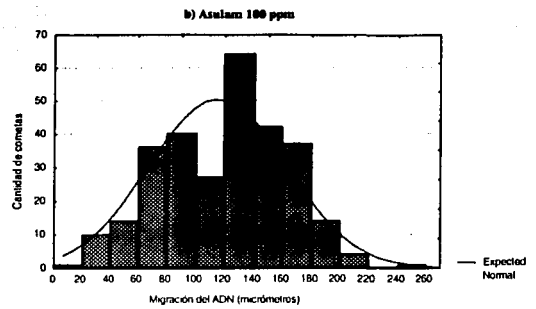
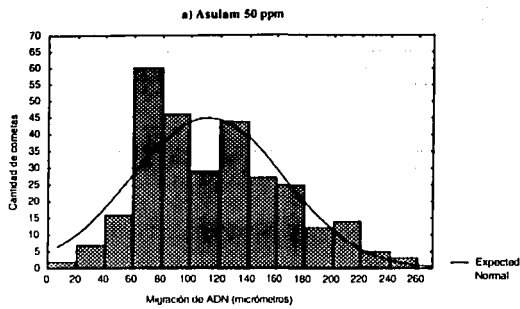


Figura 5. Frecuencias de cometas (%) a concentraciones diferentes del extracto de asulam (ppm), del testigo positivo (etanol) y los testigos negativos (fracción S10 y medio).

TESIS CON
 FALLA DE COPIEN



**TESIS CON
FALLA DE CUBIEN**

Figura 6. Intervalos de frecuencias de la migración de cometas de los cinco tratamientos de asulam y de los testigos positivo (etanol) y negativos (fracción enzimática S10 y medio de cultivo) su distribución.