



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DEL DAÑO SOBRE EL ADN EN
LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO* INDUCIDO POR EL
HERBICIDA TIOCARBÁMICO EPTC CON Y SIN
ACTIVACIÓN METABÓLICA *IN VIVO* POR LA RAÍZ DE

Vicia faba

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

RUBÉN ZÚÑIGA REYES



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

m 345573



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

FECHA: 16 de Junio del 2005

FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Evaluación del daño sobre el ADN en linfocitos humanos in vitro inducido por el herbicida tiocarbámico EPTC con y sin activación metabólica in vivo por la raíz de Vicia faba".

realizado por Zúñiga Reyes Rubén

con número de cuenta 09116489-6 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. María Elena Calderón Segura

Propietario

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Propietario

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Suplente

Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro

Suplente

M. en C. Marco Antonio González Jiménez

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez-Chávez



AGRADECIMIENTOS

A mis padres Concepción y Rubén por su cariño y comprensión, por guiar mis pasos para alcanzar mis metas realizando innumerables sacrificios y estar a mi lado cuando más los necesito.

A mis hermanas Sandra y Roció por compartir cada momento importantes de nuestras vidas y apoyarme cada vez que requiero de una mano, así como el gran esfuerzo que han realizado al no dejarme hasta alcanzar esta meta y se que en el futuro estarán conmigo siempre ya que pase lo que pase la sangre siempre nos unirá.

A mi hermana Jenny y mis sobrinos Deya, Alexis, Ashley y Axel, por ser lo más hermoso que tengo y brindarme ese cariño que tanto me motivo, esperando que todo lo que los rodea los motive a perseguir y alcanzar sus sueños y estaré con ustedes para ayudarlos en este camino lleno de obstáculos.

A toda mi familia abuelos, tíos y primos por estar a mi lado y ser una gran familia de la que estoy orgulloso de pertenecer. A Ernesto por su ayuda y amistad.

A Eric "Flaco", por no dejarme rendir y apoyarme a concluir mi carrera y esta tesis y vaya que la sufriste este logro también es tuyo, más por que estas cuando requiero de un amigo, un hermano; gracias por todo y perdón por hacerte enojar a cada segundo pero los buenos amigos lo superan todo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, junto con todos mis maestros de la Facultad de Ciencias, por darme las herramientas necesarias para lograr esta meta.

A la Doctora Maria Elena Calderón Segura, por la dedicación, amistad y esfuerzo que me brindo para ser parte del laboratorio y enseñarme la técnica y asesarme para concluir este trabajo.

A la Doctora Sandra Gómez Arroyo, por dejarme pertenecer al equipo y brindarme tiempo y consejos en mi paso por el laboratorio de citogenética.

Al Doctor Rafael Villalobos Pietrini, por brindarme un espacio en su valioso tiempo al aportar su conocimiento en la revisión de este trabajo y más aun por ser una gran persona con su gran humor en cada reunión.

A la Doctora Mari Carmen Calderón Ezquerro, por su valiosa colaboración y retroalimentación en la revisión de este trabajo.

Al Maestro Marco Antonio González Jiménez, por aceptar ser parte de mis sinodales y brindarme parte de su conocimiento.

A mis compañeros del Laboratorio por darme su amistad y apoyo: Dra. Josefina, Mtra. Ana Rosa, Sra. Emma, Vicky, Selene.

A mi nueva familia, Mis hermanas Wendy, Erika, mis sobrinas Fernanda, Irán, Itzel así como Elisa, por dejarme integrar a ustedes y motivarme en este paso.

A mis grandes amigos, Raquel, Víctor, Emiliano, Herme, Horacio y Susana, por ser parte de diferentes etapas de mi vida y que lograron motivarme.

A mi jefa Alicia López, quien a pesar de no estar en el trascurso de esta meta logro brindarme apoyo para su conclusión.

Cada persona que se cruzo en mi andar formo parte de un logro ya que todo complementa cada ciclo.

ÍNDICE

RESUMEN	3
I. INTRODUCCIÓN	5
1. Clasificación de los plaguicidas.....	8
1.1. Herbicidas tiocarbámicos.....	9
1.2. Toxicidad de los herbicidas tiocarbámicos.....	10
1.2.1. En plantas.....	10
1.2.2. En animales.....	12
2. Estudios sobre efectos mutagénicos y/o carcinogénicos de los herbicidas tiocarbámicos.....	14
3. Metabolismo de los tiocarbámicos.....	15
3.1. Reacciones de fase I.....	18
3.1.1. Reacciones de oxidación.....	19
3.1.2. N-desalquilación.....	20
3.1.2. Formación de sulfonas.....	20
3.2. Reacciones de fase II.....	20
3.3. Reacciones de fase III.....	22
4. Metabolismo del EPTC.....	22
4.1. En plantas.....	24
4.2. En animales.....	24
5. Sistemas de prueba.....	27
6. Electroforesis unicelular alcalina.....	27
II. JUSTIFICACIÓN	29
III. OBJETIVOS	30
IV. HIPÓTESIS	31
V. MATERIALES Y MÉTODOS	32
1. Propiedades fisicoquímicas del herbicida EPTC.....	32
2. Aplicaciones.....	32
3. Toxicología en mamíferos.....	33
4. Técnica de electroforesis unicelular alcalina.....	33

5. Aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica.....	35
5.1. Cuantificación de linfocitos humanos.....	36
6. Ensayo de viabilidad celular.....	36
7. Tratamientos directos con el herbicida EPTC a linfocitos humanos.....	37
8. Activación metabólica <i>in vivo</i>	
8.1 Obtención de los extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con EPTC y etanol y su aplicación a linfocitos humanos.....	37
9. Elaboración de geles con monocapa de agarosa más células con tratamiento directo y previa activación metabólica.....	39
9.1. Lisis celular.....	40
9.2. Electroforesis unicelular alcalina.....	40
10. Determinación del daño del ADN en linfocitos humanos.....	41
11. Análisis estadístico.....	41
VI. RESULTADOS.....	42
1. Tratamientos directos con EPTC a los linfocitos humanos.....	42
2. Activación metabólica <i>in vivo</i> por la raíz de <i>Vicia faba</i> .	
2.1. Tratamiento con los extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con EPTC y etanol a los linfocitos humanos <i>in vitro</i>	42
3. Evaluación del efecto citotóxico del EPTC con y sin activación metabólica por la raíz de <i>Vicia faba</i>	43
VII. DISCUSIÓN.....	44
VIII CONCLUSIONES.....	49
IX. REFERENCIAS.....	50
CUADRO II.....	62
GRÁFICAS.....	64

RESUMEN

El crecimiento poblacional genera necesidades alimenticias proporcionales, lo que plantea problemas básicos de aumento en la producción agrícola. Sin embargo, por la acción de diferentes plagas (maleza, nemátodos, roedores, etc), se pierde anualmente gran parte de la producción mundial durante el crecimiento, la recolección y el almacenamiento. Uno de los problemas que más afecta los cultivos es la maleza, la cual entra en competencia por el agua, la luz y los nutrientes, lo que hace indispensable el uso de herbicidas. Uno de los más utilizados en la agricultura mexicana es el tiocarbámico EPTC, para cultivos de: algodón, maíz, caña de azúcar, tomate, chícharo y frijol. Estudios previos han mostrado que este plaguicida después de ser activado por el metabolismo de la raíz de *Vicia faba*, induce intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos *in vitro*.

En este trabajo se investigó la capacidad metabólica de *Vicia faba* para bioactivar al herbicida EPTC es la inducción de daño al ADN y los efectos citotóxicos en linfocitos humanos de sangre periférica a través del ensayo de electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa, empleando como sistema de activación *in vivo* a la raíces, las cuales se expusieron al herbicida y sus extractos fueron aplicados a los linfocitos humanos.

Se expusieron directamente a los linfocitos interfásicos con 1.5, 2.5, 5.0, 8.0 y 10.0 µg/mL de EPTC y con 400 ng/ml de Mitomicina C (MMC) como testigo positivo directo, por 2 h, los resultados mostraron que el herbicida EPTC no produce efecto genotóxico, células con poca longitud de la cauda (caudas pequeñas) del cometa (4-16 µm), de 2 al 8 % de linfocitos con cometas con daño mínimo al ADN (nivel 1). El

análisis de varianza evidenció que no hubo diferencias significativas con relación a los valores del testigo negativo (RPMI1640), demostrando que EPTC no es mutágeno directo. La MMC indujo $22 \pm 3.6\%$ de células con daño al ADN o con cometas, dentro de los niveles 2 y 3, aumentó a $52 \pm 1.02 \mu\text{m}$ la longitud de la cauda del cometa (migración del ADN) y no alteró la viabilidad linfocitaria.

Cuando las células se coincubaron con $20 \mu\text{l}$ de extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas por 4 h con EPTC y con etanol (3600 mg/L , como promutágeno indirecto, testigo positivo), se incrementó significativamente la longitud de la cauda del cometa de 32 ± 2.2 a $94 \pm 2.2 \mu\text{m}$, la frecuencia de linfocitos con cometas del 21 al 82 % con mayor daño al ADN (en los niveles 2 y 3, caudas grandes), con respecto a la fracción S10. El daño sobre el ADN mostró un comportamiento de concentración-respuesta. El etanol previa activación metabólica produjo aumento en la longitud de la cauda de $194 \pm 3.0 \mu\text{m}$, el 78 % de células con cometas, en los niveles 2-4 comparada con la S10. La fracción enzimática S10 de la raíz de *Vicia faba* por si mismo no indujo efectos genotóxico y citotóxico en las células humanas con respecto al valor del testigo negativo (RPMI1640). El herbicida EPTC y el etanol no causaron efectos adversos sobre la viabilidad de los linfocitos con y sin activación metabólica vegetal *in vivo* comparados con los valores del testigo negativo y la fracción S10.

Los resultados demostraron que el herbicida EPTC necesita del metabolismo de la raíz de *Vicia faba* para producir daño al ADN, lo cual corrobora que el sistema enzimático de la raíz del haba puede transformar al herbicida a productos muy reactivos al ADN. Probablemente los sulfóxidos del EPTC provoquen el daño al ADN ya que tienen acción alquilante y son las formas activas del plaguicida.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, los problemas de la contaminación del aire, del agua y del suelo son de carácter internacional, pero sobre todo en países que reúnen factores de crecimiento industrial, poblacional y urbano como son: Brasil, Italia, EUA, Inglaterra, Japón, Francia, Chile, México, entre otras. Destacan las enormes y variadas cantidades de productos químicos liberados al ambiente que afectan su entorno e inclusive la salud humana (Rico *et al.* 2000).

Uno de los agentes químicos que alteran el ambiente son los plaguicidas utilizados para el combate de plagas agrícolas, de vectores de algunas enfermedades transmisibles, de insectos y roedores, tanto en campos agrícolas como en las casas. Estos se han utilizado históricamente aportando múltiples beneficios económicos e industriales; sin embargo, cada día la preocupación es mayor acerca de los efectos agudos y crónicos sobre la salud causan debido a la aspersion indiscriminada de estos productos, implicando aspectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos (Keith 2001). La intoxicación aguda, en especial por los organofosforados, se relaciona con cáncer, daños al sistema reproductor o alteraciones neurológicas (Ecobichon y Joy 1984, Ecobichon 2001, Keith 2001, Abou-Donia *et al.* 2002).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año entre 500,000 y 1 millón de personas se envenenan con plaguicidas y de 5,000 a 20,000 mueren. Al menos la mitad de los envenenados y el 75 % de los que fallecen son trabajadores agrícolas, el resto lo causa el consumo de alimentos contaminados (OMS 1990).

La Organización de Agricultura y Alimentos (FAO) define a un plaguicida como: "cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no

deseadas de plantas o animales que causen perjuicios o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos” (Harris 2002).

Durante 1995, en México el volumen de plaguicidas utilizados ascendió a 54,000 toneladas. Los cultivos que emplearon las mayores cantidades de estos productos fueron maíz, hortalizas y algodón (INEGI 1998). En México se ha registrado un aumento en ventas de plaguicidas; de 1995 al 2000, mientras que la importación de plaguicidas creció un 28.2% (CCA 2002).

En diferentes países se reportaron problemas en la salud humana causada por plaguicida desde la década de los sesenta, cuando aun no había control en su uso. En el valle de Mexicali, Baja California, en 1988 se presentó una epidemia caracterizada por náuseas, cefalea, dolor de abdomen que afectó a una cuadrilla de agricultores debido al metomil (Valdez *et al.* 2000).

En el Estado de Yucatán, los expedientes de 33 pacientes entre 1997 y 1998, mostraron que la intoxicación aguda por plaguicidas (IAP), no fue en agricultores como era de esperarse (7 casos), sino por envenenamiento (26), lo que pone en evidencia el problema que generan los agroquímicos (Durán y Colli 2000).

En 1998, un estudio realizado en el Valle de Mexicali, Baja California, reveló el grave problema de salud que representa tanto el uso de los plaguicidas aprobados por el gobierno como aquellos que no lo están, observándose similitudes con datos obtenidos en el Valle Imperial en el estado de California, EUA, ambos estados cuentan con zonas de la alta producción de algodón en el mundo. Los principales síntomas

fueron: náuseas, cefalea, diarrea e irritación de la piel en la época de aspersión sobre los cultivos, siendo los carbamatos (aldicarb y methonyl) y los organofosforados (fosolón y metamidofos) los principales productos en el Valle de Mexicali (Montoya *et al.* 1981, IMSS 1995, Reppeto y Sanjay 1996, Valdez *et al.* 2000).

Tadeo *et al.* (2000) encontraron por cromatografía líquida de alta resolución, concentraciones importantes de residuos de diferentes herbicidas, como fenoxiácidos, benzonitrilos, triazinas, cloroacetaminas, carbamatos, tiocarbamatos, entre otros, en cereales, frutas y vegetales provenientes de los campos agrícolas españoles. Albero *et al.* (2003) determinaron residuos significativos de organofosforados en jugos de frutas provenientes de supermercados españoles.

Estudios controlados en grupos expuestos a los insecticidas d-aletrina y piretrina, demostraron que ambos ocasionan alteraciones en la función respiratoria y bloqueo de la acetilcolina (Rico *et al.* 2000).

Clements *et al.* (1997), describen daño sobre el ADN de la atrazina, metaloclor, glifosato, metribuzin y 2,4-D amina, en eritrocitos del renacuajo de la rana *Catesbeiana* utilizando la electroforesis unicelular alcalina.

Tennant *et al.* (2001) observaron que las triazinas, cianazina, atrazina y simazina inducen daño al ADN en leucocitos de ratones *in vivo*, utilizando la técnica de electroforesis unicelular alcalina.

Ünderger y Basaran (2002) y Grover *et al.* (2003) mostraron daño en el ADN en linfocitos de trabajadores ocupacionalmente expuestos a diversos plaguicidas asperjados en los campos agrícolas de la India y Turquía.

1. Clasificación de los plaguicidas

Para los plaguicidas se utilizan diferentes tipos de clasificaciones, debido al amplio número de sustancias y combinaciones de los productos. Con frecuencia, se catalogan según su uso, es decir, el objetivo con el que se aplican y no desde el punto de vista de los efectos sobre la salud humana; una segunda separación es con respecto al mecanismo de acción, por ejemplo los organofosforados, comparten la capacidad de inhibir la enzima colinesterasa (Agencia de Protección Animal, EPA 1996). La OMS propone la clasificación en función de su riesgo para la salud la cual se revisa y actualiza periódicamente, basándose en su comportamiento tóxico en ratas de laboratorio exponiéndolas por vías oral y dérmica se estima la dosis letal (LD_{50}) para producir muerte al 50% de los animales expuestos, separando de menor a mayor la toxicidad en números del 1 al 4, sin embargo, especifica los efectos a mediano y largo plazos de exposiciones moderadas que suelen ser habituales en condiciones normales del uso de estos productos por los humanos (OMS 1990).

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) propone que deben investigar los principios activos de los plaguicidas sobre la salud de las personas, de sus productos o derivados del metabolismo que algunos pueden resultar más tóxicos (Harris 2002). Los derivados del metabolismo del principio activo del plaguicida tanto en animales como en plantas puede dar como resultado un metabolito acumulable y/o eliminado, e inerte o generar toxicidad (Plewa *et al.* 1984, Keith 2001, Abou-Donia *et al.* 2002).

Los plaguicidas de mayor importancia en México están representados por los organofosforados, los carbámicos y los tiocarbámicos (DGEIE 1995).

1.1. Herbicidas tiocarbámicos

Los herbicidas carbámicos son derivados del ácido carbámico:



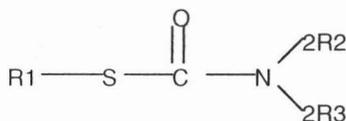
La adición de grupos funcionales da origen a los carbamatos, tiocarbamatos y ditiocarbamatos.

La sustitución de un átomo de azufre en un oxígeno del ácido da origen a los tiocarbámicos.



Estos compuestos están divididos en dos clases, los derivados S-alquilo ó S-benzilo, incluyen al cicloate, eptam ó EPTC, pebulate, tiobencarb, molinate y butilate y los derivados S-cloroalil, el dialate, el trialate y el sulfalate (Fuerts 1987, WHO 1988, Roberts 1998). Son compuestos con amplio uso en suelos agrícolas y forestales, inhibiendo el desarrollo de plántulas preemergentes de hierbas, de pastos anuales y perennes (Fuerts 1987, WHO 1988).

La fórmula general de los tiocarbámicos es:



Donde R1 es un grupo alquilo unido al azufre, originando a los S-tiocarbamatos ó en el oxígeno a los O-tiocarbamatos. R2 y R3 son dos grupos alquilo ó un grupo cíclico ó un hexametileno (WHO 1988).

Estos herbicidas pueden ser líquidos ó sólidos, no se ionizan a pH al normal del ambiente, son altamente volátiles por lo cual necesitan de incorporarse rápidamente al suelo, la mayoría son concentrados y absorbidos en la raíz con una eficiente translocación por los vasos del xilema, su degradación en el suelo suele ser en forma de sulfatos, sulfóxidos y ácido sulfónico (Devine y Vanden 1991, Roberts 1998).

Al investigarse la influencia de la estructura molecular con relación a su eficacia como herbicida, se ha comprobado que la prolongación de la cadena unida al oxígeno disminuye su actividad (Roberts 1998).

La penetración de los herbicidas carbámicos es normalmente por absorción a través de las raíces y de las hojas, su acción es mediante el bloqueo de la síntesis de aminoácidos, lípidos, carotenoides, celulosa, folatos, así como por la inhibición de la división celular y la fotosíntesis (Roberts 1998, Zimdahl 1999).

1.2. Toxicidad de los herbicidas tiocarbámicos

1.2.1. En plantas

Los herbicidas tiocarbámicos alteran varios procesos bioquímicos tales como la fotosíntesis, la respiración, la biosíntesis de lípidos (suberina y cutina); inhiben la enlongación de los ácidos grasos (excepto la enzima acetil-CoA carboxilasa), de isoprenoides (cuareno precursor de giberelinas) y de flavonoides en la raíz, en el tallo

y en las hojas (Still *et al.* 1970, Kolatokudy y Brown 1974, Karunen y Wilkinson 1975, Fuerts 1987, Roberts 1998, Baldwin *et al.* 2003). Bloquean la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos *in vitro* e *in vivo* en diferentes especies vegetales (Mann *et al.* 1965, Moreland *et al.* 1969, Ebert 1980, Weisshaar y Boger 1987, Wilkinson 1987, Zimdahl 1999). Los meristemos apicales son los más afectados por estos herbicidas, así como los intercalares cercanos al nódulo del coleóptido impidiendo el desarrollo de las hojas primarias y de la raíz, este proceso se debe al bloqueo de la división y de la elongación celular (Ebert 1980, Ashton y Grafts 1981, Zimdahl 1999).

Se ha observado que los herbicidas dialate y trialate inducen anomalías cromosómicas, alteraciones en el núcleo, agrupamiento del material cromosómico, micronúcleos, puentes anafásicos y detención de la división celular en células meristemáticas (Banting 1970, Hepler y Yackson 1989).

Los herbicidas molinate y butilate producen aberraciones cromosómicas en células de la punta de la raíz de *Vicia faba* (Gómez-Arroyo *et al.* 1992). En presencia del metabolismo tanto *in vivo* como *in vitro* de *Vicia faba* el butilate y el molinate inducen significativamente el intercambio de cromátidas hermanas (ICH), en linfocitos humanos en cultivo, estimulan la cinética de proliferación celular (CPC) y alteran los índices de replicación (IR) y mitótico (IM) (Calderón-Segura 1998, Calderón-Segura *et al.* 1999).

Al realizar el ensayo de Ames en *Salmonella typhimurium* cepas TA98 y TA100 aplicando los herbicidas EPTC y Asulam de manera directa y al aplicar la fracción enzimática S9 de *Nicotiana tabacum* y S9 de hígado de rata, se obtuvieron resultados negativos tanto en forma directa como cuando son aplicados ambos metabolismos (Coballase-Urrutia 1997). Los mismos plaguicidas producen un aumento significativo

de ICH en células meristemáticas de *Vicia faba* y en linfocitos humanos en cultivo en presencia del metabolismo de *Vicia faba* (Rosales 1998, Luna-Martín del Campo 2000).

1.2.2. En animales

Los plaguicidas entran al sistema biológico animal siguiendo los siguientes pasos: 1) absorción: oral, dérmica o inhalación, 2) distribución en los tejidos (disposición); 3) reacción con proteínas y tejidos; 4) transformación enzimática y no enzimática y 5) excreción (Ecobichon 2001, Abou-Donia *et al.* 2002).

La toxicidad de este tipo de herbicidas ha sido estudiada en ratas a las que se administró dialate, trialate, pebulate y molinate (0.5 a 200 mg/kg), los síntomas observados son anorexia, hipersalivación, lagrimeo, piloerección, hipotermia, depresión, fibrilación muscular, incoordinación, convulsiones, parálisis respiratoria, dilatación vascular en el cerebro, cerebelo, vísceras, hemorragia meningial, daño gonadal y cambio en la estructura de los espermatozoides (Akulov *et al.* 1972, IARC 1976, Ecobichon 2001). En ratas y cobayos expuestos a dosis letales del herbicida dialato se observó ausencia de coordinación y la muerte por parálisis respiratoria dos horas después de su aplicación (Doloshitsky 1969).

Rebrin y Aleksandrova (1971) reportaron 20% de mortalidad en ratas inyectadas durante cuatro meses con 232 mg/kg de cicloato y en los conejos por vía dérmica de 115 mg/kg/día se observó hipertermia y edema en la piel (Medved e Ivanova 1971).

El herbicida EPTC considerado como medianamente tóxico por la OMS, tiene efecto inmediato en el sistema nervioso al inhibir reversiblemente la enzima acetilcolinesterasa (AChE), el exceso del neurotransmisor evidencia clínicamente una parálisis del músculo esquelético y/o debilidad muscular generalizada, así como sofocación respiratoria por la parálisis del diafragma y el músculo intercostal (Ecobichon 2001, Abou-Donia *et al.* 2002).

Durante dos meses la administración de 3.6 mg/kg/día de molinate a ratas macho jóvenes no causando efecto en su fertilidad pero si provocó alteraciones a sus espermatozoides, al aparearse con hembras normales se produjo reabsorción embrionaria, por lo que se supuso un efecto letal dominante, provocando muerte posnatal (Voytenko y Medved 1973, Anina *et al.* 1975).

En seres humanos se ha encontrado un caso por intoxicación, causada por agua contaminada con molinate proveniente de los campos agrícolas, la sintomatología registrada fue diarrea, náuseas, debilidad, escalofrío, dolor abdominal y conjuntivitis, estos efectos desaparecieron al dejar de consumir el agua contaminada, un análisis posterior del agua reveló una concentración de 0.006 ppm del herbicida (Minakawa *et al.* 1978).

Los casos en humanos son accidentales o intencionales y están asociados más comúnmente con la toxicidad aguda causada por carbamatos como aldicard, metomil y propoxur (Ecobichon y Joy 1984); se registro el caso de un hombre de 39 años que ingirió 500ml de Sevin-80 (80% concentrado de carbaryl) y murió 6 horas más tarde, el análisis de los tejidos y fluidos reveló las siguientes concentraciones en ppm, fluido estomacal (2.5), contenido estomacal (148), contenido intestinal (176) sangre (14), hígado (29), riñon (25) y orina (31) (Forago 1969).

2. Estudios sobre efectos mutagénicos y/o carcinogénicos de los herbicidas tiocarbámicos.

El dialato y el trialato se comportan como mutágenos en *Streptomyces coelicolor* y en *Pellargonium*, producen aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en células de ovario de criceto dorado *in vitro* dando resultados positivos en el ensayo de linfoma en ratones con activación metabólica animal (S9) (Carrere y Morpurgo 1981, Douglas *et al.* 1981, Sandhu *et al.* 1984).

Innes *et al.* (1969) mostraron que el dialato causa tumores en hígado, pulmón y estómago en ratas y ratones machos expuestos a 100 mg/kg, mientras que el sulfalato administrado a ratones y ratas hembras induce tumores en glándulas mamarias (WHO 1988). El vernolate y el butilate causan mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster* (Murnik 1976).

El potencial de inhibición de pesticidas carbámicos en receptores neuronales nicotínicos de rata depende de la combinación de las subunidades α y β , como es el caso del receptor $\alpha 4\beta 4$ donde el potencial de inhibición tiene el siguiente orden: fenoxicarb > EPTC > carbaril, bendiocarb > propoxur > aldicarb (Smulders *et al.* 2003).

González *et al.* (2003) mostraron daño sobre el ADN en células ováricas de criceto dorado (CHO), expuestas al el ditiocarbamato zineb y al azurro (nombre comercial).

Zimmerman *et al.* (2004) encontraron que los sulfóxidos provenientes del metabolismo del molinato, vernolato, etiolato y EPTC producen aductos S-(N,N-dialquilaminocarbonil) en hepatocitos a nivel de cisteína y serina en ratas inyectadas con 100 mg/kg diarios por 5 días.

3. Metabolismo de los tiocarbámicos

Diversos estudios han corroborado que algunos agentes químicos inducen directamente modificaciones en el ADN, en tanto que otros requieren del metabolismo realizado por la fracción microsómica S9 de las células hepáticas de mamíferos o de enzimas vegetales para activarse y provocar el daño (Gentile *et al.* 1982). A estos agentes químicos que requieren de la activación metabólica para ejercer daño al material genético se les denomina promutágenos o mutágenos indirectos (Plewa *et al.* 1984a, 1988b). El término activación vegetal denota el proceso por el cual un agente químico no mutagénico es transformado por la acción enzimática de una planta en mutágeno (Plewa 1978, Plewa *et al.* 1993). Tanto en plantas como en animales, diversas enzimas que intervienen en el metabolismo de los plaguicidas se localizan en el retículo endoplásmico (Velemínsky y Gichner 1988), sin embargo en los vegetales algunas enzimas que participan en la activación mutagénica además de detectarse en este organelo se les encuentra en el citoplasma y en la pared celular (Sandermann 1992, Werck-Reichhart y Feyereisen 2000, Dixon *et al.* 2002).

El metabolismo de los plaguicidas y otros xenobióticos en las plantas ocurre en tres fases en contraste con las dos fases en animales. . La fase I del metabolismo es la más importante del herbicida y es el factor de selectividad ya que es muy común la

activación o incremento de su fitotoxicidad. La conjugación del herbicida en la fase II usualmente resulta baja actividad fitotóxica remanente de la reacción en la fase I. Ejemplos de esta activación se dan con EPTC, paratión y ésteres de ácidos orgánicos. La fase III del metabolismo es particular de las plantas, en esta fase el conjugado es convertido en un conjugado secundario insoluble (Sandermann 1982). La descripción general de las tres fases se muestra en el cuadro I y en la figura 1, indicando las rutas del metabolismo de los tiocarbamatos en plantas (Shimabukuro et al. 1981, 1982, Shimabukuro 1986, Grover y Cesna 1991).

Cuadro I. Generalidades de las fases del metabolismo de los plaguicidas en las plantas (Shimabukuro 1986)

Características	Propiedad inicial	Fase I	Fase II	Fase III
Reacción	Compuesto patrón	Oxidación Reducción Hidrólisis	Conjugación	Conjugación secundaria o incorporación hacia el interior de polímeros (residuos insolubles)
Solubilidad	Lipofílica	Amofílica	Hidrofílica	Hidrofílica e insoluble
Translocación	Movilidad selectiva	Modificada ó movilidad reducida	Limitada ó inmóvil	Inmóvil
Toxicidad	Tóxica	Modificada ó ligeramente tóxica	Muy reducida ó no tóxica	No toxica

Metabolismo vegetal de los herbicidas tiocarbámicos

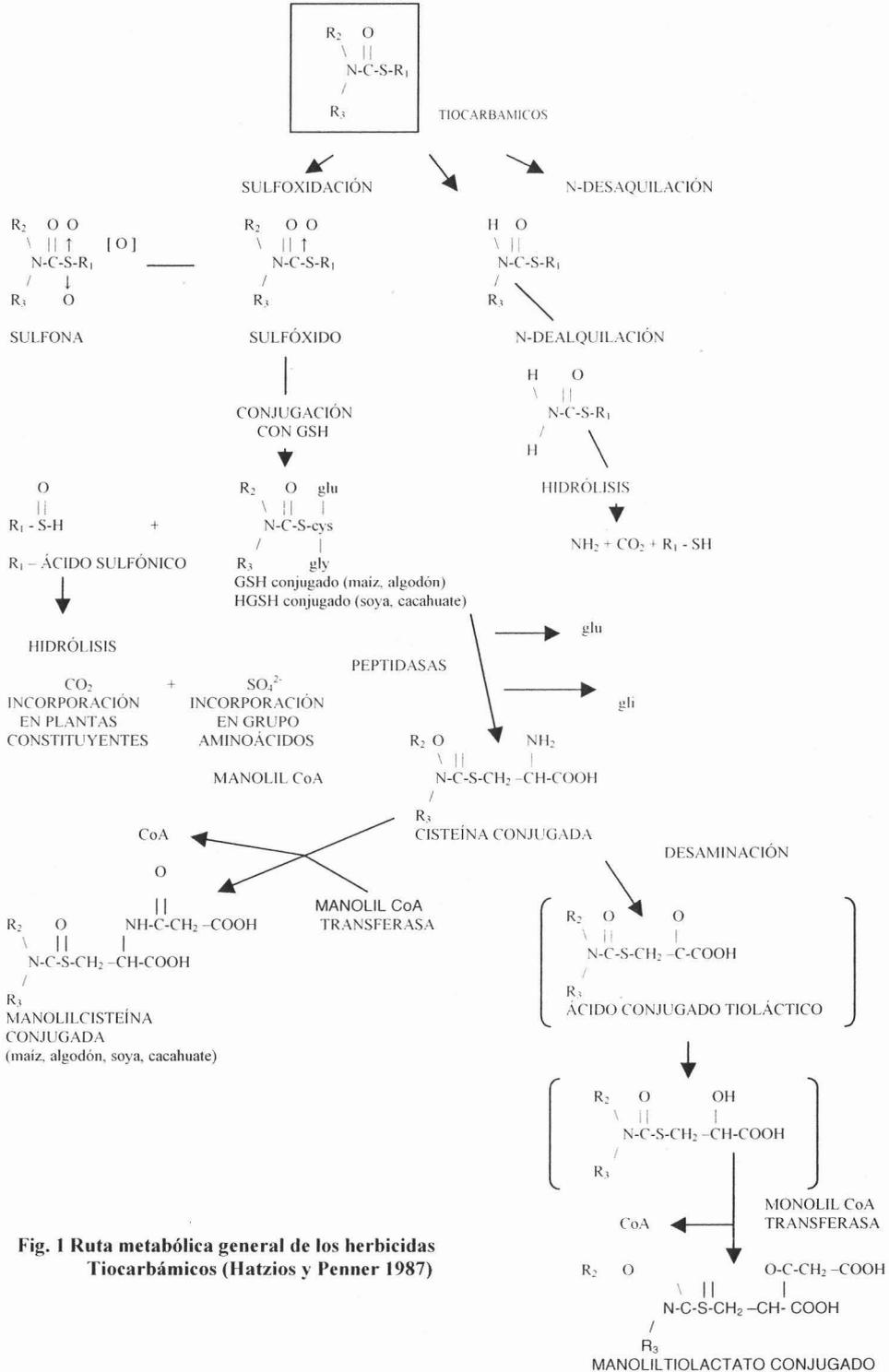


Fig. 1 Ruta metabólica general de los herbicidas Tiocarbámicos (Hatzios y Penner 1987)

3.1. Reacciones de fase I

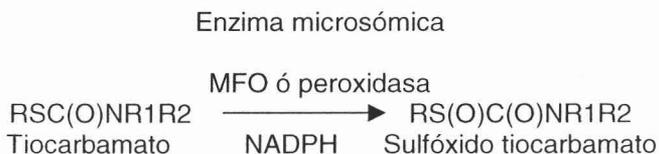
Esta fase incluye reacciones no sintéticas tales como oxidación, reducción e hidrólisis que modifican el compuesto original, dichos procesos son catalizados por oxigenasas de función mixta (MFO), que insertan un átomo de oxígeno a partir de O₂ para producir agua. Este complejo enzimático son las proteínas citocromos P-450 (Cit P-450), dividido en tres componentes principales: flavoproteína (NADPH-citocromo P-450 reductasa), fosfolípido (fosfatidilcolina) y hemoproteína (Cit P-450) cuya función es de oxidasa terminal, son análogos al Cit P-450 de la fracción microsómica de hígado de rata y en plantas se han detectado gran variedad con alta especificidad a los sustratos (Higashi *et al.* 1981, Higashi 1988, Werck-Reichhart *et al.* 2000, Morant *et al.* 2003). La nicotinamida dinucleótido fosforilada reducida (NADPH) es la mejor fuente de electrones para la reducción de la Cit P-450 (Frear *et al.* 1969, Higashi *et al.* 1981, Werck-Reichhart y Feyereisen 2000). Este complejo enzimático (Cip P-450) tiene un papel importante en el metabolismo natural de la planta ya que interviene en la formación de metabolitos secundarios necesarios en los procesos de defensa al elaborar antifedantes, en la reproducción para atraer polinizadores, así como en la calidad del fruto (cáscara, pigmento, tamaño) (Verpoorte y Memelink 2002). Actualmente, la biotecnología para la producción de Cit P-450 es una nueva alternativa para la generación de nutrientes y antioxidantes en las plantas (Morant *et al.* 2003).

3.1.1. Reacciones de oxidación

La reacción de oxidación del herbicida es la más común en las reacciones primarias dando como resultado la desintoxicación o la activación del herbicida.

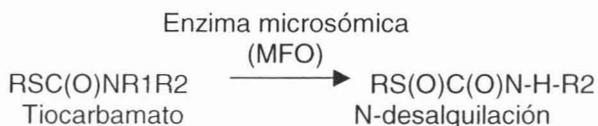
A parte del complejo MFO, también intervienen en este metabolismo oxidante reacciones de peroxidasas y oxigenasas. La oxidación en el átomo de azufre forma sulfóxidos de tiocarbámicos, que son más solubles en agua, reactivos y tóxicos que la molécula original. Los sulfóxidos son capaces de reaccionar con los sulfidrilos y son potentes agentes carbamílicos de los grupos tioles del glutatión (GSH), de la coenzima A (CoASH) y de otros componentes tisulares (Casida *et al.* 1974, Hatzios y Penner 1982, Shimabukuro 1986, Gray 1991, Quistad *et al.* 1994, Staub 1995, Veverka *et al.* 1997, Zimdalh 1999). La S-oxigenación del EPTC en microsomas hepáticos del pez rayado *Morone saxatilis* depende del medio donde se encuentre, en el agua dulce el EPTC es S-oxigenado en un proceso que involucra actividad de monoxigenasas, en contraste en el agua salada el EPTC -S-óxido y EPTC-sulfona son constituidos en un proceso independiente de la actividad monoxigenasas e involucra el papel de cooxidación de ácidos grasos (Cashman y Olsen 1989).

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



3.1.2. N-desalquilación

Es una reacción oxidante frecuente en el metabolismo de los herbicidas, considerada de desactivación sin embargo, en otros herbicidas se producen derivados muy tóxicos, estas reacciones involucran la eliminación de un grupo metilo o alquilo cercano al átomo de nitrógeno, también es catalizada por el complejo MFO formando un producto inestable, el N-hidroximetil (Casida *et al.* 1974, Adams y Lee 1983, Hubell y Casida 1977).



3.1.3. Formación de sulfonas

La transformación de los sulfóxidos tiocarbamatos dan origen a las sulfonas que son muy inestables y de vida corta (Shimabukuro 1986).

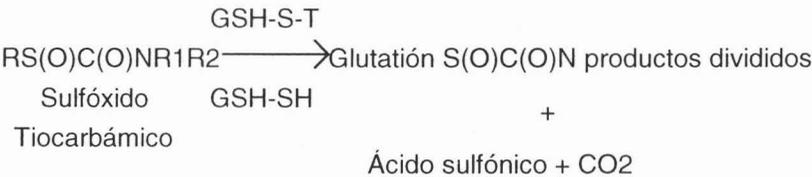
3.2. Reacciones de fase II

Incluye la síntesis o formas conjugadas de metabolitos que son desactivados por la unión de una molécula hidrofílica endógena como glucosa, malonato, glutatión o lignina. La conjugación es el mecanismo de desintoxicación del herbicida,

incrementando su polaridad o la de sus metabolitos lo que hace más difícil su aislamiento y caracterización (Shimabukuro 1986, Sanderman 1988, Coleman *et al.*1997). El sustrato principal es el glutatión (GSH) que está presente en todas las células vegetales y en las animales en su forma reducida, el grupo estructural sulfihidrido (SH) de la cisteína es el más importante en la interacción con los sulfóxidos tiocarbámicos y los xenobióticos (Lamoureux y Rusness 1981, Ezra y Gressel 1982, Shimabukuro 1986, Anders *et al.* 1992).

El GSH, la cisteína y la glicina cuya función es la degradación de los sulfóxidos tiocarbámicos, son auxiliados por el complejo enzimático glutatión-S-transferasas, enzimas citosólicas que catalizan el ataque del glutatión que rompen el enlace carbonilo y transfieren el grupo carbonilo de los sulfóxidos al GSH, dependientes de NADPH. Por lo que en estudios con antidotos para plantas de cosechas se incrementa el GSH para la inactivación de metabolito tóxico (Ezra y Gressel 1982, Huckle y Milburn 1982, Mozer *et al.* 1983, Shimabukuro 1986, Dixon *et al.* 2002).

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



3.3. Reacciones de fase III

Los metabolitos conjugados de la fase II pueden ser polimerizados o incorporados dentro de organelos celulares como las vacuolas, en la pared celular y en otros constituyentes citoplásmaticos, uniéndose a moléculas específicas como ligninas, taninos, pectinas y polisacáridos u otros componentes vegetales (Lamoureux y Rusness 1983, Sanderman 1988, Coleman *et al.* 1997).

4. Metabolismo del EPTC

El EPTC es rápidamente degradado en el suelo por los microorganismos en tiol, residuos amino y CO₂. El EPTC es rápida y eficientemente degradado a sulfóxido y su sulfona o puede ser hidrolizado en dos grupos propilo: 1-hidroxipropil que es inestable y se transforma en N-dipropil-EPTC y propionaldehído. El N-dipropil-EPTC es subsecuentemente hidrolizado a la forma ácida S-etil carbonico formandose probablemente CO₂ y metanetiol (figura 2) (O'keefe *et al.* 1987).

La biotransformación del EPTC se ha mostrado con *Rhodococcus sp.* cepas TE1 y N186/21 con el plásmido pBS303, que cuentan con los genes *eptA* y *thcB* que codifican para las enzimas de las reacciones metabólicas N-desalquilación y de las citocromos P-450 (Shao y Behki 1993, Nagy *et al.* 1995).

El EPTC mezclado con sales sodicas provoca disminución en la flora microbiana del suelo (Stiles *et al.* 2000).

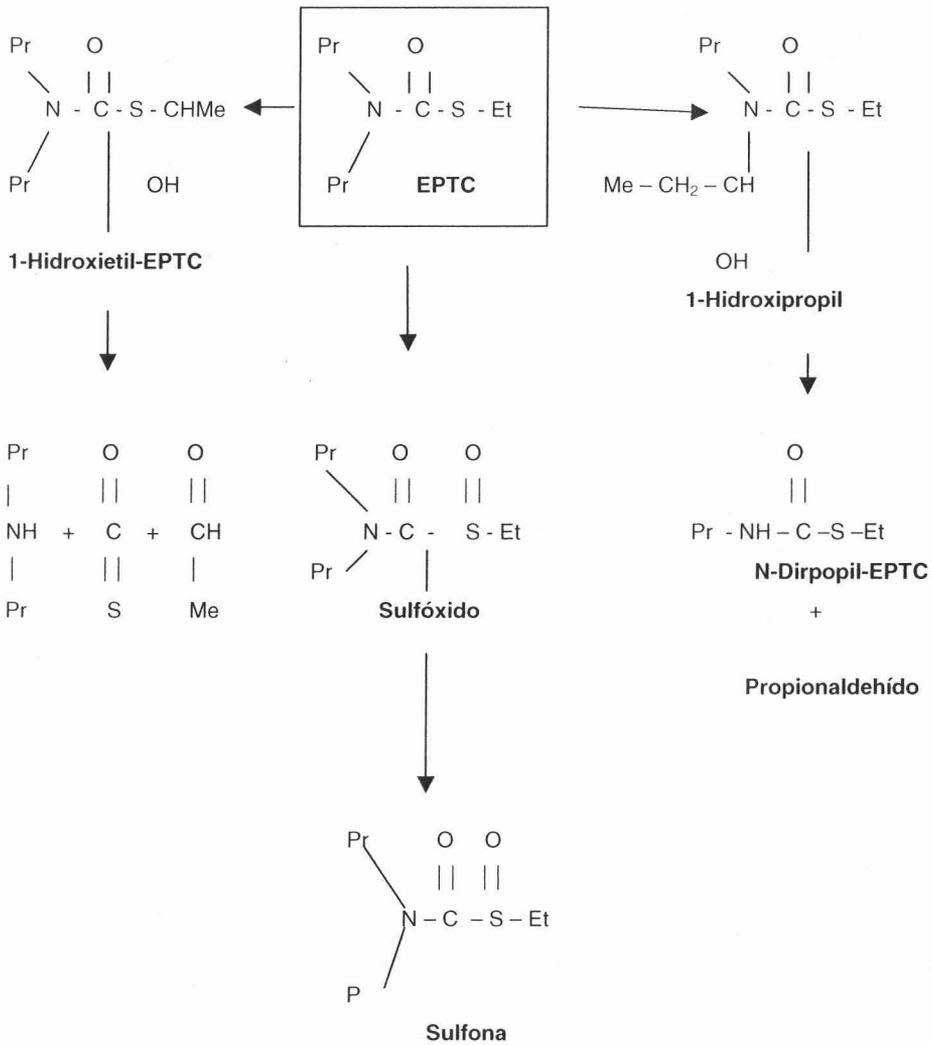


Figura 2. Degradación del EPTC por el suelo y microorganismos (Roberts 1998)

4.1. En plantas

El primer paso en el metabolismo del EPTC en plantas superiores (como el maíz) es la oxidación a sulfóxido o sulfona (Carringer *et al.* 1978). El sulfóxido del EPTC puede reaccionar enzimáticamente con el glutatión y formar su conjugado. Estudios *in vivo* han mostrado que el glutatión y la cisteína se conjugan en el maíz, produciéndose N-malonilcisteína conjugada (Lamoureux y Rusness 1983)

Los metabolitos secundarios, malonilcisteína y ácido tiólico del EPTC, son detectados en algodón y maíz, en la figura 3 se muestra la ruta del metabolismo del EPTC en estas plantas (Roberts 1998).

El sulfóxido del EPTC inhibe la enzima aldehído deshidrogenasa (ADH) de la mitocondria (responsable de la conversión de acetaldehído a acetato) provocando la fitotoxicidad (Shimabukuro *et al.* 1982, Shimabukuro 1986, Staub *et al.* 1999).

4.2. En animales

Con la fracción microsómica S9 de ratón macho albino se han mostrado las tres fases del metabolismo del EPTC, (1) la oxidación del átomo de azufre, (2) la hidroxilación del grupo etilo y (3) la hidroxilación del grupo propilo, siendo el principal metabolito el sulfóxido EPTC (Figura 4) (Hoogenboom 1995, Roberts 1998).

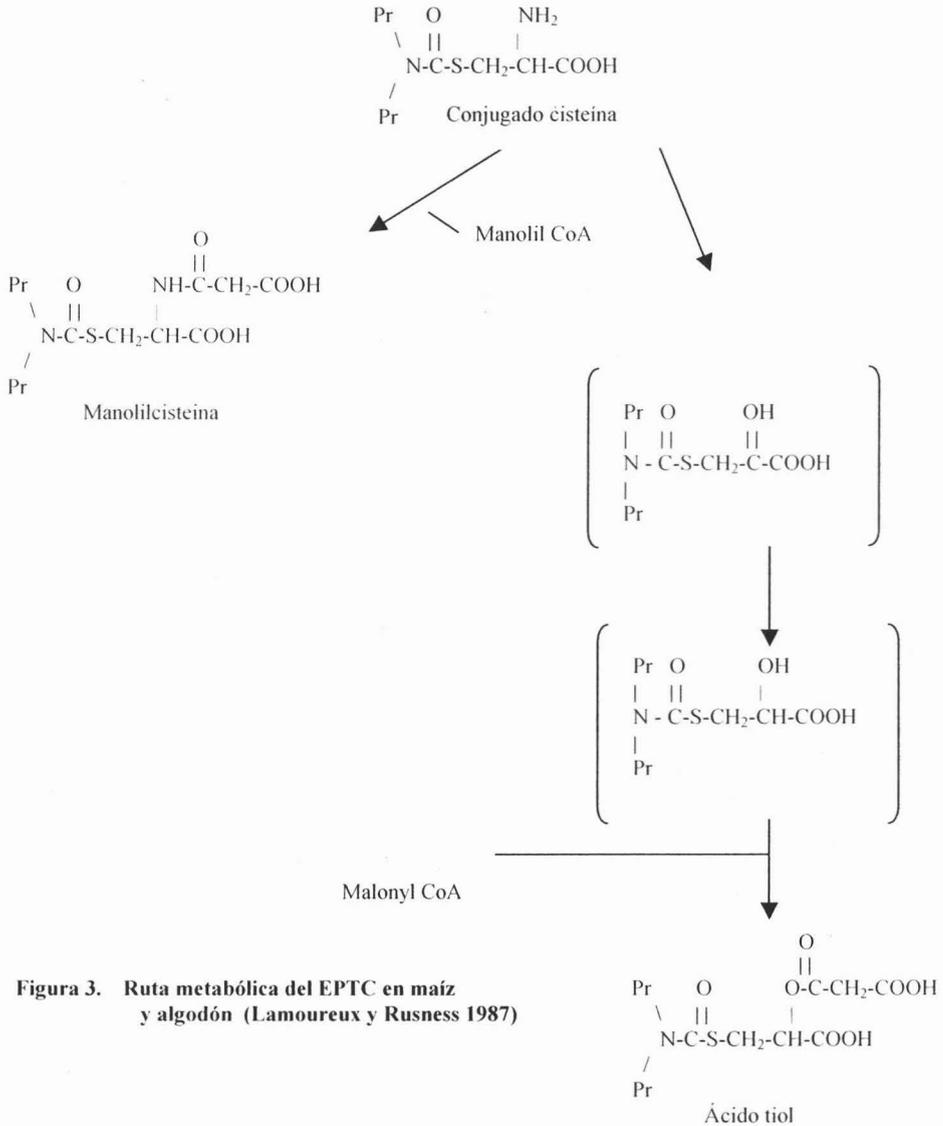
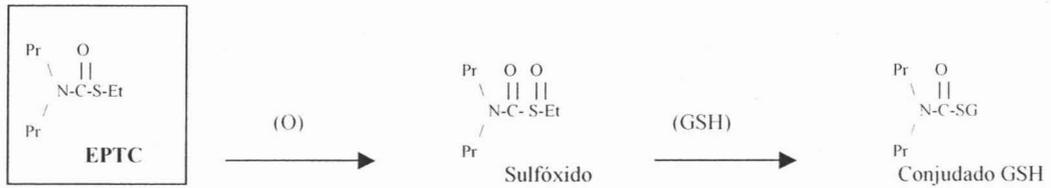


Figura 3. Ruta metabólica del EPTC en maíz y algodón (Lamoureux y Rusness 1987)

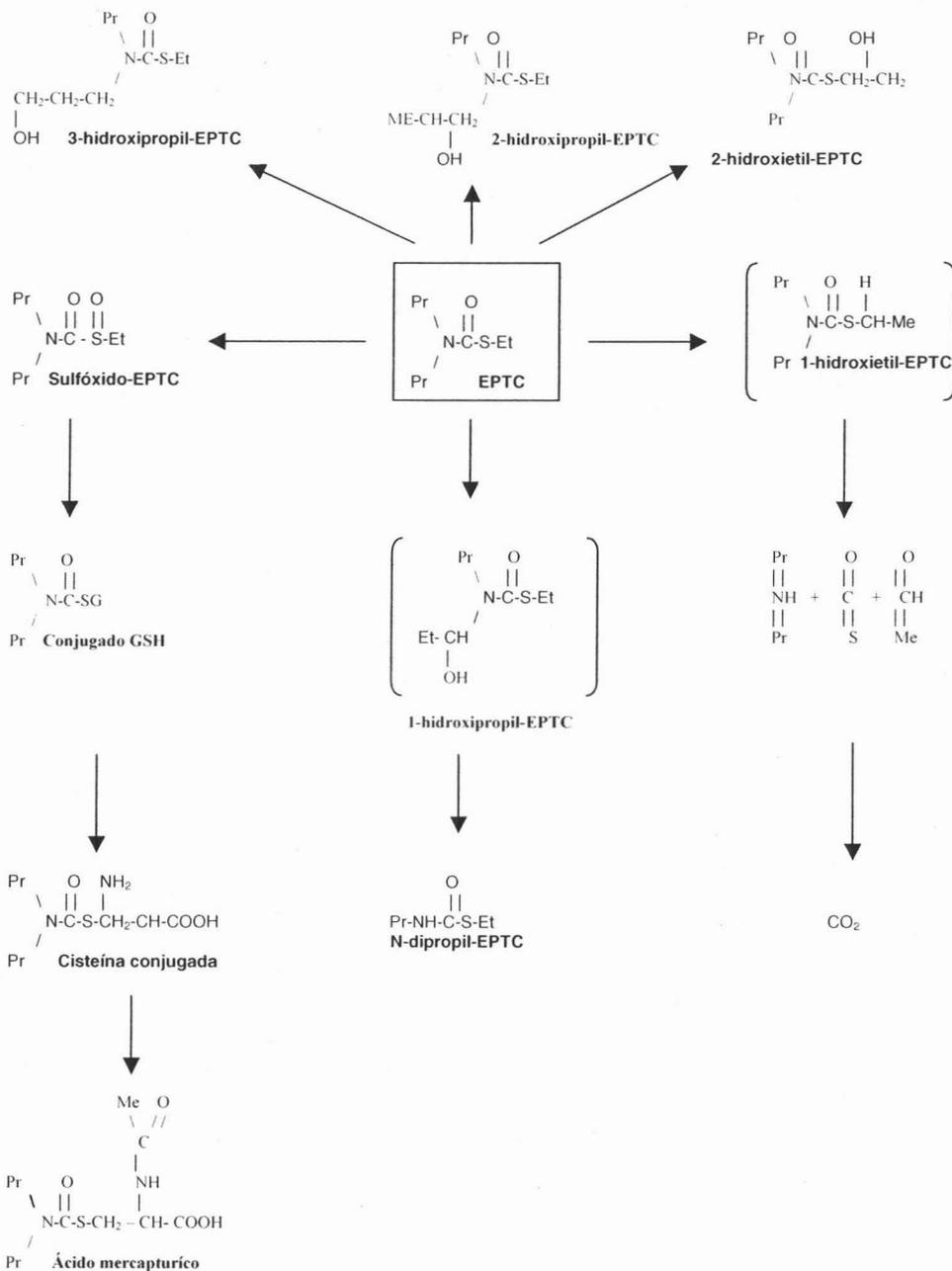


Fig. 4. Ruta metabólica del EPTC en sistemas microsómicos NADH de hígado de rata y ratón (Hoogenboom 1995)

5. Sistemas de prueba

Son varias las especies que se emplean como biomonitores de genotóxicos químicos: *Tradescandia paludosa*, *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Crepis capillaris*, *Lycopersicon sculentum*, de las cuales los más utilizados son *Allium cepa* y *Vicia faba* (Grant 1994). Las células somáticas de la punta de raíz de *Vicia faba* son comúnmente empleadas para detectar el daño cromosómico por agentes químicos ambientales (Kihlman 1971).

Con el fin de detectar los efectos genotóxicos provocados por la gran variedad de mutágenos tanto físicos como químicos, se han desarrollado diversos sistemas de evaluación del daño genético. Diversos de ellos han sido empleados para evaluar el daño inducido al ADN como son: las aberraciones cromosómicas, aductos, intercambios de cromátidas hermanas (ICH), micronúcleos y recientemente la electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa (Singh *et al.* 1988, Tice *et al.* 2000).

La electroforesis unicelular alcalina se ha adaptado en genética toxicológica, en los estudios de biomonitoreo humano para detectar directamente el daño del ADN provocado por diversos agentes físicos y químicos además, ofrece un método adecuado para detectar mutágenos y carcinógenos ambientales en linfocitos humanos (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000)

6. Electroforesis unicelular alcalina

Se han desarrollado diversas pruebas para detectar daño al ADN, desde las bioquímicas, espectrofotométricas y las basadas en sedimentación de ADN dañado, pero todas tienen el problema de alto costo, dependiendo de el grado de sensibilidad y

del tiempo que se debe de invertir (Prieto y Llopiz 1999). La electroforesis unicelular alcalina es una prueba rápida y de bajo costo y con una elevada sensibilidad muy grande lo que permite detectar rupturas de cadena simple y sitios álcali lábiles. Se utiliza para monitoreo ambiental y análisis de sensibilidad a radiaciones (Prieto y Llopiz 1999, Valverde *et al.* 1999). La ecotoxicología ha llevado a cabo con esta técnica experimentos con células de diferentes organismos como, plantas, anélidos, moluscos, peces, anfibios y mamíferos (Cotelle y Féraud 1999).

La técnica de la electroforesis unicelular o ensayo cometa ha resultado una herramienta útil en la determinación de rupturas sencillas y en los sitios lábiles en el ADN de células de eucariontos. Las modificaciones con relación al pH de las soluciones de lisis y electroforesis que Singh *et al.* (1988) hicieron a la técnica desarrollada por Rydberg y Johanson (1978), optimizaron la desnaturalización del ADN y la migración de los fragmentos, aumentando la sensibilidad en la detección del daño al material genético.

El daño al ADN es considerado como uno de los principales eventos de iniciación para enfermedades como el cáncer, que pueden deberse a factores químicos, físicos y biológicos. Las modificaciones en la estructura química del ADN causantes de daño pueden ser cambios en el sitio de una base o pérdida de éstas (sitios apurínicos y apirimídicos), el entrecruzamiento de cadenas de ADN ó bien rompimientos de una o dos hebras. Sin embargo, las células tienen la capacidad de reparación, que depende de la estructura, nivel de daño y la frecuencia de daños en el genoma (Moustacchi 2000).

II JUSTIFICACIÓN

El herbicida tiocarbámico EPTC ó eptam es considerado medianamente tóxico, debido a las reacciones agudas que genera como: hipersalivación, lagrimeo, hipotermia, depresión, fibrilación muscular, dilatación vascular en el cerebro. Su efecto inmediato es sobre el sistema nervioso al inhibir reversiblemente a la acetilcolinesterasa (AChE), (Akulov *et al.* 1972, IARC 1976, Ecobichon 1996, 2001). Así mismo, no solo la molécula original del EPTC ocasiona efectos adversos en la salud sino también sus derivados metabólicos, que son almacenados en diferentes estructuras vegetales después de su biotransformación, resultan un riesgo adicional, ya que al ser ingeridos por los animales o por el hombre pueden causarles alteraciones en el funcionamiento de diferentes órganos como pulmones y cerebro (Ecobichon 2001).

En México, el EPTC se aplica en los cultivos de cereales, frutas y verduras, plantas que tienen un papel importante en la dieta del hombre.

La apertura de los aranceles por los tratados de comercio y demanda de uso de estos agentes químicos en los campos agrícolas mexicanos crea la necesidad de regular su uso.

Tomando en cuenta el riesgo que representa para la salud humana y animal ya sea de manera directa o indirecta, en este trabajo se investigó el papel del metabolismo de la raíz de *Vicia faba* en la biotransformación del plaguicida en un promutágeno en linfocitos humanos de sangre periférica, usando como sistema de evaluación genotóxica y/o daño sobre el ADN al ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina, que es un método adecuado para detectar agentes genotóxicos y/o carcinógenos ambientales (Tice *et al.* 2000).

III OBJETIVOS

1. Evaluar el daño genotóxico en forma directa en los linfocitos periféricos humanos *in vitro* causado por la exposición al herbicida tiocarbámico EPTC a diferentes concentraciones mediante el ensayo de electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa.
2. Determinar que el herbicida EPTC es un promutágeno activado a través del metabolismo vegetal de las raíces *in vivo* de *Vicia faba*, utilizando como prueba del efecto genotóxico el ensayo cometa en linfocitos humanos de sangre periférica.
3. Analizar la acción citotóxica del herbicida EPTC en los linfocitos *in vivo* con y sin activación metabólica.

IV HIPÓTESIS

1. Si el herbicida EPTC ha mostrado ser un promutágeno activado por la fracción S10 de las raíces de *Vicia faba*, al provocar intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos en cultivo, entonces este mismo efecto se evidenciará a través de la inducción de rompimientos del DNA en linfocitos humanos de sangre periférica. A medida que aumenta la concentración del herbicida EPTC, se incrementará la frecuencia de cometas y la longitud de sus caudas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Propiedades fisicoquímicas del herbicida EPTC

Compuesto 95% puro con fórmula molecular $C_9H_{19}NOS$, peso molecular de 189.3 g/mol, punto de fusión 127 °C/20mmHg, punto de congelación inferior a los -30 °C, presión de vapor 0.01 mPa (25 °C), densidad 0.9546 (30 °C), solubilidad en agua 375 mg/L (25 °C), miscible en disolventes orgánicos e hidrolizado en soluciones de ácido fuerte (pH 1) a un derivado inactivo; líquido aromático de color amarillo cuyo nombre común es EPTC ó eptam y el establecido por las normas de la IUPAC es S-etildipropiltiocarbamato y con CAS RN [754-94-4] (Tomlim 1994).

2. Aplicaciones

Su modo de acción es sistémico selectivo absorbido por la raíz y el coleótilo de las plantas, con translocación acropétalo por tallos y hojas inhibiendo el crecimiento de tejido meristemático. Su uso puede ser anual o perenne especialmente en la maleza, como en *Cyperus* spp, hierbas de hojas anchas en los cultivos de papas, frijol, chícharo, leguminosas, caña de azúcar, alfalfa, algodón, maíz, lino, fresa, girasol, cítricos, almendras, plantas ornamentales, nuez, piñas y otros. De aplicación pre-emergente con incorporación en el suelo, compatible con otros pesticidas como el diclormid, se absorbe en los suelos secos y se lixivia por medio de la lluvia. Se degrada por la acción de microorganismos (Tomlim 1994).

3. Toxicología en mamíferos

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO) clasifica al eptam ó EPTC como medianamente tóxico (en el nivel II) y la Agencia de Protección al Ambiente (EPA) en el nivel III; la sintomatología presentada en los casos registrados más frecuentemente suelen ser vómito, diarrea, debilidad muscular, irritación moderada de ojos, piel y el tracto respiratorio, salivación, bradicardia, hiperreflexia, taquicardia, relajación de esfínteres, lagrimeo, rinorrea, entre otros. La LD₅₀ oral en ratas es > 200 mg/kg.; cutánea en ratas >2000 mg/kg, en conejos 1000 mg/kg. La LC₅₀ (4 h) por inhalación en ratas machos es de 4.3 mg/l y en ratas hembras es de 3.8 mg/l (Tomlim 1994).

La LC₅₀ de el EPTC en la codorniz blanca es de 20,000 mg/kg por siete días, en peces trucha arcoiris de 19 mg/l y en el pez luna de 14 mg/l ambos peces por 96 h (Tomlim 1994).

4. Electroforesis unicelular alcalina

El ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina es un método adecuado para detectar agentes genotóxicos y/o carcinógenos ambientales. Este ensayo utiliza suspensiones celulares mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión para formar un gel que tenga soporte sobre un portaobjetos con una capa de agarosa de fusión

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

normal y se lisan en una solución con alta concentración de sales y detergentes para eliminar la membrana celular, el citosol y el citoesqueleto. Posteriormente, se colocan en una cámara de electroforesis con amortiguador alcalino para permitir el desenrollamiento del ADN, se aplica una corriente eléctrica que induce la migración de los fragmentos dañados con dirección al ánodo y finalmente se neutralizan los geles, que pueden ser conservados utilizando metanol absoluto frío para su posterior análisis (Woods *et al.* 1999). El gel es teñido con un colorante fluorescente como el bromuro de etidio (Östling y Johanson 1984, Östling *et al.* 1987, Singh *et al.* 1988, Anderson *et al.* 1998), cuando el ADN tiene rupturas, los fragmentos producidos al desplazarse forman una imagen similar a un “cometa” con cabeza y cauda, la cabeza es el núcleo de la célula y la cauda los fragmentos de DNA dañado (imagen 1, A); si las células no presentan daño tienen núcleos intactos, sin cometas (imagen 1, B) (Singh *et al.* 1994, Ashby *et al.* 1995). Además de la longitud de la cauda, existe el parámetro denominado “momento de la cauda” referido como cantidad relativa del ADN y se calcula obteniendo el producto de su longitud y la intensidad de la misma (Hellman *et al.* 1995). El tamaño de la cauda (migración del material genético) se relaciona con la cantidad de daño estableciéndose una relación dosis-efecto (Olive *et al.* 1990). Este ensayo evalúa la diferente sensibilidad de las poblaciones celulares, inducción de la apoptosis, resistencia y cinética de reparación del ADN (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

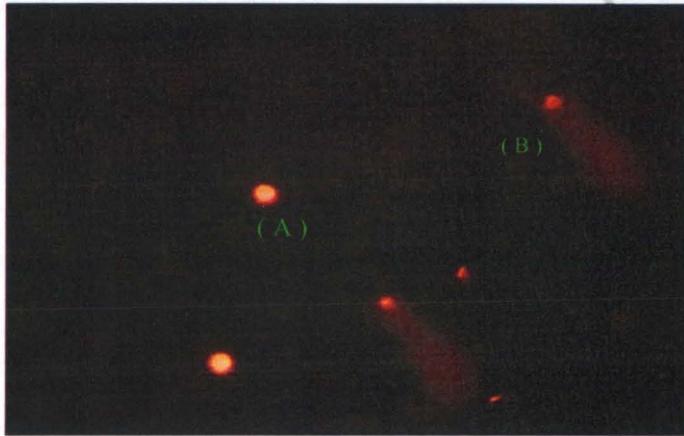


Imagen 1. Núcleos de linfocitos humanos: células sin daño (A), células con daño (B) al ADN (cometas).

5. Aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica

Se tomó una muestra de sangre periférica de un donador sano con una jeringa heparinizada, la cual se centrifugó a 2500 rpm por 30 minutos en dos tubos de centrifuga, la fase intermedia blanca correspondiente a los linfocitos fue aislada y transferida a tubos de centrifuga estériles con 3 ml de solución de Hank's (Gibco); posteriormente, se pasaron con un pipeta Pasteur estéril a otros tubos con 5 ml a un gradiente de Ficol (Gibcol, se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos.

Se transfirió la fase blanca a tubos estériles con 5 mL de solución salina de Hank a un pH de 7.5 (Gibco), el botón celular se mezcló y se lavó dos veces con la misma solución y centrifugandose dos veces a 1200 rpm durante 10 minutos.

Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se agregaron 5 mL de medio RPMI 1640 (Gibco) adicionando 5 μ l de antibiótico penicilina-estreptomina (Gibco) (1%) e incubaron a 37 °C.

5.1. Cuantificación de linfocitos humanos

Se tomaron 10 μ l del botón celular y se colocaron en la cámara de Neubauer. Se contó el total de células de los cuatro cuadrantes principales para determinar la cantidad de linfocitos por mL de medio RPMI 1640 (Gibco) para obtener 250,000 linfocitos por tratamiento, aplicando la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ linfocitos/mL} = \frac{\text{(total de células)} (2) (10,000)}{4}$$

4

6. Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó antes e inmediatamente después de los tratamientos con y sin activación metabólica del plaguicida, 10 μ l de células en suspensión fueron mezcladas con 10 μ l de azul tripano (0.4 % en PBS) (método de exclusión). el porcentaje de viabilidad linfocitaria se determinó en 100 células continuas.

7. Tratamientos directos con el herbicida EPTC a linfocitos humanos

Se coincubaron 25×10^4 linfocitos (con una viabilidad mayor al 95%) con 1.5, 2.5, 5, 8 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de herbicida (disuelta en agua desionizada), a un volumen final de 500 μl , el testigo negativo fue el medio RPMI 1640 y el positivo, la mitomicina C (MMC 400 ng/ml) por 2 horas a 37 °C.

8. Activación metabólica *in vivo*

8.1. Obtención de los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con EPTC y etanol y su aplicación a linfocitos humanos

Las semillas de *Vicia faba* (var. minor) se sometieron a imbibición por 24 horas, para después colocarlas entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave para su germinación en oscuridad, cuando las raíces alcanzaron una longitud de 4 a 6 cm, 40 plántulas por tratamiento se introdujeron en las siguientes concentraciones: 100, 200, 300, 400 y 500 mg/l de EPTC durante 4 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Se empleó como testigo positivo al etanol (EtOH, 98% de pureza, Sigma) 3600 (mg/l), que ha demostrado ser un promutágeno en esta planta, el cual verifica la capacidad metabólica de *Vicia faba*, ya que logra incrementar significativamente la frecuencia de ICH en células de criceto dorado tanto *in vivo* como *in vitro* (Takehisa *et al.* 1982) y en linfocitos humanos en cultivo (Obe *et al.* 1986, Calderón-Segura 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999). El testigo negativo fue solo agua desionizada, ambos testigos estuvieron bajo las mismas condiciones

experimentales. Transcurrido el tiempo en oscuridad, las plántulas, se lavaron tres veces con agua de la llave y con agua desionizada posteriormente, se cortaron 2 cm de la raíz principal, se maceraron y homogeneizaron sin dejar fragmentos fibrosos, en una solución amortiguadora de fosfatos de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$) 0.1 M a $\text{pH}=7.4$, a temperatura de $4\text{ }^\circ\text{C}$. La relación de volumen de la solución amortiguadora (ml) con el peso fresco de los cortes de raíz (g) fue de 1:1 (Takehisa *et al.* 1982).

El homogeneizado se ultracentrifugó por 30 min a 11,500 rpm a $4\text{ }^\circ\text{C}$. El sobrenadante con los metabolitos resultantes del EPTC, del etanol y de la fracción enzimática S10 (testigo negativo), se esterilizaron a través de un filtro miliporo de $0.45\text{ }\mu\text{m}$ e inmediatamente después, los filtrados se utilizaron para los tratamientos y el ensayo cometa (Takehisa y Kanaya 1983). Se añadieron $20\text{ }\mu\text{l}$ de los extractos resultantes a los linfocitos humanos aislados.

Los testigos negativos fueron:

- a) 25×10^4 de linfocitos + RPMI 1640
- b) 25×10^4 de linfocitos + RPMI 1640 + $20\text{ }\mu\text{l}$ de extractos de las raíces sumergidas en agua desionizada (fracción microsómica S10)

El testigo positivo fue:

- A) 25×10^4 de linfocitos + RPMI 1640 + $20\text{ }\mu\text{l}$ de extractos de las raíces tratadas con etanol (3600 mg/l).

El volumen final de los lotes experimentales fue de $500\text{ }\mu\text{l}$, coincubándolos por 2 h a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Transcurrido el tiempo, se continuó la técnica del ensayo cometa en los tratamientos directos, incluyendo la evaluación del daño del ADN.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9. Elaboración de geles con monocapa de agarosa más células con tratamiento directo y previa activación metabólica

Los geles para la electroforesis unicelular alcalina, fueron preparados colocando una monocapa uniforme de agarosa de fusión normal (NMA 1% Gibco) en PBS (amortiguador de fosfatos con pH de 7.5 Gibco) dejando solidificar a temperatura ambiente.

Después del tratamiento, todos los lotes experimentales se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min, se eliminaron 450 µl del sobrenadante, se lavaron 3 veces con medio RPMI 1640 (Gibco) a 37 °C y se agregaron 50 µl del medio RPMI, el botón celular se mezcló, se tomaron 10 µl que se transfirieron a otro microtubo para analizar la viabilidad linfocitaria que fue de 95%. Se tomo una mezcla de células (5×10^5) de cada concentración del extracto y de los testigos y se transfirió a nuevos microtubos añadiendo 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA 0.5% Gibco) a 37 °C. Posteriormente, a los geles conteniendo las células se les colocaron los cubreobjetos y se dejaron solidificar a 4 °C por 5 min, se quitó el cubreobjeto por deslizamiento y se adicionó 75 µl de LMPA (0.5%) manteniendo la preparación a 4 °C por 5 minutos (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

9.1. Lisis celular

Las laminillas se colocaron en una solución de lisis: 2.5 M de cloruro de sodio (NaCl, Sigma), 100 mM de ácido etilendiamintetracético con dehidrato de sodio (Na₂ EDTA. 2H₂O, Sigma), 10 mM de hidroximetil-amino-metano (Trisma base Sigma) y 200 mM de hidróxido de sodio (NaOH, Sigma) disueltos en 89 ml de agua desionizada ajustando a pH 10.0 y aforando a 100 mL con 1% de Tritón-X (Sigma) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) la solución fue colocada en vasos de koplín a 4 °C por 1 hora (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

9.2. Electroforesis unicelular alcalina

Los geles se colocaron en la acomodaron de electroforesis con amortiguador alcalino recién preparado (300 mM NaOH/1 mM EDTA a pH 13) durante 20 min para desenrollar el ADN, a temperatura ambiente, el corrimiento electroforético se llevo a cabo por 20 min a 25 volts y 300 mA (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

Transcurrido el tiempo de corrimiento los geles fueron lavados tres veces durante 5 min con un amortiguador neutralizante (Trisma base 0.4 mM, pH=7.5) (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

A cada gel se le agregó 50 µL de bromuro de etidio (20 µg/ml) en oscuridad, para teñir el ADN y visualizar el daño (rupturas al ADN) (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000). Todos los pasos fueron llevados a cabo en luz amarilla.

10. Determinación del daño del ADN en linfocitos humanos

Para cada concentración del plaguicida con y sin activación metabólica se analizaron 25 células en cada laminilla, se determinó en 50 células consecutivas la frecuencia de células con y sin daño al ADN (con y sin cometas), así como el diámetro del núcleo, la longitud de la cauda y los niveles de daño sobre al ADN dentro de cinco categorías: nivel 0= célula sin daño (sin cometa); el nivel 1= 5-25 μm ; nivel 2= 25-50 μm ; nivel 3= 51-100 y nivel 4 \geq 101 μm , las observaciones se realizaron en el microscopio de fluorescencia, con el objetivo micrométrico 40X, con filtros de excitación de 515-560 nm y de barrera de 590 nm.

Los geles fueron reetiquetados con una clave desconocida por el lector para evitar prejuicios.

11. Análisis estadístico

En cada experimento se realizaron tres repeticiones cuyos valores se compararon entre sí, mediante una prueba "t" de student; posteriormente se aplicaron análisis de varianza (ANOVA) y de comparación múltiple Newman-Keuls.

VI. RESULTADOS

1. Tratamientos directos con EPTC a los linfocitos humanos

Los tratamientos directos con 1.5, 2.5, 5, 8 y 10 µg/ml del herbicida EPTC, se adicionaron a los núcleos de los linfocitos humanos por 2 h, mostraron resultados negativos en la inducción de daño al ADN y la longitud de la cauda ($4 \pm 2.6 \mu\text{m}$) la frecuencia de células con daño al ADN (con cometas) correspondió a 2 ± 2.0 a 8 ± 1.5 %, en la categoría 1, estando dentro de los intervalos reportados con respecto a los valores del testigo negativo (RPMI1640), (Cuadro II y gráficas 1, 3 y 5).

La mitomicina C (MMC, 400 ng/ml) aumentó significativamente la longitud de la cauda del cometa a $52 \pm 1.02 \mu\text{m}$ y las células con daño al ADN a 22 ± 6 %, presento mayor proporción de cometas en los niveles 1 a 3, al ser comparados con los valores del testigo negativo (Cuadro II y gráficas 1, 3 y 5). La MMC no alteró la viabilidad de los linfocitos periféricos humanos *in vitro* (Cuadro II y gráficas 1, 3 y 5).

2. Activación metabólica *in vivo* por la raíz de *Vicia faba*

2.1 Tratamiento con los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con EPTC y etanol a los linfocitos humanos *in vitro*

Al coincubar los linfocitos humanos con los extractos de las raíces de *Vicia faba* (sistema de activación metabólica *in vivo*) tratadas con 50, 100, 200, 400 y 500 µg/l) se incrementaron de 32 ± 2.0 a $94 \pm 3.5 \mu\text{m}$ la longitud de la cauda, de 21 ± 3.5 % a 82 ± 1.7 % la frecuencia de células con daño al ADN (con cometas), con elevada

proporción de cometas en las categorías 1 a 3, obteniendo una relación de concentración-respuesta (Cuadro II y gráficas 2, 4 y 6).

Con el etanol previamente activado por la raíz de *Vicia faba*, se indujo 194 ± 3.0 μm la longitud de la cauda y 78 ± 2.4 % de células con daño del ADN, con mayor proporción de cometas en los niveles 1-4 al ser comparados con fracción S10 de la raíz de *Vicia faba* sin tratamiento (Cuadro II y gráficas 2, 4 y 6). La fracción S10 no produjo efectos genotóxico y citotóxico en los linfocitos humanos al ser comparada con los valores del testigo negativo (Cuadro II y gráficas 2, 4 y 6).

3. Evaluación del efecto citotóxico del EPTC y del etanol con y sin activación metabólica por la raíz de *Vicia faba*

No se observaron diferencias significativas en los valores del porcentaje de la viabilidad de los linfocitos tratados con EPTC y etanol con y sin activación metabólica *in vivo* con relación a los valores de la S10 y del testigo negativo (RPMI 1640) (Cuadro II y gráficas 7 y 8).

VII DISCUSIÓN

Los plaguicidas son un grupo de agentes químicos diversos usados como fungicidas, nematocidas, acaricidas, insecticidas y herbicidas. México es uno de los países en América Latina que en los últimos años ha incrementado el uso de estas sustancias debido a la necesidad de aumentar su producción agrícola. Sin embargo, muchos de estos agentes químicos contaminan el suelo, agua, aire y afectan directamente a los organismos, incluyendo los humanos.

En este trabajo se evaluó la capacidad metabólica de la raíz de *Vicia faba* para bioactivar el herbicida EPTC como promutágeno con inducción de daño al ADN y efecto citotóxico en linfocitos humanos de sangre periférica a través de la electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa). Este ensayo ha mostrado ser una prueba para medir la relación entre daño al ADN y la exposición a genotóxicos ambientales en animales y humanos, además esta técnica ofrece considerables ventajas sobre otros métodos citogenéticos como son las aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromátidas hermanas y los micronúcleos, debido a que no necesita de células en cultivo (Tice *et al.* 2000).

Al aplicar directamente el herbicida EPTC a los linfocitos humanos se observó que no es un agente genotóxico directo en células humanas ya que los resultados mostraron que no produce daño al ADN. Esto concuerda con resultados obtenidos con diferentes plaguicidas carbámicos (Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999, Luna-Martín del Campo 2000).

Cuando los linfocitos humanos fueron coincubados por 2 horas con 20 μ l de los extractos de la raíz de *Vicia faba* tratadas con 50, 100, 200, 400 y 500 mg /l de EPTC, se incrementó significativamente la longitud de la cauda del cometa, el porcentaje de células con daño al ADN y el grado o nivel de daño en comparación con los valores de la fracción S10 con una clara relación de concentración-respuesta. Este efecto muestra que el EPTC necesita del metabolismo de *Vicia faba* para producir rompimientos de la hebra de ADN (Luna-Martín del Campo 2000).

La acción genotóxica del EPTC en los linfocitos humanos es similar a los resultados obtenidos con los plaguicidas tiocarbámicos molinate y butilate después de la activación metabólica *in vivo* por la raíz de *Vicia faba* induciendo intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos periféricos *in vitro* (Calderón-Segura 1998, Calderón-Segura *et al.* 1999). De igual manera, los herbicidas ametrina y metribuzina previa activación metabólica *in vivo* e *in vitro* por la raíz de *Vicia faba* en linfocitos humanos en cultivo indujeron intercambio de cromátidas hermanas (Luna-Martín Del Campo 2000, Flores-Maya *et al.* 2005) e incrementaron significativamente la frecuencia de células con daño mediante el ensayo cometa en linfocitos humanos (López-González 2004).

El EPTC ejerce su mayor efecto herbicida después de la conversión metabólica a su derivado sulfóxido o sulfona (Owen 1991, Katagi y Mikami 2000). Este proceso puede ser catalizado por el grupo de monoxigenasas dependientes del sistema citocromos P-450 (Cit P-450) conocidas como oxidasas de función múltiple (OFM) ó probablemente a las peroxidasas que se encuentran en la raíz de *Vicia faba* (Blée 1998, Barret y Harwood 1998). La sulfoxidación del EPTC representa el principal mecanismo para generar intermediarios reactivos electrofílicos, los sulfóxidos que

quizás sean los agentes alquilantes son por lo tanto, los candidatos para interactuar potencialmente con el ADN (Casida *et al.* 1975). Otra manera potencial de daño de estos productos metabólicos es la posibilidad de unirse covalentemente a biomoléculas que contienen grupos sulfhidrilos o tioles que pueden interferir con el metabolismo de la coenzima A (CoA) u otros procesos bioquímicos. Su conjugación con el glutatión (GSH) es un ejemplo de su reactividad química al interactuar con el sulfhidrilo, los conjugados CoA-sulfóxidos, pueden obstaculizar competitivamente otras reacciones que utilizan la acetil CoA u otros intermediarios CoA (Lay y Casida 1976, Carringer *et al.* 1978, Hoogenbom 1995). También estos metabolitos pueden inhibir la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) en mitocondrias de hígado de ratones (Quistad *et al.* 1994). Se ha evidenciado que el sulfóxido-EPTC inhibe la elongación de los ácidos grasos en las plantas (Baldwin *et al.* 2003). Recientemente, se ha demostrado que este metabolito produce aductos en hepatocitos de rata (Zimmermann *et al.* 2004). Sin embargo, Coballase-Urrutia (1997) obtiene resultados negativos con los herbicidas EPTC y Asulam con y sin activación metabólica vegetal de *Nicotiana tabacum* y con la fracción S9 de hígado de rata coincubados con *Salmonella typhimurium* cepas TA98 y TA100. Estos datos no coinciden con lo obtenido en este estudio, probablemente esto puede deberse a las diferencias en el metabolismo que realizan las enzimas de la fracción S9 y las de *N. tabacum*, mientras que las enzimas de *Vicia faba*, han mostrado activar diferentes plaguicidas carbámicos en metabolitos capaces de interactuar con el ADN y producir genotoxicidad en células humanas (Calderón-Segura *et al.* 1999, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Luna-Martín del Campo 2000, López-González 2004, Flores-Maya *et al.* 2005).

La acción genotóxica directa de la mitomicina C (MMC) ha sido evaluada en diferentes sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro* empleando distintas pruebas de evaluación de daño al ADN, indicando que es un agente inductor de aberraciones cromosómicas, ICH, micronúcleos, aductos y migración del ADN por electroforesis unicelular alcalina, siendo conocida su acción intercalante ADN-ADN. Por tal motivo, en el presente trabajo se utilizó la MMC (400 ng/ml) como testigo positivo que aumentó significativamente la longitud de la cauda del cometa y la frecuencia de células con daño al ADN.

Para comprobar la capacidad metabólica del haba, se utilizó como testigo positivo al etanol (3600 µg/l), que incrementó significativamente la longitud de la cauda del cometa (migración del ADN) la proporción de cometas en los niveles de daño al ADN 2 y 3, al ser comparados con la fracción S10 de la raíz de *Vicia faba* (sin tratamiento) (Cuadro II y Gráficas 2,4 y 6). La activación metabólica vegetal del etanol consiste en su transformación a acetaldehído, esta reacción de óxido-reducción involucra la participación de la enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y en ácido acético por la aldehído deshidrogenasa (ALDH) también dependiente de NAD, llevándose a cabo en las mitocondrias y/o en el citoplasma (Obe y Ristow 1977). Se ha comprobado que el principal metabolito es el acetaldehído sin embargo, pueden generarse radicales de oxígeno reactivos los cuales se pueden unir covalentemente a ADN, proteínas y otras biomoléculas complejas (grupos ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos) en la célula, formando aductos, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero (Fraenkel-Conrat y Singer 1988, Tuma y Casey 2003). Se han caracterizado diversos aductos del acetaldehído que podrían estar

implicados en sus efectos mutagénicos y carcinogénicos en distintas líneas celulares (Wang *et al.* 2000). Lo cual apoya los resultados genotóxicos obtenidos en el presente estudio y confirma que el alcohol es un potente promutágeno activado por *Vicia faba* (Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999).

El análisis de viabilidad de los linfocitos coincubados con el EPTC y etanol con y sin activación metabólica vegetal por la raíz de *Vicia faba* mostró que no ejerce efecto citotóxico ya que los datos son muy semejantes al ser comparados con los valores del testigo negativo y de la fracción S10 (Cuadro II y Gráficas 7 y 8).

Los datos de la viabilidad de los linfocitos tratados con EPTC de manera directa y previa activación metabólica *in vivo* por *Vicia faba* indicaron que el efecto citotóxico no influye en la acción genotóxica del EPTC ya que no se encontró correlación entre ambas pruebas (Cuadro II y Gráficas 1 a 8). Este mismo efecto se obtuvo con los testigos positivo directo (MMC) e indirecto, (etanol) con relación al testigo negativo y a la fracción S10 (Cuadro II y Gráficas 1 a 8).

Los resultados de este estudio muestran que el EPTC requiere de la activación metabólica por la raíz de *Vicia faba* para actuar como promutágeno y generar daño al ADN en los linfocitos humanos *in vitro* (López-González 2004).

En los últimos años el uso de los plaguicidas carbámicos excede a las 20 000 toneladas así mismo, se ha incrementado el riesgo de cáncer, alteraciones neurológicas, inmunológicas y reproductivas en la población mundial (Lang 1993, Woodroff *et al.* 1994), los estudios sobre sus efectos genotóxicos y/o mutagénicos dados por la bioactivación animal y vegetal deben ser investigados, más aun cuando hay evidencia de residuos de estos en frutos, cereales y hortalizas, y sugiera medidas de regulación para disminuir el riesgo en los animales y el ser humano.

VIII CONCLUSIONES

- El herbicida tiocarbámico EPTC, es genotóxico indirecto que se activa a través del metabolismo vegetal.
- Se evidencia la capacidad metabólica de la raíz de *Vicia faba* para transformar al EPTC en metabolitos capaces de inducir daño significativo al ADN de los linfocitos humanos periféricos, mediante la electroforesis unicelular alcalina.
- La mitomicina C (mutágeno directo) y el etanol (previa activación metabólica *in vivo* por *Vicia faba*) producen un incremento significativo de células con daño al ADN, siendo más potente el etanol, lo cual indica que son testigos positivos para el ensayo cometa.
- El EPTC con y sin activación metabólica vegetal *in vivo* por la raíz de *Vicia faba* no disminuye la viabilidad de los linfocitos por ello no es un herbicida citotóxico.
- La fracción enzimática S10, no induce daño al ADN ni citotoxicidad en los linfocitos humanos *in vitro*.

IX REFERENCAS

- Abuo-Donia M. B., Elamarsy E. M. y Abu-Qare A. W. 2002. Metabolism and toxicokinetic of xenobiotics. En: Derelanko M. J. y Hollinger M. A. (Eds) *Handbook of toxicology*. CRC Press, Boca Ratón, Florida 769-833.
- Adams D. O. y Lee R. Y. 1983. Uptake and metabolism of S-ethyl-N,N-dipropylthiocarbamate (EPTC) and EPTC sulfoxide by suspension cells of *Zea mays* (Black Mexican Sweet). *Plant Physiol. Suppl.* **72**, 175-183.
- Akulov A. A., Verkhovskiy A. P. y Yerdokimov S. M. 1972. Triallate poisoning of animals. *Veterinariia* (Rusia) **10**, 105-106.
- Albero B., Sanchéz-Brunete C. y Tadeo J L. 2003. Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatog.* **51**, 6915-6921.
- Anders M. W., Dekant W. y Vamuakas S. 1992. Glutathione-dependent toxicity. *Xenobiotica* **22**, 1135-1145.
- Anina I. A., Medved I. N. y Proklin T. L. 1975. Gonadotix action of pesticidel thiocarbamate acid derivatives. *Farmakol. Toksikol.* (Moscú). **38**, 90-93.
- Anderson D., Tian-Wer. Y. y McGregor D. 1998. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis* **13**, 539-555.
- Ashby J., Tnwell H., Lefevre P. A. y Browne M. A. 1995. The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* **10**, 83-90.
- Ashton F. M. y Grafts A. S. 1981. Thiocarbamates. En: Casarett y Doulls (Eds). *In mode of action of herbicides*. Wiley, Nueva York. pp. 303-327.
- Baldwin A., Rogers H. J., Francis D. y Harwod J. L. 2003. Fatty acid elongation is important in the activity of thiocarbamate herbicides and in safening by dichlormid. *J. Exp. Bot.* **54**, 1289-1294.
- Banting J. D. 1970. Effects of diallate and triallate on wild oat and weat cells. *Weed Sci.* **18**, 80-84.
- Barret P. B. y Harwood J. L. 1998. Naphthalic anhydride prevents inhibition of fatty acid elongation by thiocarbamate. *Phytochemistry* **49**, 1897-1903.
- Bejarano F. 1989. Transnacionales y usos de plaguicidas. *Nueva Época, México* **25**, 15-22.

- Bleé E. 1998. Phytooxylipins and plants defense reactions. *Progress in Lipid Research* **37**, 33-72.
- Calderón-Segura M. E. 1993. Intercambio de cromátidas hermanas inducidos por propoxur previa activación metabólica por *Vicia faba*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F. 75 p.
- Calderón-Segura M. E. 1998. Evaluación del efecto genotóxico provocado por los herbicidas tiocarbámicos molinate y butilate en dos sistemas de prueba con la participación del metabolismo vegetal. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 87 p.
- Calderón-Segura M. E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Ramírez M. 1999. *In vivo* and *in vitro* promutagen activación by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butilate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* **438**, 81-88.
- Carrere A. y Morpurgo G. S. K. 1981. Comparison of the mutagenic activity of pesticides *in vitro* short term. *Progr. Mutat. Res.* **2**, 87-104.
- Carringer R. D., Rieck C. E. y Bush L. P. 1978. Metabolism of EPTC in corn (*Zea mays*). *Weed Sci.* **26**, 157.
- Cashman J. R., Olsen L. D., Young G. y Bern H. 1989. S-Oxygenation of Eptam in hepatic microsomes from Fresh and Saltwater Striped Bass (*Morone saxatilis*). *Chem. Res. Toxicol.* **2**, 392-299.
- Casida J. E., Gray R. A. Y Tilles H. 1974. Thiocarbamate sulfoxide: potent, selective, and biodegradable herbicides. *Science* **184**, 573-574.
- CCA (Comisión de Cooperación Ambiental). 2002. Boletín de trabajo. México, 38 p.
- Clements C, Ralph S. y Petras M. 1997. Genotoxicity of select in *Rana castesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay. *Environ. Mol. Mutagenesis* . **29**, 277-288.
- Coballase-Urrutia. E. 1997. El metabolismo vegetal y animal en la expresión mutagénica de algunos herbicidas carbámicos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 56 p.
- Coleman J. O. D., Blake-Kalff M. M. A. y Emyr D. T. G. 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemicals modification and vacuolar compartmentation. *Trend Plant Sci.* **2**, 144-151.
- Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) 1998. México, 56 p.

- Cotelle S. y Férard J. F. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ. Mol. Mutagen.* **34**, 246-255.
- Devine M. D. y Vanden Born W. 1991. Absorption and transport in plants. En: Grover R. y Cessna A. (Eds). *Environmental chemistry of herbicides*. CRC Press, Boca Ratón. **II**, 119-140.
- DGEIE (Dirección General de Estadística Informática y Evaluación). 1995. Informe Anual Agrícola. México. D.F. 48 p.
- Dixon D. P., Laphorn A. y Edwards R. 2002. Plant glutathione transferases. *Genom. Biology* **3**, 3004.1-3004.10.
- Doloshitsky S. L. 1969. Hygienic standardization of herbicide avadex containing chlorine in water. *Hyg. Sanit.* **34**, 21-25.
- Douglas G. R., Nestmann E. R., Grant C. E., Bell R. D. L., Wytsma J. M. y Kowbel D. J. 1981. Mutagenic activity of diallate and triallate determined by a battery of *in vitro* mammalian and microbial test. *Mutat. Res.* **85**, 142-147.
- Durán-Nah J. J. y Colli-Quintal J. 2000. Intoxicación aguda por plaguicidas. *Salud Publica de México* **42**, 53-55.
- Ebert E. 1980. Herbicidal effects of metolachlor [2-chloro-n-(2-ethyl-6-methyl-N-(2-methoxy-1-methyl) acetamide)] at the cellular level in sorghum. *Pestic. Biochem. Physiol.* **13**, 227-236.
- Ecobichon J. D. 1996. Toxic effects of pesticides. En: Casarett y Doulls (Eds). *Toxicology, the basic science of poisons*. McGraw-Hill, Nueva York. 655-662.
- Ecobichon J. D. 2001. Carbamate insecticides. En: Kriger R. (Ed). *Handbook of pesticides. Toxicology Principles.* **2**, 1087-1106.
- Ecobichon D. F. y Joy R. 1984. Pesticides and neurological disease. CRC Press, Boca Ratón. 285-310.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1996. Proposed guidelines for carcinogen risk assessment. *Fed. Regul.* **61**, 17960-18011.
- Ezra G. y Gressel J. 1982. Rapid effects of a thiocarbamate herbicide and its dichloroacetamide protectant on macromolecular syntheses and glutathione levels in maize cell cultures. *Pestic. Biochem. Physiol.* **17**, 48.
- Fraenkael-Conrad H. y Singer B. 1988. Nucleoside adducts are formed by cooperative reaction of acetaldehyde and alcohols; possible mechanism for the role of ethanol in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 3758-3761.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Fuerts E. P. 1987. Understanding the mode of the action of the chloroacetamide and thiocarbamate herbicides. *Weed Technol.* **1**, 270-227.
- Forago R. G. 1969. Suicida, fatal Sevin (1-naphthyl-N-methyl carbamate) poisoning. *Arch. Toxicol.* **24**, 309-315.
- Frear D. S., Swanson L. y Tanuku F. S. 1969. N-demethylation substituted 3-(phenyl)-methylureas: isolation and characterization of microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochem.* **8**, 2157-2169.
- Gentile J. M., Gentile G. J., Bultam J., Sechriest R., Wagner E. D. y Plewa M. J. 1982. An evaluating of the genotoxic proprieties of insecticides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* **101**, 19-29.
- Gómez-Arroyo S., Rodríguez-Madrid L. y Villalobos-Pietrini R. 1992. Chromosomal alterations induced by the thiocarbamate herbicida molinate (Ordram) in *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **8**, 77-80.
- Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M. E. y Villalobos-Pietrini R. 1995. Siter chromatid exchanges in human lymphocytes induced following plant activation by *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutagen.* **26**, 324-330.
- González M., Soloneski S., Reigosa A. y Larramendy M. 2003. Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its comercial formulation, azzurro. IV. DNA damage and repair kinetics assessed by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat. Res.* **534**, 145-154.
- Grant W. F. 1994. The present status of higher plant bioassay for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* **310**, 175-185.
- Gray L. 1991. Behavior persistence and degradation of carbamate and thiocarbamate herbicide in the environmental. En: *Proceeding of the California Weed Control Conference.* 128-134.
- Gronwald W. J. 1991. Lipid biosynthesis inhibitors. *Weed Sci.* **39**, 435-449.
- Grover R. y Cessna A. J. 1991 *Environmental chemistry of herbicides. II.* CRC. Press, Inc Boca Ratón, Florida. 120-135.
- Grover P., Danadevi K., Mahboob M., Rozati R., Banu B. y Rahman M.F. 2003. Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the comet assay. **18**, 201-205.
- Harris J. E. 2002. Regulatory toxicology: U.S. EPA/Pesticides (FIFRA). En: Derelanko M. J. y Hollinger M. A. (Eds). *Handbook of toxicology.* CRC Press, Boca Ratón. 1149-1154.



- Hatzios K. K. y Penner D. 1982. Metabolism of herbicides in higher plants. Burgess Publishing, Mineapolis. 77-98.
- Hellman B., Vaghef H. y Boström B. 1995. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* **336**, 123-131.
- Hepler P. K. y Jackson W. T. 1989. Isopropyl N-phenylcarbamate affects spindle microtubule orientation in dividing endosperms cells of *Haemanthus katherinae* Baker. *J. Cell Sci.* **5**, 727-743.
- Higashi K., Nakashima K., Karasaki Y., Fukunaga M. y Mizugashi K. 1981. Activation of benzo(a)pyrene by microsomes of higher plant tissues and their mutagenicity. *Biochem. Int.* **2**, 373-380.
- Higashi K. 1988. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* **197**, 273-288.
- Hoffman D. J., Rattner B. A., Burton C. A. y Lavoie D. R. 2002. Ecotoxicology. En: Derelanko M. J. y Hollinger M. A. (Eds). Handbook of toxicology. CRC Press, Boca Ratón. 867-911.
- Hoogenboom L. A. 1995. The mammalian metabolism of agrochemicals. Chichester. 163-167.
- Hubbell J. P. y Casida J. E. 1977. Metabolic fate of the N,N-dialkylcarbamyl moiety of thiocarbamate herbicides in rats and corn. *J. Agric. Food Chem.* **25**, 404- 413.
- Huckle K. R. y Milburn P. 1982. Biochemical mechanism of amino acid conjugation of xenobiotics. En Hutson D. H. y Roberts T. R. (Eds). Progress in pesticide biochemistry and toxicology. **2**, 127-142.
- IARC. 1976. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to man. Some carbamates, thiocarbamates and carbazides. International Agency for Research on Cancer Lyon. **12**, 245-270.
- Ikushima T., Aritomi H. y Murist J. 1996. Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat. Res.* **358**, 193-198.
- IMSS. 1995. Memorias del curso sobre plaguicidas. México, 77 p.
- INEGI. 1998. Informe 1997. "Estadística del Medio Ambiente". México, 115 p.
- Innes J. R. M., Ulland B. M., Valerio M. G., Petrucelli L., Fishbein E. R., Hart A. J., Pallota R. R., Bates H. L., Falk J. J., Gart M., Klein I., Mitchel I. y Peters J. 1969. Biossays of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: preliminary note. *J. Natl. Cancer Inst.* **42**, 1101-1113.

- Karunen P. y Wilkinson R. E. 1975. Influence of S-ethyl dipropylthiocarbamate (EPTC) on wheat root phospholipid fatty acid composition. *Physiol. Plant.* **35**, 228-231.
- Katagi T. y Mikami N. 2000. Primary metabolism of agrochemicals in plants. En Roberts T. (Ed). *Metabolism of agrochemicals in plants*. Nueva York, John Wiley 43-106.
- Keith R. S. 2001. Ecotoxicological risk assessment of pesticides in the environment. En: Kriger R. (Ed). *Handbook of pesticides. Toxicology Principles*. American Chemical Society, Washington D. C **1**, 353-374.
- Kihlman B. A. 1971. Root tips studying the effects of chemicals on chromosomes. En: Hollaender A. (Eds.). *Chemicals Mutagens Principles and Methods for their Detection*. Plenum Press, Nueva York. **2**, 489-514.
- Kishi M., Hirschheim N., Djajadisastra M., Satterlee L. 1995. Relationship of pesticide organophosphates spraying to signs and symptoms in Indonesian farmers. *Scand J Work Environ Health* **21**, 124-133.
- Kolattukudy P. E. y Brown L. 1974. Inhibition of cuticular lipid biosynthesis in *Pisum sativum* by thiocarbamates. *Plant Physiol.* **53**, 903-906.
- Komives T. y Dutka F. 1980. On the mode of action of EPTC and its antidotes in corn. *Cereal Res. Commun.* **8**, 627-645.
- Lamoureux G. L. y Rusness D. G. 1981. Catabolism of glutathione conjugates of pesticides in higher plants. En: Rosen J. D., Magee P. S. y Casida J. E. (Eds). *Sulfur in pesticide action and metabolism*. American Chemical Society, Washington D. C. 133-185
- Lamoureux G. L. y Rusness D. G. 1983. Malonylcysteine conjugates as end-products of glutathione conjugate metabolism in plants. En Miyamoto J. (Ed). *IUPAC pesticide chemistry: human welfare and the environment*. Pergamon Press, Nueva York. 295-341.
- Lamoureux G. L. y Rusness D. G. 1987. EPTC. Mutagenic in corn, cotton and soybean: identification of a novel metabolite derived from the metabolism of glutathione conjugate. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 1-7.
- Lang L. 1993. Are pesticides a problem?. *Environment Health Perspect.* **101**, 578-583.
- Lay M. M. y Casida J. E. 1976. Dichloroacetamide antidotes thiocarbamate sulfoxide detoxification by elevation corn root glutathione content and glutathione S-transferase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* **6**, 442-456.

- López-González L. 2003. Genotoxicidad del herbicida ametrina en linfocitos humanos, previa activación metabólica por *Vicia faba* mediante ensayo cometa. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 52 p.
- Luna-Martin del Campo 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. 47 p.
- Mann J. D., Jordan S. L. y Day B. E. 1965. A survey of herbicides for their effects upon protein synthesis. *Plant Physiol.* **40**, 840-843.
- Márquez M. E., Fujigaki L. A. y Aranda R. B. 1967. Problema de contaminación de alimentos con pesticidas: Caso Tijuana. *Salud Publica de México.* 25 p.
- Medved I. e Ivanova Z. V. 1971. Higienic establishment of working conditions during Eptam application in agriculture. *Gigi Sanit.* **2**, 29-32.
- Minakawa O., Ishii S. y Konnot T. 1978. Analytical method of residue of molinate a herbicide in paddy field and actions of molinate to living bodies, *Jpn. J. Public Health* **25**, 645-651.
- Montoya M. A., Carboney A. J. y Zorrilla E. 1981. Intoxicación por endrin. SSA. Boletín de epidemiología. México, 32 p.
- Morant M., Baks S., Moller B. L. y Werck-Reichhart D. 2003. Plant cytochrome P-450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 151-162.
- Moreland D. E., Malhotra S. S., Gruwnhagen R. D. y Shokrah T. E. 1969. Effects of herbicides on RNA and protein synthesis. *Weed Sci.* **17**, 556-563.
- Moustachi E. 2000. DNA damage and repair: consequences on dose-tesponses. *Mutat. Res.* **464**, 35-40.
- Mozer T. J., Tiemeier D. C. y Jaworski E. G. 1983. Purification and caracterizacion of corn glutathione S-transferases. *Biochemistry* **22**, 1068.
- Murnik M. R. 1976. Mutagenicity of widely-used herbicides. *Genetics* **83**, 554.
- Nagy I., Comperhole F., Ghys K., Vanderleyden J. y Demot R. 1995. A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (S-Ethyl Dipropylthiocarbamate) and Atrazine by *Rhodococcus* sp. Strain N186/21. *Applied Environ. Microb.* **61**, 2056-2060.
- Obe G. y Ristow H. 1977. Mutagenic carcinogenic and teratogenic effects of alcohol *Mutat Res.* **65**, 229-259.

- Obe G, Jonas R, Schmidt S. 1986. Metabolism of ethanol *in vitro* produces a compound which induces sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes *in vitro*: Acetaldehyde not ethanol is mutagenic. *Mutat Res* **174**, 47-51.
- O'Keefe D. P., Romesser J. A. y Leto K. J. 1987. Plant and bacterial cytochromes P-450: involved in herbicides metabolism. En Sauders J. A., Kosak-Channing L. y Conn E. E. (Eds). *Phytochemical effects of environmental compounds, recent advances in phytochemistry*. Plenum Press, Nueva York. **21**, 151.
- Olive P. L., Banáth J. P. y Durand R. E. 1990. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chenise hamster cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 779-783.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1990. Plaguicidas. Informe técnico **12**, 15-32.
- Östling O. y Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291-298.
- Östling O., Johanson K. J., Blanquist E. y Hagelquist E. 1987. DNA damage clinical radiation therapy studied by microelectrophoresis in single tumor cells. *Acta Oncol.* **26**, 45-48.
- Owen J. 1991. Herbicide metabolism as a basis for selectivity. En; Kirkwood R. C. (Ed). *Target Sites for herbicide metabolism action*. Nueva York, Plenum Press. 321-356
- Plewa M. J. 1978. Activation of chemical into mutagens by green plants. A preliminary discussion. *Environ. Health Perspect.* **27**, 45-50.
- 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 suppresses the plant activation assay for the analysis of plant-activated promutagen. *Mutat. Res.* **197**, 207-209.
- Plewa M. J. y Wagner E. D. 1993. Activation of promutagens by green plants. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 93-113.
- Prieto G. E. y Llopiz J. N. 1999 Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa). *Rev. Cubana Invest. Biomed.* **18**. 34-36.
- Quistad G. B., Speak S. E. y Casida J. E. 1994. Aldehyde dehydrogenase of mice inhibited by thiocarbamate herbicides. *Life Sci.* **55**, 1537-1544.

- Rebrin V. G. y Aleksandrova L. G. 1971. Toxicohygenic characteristics of the new herbicide. Ronit. Urach. Delo. **12**, 118-121.
- Repetto R. Y Sanjay S. 1996. Los plaguicidas y el sistema inmunitario: riesgos para la salud publica. World Resources Instituted. U.S.A.
- Rico-Méndez F., Ochoa J. L., Ocaña S. H., Escobedo A. G., Cabrera R. M. y Jacabo A. 2000. Efecto de dos plaguicidas intramuros en la función respiratoria de una población mexicana. Rev. Alerg. Méx. **XLVII**, 70-74.
- Roberts T. R. 1998. Metabolic pathways of agrochemicals. En: Kirkwood R. C. (Ed). Herbicides and plant growth regulators. The Royal Society of Chemistry. 849 p.
- Rojas E., López M. C. y Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: Metodología and applications. J. Chromatogr. B. **722**, 225-254.
- Rosales H. B. 1998. Efecto citogenético provocado por los herbicidas carbámicos Eptam y Asulam en *Vicia faba*. Tesis de licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM. México. 61 p.
- Rydberg B. y Johanson K. 1978. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. En: Hanawalt P., Fox F. y Friedberg E. (Eds). DNA repair mechanism. Academic Press, Nueva York. 465-468.
- Sandermann H. 1982. Metabolism of environmental chemicals: a comparison of plant and liver enzyme systems. En Klekowski E. J. (Ed). Environmental mutagenesis, carcinogenesis, and plant biology. Preger, New York. I.
- Sandermann H. 1988. Mutagenic activation of xenobiotics by plants enzymes. Mutat. Res. **197**, 183-194.
- Sandermann H. Jr. 1992. Plant metabolism of xenobiotics. TIBS. **17**, 82-84.
- Sandhu S. S., Waters M. D., Mortelmans K. E., Evans E. Y., Jotz M. M., Mitchel A. D. y Kasica V. 1984. Evaluation of diallate and triallate herbicides for genotoxic effects in a battery of *in vitro* and short-term *in vivo* test. Mutat. Res. **136**, 171-183.
- Shao Z. Q. y Behki R. 1995. Cloning of the genes for degradation of the herbicides EPTC (S-Ethyl Dipropyltiocarbamate) and Atrazine from *Rhodococcus* sp. Strain TE1. Applied and Envirom. Microb. **61**, 2061-2065.
- Shimabukuro R. H. 1986. Detoxication of herbicides. En Duke S. O. (Ed). Weed phisiology. CRC Press. Boca Ratón. **II**, 215-240.

- Shimabukuro R. H., Lamoreux G. L. y Frear F. S. 1981. *Pesticide metabolism in plants: principles and mechanism*. En: Matsumura F. (Ed). *Biological Degradation of pesticide*. Plenum Press, Nueva York. 123-145.
- Shimabukuro R. H., Lamoreux G. L. y Frear F. S. 1982. Pesticides metabolism in plants reactions and mechanism. En Matsumura F. y Murti C. R. K. (Eds). *Biodegradation of pesticides*. Plenum Press, Nueva York, 21-66.
- Singh N. F., McCoy M. T., Tice R. R., Scheneider E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Esp. Cell Res.* **175**, 184-191.
- Singh N. P., Stephens R. E. y Schneider E. L. 1994. Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int. J. Radiat. Biol.* **66**, 23-28.
- Smulders Chanal J.G.M., Bueters Tjerk J.H., Van Kleef Regina G.D.M. y Vijverberg Henk P.M. 2003. Selective effects of carbamates pesticides on rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors and rat brain acetylcholinesterase. *Mutat. Res.* **193**, 139-146.
- Staub R. E., Quistad G. B. y Casida J. E. 1999. S-Methyl N-Buthilthiocarbamate sulfoxide. *Biochemil. Pharma.* **58**, 1467-1473.
- Stiles C. L., Sams C. E., Robinson D. K., Coffey D. L. y Mueller T. C. 2000. Influence of metam sodium on the dissipation and residual biological activity of herbicides EPTC and pebulate in surface soil under black plastic mulch. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4681-468.
- Still G. G., Davis D. G. y Zander G. L. 1970. Plant epicuticular lipids: alteration by herbicidal carbamates. *Plant Physiol.* **46**, 307-314.
- Swirsky G. L., Slone T. H., Ames B. N. y Menly N. B. 2001. Pesticide residues in food and cancer risk: a critical analysis. En Krieger R. (Ed). *Handbook of pesticide toxicology, principles*. **1**, 799-843.
- Tuna D. E. y Casey C. A. 2003. Dangerous by products of alcohol breakdown focus on adducts. *Alcohol Res. Realth.* **27**, 285-290.
- Tadeo J. L., Sánchez-Bronete C., Pérez R. A. y Fernández M. D. 2000. Analysis of herbicides residues in cereal, fruits and vegetables. *J. Chromat.* **882**, 175-191.
- Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. 1982. Inducción of SCHs in CHO cells by extracts from *Vicia faba* roots exposed to ethanol. *Mutat. Res.* **105**, 169-174.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Takehisa S. y Kanaya N. 1983. A comparison of *Vicia faba* root S10 and rat liver S9 activation of ethanol, maleic hidrazide and cyclophosphamide as measured by sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cell. *Mutat. Res.* **197**, 195-205.
- Tennant Alan H., Peng Baocheng y Kligerman Andrew D. 2001. Genotoxicity studies of three triazine herbicides: *in vivo* studies using the alkaline single cell gel (SCG) assay. *Mutat. Res.* **493**, 1-10.
- Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C. y Sasaki Y. F. 2000. Single cell/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206-221.
- Tomlin C. 1994. The pesticides manual. The British crop protection council and The Royal Society of Chemistry. 394-395.
- Undeger U. y Basaran N. 2002. Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assay. *Arch. Toxicol.* **76**, 430-436.
- Valdez S. B., García D. E., Cobo R. J., y López B. G. 2000. Impacto de los plaguicidas en la salud de los habitantes del Valle de Mexicali, México. *Rev. Ecología Latino Americana* **3**, 15-21.
- Valeminsky J. y Gichner T. 1988. Mutagenic activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. *Mutat. Res.* **197**, 221-242.
- Valverde M, Ostrosky-Wegman P., Rojas E., Fourtoul T., Meneses F., Ramírez M., Díaz-Barriga M. y Cebrian M. 1999. The application of single cell gel electrophoresis or comet assay to human monitoring studies. *Salud Pública de México.* **41**, suplemento 2, S109-S113.
- Verpoorte R. y Menelink J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology.* **13**, 181-187.
- Veverka K. A., Johnson K. L., Mays D. C., Lipsky J. J. y Naylor S. 1997. Inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and its metabolite methyl diethylthiocarbamoyl-sulfoxide. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 511-518.
- Voytenko G. A. y Medved I. L. 1973. Effect of some thiocarbamates on reproductive functions. *Gig. Sanit.* **38**, 11-114.
- Wang M., McIntee E., Cheng G., Shi Y., Villata P. y Hecht S. 2000. Identification of DNA adducts of acetaldehyde. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 1149-1157.

- Weisshaar H. y Boger P. 1987. Primary effects of chloroacetamide inhibition of fatty acid synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* **32**, 212-216.
- Werck-Reichhert D. y Feyereisen R. 2000. Cytochromes P-450: a success story. *Genome Biology.* **1**, 3003.1-3003.9
- Werck-Reichhert D., Hehn A. y Didierjean L. 2000. Cytochromes P-450 for engineering herbicides tolerance. *Science.* **5**, 116-122.
- WHO (World Health Organization). 1972. Health Hazard of Human Envirom. Ginebra. pp. 97-105.
- WHO (World Health Organization). 1988. Thiocarbamate pesticida. A general introducción. *Environ. Health. Crit.* **76**. Ginebra.
- Wild D. 1975. Mutagenicity studies on organophosphorus insecticidas. *Mutat. Res.* **32**, 133-150.
- Wilkinson R. E. 1987. S-ethyl dipropyltiocarbamate (EPTC) and 2,2-dichloro-N,N-di-2-propenylacetamide (dichlormid) inhibitions of syntesis of acetyl-coenzima A derivates. *Pestic. Biochem. Physiol.* **28**, 38-43.
- Wojewodska M., Wojcik A. y Szumiel I. 1995. Faster DNA damage repair in adapted human lymphocytes. En: Hagen V., Jung H. y Sreffer (Eds). *Proceeding of the tenth International Congress of Radiation.* Res. Wurzburg, Germany, Aug-Sept. p 307.
- Woodroff T.J., Kyle A.D. y Bois F.Y. 1994. Evaluating health risk from occupational exposure to pesticide and the regularity response. *Envirom. Health Perspect.* **102**, 1088-1096.
- Woods J. A., O'Leary K. A. McCarthy R. P. y O'Brien N. M. 1999. Preservation of comet assay slides: comparison with fresh slides. *Mutat. Res.* **429**, 181-187.
- Zimdahl R. L. 1999. *Fundamentals of weed science.* Academic Press. San Diego Cal. 542p.
- Zimmerman L. J., Valentine H. L. y Valentine W. M. 2004. Characterization of S-(N,N-Dialkylaminocarbonyl) cysteine adducts and enzyme inhibition produced by thiocarbamate herbicides in the rat. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 175-191.

C U A D R O I I

Cuadro II. Evaluación del daño al ADN en linfocitos periféricos humanos, inducidos por el herbicida tiocarbámico EPTC con y sin activación metabólica *in vivo* por la raíz de *Vicia faba* mediante electroforesis unicelular alcalina^a.

	% células con daño al ADN	Longitud de la cauda (µm)	% Niveles de daño al ADN					% viabilidad celular
			0	1	$\bar{X} \pm S.E.$		4	
	$\bar{X} \pm S.E.$	$\bar{X} \pm S.E.$			2	3		$\bar{X} \pm S.E.$
Testigo negativo (FPMI 1640)	2 ± 2.3	11 ± 3.5	98 ± 0.0	0	0	0	0	97 ± 0.0
Linfocitos tratados directamente con EPTC (µg/ml)								
1.5	2 ± 2.6	12 ± 2.2	94 ± 0.0	4 ± 1.5	0	0	0	96 ± 0.0
2.5	8 ± 1.5	16 ± 2.0	97 ± 0.0	3 ± 0.5	0	0	0	94 ± 0.0
5.0	2 ± 2.3	8 ± 2.0	98 ± 3.0	2 ± 0.0	0	0	0	96 ± 9.0
8.0	5 ± 2.8	6 ± 1.0	95 ± 0.5	3 ± 0.5	0	0	0	88 ± 1.0
10.0	2 ± 2.0	4 ± 2.0	98 ± 2.0	2 ± 0.0	0	0	0	86 ± 9.0
Testigo positivo Mitomicina C	22* ± 3.6	52* ± 1.02	34 ± 7.0	45 ± 1.0	3 ± 1.0	8 ± 3.0	6 ± 1.4	95 ± 0.6
Linfocitos coincubados con la fracción S10 de la raíz de <i>Vicia faba</i>								
	2 ± 1.0	11 ± 1.6	98 ± 1.0	2 ± 0.0	0	0	0	98 ± 0.0
Linfocitos coincubados con los extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> después del tratamiento con EPTC (µg/ml)								
50	21* ± 3.5	32* ± 2.0	79 ± 5.5	5 ± 0.0	27 ± 0.5	0	0	96 ± 1.0
100	28* ± 2.0	66* ± 1.5	72 ± 5.0	14 ± 0.5	26 ± 2.5	16 ± 7.5	9 ± 1.4	98 ± 0.0
200	35* ± 2.9	69* ± 1.4	65 ± 3.5	11 ± 3.5	27 ± 2.5	22 ± 1.0	6 ± 1.4	96 ± 1.0
400	52* ± 1.0	77* ± 1.5	48 ± 7.0	10 ± 2.5	49 ± 3.5	18 ± 6.0	0	94 ± 5.0
500	82* ± 1.7	94* ± 3.5	18 ± 1.0	2 ± 9.0	57 ± 5.0	35 ± 0.0	0	92 ± 7.0
Testigo positivo Linfocitos coincubados con los extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratados con Etandl 3600 mg/ml	78* ± 2.4	194* ± 3.0	22* ± 7.0	3 ± 1.0	37 ± 1.0	12 ± 3.0	18 ± 1.4	98 ± 5.0

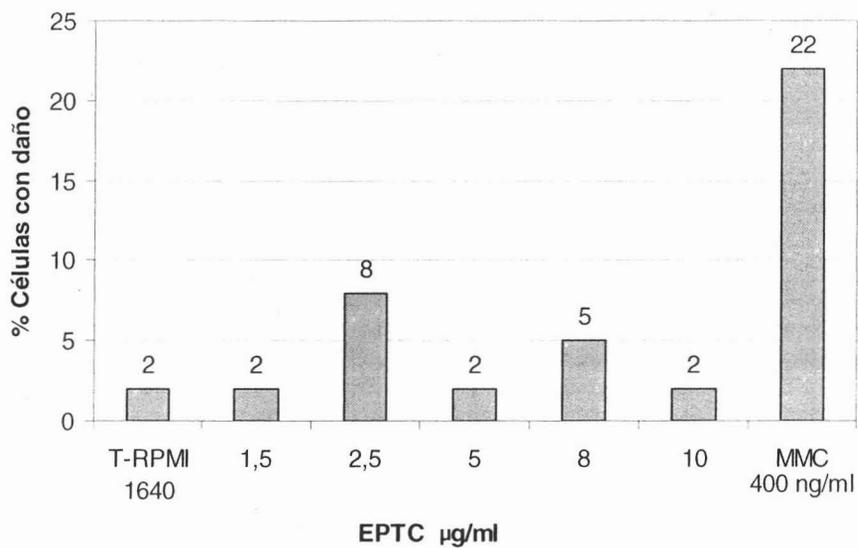
^a n=200 células en dos experimentos

No se encontraron diferencias significativas entre el testigo negativo y cada grupo de aplicando el analisis de varianza $F_{EPTC}=1.73$

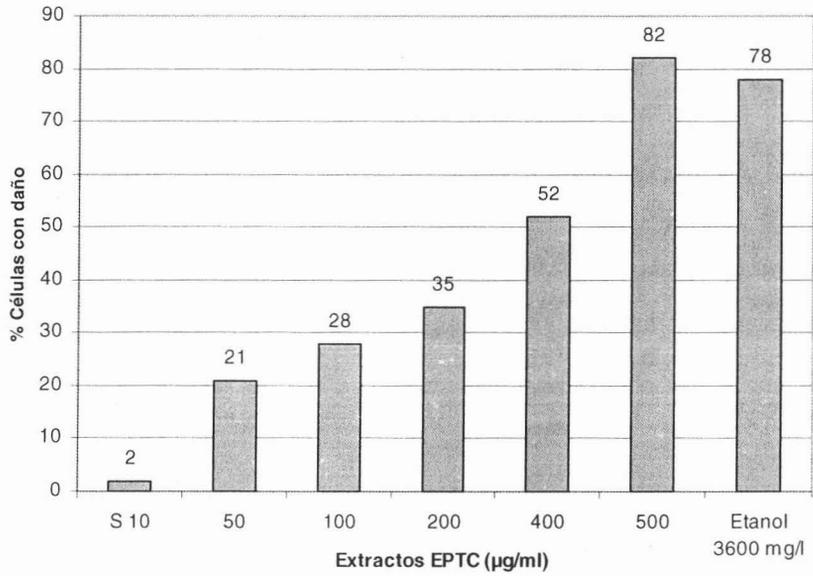
* Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento, utilizando un (ANOVA) donde $F_{EPTC}=65.38$ a $p<0.0001$, y aplicando la prueba de comparación múltiple de Newman- $p<0.001$

GRÁFICAS

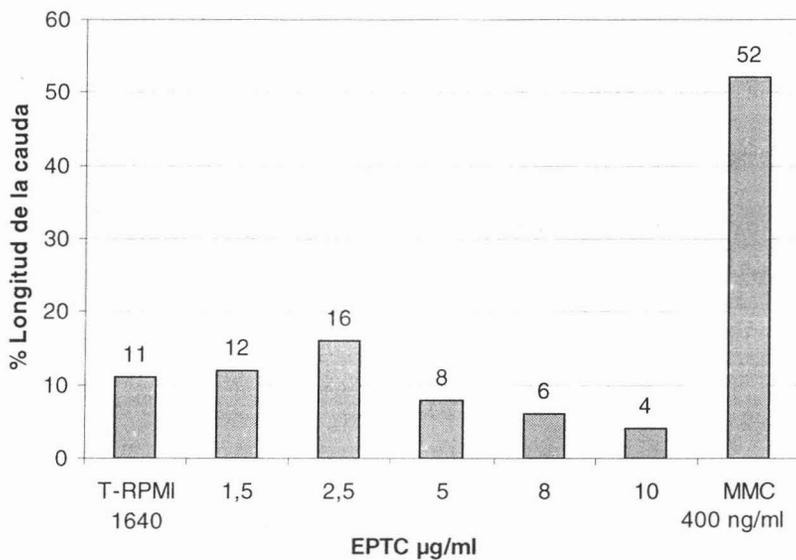
1. Promedio de células con daño sobre el ADN en linfocitos periféricos humanos sin activación metabólica por la raíz de *Vicia faba*.



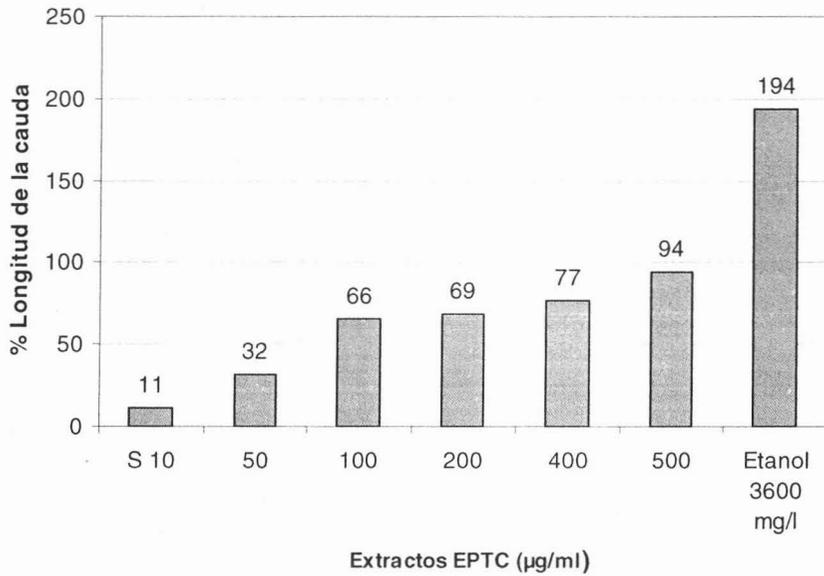
2. Promedio de células con daño sobre el ADN en linfocitos periféricos humanos con activación metabólica por la raíz de Vicia faba.



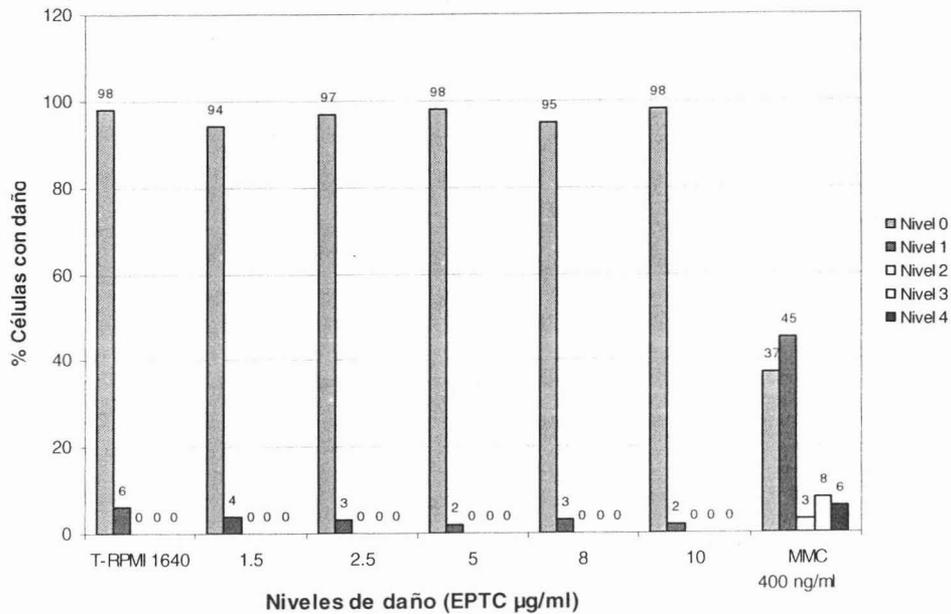
3. Promedio de la longitud de la cauda en células con daño sobre el ADN en linfocitos periféricos humanos sin activación metabólica por la raíz de *Vicia faba*.



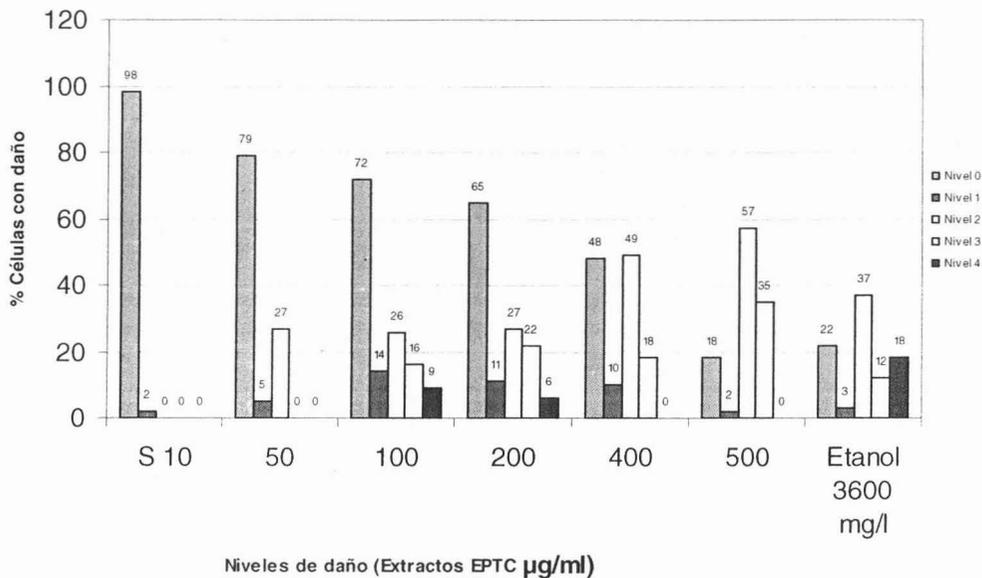
4. Promedio de la longitud de la cauda en células con daño sobre el ADN en linfocitos periféricos humanos con activación metabólica por la raíz de *Vicia faba*.



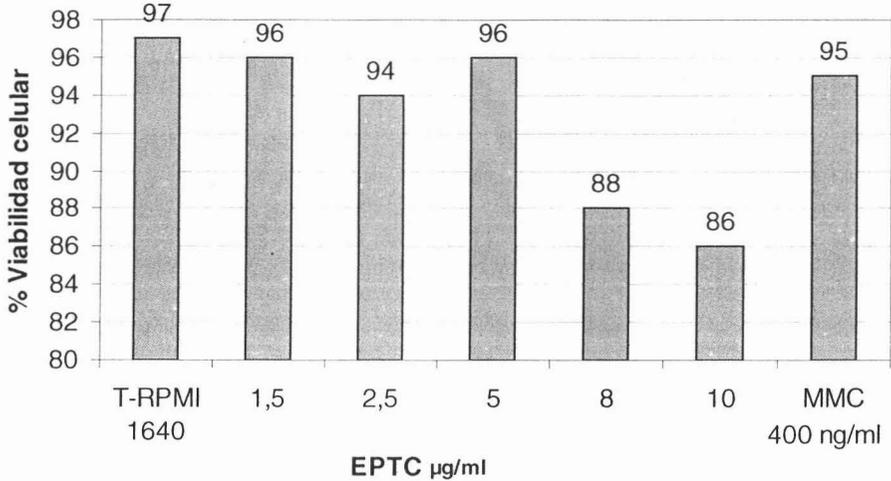
5. Promedio de los niveles en células con daño sobre el ADN en linfocitos periféricos humanos sin activación metabólica por la raíz de *Vicia faba*.



6. Promedio de los niveles en células con daño sobre el ADN en linfocitos periféricos humanos con activación metabólica por la raíz de *Vicia faba*.



7. Promedio de la viabilidad en células con daño sobre el ADN en linfocitos periféricos humanos sin activación metabólica por la raíz de *Vicia faba*.



8. Promedio de la viabilidad en células con daño sobre el ADN en linfocitos periféricos humanos con activación metabólica por la raíz de *Vicia faba*.

