



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO A TRAVÉS
DEL SISTEMA DE *Salmonella typhimurium*
PRODUCIDO POR CUATRO INSECTICIDAS
ORGANOFOSFORADOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

MARÍA CONCEPCIÓN MORENO ZENTENO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Apoyos financieros

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante 18 meses. (No. De becario: 172696) y al programa de Apoyo de la Dirección General de Estudios de Posgrado, por la beca otorgada por 24 meses.

Académicos

Con mi más franca actitud a la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo por la aceptación, dirección e invaluable ayuda para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini por todo el apoyo brindado en todo momento que lo requerí.

Con gran aprecio y admiración al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre por su orientación y valiosa asesoría.

A la Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón por la revisión de esta tesis y por sus atenciones.

Al Dr. Pedro Rosendo Morales Ramírez por sus aportaciones y comentarios para la realización de este trabajo.

Técnicos

Al Biólogo Alejandro Frías Villegas por el apoyo técnico en la realización de los ensayos mutagénicos.

A la M. en C. Diana Escobar García por el apoyo técnico en el manejo de las cepas bacterianas y la fracción enzimática S9.

A la M. en C. Ana Rosa Flores Márquez, por su asesoría en el uso del equipo de laboratorio

A la Dra. Josefina Cortes Eslava, por el apoyo técnico brindado en el laboratorio.

Institucionales

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

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera de la Universidad Nacional Autónoma de México, lugar donde se realizó el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de una tesis es un proceso que requiere de tiempo y esfuerzo, no solo de quien lo realiza sino de la gente que nos rodea. Es por esto que quiero hacer un especial agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado durante estos años y gracias a las cuales este trabajo ya concluyó.

Mi más profundo agradecimiento y amor a Fernando Ramírez, por absolutamente todo el apoyo incondicional brindado, principalmente en los momentos más difíciles.

A mi familia: mi contrafuerte, por que gracias a TODOS ustedes llegué hasta aquí. Por que desde que nací me han enseñado a ser feliz aún en los trancazos más fuertes de mi vida. Siempre saben darme la fortaleza, la confianza, las ganas de vivir y gracias a sus consejos y lecciones de vida he podido culminar este proceso y les aseguro que culminaré muchos, muchos, muchos más.

TODOS = Mamá, Pápá, Yola, Mary, Tere, Vero, Lucy, Jesús, Fofe, Francisco, Betty, Víctor y Letty.

A la sangre nueva, por ayudarme a entender el milagro de una nueva vida y por absolutamente toda la felicidad que traen consigo:

A Danny G. Moreno: mi hermanito pequeño, mi consen.

A Lizbeth y Karla: sin duda un par de “chicas superpoderosas”.

A Mafer, Ivann, Ilse, Ingrid, por que con su curiosidad, inocencia y sinceridad siempre me hacen recordar lo primordial en este mundo.

Un millón de gracias a mi segunda familia “mis amigos”, por absolutamente todos los excelentes ratos que compartimos juntos, por que son mi otro pilar y ustedes han hecho milagros en los momentos requeridos:

A Vero Borgonio, mil gracias por ser una persona simple y sencillamente fuera de serie, ¡Sabes que para mi simplemente eres la ley!

A Emmanuel Ramírez y Erika Arroyo, la familia peluche, por que son por mucho... unos auténticos hermanos.

A Sury Martínez, Juan Luis y André, por que mejor buen plan, ¡imposible!

A Alex Frías por todo el apoyo que me has brindado siempre.

A Cesar Guerrero e Ivonne Santiago: por sus atenciones y preocupación que muestran hacia mí y hacia todos los que convivimos con ustedes.

A Florecita Mejía por que a pesar del tiempo y la distancia estás conmigo siempre que lo necesito

A Iris, Samuel y a la nueva bebé, les deseo lo mejor.

A Vicky Cilia, por que siempre que encuentro un mensaje tuyo en el momento menos esperado.

A Vicky y a la Sra Emma, por todas sus atenciones.

A mis compañeros del laboratorio de Mutagénesis y Citogenética: Leonel, Selene, Toño, Rodrigo, Martha, Caro, Alex Picachú, Sofía y Rocío, gracias a ustedes por conseguir que mi estancia se hiciera muy agradable y divertida a pesar de haber momentos difíciles.

A todos ustedes ¡¡¡¡ MIL GRACIAS!!!!

DEDICATORIAS

Con todo mi corazón dedico esta tesis:

A mis padres, Concepción Zenteno y Francisco Moreno, con mi más profundo agradecimiento por todo su amor y apoyo, por que me han otorgado un par de tesoros invaluable: la vida y la educación.

A Fernando Ramírez Alatraste, por su apoyo incondicional incluso en los momentos más difíciles.

A mis hermanos y sobrinos, especialmente a Franky, por que a pesar de que no puedo convivir contigo, yo sé que eres un bebé muy especial, simplemente por que eres el hijo de una persona a la que más quiero y admiro.

A la Familia Ramírez Herrera que desde que los conocí me han mostrado un gran aprecio y cariño

A la Familia Amador Viveros que nos hicieron partícipes en sus vidas.

A mis amigos eternos.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Clasificación de los plaguicidas.....	3
1.2 Movilidad de los plaguicidas en el ambiente.....	5
1.3 Toxicología.....	8
1.4 Efectos adversos de los plaguicidas.....	12
1.5 Plaguicidas en México.....	15
1.6 Compuestos Organofosforados y su biotransformación.....	17
1.7 Toxicología Genética.....	22
2. ANTECEDENTES	24
2.1 Ensayo de Ames.....	24
2.2 Efectos genotóxicos de los Plaguicidas Organofosforados.....	27
3. OBJETIVOS	31
4. HIPÓTESIS	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 Plaguicidas empleados en la evaluación genotóxica.....	33
6.2 Ensayos de Mutagenicidad.....	34
6.3 Análisis estadístico.....	36
6. RESULTADOS	37
6.1 Prueba de marcadores.....	37
6.2 Evaluación genotóxica de Folimat	39
6.3 Evaluación genotóxica de Foley.....	43
6.4 Evaluación genotóxica de Gusatión.....	49
6.5 Evaluación genotóxica de Tamarón.....	52

7.	DISCUSIÓN	55
	7.1 Metabolismo de Organofosforados	55
	7.2 Plaguicidas Organofosforados formulados.....	57
	7.3 Folimat.....	57
	7.4 Foley.....	58
	7.5 Gusación.....	59
	7.6 Tamarón.....	59
8.	CONCLUSIONES	61
9.	REFERENCIAS	62

RESUMEN

En la actualidad los plaguicidas organofosforados se utilizan ampliamente en la agricultura a nivel mundial y son el tipo de compuestos que están involucrados en la mayor cantidad de intoxicaciones. El metabolismo de los organofosforados sigue en general las dos fases habituales de desintoxicación de xenobióticos en el organismo, las denominadas fase I y II. Paradójicamente, en ocasiones, el organofosforado al ser metabolizado se convierte en un compuesto biológicamente activo, y por lo tanto nocivo para el organismo. El metabolismo de estos compuestos ocurre principalmente por el sistema flavin-monooxigenasa y por las isoenzimas hepáticas citocromos P-450.

Existe evidencia de que en diversos sistemas de prueba los plaguicidas organofosforados pueden provocar diferentes daños a nivel celular, inducir aberraciones cromosómicas y mutaciones puntuales y se ha comprobado activación metabólica de algunos plaguicidas organofosforados con la prueba de Ames, al aumentar su efecto mutagénico con la adición de mezclas enzimáticas de hígado de rata.

En el presente estudio se analizó el daño genotóxico de cuatro plaguicidas organofosforados formulados: Folimat, Foley, Gusatión y Tamarón, a través del sistema de mutación reversa de *Salmonella typhimurium*, con la presencia y ausencia de la fracción enzimática (S9), empleando las cepas TA98 y TA100. Para obtener la potencia mutagénica (revertantes/ μg) de cada ensayo se calculó la pendiente por medio del método de mínimos cuadrados y se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para realizar la prueba de hipótesis relativa a la pendiente. Se obtuvieron los valores del coeficiente de correlación (r^2) que indica la cantidad de variación de Y que se observa en la ecuación de regresión. La comparación de los resultados de los ensayos con activación y sin activación metabólica se realizaron aplicando "t" de Student obteniendo la diferencia entre regresiones independientes.

Los resultados indican que Folimat no presentó comportamiento mutagénico ó citotóxico de forma directa e indirecta con ninguna de las concentraciones examinadas en la cepa TA98, sin embargo, mostró efecto mutagénico en la cepa TA100, a partir de 1000 μg /placa con y sin activación metabólica. Además se determinó que existe diferencia significativa entre los tratamientos de forma directa e indirecta.

Foley no presentó comportamiento mutagénico de forma directa ni indirecta en ninguna de las concentraciones examinadas con la cepa TA98. Evaluado sin metabolismo tuvo efecto citotóxico a partir de 800 µg/placa y en la forma indirecta el evento tóxico se evidenció desde 3000 µg/placa. Con la cepa TA100 se observó comportamiento mutagénico, a partir de 800 µg/placa sin la fracción enzimática S9 y con activación metabólica a partir de 1000 µg/placa. Los resultados obtenidos en el análisis estadístico indican que existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

El plaguicida Gusatión no mostró comportamiento mutagénico de forma directa e indirecta en ninguna de las concentraciones examinadas con las cepas TA98 y TA100, no obstante en ambas se observó efecto citotóxico. Con TA98 de forma directa se evidenció dicho efecto a partir de 40 µg/placa y de forma indirecta desde 200 µg/placa. Con la cepa TA100 de manera directa se presentó efecto citotóxico a partir de 20 µg/placa e indirecta desde 800 µg/placa.

Tamarón no demostró comportamiento genotóxico de forma directa ni indirecta en ninguna de las concentraciones examinadas con las cepas TA98 y TA100.

A partir de los resultados alcanzados en el presente trabajo se sugiere que el mecanismo de inducción de mutaciones puntuales por medio del cual actúan los plaguicidas organosforados preferentemente es por sustitución de pares de bases, debido a la obtención de resultados positivos con la cepa TA100.

SUMMARY

Currently, organophosphorus pesticides are widely used in agriculture worldwide and are the kind of compounds involved in most cases of poisoning. The metabolism of organophosphorus pesticides generally follows the two common phases of xenobiotic detoxification in the organism, the so-called phases I and II. Paradoxically, occasionally, when an organophosphorus pesticide is metabolized, it becomes a biologically active compound, and hence harmful to the organism. The metabolism of these compounds occurs principally via the flavin-monooxygenase system and the hepatic cytochrome P-450 isoenzymes.

There is evidence that in several test systems, organophosphorus pesticides can cause damages at cellular level and induce chromosomal aberrations and point mutations. Metabolic activation of some organophosphorous pesticides has been demonstrated using the Ames test, when their mutagenic effect increases with the addition of rat liver enzyme homogenates.

In the current study, the genotoxic damage of four formulated organophosphorous pesticides, Folimat, Foley, Gusathion and Tamaron, was analysed using the reverse mutation system of *Salmonella typhimurium*, both in the presence and absence of the enzymatic fraction (S9), using TA98 and TA100 strains. In order to obtain the mutagenic potency (revertants/ μg) of each assay, the slope was calculated via the least-squares method, and an analysis of variance (ANOVA) was applied to perform a hypothesis test on the slope. The values of the correlation coefficient were obtained, indicating the amount of variation of Y observed in the regression equation. The comparison of the results of the tests with or without metabolic activation was carried out by applying the Student *t*-test, obtaining the difference between independent regressions.

The results indicate that Folimat showed no mutagenic or cytotoxic behavior, either directly or indirectly, with the TA98 strain concentrations. However, a mutagenic effect was found in the TA100 strain, upwards of 1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, with and without metabolic activation. Moreover, it was determined that there is a significant difference between the direct and indirect treatments.

Foley showed no mutagenic behavior, directly or indirectly, for any of the TA98 strain concentrations examined. Tested without metabolism, it had a cytotoxic effect above 800 $\mu\text{g}/\text{plate}$, and in the indirect case toxicity was observed above 3000 $\mu\text{g}/\text{plate}$. With the TA100 strain, a mutagenic effect was observed above 800 $\mu\text{g}/\text{plate}$ without the enzymatic fraction S9, and with metabolic activation above 1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$. The results obtained in the statistical analysis show a significant difference between both treatments.

Gusathion pesticide showed no mutagenic behavior directly or indirectly in any of the examined concentrations with the TA98 and TA100 strains; nevertheless, a cytotoxic effect was observed in both. With the direct application of TA98, such an effect was observed above 40 µg/plate, and indirectly above 200 µg/plate. With the TA100 strain applied directly, the cytotoxic effect appeared from 20 µg/plate, and indirectly from 800 µg/plate.

Tamaron did not show genotoxic behavior in TA98 and TA100 strains directly or indirectly.

The results obtained in the present work, due to the positive results obtained with the TA100 strain, suggest that the mechanism of induction of point mutations, by which the organophosphorus pesticides act preferentially, is base-pair substitution.

1. INTRODUCCIÓN

El ser humano inicia la actividad agrícola en su esfuerzo por garantizar la obtención regular de alimentos, ya que depende de los productos de la tierra para su supervivencia (Childe 1992). Si bien, en la falta de alimento intervienen múltiples factores ajenos a la agricultura, por ejemplo: las guerras o los desastres naturales; una gran parte de las pérdidas de cultivos también se deben a los ataques realizados por diversas plagas. Respecto a la destrucción masiva de cultivos se pueden citar un par de ejemplos que desembocaron en resultados catastróficos, el primero ocurrió en Irlanda entre 1845 y 1849, debido al hongo *Phytophthora infestans*, que indujo la pérdida general de cosechas de papa, producto que constituía el alimento básico de la población provocando una hambruna que causó la muerte de más de un millón de personas y la migración, de otro millón y medio, principalmente a Norteamérica (Cremllyn 1989). Otro ejemplo ocurrió en varios países de África, durante 2004, ya que las langostas del desierto ocasionaron cuantiosas pérdidas en el sector agrícola y aunado a una etapa de sequía, la población se enfrentó a una grave crisis alimentaria (FAO 2005a). Con los casos citados anteriormente se deriva que desde la antigüedad hasta nuestros días la protección de los cultivos es inherente a la agricultura y el empleo de productos químicos fitosanitarios representan un papel fundamental en la resguardo de los alimentos (Blasco *et al.* 2003, Mitsushi *et al.* 2004).

Por otro lado el uso de plaguicidas para el cuidado de animales de granja, juega un papel elemental, ya que las pérdidas económicas causadas por diversas plagas que atacan al ganado pueden ser cuantiosas. En 1998, el ganado vacuno de las granjas de Queensland (Inglaterra) presentó infestación por garrapatas y las pérdidas superaron los 4 millones de dólares por año (Jonsson *et al.* 2001).

El control químico es el elemento más importante en el enfoque integrado de la lucha contra los vectores y las plagas de impacto en la salud pública. Padecimientos como el paludismo, la enfermedad de Chagas, el dengue, la fiebre hemorrágica, la oncocercosis y la leishmaniasis, afectan la salud y el bienestar de millones de personas en todo el mundo y son un impedimento para el desarrollo social y económico (OMS/CPEET/PEPOMS 2001).

De las más de 70 000 sustancias que se encuentran en el mercado, los plaguicidas sintéticos han ocupado un lugar destacado desde 1940. La producción mundial de plaguicidas se duplicó entre 1970 y 1985 y las ventas, que en 1970 fueron de 2700 millones de dólares al final del siglo XX alcanzaron los 40 000 millones de dólares anuales en el mundo (FAO 2002a).

El artículo 2° de la revisión del *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas* (FAO 2003) define al plaguicida: como «cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas 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 causan perjuicio 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. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte».

El ingrediente activo se define como el componente químico que confiere a cualquier producto, dilución o mezcla, el carácter plaguicida específico del mismo. El ingrediente inerte, diluyente o coadyuvante es el grupo de sustancias que se adicionan a un plaguicida para facilitar su manejo, aplicación y efectividad (NOM-045-SSA1-1993).

Más del 80 por ciento de las ventas de los plaguicidas está dividido entre 8 compañías: Aventis, BASF, Bayer, Dow AgroSciences, Dupont, Monsanto, Sumitomo y Syngenta (FAO 2001). Para fines de siglo XX se vendieron aproximadamente 2800 millones de kilogramos de plaguicidas, representados en 900 ingredientes activos y más de 50 000 formulaciones comerciales. De ellos, el porcentaje utilizado en países menos industrializados ha ascendido en las últimas tres décadas del 20 % a cerca del 40 % (FAO 2002a).

Según las agencias de regulación OMS/CPEET/PEPOMS (2001), alrededor del 30 % de los plaguicidas comercializados en los países en desarrollo con destino a la agricultura y la salud pública, con un valor anual estimado de mercado de 900 millones de dólares, no cumplen con las normas de calidad aceptadas internacionalmente. Estos plaguicidas contienen con frecuencia sustancias e impurezas peligrosas que ya se han prohibido o restringido rigurosamente en algunos países y que representan una amenaza importante para la salud humana y el ambiente (Wesseling *et al.* 2005). Su compra también podría dar lugar al despilfarro de los fondos, debido a la falta de eficacia, y contribuir a la acumulación de existencias de plaguicidas obsoletos.

1.1 Clasificación de los plaguicidas

Existen considerables formas de clasificar los plaguicidas y a continuación se muestran las que se emplearán en el desarrollo del presente trabajo. En el cuadro 1 se presenta la clasificación por el modo de acción del ingrediente activo.

Cuadro 1. Clasificación de los plaguicidas por su modo de acción (CICOPLAFEST 2004)

Sistémico	Al aplicarse en plantas o animales, se absorbe y traslada por su sistema vascular a puntos remotos del lugar en que se aplica y en los cuales actúa
De ingestión	Debe ser ingerido por el organismo plaga para su acción efectiva
De contacto	Actúa principalmente al ser absorbido por los tejidos externos del organismo plaga
Fumigante	Se difunde en estado gaseoso o de vapor y penetra por todas las vías de absorción
Repelente	Impide que las plagas ataquen
Desfoliante	Causa la caída del follaje de las plantas

Por su concentración los plaguicidas se dividen en técnicos y formulados. El primero es la máxima concentración del ingrediente activo obtenida como resultado final de su fabricación, del cual se parte para preparar un plaguicida formulado; por su estado físico el plaguicida técnico puede ser sólido, líquido y gaseoso. El formulado es la mezcla de uno o más plaguicidas técnicos, con uno o más ingredientes inertes, cuyo objeto es dar estabilidad al ingrediente activo o hacerlo útil y eficaz; constituye la forma usual de los plaguicidas (NOM-045-SSA1-1993).

Los plaguicidas también se clasifican de acuerdo a la plaga que controlan, por ejemplo: acaricida, avicida, funguicida, herbicida, insecticida, nematocida y rodenticida (COFEPRIS 2004), ó al uso al que se destinan: agrícolas, forestales, urbanos, de jardinería, pecuarios, domésticos o industriales (CICOPLAFEST 2004).

Por su composición Química los ingredientes activos pueden ser como se aprecia en el cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación de los plaguicidas por su composición química (COFEPRIS 2004).

Plaguicidas biológicos	Se llama así a los virus, microorganismos o derivados de su metabolismo, formulados como insumos, que pueden controlar a una plaga en particular.
Compuestos inorgánicos	Carecen de carbono; se consideran los derivados de cobre, azufre, zinc y aluminio.
Compuestos orgánicos	Los compuestos orgánicos sintéticos utilizados como plaguicidas pertenecen a distintos grupos* o familias químicas. Cada uno de éstos grupos tienen algunas características comunes y en cualquiera de ellos puede haber insecticidas, acaricidas, funguicidas, herbicidas u otros tipos de plaguicidas.

*Los grupos o familias de compuestos que se consideran son: Organoclorados, **Organofosforados**, Carbamatos, Piretroides, Tiocarbamatos, Ftalimidas, Carboxamidas, Carboximidaz, Guaninas y Naftoquinonas, Organoestánicos, Orgánicos con azufre, Clorfenoxi, Dinitrofenoles, Derivados de la urea, Triazinas, Derivados de los ácidos tricloracético y tricloropicolínico y Bipiridílicos.

Los plaguicidas que persisten más tiempo en el ambiente, tienen mayor probabilidad de interactuar con los diversos elementos que conforman los ecosistemas. La persistencia se define como la capacidad de cualquier plaguicida para retener sus características físicas, químicas y funcionales en el medio en el cual es transportado o distribuido,

durante un período limitado después de su emisión. Con base en la persistencia los plaguicidas se clasifican como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su persistencia (INE 2003)

PERSISTENCIA	TIEMPO
Ligeramente persistente	Menor de 4 semanas
Poco persistente	De 4 a 26 semanas
Moderadamente persistente	De 27 a 52 semanas
Altamente persistente	De 1 a 20 años
Permanentes	Mayor de 20 años

1.2 Movilidad de los plaguicidas en el ambiente

Para entender como se comporta un plaguicida en el ambiente se necesita conocer cierta información sobre las propiedades físico-químicas de la molécula y su mecanismo de transporte, así como las características ambientales del lugar en el que se le encuentra. Con la gran complejidad y cantidad de datos requeridos, no siempre se puede predecir exactamente lo que ocurrirá con una partícula de plaguicida cuando ésta ha entrado en el ambiente. A pesar de lo complejo del problema, se han logrado determinar ciertas características físico-químicas cuantificables, como es la solubilidad, presión de vapor, la tendencia de un plaguicida a volatilizarse, o el coeficiente de adsorción suelo/agua. Con esta información es posible predecir el lugar donde puede encontrarse un plaguicida en altas concentraciones. Por otra parte, su molécula no permanece intacta por tiempo indefinido en el ambiente, ya que con el tiempo sufre una degradación influenciada por microorganismos, actividad química, pH, clima y contenido de materia orgánica del suelo, entre otros (FAO 1997, INE 2004).

1.2.1 Mecanismos de transporte ambiental de los plaguicidas

Involucra la forma en que se mueven los plaguicidas en el ambiente, desde la fuente emisora hasta los puntos donde existe exposición para el ser humano o biota (Figura 1). El transporte ambiental incluye los movimientos de gases, líquidos y partículas sólidas dentro de un medio determinado y a través de las interfaces entre el aire, el agua, sedimento, suelo, plantas y animales.

La difusión es el movimiento de moléculas debido a un gradiente de concentración. Este movimiento es al azar pero trae como consecuencia el flujo de materiales de zonas más a menos concentradas. Para medir la difusión de un compuesto en el suelo hay que considerar la interacción conjunta de parámetros tales como la porosidad, los procesos de adsorción, la naturaleza del compuesto, etc. Lixiviación es el parámetro más importante de evaluación del movimiento de una sustancia en el suelo, se encuentra ligada a la dinámica del agua, a la estructura del suelo y

a factores propios del plaguicida. Los compuestos aplicados al suelo tienden a desplazarse con el agua y lixiviar a través del perfil, alcanzando las capas más profundas y el acuífero, que en consecuencia resulta contaminado. La evaporación es la tasa de pérdida de un plaguicida por volatilización que depende de su presión de vapor, de la temperatura, de su volatilidad intrínseca y de la velocidad de difusión hacia la superficie de evaporación (FAO 1997, INE 2004, Banks *et al.* 2005)

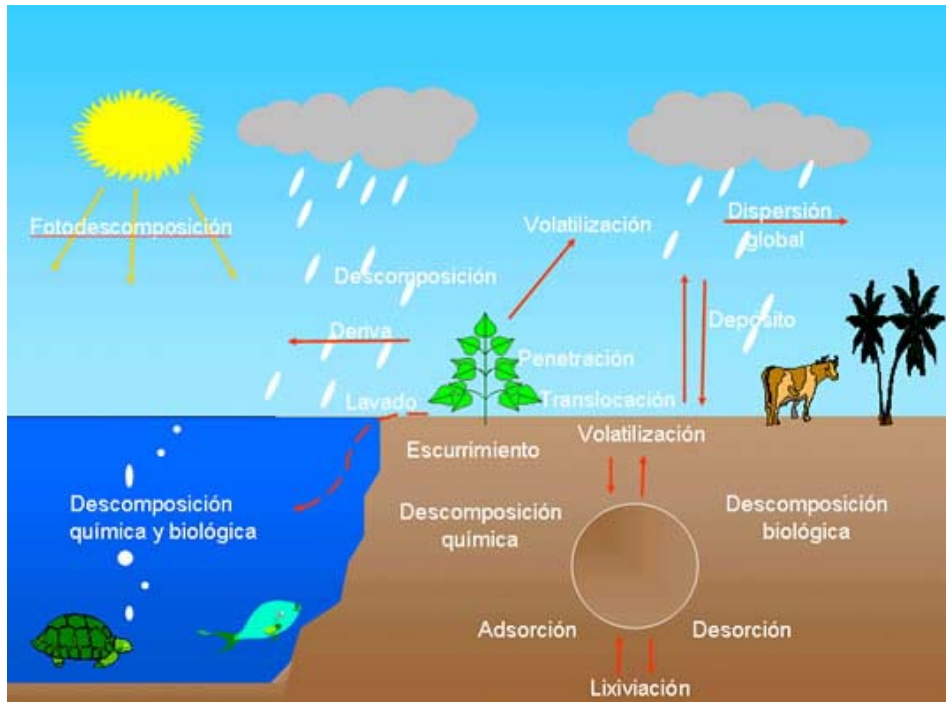


Figura 1. Posibles mecanismos de transporte y transformación de plaguicidas en el ambiente. Fuente: INE 2004

1.2.2 Metabolismo y degradación de los plaguicidas

La vida media de un plaguicida se define como el tiempo (en días, semanas o años) requerido para que la mitad del mismo se descomponga en productos de degradación después de una aplicación. Como se muestra en la Figura 2, la descomposición depende de varios factores incluidos la temperatura, el pH del suelo, clima, exposición del plaguicida a la luz (fotólisis), agua (hidrólisis), oxígeno y a la biodegradación (INE 2004, CICOPAFEST 2004). Las enzimas de plantas o animales son las responsables de un alto rango de biotransformaciones y muchas de las cuales se encuentran determinadas por enzimas específicas.

El metabolismo de los plaguicidas en los animales es un mecanismo importante en virtud del cual los organismos se protegen frente a los efectos tóxicos de las sustancias xenobióticas (productos extraños) que se encuentran en su suministro alimentario (FAO 1997). El metabolismo de xenobióticos generalmente ocurre en dos fases: la I o de funcionalización, incluye reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis y se caracteriza por introducir grupos funcionales específicos a las moléculas lipofílicas, ya que este proceso es requerido para que actúen las enzimas de la fase II. Dentro del grupo de enzimas de fase I se encuentran la Flavin-monooxigenasa y los Citocromos P450 (Escobar-García 2003). En fase II o de conjugación se realizan reacciones de gluconidación, sulfatación, conjugación con glutatión, metilación y acetilación. En ésta también se incorporan a las sustancias que se están metabolizando, moléculas hidrofílicas lo cual las hace aún más polares y pueden ser más fácilmente eliminadas ya

sea por vía urinaria o biliar. Las reacciones de ambas fases son frecuentemente coordinadas, de manera que el producto de una reacción es el sustrato de la otra (Ioannides 2002, Escobar-García 2003).

El último paso de la biotransformación tanto en plantas como en animales, es la conjugación. No obstante, en los vegetales los conjugados son polimerizados y/o incorporados a sus componentes estructurales, puesto que no cuentan con sistemas excretores para su eliminación, abriendo la posibilidad de hacer daño a la propia planta, o bien solo almacenarlos hasta que al ser digeridas por los animales se libere en el tracto gastrointestinal o en los órganos de los mismos. Los productos pueden ser compartimentalizados en vacuolas, transferidos al espacio extracelular o a la pared, en donde pueden unirse a ligninas, taninos, pectinas y polisacáridos como la celulosa y el almidón, por lo cual se dice que las plantas son capaces de bioconcentrar agentes ambientales (Romero-Martínez 2003, Van Eerd *et al.* 2003).

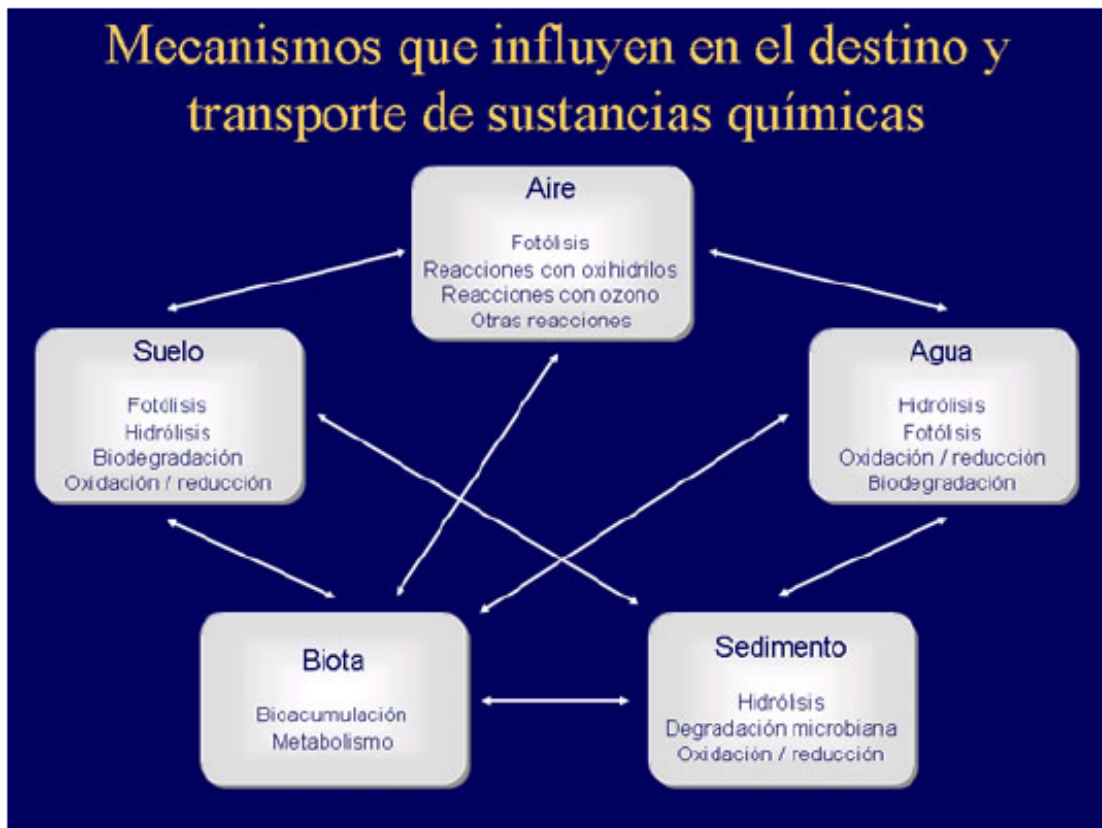


Figura 2. Tipos de procesos físico-químicos en el ambiente (Fuente: INE 2004).

1.3 Toxicología

La toxicología de los plaguicidas es un fenómeno complejo en el que intervienen, por parte de los diversos compuestos, su estructura molecular (relación estructura-actividad), sus propiedades fisicoquímicas, de las que depende su afinidad por sistemas biológicos específicos (toxicidad selectiva) y, de manera preponderante, la

dosis en que los humanos se exponen a los mismos (relación dosis-tiempo-respuesta). Es frecuente que los efectos tóxicos de los plaguicidas se potencien por los ingredientes inertes y aditivos, que en ocasiones pueden ser tanto o más dañinos que los ingredientes activos; así ocurre con los disolventes orgánicos de toxicidad reconocida. El que un efecto tóxico ocurra o no, dependerá de las características del agente, el ambiente y el huésped (Bolognesi 2003, CICOPAFEST 2004).

1.3.1 Evaluación de la toxicidad mediante la DL50

El método comúnmente empleado y avalado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para medir la toxicidad es la Dosis Letal 50 ó DL₅₀, que se define como la cantidad mínima de una sustancia, generalmente expresada en mg/kg, que es capaz de matar al 50% de una población de los organismos de prueba. El método original se ha modificado a través del tiempo para hacerlo más confiable y facilitar su manejo estadístico. Los resultados de DL₅₀ obtenidos para una sustancia dada, se extrapolan a los humanos y sirven de base para los sistemas de clasificación de la toxicidad. En general, la DL₅₀ evalúa la toxicidad aguda (FAO 1997, CICOPAFEST 2004)

Cuadro 4. Factores que contribuyen en la toxicología de plaguicidas (COFEPRIS 2004).

VARIABLE	CARACTERÍSTICAS A CONSIDERAR
Agente o compuesto	Tipo de agente de acuerdo con su clasificación química, propiedades físico-químicas, concentración, mezcla, frecuencia de exposición, etc
Ambiente	Humedad, tipo de suelo, velocidad de los vientos, altitud, etc.
Huésped	Estado funcional, enfermedades previas, enfermedades actuales, estado hormonal, etc.

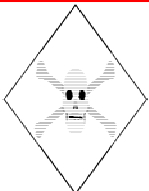
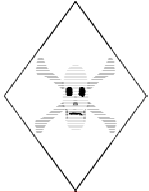
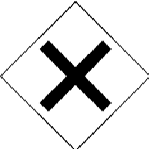
Es de importancia considerar la duración y la frecuencia de la exposición, lo que permite definir las posibilidades que aparecen en el cuadro 5.

Cuadro 5. Tipos de intoxicación (COFEPRIS 2004).

TIPO DE EXPOSICION	DEFINICIÓN
Aguda	Exposición a un agente tóxico durante menos de 24 horas
Subaguda	Exposición repetida durante menos de 30 días
Subcrónica	Exposición repetida por un lapso de 1 a 3 meses
Crónica	Exposición repetida por más de 3 meses

--	--

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto la clasificación de los plaguicidas en diferentes categorías de peligrosidad, con base en la DL₅₀ de producto formulado (Cuadro 6), sólido o líquido, en ratas expuestas por vía oral o cutánea. La Directriz sobre el etiquetado de plaguicidas de la FAO recomienda que las etiquetas de los productos incluyan frases de advertencia que indiquen el grado de peligrosidad, una banda de color diferente para cada uno y símbolos pictográficos para cada categoría (INE 2005a).

Categoría de la OMS	dl ₅₀ aguda (rata) de productos formulados				
	pictográfico	Vía oral		Vía dérmica	
Frase de advertencia		Sólido	Líquido	Sólido	Líquido
IA Extremadamente peligroso. "Muy tóxico"		5 ó menos	20 ó menos	10 ó menos	40 ó menos
IB Altamente peligroso. "Tóxico"		5-50	20-200	10-100	40-400
II Moderadamente peligroso. "Dañino"		50-500	200-2 000	100-1 000	400-4 000
II Ligeramente peligroso. "Cuidado"	—	500-2 000	2 000-3 000	Más de 1 000	Más de 4 000
IV Plaguicidas que parecen no representar peligro en condiciones normales de uso	—	Más de 2 000	Más de 3 000		

Cuadro 6. Clasificación de los plaguicidas formulados propuesto por la OMS (INE 2005).

Cuando el ingrediente activo produce daño irreversible a los órganos vitales, es altamente volátil, tiene resultado acumulativo en su efecto o en observaciones directas se detecta que es especialmente peligroso o significativamente alergénico para el hombre, el compuesto se colocará en la clase más estricta. En algunos casos

especiales (preparaciones de aerosoles y fumigantes), los valores de la DL50 oral y dérmica no deben emplearse como base de clasificación, siendo necesario, por lo tanto, utilizar otros criterios como son los niveles de concentración en el aire (Henaó *et al.* 1986). La clasificación toxicológica de los plaguicidas según los criterios antes mencionados más la categoría toxicológica de acuerdo con los colores según la NOM-045-SSA1-1993 se anotan en el cuadro 7.

Cuadro 7. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su toxicidad aguda (CICOPLAFEST 2004)

CATEGORIA	DL ₅₀ en mg/kg de masa corporal								CL50 por Inhalación Vapor mg/l Exposición: 1 h	
	AGUDA ORAL				AGUDA DÉRMICA					
	ESTADO FÍSICO				ESTADO FÍSICO					
	SÓLIDO		LÍQUIDO		SÓLIDO		LÍQUIDO			
	Más de	Hasta	Más de	Hasta	Más de	Hasta	Más de	Hasta	Más de	Hasta
I Extremadamente tóxicos	-	5.0	-	20.0	-	10.0	-	40.0	-	0.5
II Altamente tóxicos	5.0	50.0	20.0	200.0	10.0	100.0	40.0	400.0	0.5	2.0
III Moderadamente tóxicos	50.0	500.0	200.0	2000.0	100.0	1000.0	400.0	4000.0	2.0	10.0
IV Ligeramente tóxicos	500.0	-	2000.0	-	1000.0	-	4000.0	-	10.0	-

1.4 Efectos adversos de los plaguicidas

Los plaguicidas se incluyen en una gran variedad de contaminantes orgánicos que tienen efectos ecológicos. Las distintas categorías tienen diferentes tipos de repercusión en los organismos, por lo que es difícil hacer afirmaciones generales.

Uno de los efectos adversos que comparten todas las categorías es la resistencia, ya que con el uso continuo de productos químicos se eliminan los organismos no resistentes y solamente subsisten los individuos bien adaptados a vivir en el medio modificado por el hombre. En poblaciones que no han sido previamente expuestas a productos químicos, el desarrollo de la resistencia es relativamente lento; pero la frecuencia de genes resistentes, aumenta rápidamente en una población que por varias generaciones ha sido repetidamente expuesta a estos compuestos (Restrepo 1992, FAO 1997).

En 2001 la FAO ya reconocía que las grandes cantidades de residuos químicos tóxicos procedentes de plaguicidas no utilizados o caducos representaban una amenaza continua y cada vez más grave para las personas y el ambiente. Los plaguicidas obsoletos ó vencidos son los restos que han quedado de las campañas de control de plagas y se han acumulado porque son productos prohibidos por razones sanitarias o ambientales y nunca fueron retirados o eliminados. La condición en la que se encuentran éstos va desde la de los productos bien conservados hasta la de los que se han derramado de los envases metálicos corroídos y de otros tipos de recipientes, infiltrándose y contaminando el agua y los suelos y de esta forma envenenando zonas muy vastas al grado de inutilizarlas para la agricultura. En 2004 la FAO estimó que en Ucrania había alrededor de 19,500 toneladas de sustancias envejecidas, en Macedonia 10.000 toneladas, en Polonia 15,000 toneladas y en Moldavia 6.600 toneladas. En Asia las existencias alcanzaban las 6,000 toneladas, sin incluir a China, donde se supone que el problema de los residuos de plaguicidas está muy difundido y en el Oriente Medio y América Latina el volumen calculado fue de 10,000 toneladas (FAO 2004a). En 2005 la FAO publicó una noticia mucho más preocupante “La magnitud del problema de los residuos químicos tóxicos procedentes de los pesticidas obsoletos almacenados en América Latina es mucho mayor de lo estimado anteriormente, ya que se considera que la cantidad de plaguicidas en desuso se encuentra entre 30, 000 y 50, 000 toneladas” (FAO 2005b).

Hay dos convenios internacionales cuyo objetivo es reducir los aspectos negativos de los plaguicidas para la salud y el ambiente. El *Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes*, creado para reducir y eliminar el uso de 12 de estas sustancias, de las cuales nueve son plaguicidas, y el *Convenio de Rotterdam sobre el Procedimiento de Consentimiento Fundamentado Previo Aplicable a Ciertos Plaguicidas y Productos Químicos Peligrosos Objeto de Comercio Internacional*. Éste último facilita el suministro de información sobre una amplia variedad de sustancias que pueden ser peligrosas, y da a los países importadores la capacidad de decidir si quieren o no recibir futuras importaciones de determinados productos (FAO 2004b).

La biomagnificación es otro efecto adverso y se define como: el proceso por el cual los plaguicidas pueden aumentar su concentración de manera progresiva a lo largo de las cadenas tróficas, a un grado tal que pueda ser tóxico para los organismos intermedios o de los últimos niveles de dicha cadena (CICOPLAFEST 2004), para lo cual el plaguicida debe tener las siguientes características: alta movilidad, persistencia y debe ser soluble en grasa. Entre

mayor sea la persistencia de una sustancia estará más tiempo disponible en el medio para que algún organismo la ingiera, asimismo cuando tiene alta movilidad aumenta la posibilidad de entrar en contacto con organismos que eventualmente puede absorberlas. Si a lo anterior aunamos el hecho de que la sustancia se puede acumular en tejidos grasos por su gran solubilidad en lípidos, la cantidad en el organismo será elevada y tenderá a almacenarse en el siguiente organismo de la cadena trófica, sumándose además a la carga ya depositada de esta sustancia absorbida por una vía diferente (CICOPLAFEST 2004, Sankaramakrishnan *et al.* 2005)

Los plaguicidas están diseñados para controlar muchos insectos nocivos para los cultivos, sin embargo hay especies que son benéficas para el ser humano y cuyas poblaciones son afectadas debido al uso indiscriminado de plaguicidas. Un ejemplo de estos son las abejas cuyo papel como polinizadores son importantes tanto para la diversidad silvestre como para la actividad económica. Algunos artrópodos también son útiles y dentro de este grupo destacan los arácnidos que tienen un papel significativo como controladores naturales de las poblaciones de insectos (FAO 1997, Hernández *et al.* 1998, Van Eerd *et al.* 2003, CICOPLAFEST 2004).

La intoxicación por plaguicidas es un problema muy serio que afecta principalmente a países en vías de desarrollo. La intoxicación aguda se presenta particularmente en áreas rurales dedicadas a la agricultura donde los productos químicos son utilizados ampliamente y de forma pobremente controlada, aunque también pueden ocurrir por ingerir alimentos contaminados, por accidentes domésticos, por intento de suicidio, por exposición exhaustiva en el área laboral o por ataques terroristas (FAO/OMS 2002b, Roberts *et al.* 2003, Sogorb *et al.* 2004, London *et al.* 2005). Entre las manifestaciones clínicas de intoxicación aguda más frecuentes se encuentran dolor de cabeza, mareos, debilidad, falta de coordinación, temblores, náusea, diarrea, salivación y miosis, que pueden complicarse con broncoconstricción, edema pulmonar y parálisis respiratoria, dependiendo de la gravedad de la intoxicación (Reigart y Roberts 1999, Palacios-Nava *et al.* 1999, Sogorb *et al.* 2004).

Existen muchos problemas para identificar las intoxicaciones crónicas, ya que aunque son habitualmente objeto de seguimiento específico, no suelen ser identificadas correctamente. En estos casos el monitoreo biológico es un elemento importante, ya que se realizan evaluaciones y mediciones de agentes químicos y/o sus metabolitos para determinar la exposición y el riesgo a la salud con base en métodos validados (De Blaquiére *et al.* 2000, Sogorb *et al.* 2004).

Los plaguicidas representan un grupo al que se le atribuye un amplio rango de consecuencias adversas para la salud humana, incluyendo los efectos genotóxicos (Bolognesi 2003). Estudios epidemiológicos han correlacionado la exposición a plaguicidas organofosforados con problemas dérmicos, del sistema nervioso (polineuropatías,

desorden neuropsiquiátrico y enfermedad de Parkinson), algunos tipos de cáncer como leucemia y linfoma no Hodgkin (Sierra-Torres *et al.* 1998, Palacios *et al.* 1999, Orozco-De Los Ríos *et al.* 2005)

Todas las personas están en contacto inevitablemente con los plaguicidas, ya sea por contaminación ambiental o por exposición ocupacional. La población en general se considera que entra en contacto con las moléculas por ingestión de residuos o por productos de degradación biológica presentes en alimentos o agua y los individuos que se consideran de alta exposición son los trabajadores agrícolas, fumigadores sanitarios, trabajadores de industrias formuladoras y soldados (Buratti *et al.* 2003, Sogorb *et al.* 2004).

1.5 Plaguicidas en México

A pesar de que México todavía cuenta con importantes recursos forestales y marinos, gran variedad de suelos y alta diversidad de especies y ecosistemas, el modelo de desarrollo y las políticas públicas seguidas en los últimos años han jugado un papel desafortunado, contribuyendo a la pérdida de este valioso capital natural. Las únicas estimaciones en torno a la generación de residuos peligrosos (RP) en México proceden de las propias empresas que los producen. Por normatividad, éstas deben identificar si los desperdicios que originan son peligrosos o no, en cuyo caso deben dar parte a las autoridades respectivas. Debido a las características inherentes a este proceso, una cantidad indeterminada de generadores se mantienen al margen del mismo, de manera que mientras 27 280 empresas manifestaron en 2002 la generación de RP, una cantidad entre tres y diez veces superior no lo hizo. Dentro del grupo de RP se encuentran los plaguicidas y fertilizantes (SEMARNAT 2002). En 2004 la Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM) y Greenpeace pidieron a la Secretaría de Salud y a SEMARNAT que atendieran con rigor sus obligaciones respecto al uso y manejo de plaguicidas, debido a que los ciudadanos de Juchitepec, estado de México, solicitaron la clausura de la planta Artivi, S.A de C.V por operar en esa localidad infringiendo múltiples disposiciones y afectando la salud de la población ya que denunciaron que la empresa se instaló hace 10 años con el registro de una planta procesadora de alimentos cuando en realidad se dedicaba a la formulación de plaguicidas, además de desechar sus residuos en el drenaje y el basurero municipal, violando las disposiciones de las licencias que actualmente tiene.

Palacios-Nava y Moreno-Tetlacuilo (2004) describen ampliamente el proceso laboral agrícola en el estado de Sinaloa y reporta: "Año tras año se integran hombres, mujeres y niños como asalariados. En la actividad agrícola se distinguen diferentes etapas: siembra, tutorado, deshierbe, corte, recolección, empaque y aplicación de plaguicidas. Las mujeres pueden emplearse en cualquiera de estas etapas, excepto en la aplicación de plaguicidas, actividad que realizan exclusivamente los hombres. En teoría, los que tienen un mayor contacto con estas sustancias son los aplicadores. No obstante, la mayoría de ellos usan aditamentos que les permiten protegerse parcialmente durante la aplicación de las sustancias y una vez desarrollado su trabajo se alejan del área en donde la 0aplicaron, para rociar otro sembradío. A diferencia de ellos, el resto de trabajadores reingresan a su espacio de trabajo 5 ó 10 minutos después de que las sustancias fueron esparcidas, empleando como equipo de protección un sombrero y un paliacate".

La aplicación aérea de plaguicidas representa otra serie de problemas tanto para el que proporciona el servicio como para el que lo recibe. Las dificultades comienzan con la poca existencia de pistas pavimentadas y sin disposición de áreas adecuadas para el llenado y lavado de aviones. Generalmente los aviones reciben poco mantenimiento, ya que es frecuente que tengan fugas en las válvulas aspersoras provocando variación en el tamaño de gota. En algunas ocasiones los aviones recorren grandes distancias para llegar a los lugares de fumigación, por lo que para no regresar a recargar el producto aterrizan en caminos de terracería laterales a los canales de riego y de estos toman el agua para hacer las mezclas de plaguicidas o para lavar los tanques. Pocos son los pilotos que cuentan con licencia como aplicadores aéreos, por lo que no es de extrañarse que debido a su inexperiencia los aterrizajes concluyan en accidentes además, de realizar mal la tarea de fumigación (Restrepo 1992).

Se estima que para 1995, en México ya se utilizaban 54,600 toneladas de plaguicidas y sus ventas sobrepasaron los 2,200 millones de pesos (Palacios-Nava *et al.* 1999). Actualmente los plaguicidas empleados con mayor frecuencia en la agricultura son los organofosforados y los carbamatos (González-Farías *et al.* 2002) y ambos pueden producir intoxicaciones agudas o crónicas (Palacios-Nava y Moreno-Tetacuilo 2004). En México al igual que en el ámbito internacional, el conocimiento sobre los efectos crónicos de los plaguicidas es muy limitado (Ortega *et al.* 1994) y en este sentido el estudio de los plaguicidas organofosforados resulta de suma importancia (Sierra-Torres *et al.* 1998)

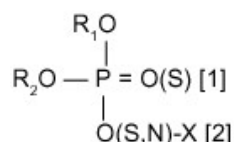
Un ejemplo que evidencia la gravedad del problema en nuestro país ocurrió en 2005 al ingresar un campesino al Hospital General de Puebla, quien de forma accidental ingirió Metil Paration, y ocho trabajadores del lugar (enfermeras y médicos que atendieron al paciente) presentaron síntomas de intoxicación al no tomar las medidas de seguridad necesarias, provocando que tanto personal como pacientes fueran desalojados y trasladados a otro hospital por elementos del cuerpo de bomberos, Cruz Roja y Protección Civil Municipal (El Universal de Puebla 2005). El Metil Paration está involucrado en gran número de intoxicaciones en México desde 1962 (Restrepo 1992) y a pesar de ser prohibido y restringido en muchos países debido a los resultados de su análisis, en México se le dispone de forma factible.

1.6 Compuestos Organofosforados y su biotransformación

La química orgánica del fósforo inicia en 1820 cuando Lassaigne estudia por primera vez las reacciones del alcohol con el ácido fosfórico. En 1854 Clermont prepara pirofosfato de tetraetilo (TEPP), aunque las poderosas propiedades insecticidas de este compuesto no se descubrieron sino hasta ochenta años después. Entre 1930 y 1940 grupos guiados por Sanders en Inglaterra y Gerhard Schrader en Alemania produjeron varios compuestos altamente tóxicos. Sanders elaboró el primer insecticida comercial "Dimefox" y Schrader desarrolló a partir de la Segunda Guerra Mundial los gases de guerra, conocidos como "gases nerviosos", entre los que se encuentran el

Sarin, Tabun y Soman (Cremllyn 1989, Cope *et al.* 2004). La Organización para la Prohibición de Armas Químicas ha reportado la existencia de miles de toneladas de estos “gases nerviosos”, los cuales se sintetizan de una forma relativamente fácil y disponible. El Sarin se utilizó con propósitos terroristas en Matsumoto (1994) y en Tokio (1995) y se considera que las tropas aliadas lo emplearon durante 1981 y 1988 en la Guerra de Golfo (OMS 2003, Sogorb *et al.* 2004). Sin embargo la aplicación más relevante de los organofosforados se encuentra fundamentalmente en la agricultura en donde constituyen un grupo muy amplio de compuestos de síntesis, son empleados principalmente como insecticidas y acaricidas, y en menor grado como herbicidas y fungicidas. Se usan en el control de plagas en interiores y jardines, en prácticas veterinarias y como control químico en la lucha contra vectores de enfermedades (Reigart y Roberts 1999, Sams *et al.* 2000, Sogorb *et al.* 2004).

Los compuestos organofosforados son derivados del ácido fosfórico. Su fórmula estructural general se caracteriza por la presencia de tres funciones éster y presenta un átomo de fósforo unido por un doble enlace a un átomo de oxígeno o azufre [1].



R_1 y R_2 son radicales alquilo, generalmente metil, etil o isopropil. El grupo X o grupo saliente [2] es característico de cada especie química, siendo frecuentemente un radical arilo que suele contribuir de forma importante a sus propiedades físicas y químicas y biológicas (Cocker *et al.* 2002, Costa *et al.* 2005)

Actualmente los plaguicidas organofosforados son ampliamente utilizados por su baja persistencia y bioacumulación en los organismos, aunque los niveles dependen de la formulación, estado climático y el método de aplicación, entre otros (Sogorb *et al.* 2004, Sankaramakrishnan *et al.* 2005).

Existen muchos compuestos organofosforados, los tipos más importantes son: fosfatos, fosfortoatos, fosforoditioatos, fosforoamidatos, fosfonatos y pirofosfatos (Henaó *et al.* 1986). Se trata de sustancias, en general, marcadamente apolares, aunque con grandes diferencias de un compuesto a otro (Reigart y Roberts 1999). Desde el punto de vista biológico tienden a disolverse en grasas ya que necesitan traspasar el exoesqueleto de los insectos (Cocker *et al.* 2002). Por tal motivo, la piel, puede constituir una importante vía de entrada, aunque también ingresan al organismo por vía respiratoria, digestiva y conjuntiva. Algunos pueden ser eliminados sin la vía metabólica y en la mayoría de los casos son de rápida degradación (Sogorb *et al.* 2004). La vida media de los organofosforados y sus productos de biotransformación es relativamente corta (horas a días), su estabilidad depende del pH del medio; a pH fuertemente alcalino se descomponen, lo que puede ser utilizado para destruirlos y los metabolitos

resultantes son eliminados principalmente en orina (Sogorb *et al.* 2004). El empleo y estudio de plaguicidas organofosforados (POF) incrementó en paralelo al decremento del uso de los plaguicidas organoclorados debido a la prohibición de estos, un ejemplo es el DDT (Cho *et al.* 2000, Ballesteros *et al.* 2004). Los POF son la clase de compuestos que comúnmente están involucrados en intoxicaciones o envenenamientos (Mara 2000, Wesseling *et al.* 2005). La cantidad de intoxicaciones por POF se estima en 3 millones por año, y el número de muertes oscila entre 200 000 y 300 000 (Eyer 2003, Sogorb *et al.* 2004).

1.6.1 Biotransformación de compuestos organofosforados

El metabolismo de los organofosforados sigue en general las dos fases habituales de desintoxicación de xenobióticos en el organismo, las denominadas fase I y II (Jokanovic 2001).

Las reacciones de biotransformación de xenobióticos en fase I adicionan un grupo polar por ejemplo: hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), tiol (-SH) ó amino (-NH₂), el cual es introducido a la molécula a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. En las reacciones de fase II los metabolitos polares son conjugados con sustratos endógenos tales como: glucorónidos, sulfatos, acetatos y aminoácidos, los cuales forman productos hidrosolubles que pueden ser secretados por la orina (Jokanovic 2001).

Paradójicamente, en ocasiones, el organofosforado requiere que se metabolice antes de convertirse en un compuesto biológicamente activo, y por lo tanto nocivo para el organismo. Solamente la mitad de los compuestos organofosforados, con enlace P=O pueden interactuar con la acetilcolinesterasa (ACE), los compuestos con enlace P=S (fosforotioatos) son débiles inhibidores de la ACE y necesitan ser bioactivados por sus oxígenos análogos (Hernández *et al.* 1998, Sams *et al.* 2000, Costa *et al.* 2005). El metabolismo de estos compuestos ocurre principalmente por el sistema flavin-monooxigenasa y por las isoenzimas hepáticas (Citocromos P-450) (Sogorb *et al.* 2004).

Estas mismas enzimas contribuyen en la desintoxicación metabólica de algunos organofosforados (Figura 4) aunque otros pueden inactivarse por la conjugación con glutatión o ser hidrolizados por varias fosforotriesterasas como la carboxilesterasa y paraoxonasa (Costa *et al.* 2005).

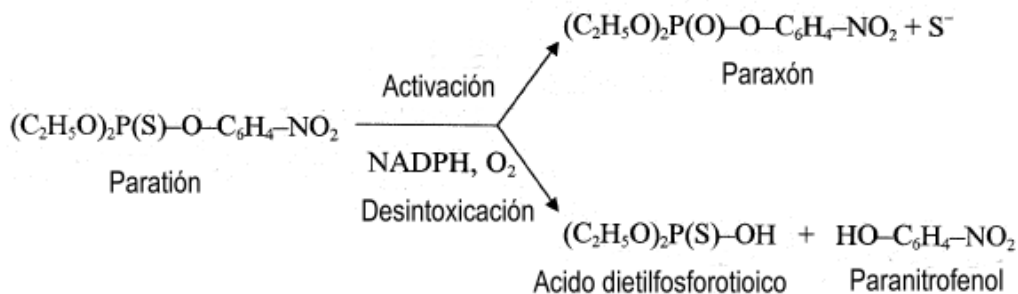


Figura 4. Activación metabólica y desintoxicación del Paratión (Fuente Jokanovic 2001).

La conversión de un compuesto exógeno en metabolitos más tóxicos se conoce como activación metabólica (Escobar 2003) y un ejemplo de dicha activación ocurre con el Paratión en la transformación a su forma reactiva Paraoxón, por el mecanismo de activación de Citocromos P-450 (Figura 4) (Jokanovic 2001).

Los Citocromos P-450 son una familia de hemoproteínas presentes tanto en eucariontes como en procariontes y actúan como mono-oxigenasas, ya que incorporan solo un átomo de O_2 molecular en el sustrato y tienen funciones específicas en la síntesis de compuestos endógenos (endobióticos) tales como hormonas esteroideas, vitaminas y ácidos grasos; también participan en el metabolismo de compuestos exógenos tales como fármacos, contaminantes ambientales y carcinógenos (xenobióticos) (Albores *et al.* 2001, Van Eerd *et al.* 2003, Escobar 2003). Los promutágenos son agentes químicos inocuos por sí mismos y se convierten en mutágenos cuando son transformados mediante activación metabólica (Cortés- Eslava 2002).

Muchos estudios sugieren que la mayoría de los carcinógenos químicos en el ambiente no son activos por sí mismos en reacciones con el ADN, no obstante inducen tumores sólo después de la activación metabólica por medio de una gran cantidad de enzimas del metabolismo que incluyen a los CYP 450 (Josephy *et al.* 1997, Oesch-Bartlomowich y Oesch 2004).

Los POF presentan propiedades alquilantes, ya que la presencia del fósforo y del carbono los hace susceptibles de reaccionar con nucleófilos y el ADN posee muchos y diversos sitios nucleofílicos susceptibles a ese tipo de reacción (Sierra-Torres *et al.* 1998).

Se ha comprobado la activación metabólica de algunos compuestos organofosforados en el sistema de mutación reversa de *Salmonella typhimurium*, los cuales son capaces de aumentar su efecto mutagénico con la adición de mezclas enzimáticas de hígado de rata (Sierra-Torres *et al.* 1998, Cho *et al.* 2000).

1.6.2 Mecanismos de acción tóxica de los Plaguicidas Organofosforados

Los organofosforados pueden causar principalmente dos efectos tóxicos y ambos están relacionados con su estructura química además de estar altamente influenciados por el metabolismo de éstos (Jokanovic 2001), el primer efecto es ampliamente conocido como “toxicidad aguda” y se describe de la siguiente forma: el impulso nervioso es transmitido a las sinápsis por medio de neurotransmisores químicos y la acetilcolina es uno de ellos. Cuando un impulso nervioso llega a la membrana presináptica, la acetilcolina es liberada de forma simultánea en la célula y el neurotransmisor se difunde a través de la fisura sináptica a la membrana postsináptica, donde se une a los lugares de recepción de la acetilcolina. La acetilcolina no debe permanecer en la sinapsis por mucho tiempo, ya que produciría una cadena de impulsos nerviosos. Por lo general, el neurotransmisor es eliminado por su reacción con la enzima ACE presente en la membrana postsináptica (Cremlyn 1989, Buratti *et al.* 2003).

Los plaguicidas organofosforados deben sus propiedades biocidas primeramente a la fosforilación de la enzima ACE (Reigart y Roberts 1999), ya que en su presencia no se puede catalizar la hidrólisis de acetilcolina a colina; en consecuencia hay acumulación de acetilcolina en las sinapsis (Cremlyn 1989). La acetilcolina actúa como neurotransmisor en diferentes puntos, el primero es en las neuronas preganglionares del sistema simpático y parasimpático (receptores nicotínicos), el segundo es en las neuronas postsinápticas del sistema parasimpático (receptores muscarínicos). Los otros puntos se observan en las sinapsis existentes entre neuronas del propio SNC y de las terminaciones motoras en los músculos estriados (voluntarios) y en las uniones neuromusculares, también con receptores nicotínicos (Ver figura 3) (Sogob *et al.* 2004, Costa *et al.* 2005).

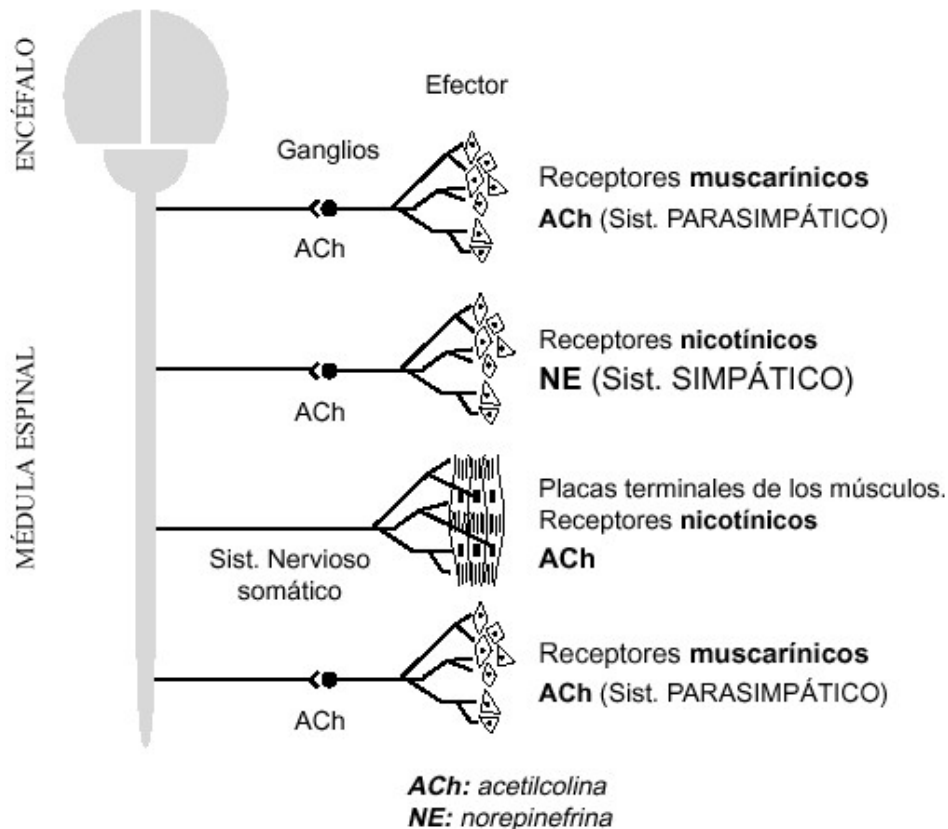


Figura 3. Sistema nervioso periférico con los principales neurotransmisores preganglionares y postganglionares, y tipos de receptores en los efectores

La acumulación de acetilcolina en cualquiera de los puntos que se citaron anteriormente, por inhibición de la actividad colinesterásica, trae como consecuencia la aparición de trastornos de mayor o menor intensidad y de naturaleza distinta. En general, se habla de efectos muscarínicos (cuando recuerdan los de la muscarina, el agente tóxico de la seta venenosa *Amanita muscaria*) o de efectos nicotínicos, (similares a los de la nicotina, el agente tóxico de la planta del tabaco, *Nicotiana tabacum*), según actúe sobre uno u otro de los referidos tipos de receptores (Ortega et al. 1994, Fortes et al. 2002, Sogorb et al. 2004).

El segundo efecto tóxico es la polineuropatía retrasada inducida por organofosfatos (OPIDP), que no está asociada a la inhibición de la acetilcolinesterasa sino a la inhibición de al menos el 70 % de la actividad esterasa del blanco neuropático (NTE), seguida algunas veces por una transformación irreversible de la enzima inhibida a su forma no reactiva. Los síntomas de OPIDP aparecen de 1 a 4 semanas después de la exposición con dolor muscular, calambres en las piernas y debilidad progresiva, pudiendo desembocar en ataxia y parálisis. Se tiene poca información de los mecanismos que ocurren posteriormente a dicha cadena de reacciones. Existe un tercer síndrome conocido como intermedio y ocurre de 1 a 4 días después de la exposición, se caracteriza por un ataque de debilidad muscular y dificultad para respirar con una recuperación completa de 4 a 21 días posteriores al evento, se desconocen los mecanismos que producen dichas características, pero se considera que tienen relación con la alteración de receptores nicotínicos y muscarínicos (Jokanovic 2001, Buratti et al. 2003, Costa et al. 2005).

1.7 Toxicología genética

Existen tres razones principales que justifican la preocupación por la exposición del hombre a los agentes mutagénicos. Primero, el incremento de riesgo de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores) que puede provocar el aumento en la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la existencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas. Tercero, el origen ambiental del cáncer (Mortelmans y Zeiger 2000, Bolognesi et al. 2003).

Los efectos de la interacción de los agentes químicos tóxicos con el material genético pueden dividirse en tres tipos: aneuploidías, clastogénesis y mutagénesis. La aneuploidía es la adquisición o pérdida de cromosomas completos. Clastogénesis es la pérdida, adición o rearreglo de una parte del cromosoma y mutagénesis es la pérdida, adición o alteración de una o varias pares de bases (Timbrell 1992).

1.7.1 Pruebas de genotoxicidad

Las pruebas de genotoxicidad son ensayos que evidencian alteraciones causadas al material genético, por agentes, tanto en células somáticas como germinales. Los ensayos de genotoxicidad utilizan gran número de sistemas biológicos dentro de los que se encuentran: virus, bacterias, hongos, cultivos de células eucariotas, plantas, insectos y mamíferos. Se han propuesto más de 200 ensayos de genotoxicidad y su importancia radica fundamentalmente en el valor predictivo de la información sobre los mecanismos de acción del compuesto.

La gran cantidad de productos nuevos que son lanzados anualmente al mercado dificulta su total evaluación empleando ensayos en roedores debido al costo y a su amplia duración. Ello orienta al empleo de ensayos a corto plazo los cuales, informan en poco tiempo acerca de los daños que producen dichas sustancias. Existe una amplia batería de ensayos a corto plazo utilizada en las regulaciones internacionales, las cuales pueden dividirse en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los primeros agrupan tanto los que utilizan microorganismos como cultivos celulares en general; mientras que los segundos se basan en la experimentación con organismos de laboratorio, principalmente plantas, insectos y mamíferos (Josephy *et al.* 1997).

Los ensayos a corto plazo permiten detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño primario a la estructura del ADN, transformaciones celulares, etc. (Cuadro 8).

Cuadro 8. Clasificación de los ensayos de corta duración.

Efectos de los agentes tóxicos	Características de los eventos detectables
Mutación génica	Cambios de nucleótidos por sustitución, adición o delección
Aberraciones cromosómicas	Cambios estructurales y/o numéricos en cariotipos normales
Daño al ADN	Interacciones del ADN con grupos heterogéneos, incluyendo aductos al ADN, ICH
Transformación morfológica	Cambios morfológicos en células blanco asociados con tumores

2. ANTECEDENTES

2.1 Ensayo de Ames

El ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* desarrollado por Ames y colaboradores en 1973, emplea como sistema biológico diversas cepas bacterianas mutantes aisladas a partir de cepas silvestres. Es uno de los métodos recomendados por diferentes laboratorios de investigación y dependencias gubernamentales de distintos países para la evaluación de mutagenicidad de productos químicos, fitosanitarios, farmacéuticos, alimentarios, muestras ambientales, etc. Esto refleja la flexibilidad intrínseca, el poder de dichos ensayos y el reconocimiento de los investigadores de un sistema sujeto a una validación intensa. La prueba es comúnmente utilizada como una primera evaluación de la actividad genotóxica, y detecta la actividad inductora de mutaciones puntuales (Josephy *et al.* 1997, OECD 2003).

2.1.1 Fundamentos de la prueba

El ensayo tiene sustento teórico en el hecho de que la mayoría de los compuestos mutagénicos conocidos son cancerígenos y las mutaciones puntuales provocadas en el organismo de prueba permiten detectar compuestos potencialmente dañinos (OECD 2003). Muchas enfermedades tienen su causa en las mutaciones puntuales y hay evidencia de que éstas en oncogénos y en genes supresores de tumores en las células somáticas, se encuentran involucradas en la formación de tumores en humanos y animales experimentales (Erdinger *et al.* 2004). El ensayo diseñado por Ames *et al.* (1973) tiene entre otras ventajas una alta especificidad, ya que cerca del 90% de los cancerígenos probados resultaron ser mutagénicos en la prueba, además del bajo costo y la obtención de resultados a corto plazo (McCann y Ames 1976).

El ensayo se basa en la reversión del genotipo his^- (auxótrofo) a his^+ (protótrofo) presente en diferentes cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* incapaces de sintetizar el aminoácido esencial histidina, debido a la mutación por sustitución de pares de bases o por corrimiento de marco de lectura y por tanto, sin la posibilidad de crecimiento y formación de colonias.

Nuevas mutaciones en el sitio de las mutaciones preexistentes, o en genes relacionados, pueden restaurar la funcionalidad del gen y por lo tanto permitirle la síntesis de histidina. Estas nuevas células mutadas pueden crecer en la ausencia de histidina y formar colonias, por esta razón el ensayo también se conoce como “ensayo de mutación reversa” (Josephy *et al.* 1997, Mortelmans y Zeiger 2000, OECD 2003).

Cada cepa revierte espontáneamente con una frecuencia característica recuperando la síntesis de histidina y este evento se puede visualizar sobre un medio uniforme de bacterias auxotróficas. Maron y Ames (1984) describen los valores de reversión espontánea para cada cepa y mencionan que la tasa de revertantes espontáneos por placa está en un margen de 10^5 a 10^8 células y que es independiente del número de bacterias sembradas. La cantidad de células auxotróficas (fondo de bacterias) no se cuantifica, pero se supone que el número no cambia ya que la concentración de histidina es constante.

La cepa TA98 tiene una mutación *hisD3052* que produce corrimiento del marco de lectura, dicha mutación se encuentra en el gen *hisD* que codifica para la enzima histidinol deshidrogenasa. La mutación *hisD3052* tiene la secuencia -CGCGCGCG- y está diseñada para detectar mutágenos que producen delección o inserción de pares de bases, ya que su presencia restablece el correcto marco de lectura; su reversión espontánea se encuentra entre 30 y 50 revertantes por placa (Maron y Ames 1984).

La cepa TA100 presenta una mutación *hisG46*, en el gen *hisG* que codifica para la primera enzima de la biosíntesis de la histidina, por una sustitución de pares de bases, que implica un cambio del aminoácido prolina -GGG- por leucina -CCC- ; la reversión se lleva a cabo por una transición o transversión en el codón mutante y su reversión espontánea se encuentra entre 120 y 200 revertantes por placa (Maron y Ames 1984).

Cuadro 9. Características de las cepas empleadas en el presente trabajo. Fuente: Espinosa-Aguirre *et al.* (1999) y Mortelmans y Zeiger (2000).

CEPA	GENOTIPO	EVENTO MUTACIONAL
TA98	<i>hisD3052, rfa, Δ(uvrB, chl y bio), pKM101 (Ap^r)</i>	Corrimiento de marco de lectura
TA100	<i>his G46, rfa, Δ(uvrB, chl y bio), pKM101 (Ap^r)</i>	Substitución de pares de bases

Las cepas tienen otras características que hacen a los microorganismos más sensibles a los mutágenos; por ejemplo: la mutación *rfa* que implica una pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos, que incrementa su permeabilidad a moléculas grandes, la delección del gen *uvrB*, que también incluye a los genes de la nitrato reductasa (*Chl*) y de biotina (*bio*), que elimina el sistema de reparación por escisión en el ADN (Maron y Ames 1984, Mortelmans y Zeiger 2000).

Las cepas poseen factores R o de resistencia a antibióticos que incrementan la capacidad propensa al error al introducir los genes *mucAB*, presentes en el plásmido pKM101, por lo que las cepas que tienen dicho plásmido asumirán elevada mutabilidad al ser expuestas a agentes que dañen el ADN (Maron y Ames 1984, Mortelmans y Zeiger 2000).

2.1.2 Metabolismo

En un principio el ensayo sólo aportaba información de compuestos con actividad mutagénica directa, (OECD 2003) ya que las bacterias tienen baja capacidad de transformación, siendo imposible detectar compuestos que necesitan ser metabolizados para expresar su efecto mutagénico. La situación fue resuelta con la adición de mezclas enzimáticas de hígado de rata (fracción S9), inducidas previamente por compuestos como aroclor ó fenobarbital y βnaftoflavona. De esta forma los compuestos son transformados en intermediarios electrofílicos que pueden interactuar con

macromoléculas celulares incrementando efectos de toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad (Mortelmans y Zeiger 2000, Oesch-Bartlomowich y Oesch 2004), por lo que es posible evaluar el potencial mutagénico de compuestos de actividad directa e indirecta.

Para la prueba de Ames son de particular importancia las enzimas de la fase I, ya que son las que se encuentran en la fracción enzimática S9, la cual contiene enzimas de las familias de citocromos P450 (sistema monooxigenasa), algunas de las cuales son capaces de activar a los plaguicidas organofosforados (Sierra-Torres *et al.* 1998, Cho *et al.* 2000).

2.1.3 Diseño experimental

Tanto en la prueba de Ames como en cualquier experimento de genética toxicológica, es indispensable emplear testigos. Estos son de dos tipos: históricos y concurrentes. Los concurrentes son los que se hacen en paralelo a los experimentos, aplicando los vehículos o disolventes (testigo negativo) utilizados en la reparación y administración del agente sujeto a prueba. Además se usa un testigo positivo, que está constituido por aquellas sustancias de referencia cuya respuesta produce un efecto conocido en el sistema de prueba. Los testigos históricos suelen estar conformados por los datos obtenidos a través del tiempo por un grupo de trabajo, con un determinado sistema de prueba (EPA 1998a, Frías-Villegas 2005).

Usualmente en el diseño se utilizan concentraciones múltiples, con al menos seis dosis en los ensayos preeliminares y tres en los ensayos definitivos. Cada dosis se prueba por triplicado aunque el uso de duplicados es aceptable cuando esté justificado, por ejemplo en el caso de escasez de muestra (EPAa 1998, OECD 1997).

2.1.4 Interpretación de resultados

En el ensayo de Ames se considera mutagénico un compuesto o muestra a analizar, cuando una determinada dosis, inferior a 5 mg/caja de Petri es capaz de duplicar el número de colonias bacterianas que se presentan en ausencia de dicho mutágeno. Estadísticamente otro criterio es la existencia de una curva de dosis-respuesta, calculada por el método de mínimos cuadrados (Maron y Ames 1984, OECD 1997).

Se considera tóxico un compuesto en el ensayo de Ames cuando al observar la placa en un microscopio (40x), el fondo bacteriano auxótrofo no se observa, y en su lugar se encuentran colonias muy pequeñas; a este evento se le denomina "pinpoint" o crecimiento de fondo (Mortelmans y Zeiger 2000)

A pesar de que se llegó a pensar que los ensayos *in vitro* podrían reemplazar a los bioensayos con roedores, ha sido demostrado que aunque se adicione un sistema de activación metabólica, no es posible imitar en buena parte el

metabolismo de los organismos, por lo que para clasificar una sustancia como mutagénica, aún no puede prescindirse de los ensayos *in vivo* (OECD 2003, Frías-Villegas 2005).

2.2 Efectos genotóxicos de los plaguicidas organofosforados

Existe evidencia de que en diversos sistemas de prueba los plaguicidas organofosforados pueden provocar diferentes daños a nivel celular, como inducir aberraciones cromosómicas y mutaciones puntuales (Gómez-Arroyo *et al.* 1985, 1987, 1988 y Cortes-Eslava *et al.* 2001,2002).

De la misma forma se ha comprobado la activación metabólica de algunos plaguicidas organofosforados en el sistema de mutación reversa de *Salmonella typhimurium*, los cuales son capaces de aumentar su efecto mutagénico con la adición de mezclas enzimáticas de hígado de rata (Sierra-Torres *et al.* 1998, Cho *et al.* 2000).

2.2.1 Folimat

Folimat es un plaguicida organofosforado formulado utilizado ampliamente en la agricultura en países en desarrollo y en particular en México, contiene como ingrediente activo Ometoato (Restrepo 1992), cuya estructura química se muestra en la figura 5. Ometoato es empleado en cultivos frutales, arroz, cereales y ornamentales, entre otros. Su modo de acción es por contacto e ingestión y tiene alta movilidad en el suelo, aunque es degradado rápidamente. Su uso está prohibido en Malasia y Panamá, y tiene empleo restringido en la Unión Europea y China (OPS/OMS/HEP/MASICA/PLAGSALUD 2001).

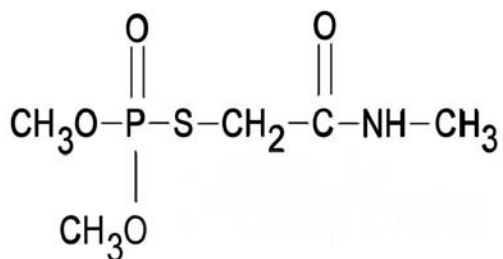


Figura 5. Fórmula estructural del Ometoato. Fuente: Anderson y Zhu (2004).

2.2.2 Foley

Es un plaguicida organofosforado formulado y contiene como ingrediente activo Metil Paratión y su estructura química se muestra en la figura 6. Metil Paratión es uno de los ingredientes activos más estudiados, se introdujo al mercado

desde 1949, tiene un amplio espectro insecticida y puede poseer alta persistencia en condiciones de baja temperatura y luz (Cremlyn 1989, Cho *et al.* 2000). Es uno de los plaguicidas más empleados en México (Albores *et al.* 2001) y se dispone de él de forma factible, a pesar de ser de uso restringido, prohibido y de estar incluido en la convención de Róterdam en múltiples países (OPS/OMS/HEP/MASICA/PLAGSALUD 2001, Wesseling *et al.* 2005). Este compuesto está involucrado en gran número de intoxicaciones en México desde 1962 (Restrepo 1992) y hasta la actualidad.

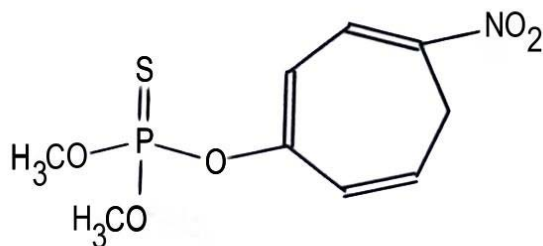


Figura 6. Fórmula estructural del Metil paratión. Fuente: Bello-Ramírez *et al.* (2000).

2.2.3 Gusatión

Es un plaguicida organofosforado formulado y contiene como ingrediente activo Metil azinfos, la estructura química se muestra en la figura 7. El Metil azinfos se ha reportado como un plaguicida altamente tóxico tanto para insectos como para mamíferos, es ligeramente persistente y tiene moderada movilidad en el suelo. Es de uso restringido en la Unión Europea y está prohibido en Belice (OPS/OMS/HEP/MASICA/PLAGSALUD 2001). En México es ampliamente utilizado (Restrepo 1992).

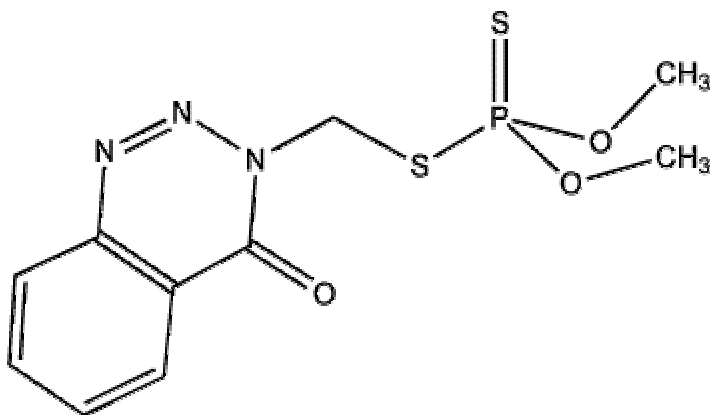


Figura 7. Fórmula estructural del Metil azinfos. Fuente: Buratti *et al.* (2003)

2.2.4 Tamarón

Es un plaguicida organofosforado formulado y contiene como ingrediente activo Metamidofos, la estructura química se muestra en la figura 8. Su modo de acción es sistémico, de contacto e ingestión. Tiene extrema movilidad en el suelo y es persistente en el agua y sedimento. Su uso está prohibido en Indonesia, Kuwait y Samoa y tiene empleo restringido en la Unión Europea, China, Belice y Sri Lanka (OPS/OMS/HEP/MASICA/PLAGSALUD 2001). Es uno de los ingredientes activos incluido en la convención de Róterdam, el cual requiere de consentimiento fundamentado previo (Wesseling *et al.* 2005).

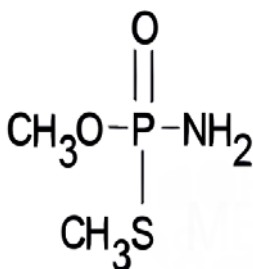


Figura 8. Fórmula estructural del Metamidofos.

3. OBJETIVOS

- Analizar actividad mutagénica directa producida por los plaguicidas formulados Folimat, Foley, Gusatión y Tamarón, utilizando como criterio de evaluación del efecto genético la mutación revertante de *Salmonella typhimurium*.
- Evaluar la capacidad metabólica de la fracción S9 en la activación de los plaguicidas organofosforados Folimat, Foley, Gusatión y Tamarón
- Observar el mecanismo por el cuál se producen las mutaciones puntuales empleando las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*.
- Analizar la presencia de efecto tóxico producido por los plaguicidas organofosforados Folimat, Foley, Gusatión y Tamarón considerando como criterio de evaluación el sistema de *Salmonella typhimurium*.

4. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que la fracción enzimática S9 activa metabólicamente diversos promutágenos y se espera que con la adición de dicha mezcla enzimática los plaguicidas Folimat, Foley, Gusatión y Tamarón expresen efecto mutagénico en el sistema de mutación reversa de *Salmonella typhimurium*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Plaguicidas empleados en la evaluación genotóxica

En el presente trabajo fueron evaluados cuatro plaguicidas organofosforados formulados de origen comercial: Folimat, Foley, Tamarón y Gusatión. Las características de cada uno se muestran en el cuadro 10.

Para conocer las dosis no tóxicas se hicieron ensayos preliminares y en el caso de mutagenicidad positiva se recurrió a la réplica de ensayos definitivos.

Cuadro 10. Características físico-químicas de los cuatro plaguicidas empleados.

	FOLIMAT (Bayer)	FOLEY (Dragón)	GUSATION (Bayer)	TAMARON (Bayer)
Ingrediente activo (I.A.)	Ometoato	Metil paratión	Metil azinfos	Metamidofos
Concentración (g / L)	800	720	200	600
Peso molecular del I.A.	213.2	263.22	317.1	141.12
Fórmula del I.A.	$C_5H_{12}NO_4PS$	$C_8H_{10}NO_5PS$	$C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$	$C_2H_6NO_2PS$
Clasif. Toxicol. OMS	1B	1B	1B	1B
Clasificación	Insecticida y acaricida	Insecticida y acaricida	Insecticida y acaricida	Insecticida y acaricida

5.2 Prueba de marcadores

Antes y durante el período en el que se realizaron los ensayos de mutación reversa se confirmó la presencia de marcadores genéticos en las cepas empleadas conforme a lo descrito por Maron y Ames (1984).

5.2.1 Confirmación del genotipo *his*

En una placa con agar que contenían histidina (0.1 M) y biotina (0.5 mM), se inocularon bacterias por estriado lineal y paralelo, provenientes de cultivos nocturnos de las cepas TA98, TA100 y LT2. Se repitió el proceso en las placas testigos que sólo contenían biotina (0.5 mM). Las placas se incubaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 h.

5.2.2 Confirmación del genotipo *rfa*

Se agregaron 100 μl de cultivo nocturno de la cepa LT2 a un tubo de 2 mL de agar de superficie con medio completo, se mezcló en un vortex y se vertió en placas con medio completo. Una vez solidificado el agar se colocaron 3 filtros estériles, a dos de ellos se les adicionó 10 μl de solución de cristal violeta (0.1%) y el tercero se utilizó como testigo. Se repitió el proceso para las cepas TA98 y TA100. Las placas se incubaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 h.

5.2.3 Confirmación del genotipo *UvrB*

En una placa con medio completo se inocularon bacterias por estriado lineal y paralelo provenientes de los cultivos nocturnos (TA98, TA100 y LT2). Se cubrió la mitad de la placa con papel aluminio y se irradió con luz ultravioleta empleando una lámpara de 15 W a 33 cm de distancia durante 8 segundos. Las placas se incubaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 h.

5.2.4 Confirmación del factor R

En una placa de agar con antibiótico (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se inocularon bacterias por estriado lineal y paralelo provenientes de los cultivos nocturnos (TA98, TA100 y LT2). Las placas se incubaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 h.

5.3 Ensayos de mutagenicidad

Los ensayos se realizaron según lo establecido por Maron y Ames (1983) utilizando el método de incorporación en placa. Las cepas empleadas para la evaluación del efecto mutagénico fueron la TA98 y TA100 (Cuadro 9) y los cuatro plaguicidas se probaron con y sin activación metabólica (S9) con ambas cepas. En cada ensayo se inoculó una solución de medio nutritivo Oxid No. 2 (ampicilina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con 200 μl de la reserva criogénica almacenada en nitrógeno líquido (-80°C) de la cepa a utilizar (TA98 o TA100), posteriormente se incubó por agitación (120 rpm) a 37°C en oscuridad durante 16 a 17 h. Concluida la incubación, en tubos con 2.5 mL de agar de superficie (histidina/biotina 50 nM, 45°C) se adicionaron 100 μl del cultivo bacteriano y 100 μl de la dosis a probar. En el caso de los ensayos indirectos (utilizando S9), se emplearon tubos con 2.0 mL de agar de superficie (histidina/biotina 50 nM, 45°C) adicionando 500 μl de mezcla S9, 100 μl de la dosis a probar y 100 μl del cultivo bacteriano. La mezcla se agitó en un vortex y se vertió en una placa con agar mínimo. Se realizaron triplicados para cada concentración. Todas las placas se incubaron a 37°C por 48 h efectuando posteriormente la cuantificación de colonias revertantes por medio de un contador manual.

5.3.1 Testigos empleados

En los ensayos sin actividad metabólica con la cepa TA98 se utilizó como testigo histórico 1-Nitropireno (1-NP) y como testigos concurrentes 100 μ l de cultivo nocturno bacteriano y 100 μ l de cultivo nocturno bacteriano más el disolvente (DMSO).

Para los ensayos con actividad metabólica con la cepa TA98 se empleó 2-Aminofluoreno (2-AF) como testigo histórico y como testigos concurrentes 100 μ l de cultivo nocturno bacteriano, 100 μ l de cultivo nocturno bacteriano más el disolvente (DMSO) y 100 μ l de cultivo nocturno bacteriano adicionando el disolvente (DMSO) y la mezcla enzimática S9.

Con la cepa TA100 se utilizó como testigo histórico Azida sódica (NaN_3) en los ensayos sin actividad metabólica y como testigos concurrentes 100 μ l de cultivo nocturno bacteriano y 100 μ l de cultivo nocturno bacteriano más el disolvente (H_2O).

En los ensayos con actividad metabólica (S9) con la cepa TA100 se empleó como testigo histórico 2-Aminofluoreno (2-AF) y como testigos concurrentes 100 μ l de cultivo nocturno bacteriano y 100 μ l de cultivo nocturno bacteriano adicionando el disolvente (DMSO) y la mezcla enzimática S9.

5.3.2 Preparación de la mezcla S9

La fracción enzimática se adquirió en el laboratorio de Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. La fracción se obtuvo a partir de hígado de ratas macho Wistar pretratadas con una mezcla de fenobarbital y β -Naftoflavona de acuerdo con lo reportado por Maron y Ames (1983).

En condiciones de esterilidad y baja temperatura (utilizando hielo) se preparó la mezcla S9 al 10% combinando las siguientes soluciones: 5 mL de amortiguador de fosfatos (0.2 M y pH 7.4), 200 μ l de la solución de cloruros ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4M y KCl 1.65M), 2 mL de solución NADP (1 M) con pureza de 95%, 2 mL de solución de glucosa-6-fosfato y 1 mL de fracción enzimática S9 (50.9 mg de proteína/mL), obteniendo un volumen final de 10.2 mL.

5.3.3 Evaluación tóxica

Se realizó con un microscopio óptico examinando con objetivo 10x y 40x el crecimiento o ausencia de fondo bacteriano en contraste con los testigos (Mortelmans y Zeiger 2000).

5.4 Análisis estadístico

Para obtener la potencia mutagénica (revertantes/ μ g) de cada ensayo se calculó la pendiente por medio del método de mínimos cuadrados y se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para realizar la prueba de hipótesis relativa a la pendiente y se empleó la prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer. Se obtuvieron los valores del coeficiente de correlación (r^2) que indica el grado de variación de Y que se observa en la ecuación de regresión. La comparación de los resultados de los ensayos con activación y sin activación metabólica se realizó aplicando "t" Student obteniendo la diferencia entre regresiones independientes de acuerdo con lo propuesto por Steel y Torrie (1995).

Los análisis estadísticos se efectuaron con Minitab para Windows versión 11.2, GraphPad InStat y Microsoft Excel 2000.

6. RESULTADOS

6.1 Prueba de marcadores

El requerimiento de histidina se evidenció por el crecimiento de estrías en placas con histidina en exceso (0.1 ml 0.1 M) y biotina (0.1 ml 0.5 mM), en comparación de las placas testigo que sólo contiene biotina como se muestra en las siguientes figuras.

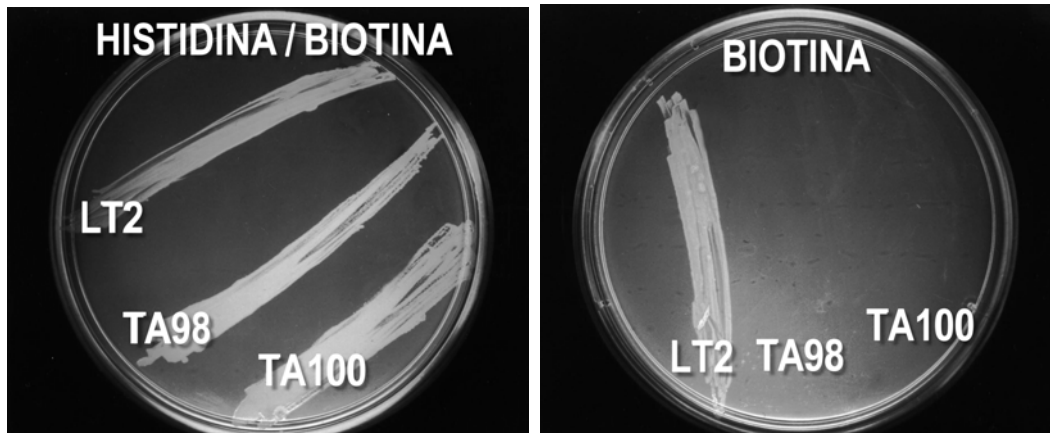


Figura 9. Confirmación del genotipo his-

La delección UvrB se evidencia por falta de crecimiento de estrías con placas con medio completo después de ser irradiadas con una lámpara de UV a 33 cm por 8 seg. La mitad a lo largo de las estrías se cubre previamente con papel aluminio y la parte no expuesta a la radiación presenta crecimiento. Se observó la presencia del plásmido pKM101 en la cepa TA98 que le confiere la característica de resistencia a ampicilina.

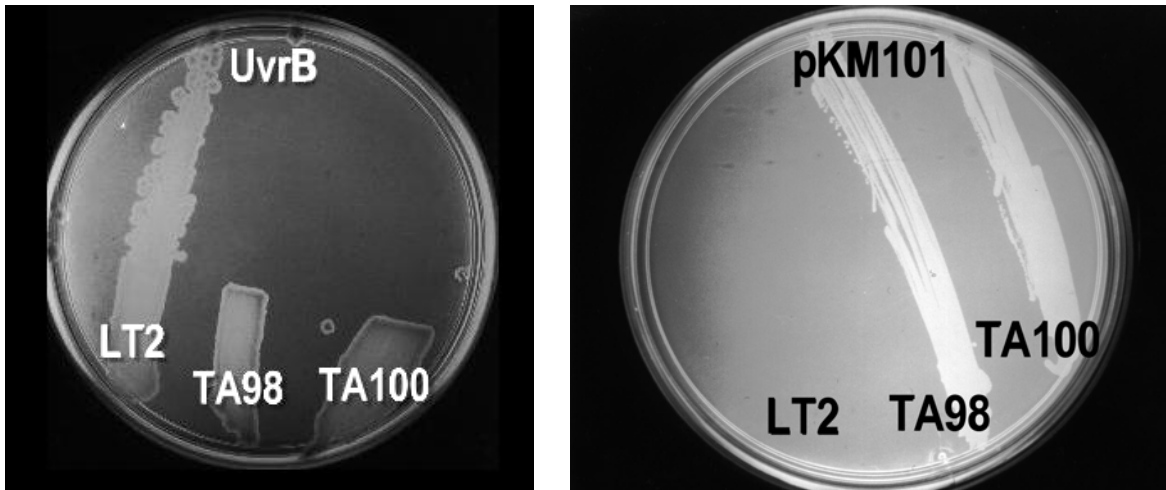


Figura 10. Confirmación de los genotipos UvrB⁻ y pKM101.

El marcador *rfa* se observó mediante la aparición del halo de inhibición de crecimiento en placas con medio completo donde se colocan 0.1 ml de cultivo de bacterias nocturno y un filtro estéril al que se adicionan 10 μ l de una solución de cristal violeta (1 mg/ml).

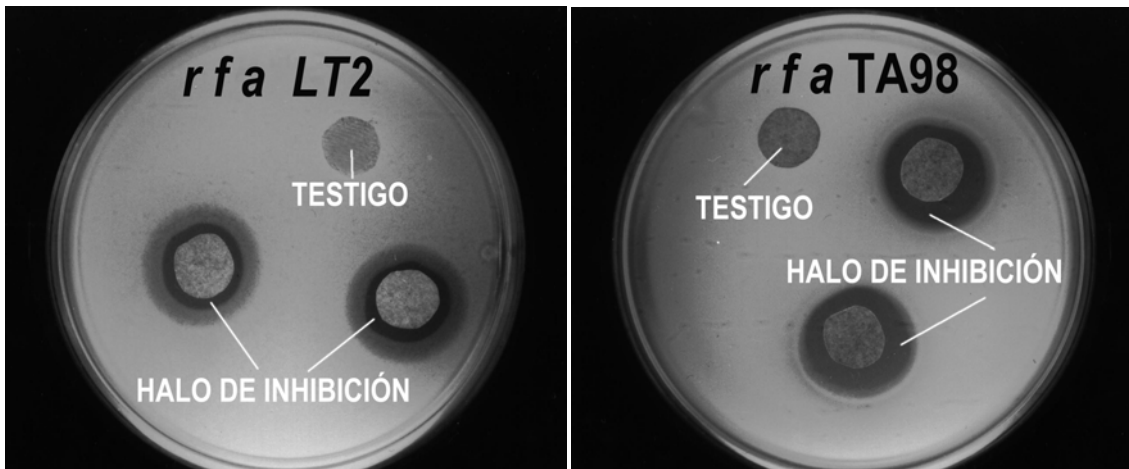


Figura 11. Confirmación del genotipo *rfa*



6.2 Evaluación genotóxica de Folimat

Este plaguicida no presentó comportamiento mutagénico o citotóxico de forma directa e indirecta con ninguna de las concentraciones examinadas con la cepa TA98 (Tablas 1 y 2).

Con la cepa TA100 se observó efecto mutagénico a partir de 1000 $\mu\text{g}/\text{placa}$ con y sin activación metabólica (Tabla 3) y (Figura 12), los resultados obtenidos en el análisis estadístico indican que existe diferencia significativa entre los tratamientos de forma directa e indirecta obteniendo $p < 0.05$ (Gráfica 3).

TABLA 1: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DE FOLIMAT CON LA CEPA TA98, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA, EN CONCENTRACIONES DE 0 A 1000 µg/ PLACA

TESTIGOS	Revertantes ^a
1-NP (0.08 µg) - S9	*124 ± 9.6
2AF (1 µg) +S9	*235 ± 23.3

Concentración (µg)	FOLIMAT (OMETOATO)	
	Sin S9	Con S9
0	22 ± 1.5	27 ± 4.7
1	24 ± 3.1	23 ± 0.6
2	28 ± 3.5	24 ± 4.4
4	20 ± 2.1	25 ± 4.3
8	19 ± 2.8	30 ± 3.2
10	20 ± 4.6	22 ± 3.5
20	23 ± 3.0	34 ± 2.9
40	24 ± 4.0	26 ± 4.0
80	27 ± 6.1	24 ± 1.2
160	25 ± 4.6	32 ± 7.0
320	19 ± 3.4	24 ± 3.6
640	25 ± 2.9	27 ± 4.5
1000	28 ± 5.5	31 ± 5.2

^aPromedio de 3 placas ± E.E. * Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Folimat sin S9 y con S9}} = 61.015$, $P < 0.001$

TABLA 2: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DE FOLIMAT CON LA CEPA TA98, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA, EN CONCENTRACIONES DE 0 A 5000 µg/ PLACA

TESTIGOS	Revertantes ^a
1-NP (0.08 µg) - S9	*139 ± 13.9
2AF (1 µg) +S9	*291 ± 25.9

Concentración (µg)	FOLIMAT (OMETOATO)	
	Sin S9	Con S9
0	43 ± 2.6	59 ± 1.7
100	37 ± 4.8	51 ± 5.2
200	44 ± 1.2	51 ± 3.0
400	38 ± 0.9	54 ± 1.7
600	34 ± 2.6	49 ± 4.2
800	40 ± 2.6	53 ± 5.2
1000	43 ± 2.3	50 ± 8.1
1500	35 ± 2.9	46 ± 1.5
2000	42 ± 2.8	56 ± 2.0
2500	43 ± 3.4	52 ± 3.0
3000	44 ± 2.6	46 ± 2.0
3500	45 ± 5.4	48 ± 9.1
4000	44 ± 4.6	51 ± 2.3
4500	36 ± 7.9	45 ± 6.1
5000	46 ± 4.0	51 ± 1.2

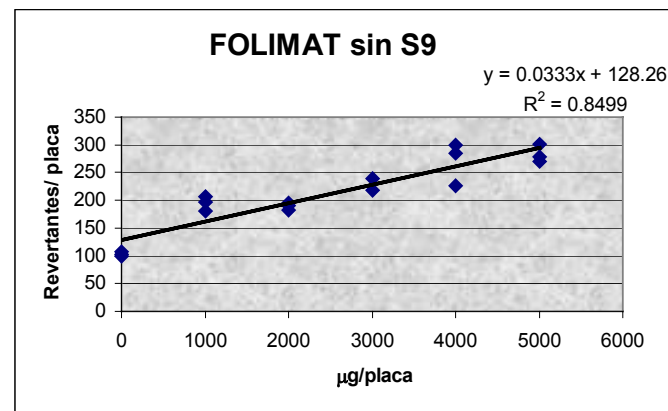
^aPromedio de 3 placas ± E.E. *Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Folimat sin S9 y con S9}} = 58.591$, $P < 0.001$

TABLA 3: EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE FOLIMAT CON LA CEPA TA100 APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA, EN CONCENTRACIONES DE 0 A 5000 µg/ PLACA

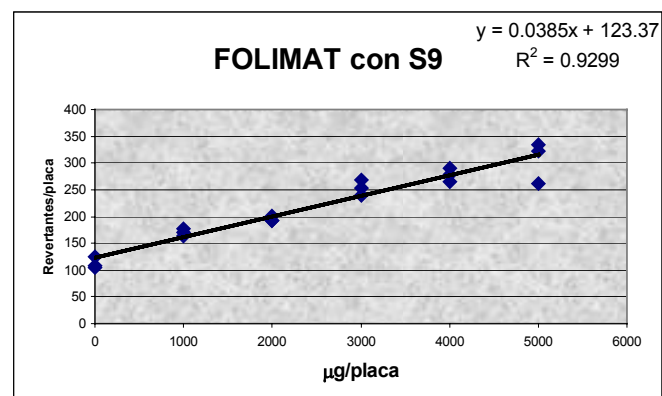
TESTIGOS	Revertantes ^a
NaN3 (0. 32 µg) - S9	* 242 ± 15.1
2AF (8 µg) +S9	*1435 ± 161.7

Concentración (µg)	FOLIMAT (OMETOATO)	
	Sin S9	Con S9
0	103 ± 2.1	112 ± 6.2
1	149 ± 5.0	100 ± 3.2
2	115 ± 10.2	109 ± 3.9
4	125 ± 9.6	110 ± 5.5
8	157 ± 9.7	108 ± 11
10	129 ± 4.5	134 ± 12
20	142 ± 6.2	145 ± 9.6
40	166 ± 7.3	118 ± 5.6
80	149 ± 10.8	118 ± 9.8
100	126 ± 14	128 ± 8.1
200	121 ± 12.3	142 ± 12.3
400	122 ± 20	127 ± 4.7
800	116 ± 15.5	155 ± 7.2
1000	*195 ± 7.6	170 ± 3.8
2000	*189 ± 3.8	*189 ± 2.7
3000	*205 ± 24.2	*254 ± 8.4
4000	*270 ± 22.6	*278 ± 7.5
5000	*283 ± 9.2	*305 ± 22.6

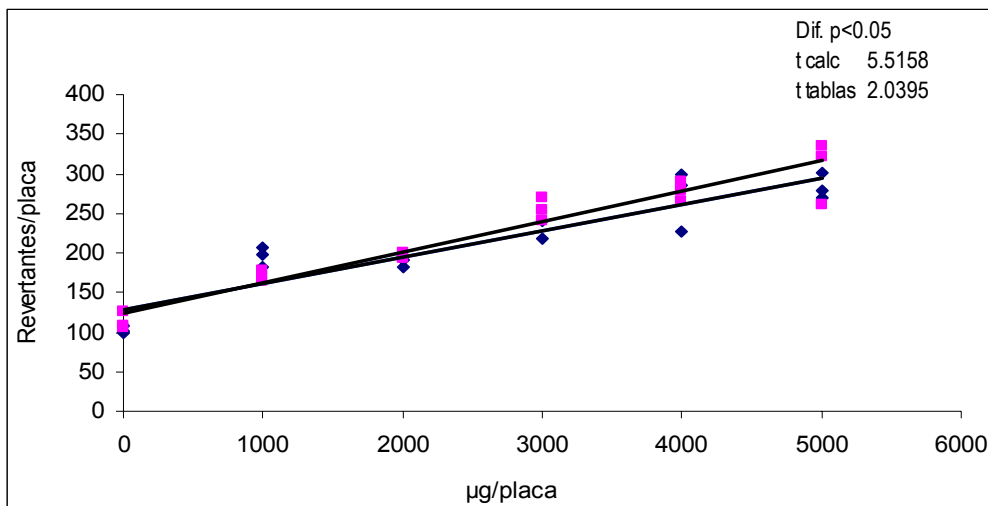
^oPromedio de 3 ensayos ± E.E. * Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Folimat sin S9}} = 19.29$, $F_{\text{Folimat con S9}} = 11.64$ y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, $P < 0.001$.



Gráfica 1. Potencia mutagénica de Folimat en la cepa TA100 sin activación metabólica animal.



Gráfica 2. Potencia mutagénica de Folimat en la cepa TA100 con activación metabólica animal.



Gráfica 3. Comparación de las pendientes de los tratamientos de Folimat de forma directa e indirecta con la cepa TA100

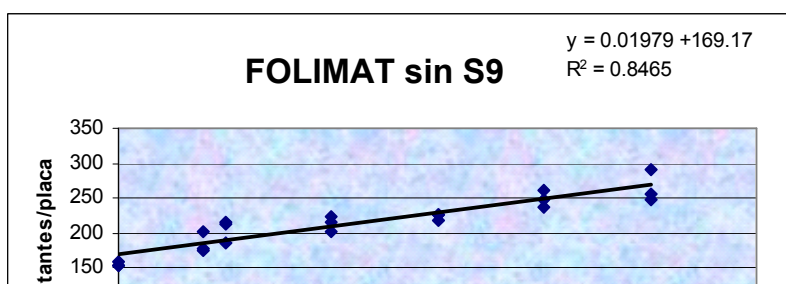
Al obtener resultado mutagénico positivo para Folimat con la cepa TA100, se procedió a la repetición del ensayo (Tabla 4) y se realizó su respectivo análisis de comparación entre las pendientes (Gráfica 4 a 6), corroborando diferencia significativa entre el ensayo de forma directa e indirecta obteniendo $p < 0.05$.

TABLA 4. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE FOLIMAT CON LA CEPA TA100, DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA EN CONCENTRACIONES ENTRE 0 Y 6000 µg/ PLACA

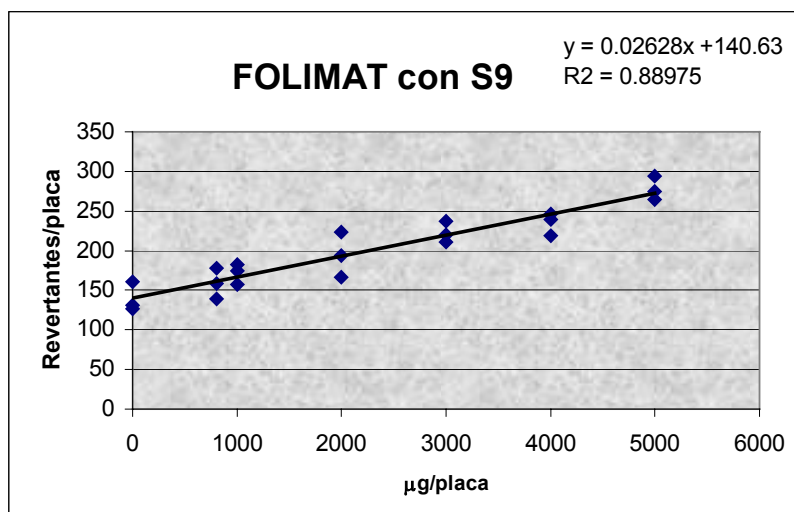
TESTIGOS	Revertantes ^a
NaN3 (0. 32 µg) - S9	* 834 ± 44.9
2-AF (8 µg) +S9	*1194 ± 103.5

Concentración (µg)	FOLIMAT (OMETOATO)	
	Sin S9	Con S9
0	155 ± 1.9	139 ± 10.7
800	184 ± 9.2	168 ± 5.5
1000	*205 ± 9.7	171 ± 7.4
2000	*214 ± 4.8	*194 ± 16.2
3000	*223 ± 10.2	*222 ± 7.6
4000	*248 ± 7.2	*234 ± 8.1
5000	*266 ± 13.2	*278 ± 8.5
6000	*264 ± 6.8	*270 ± 9.5

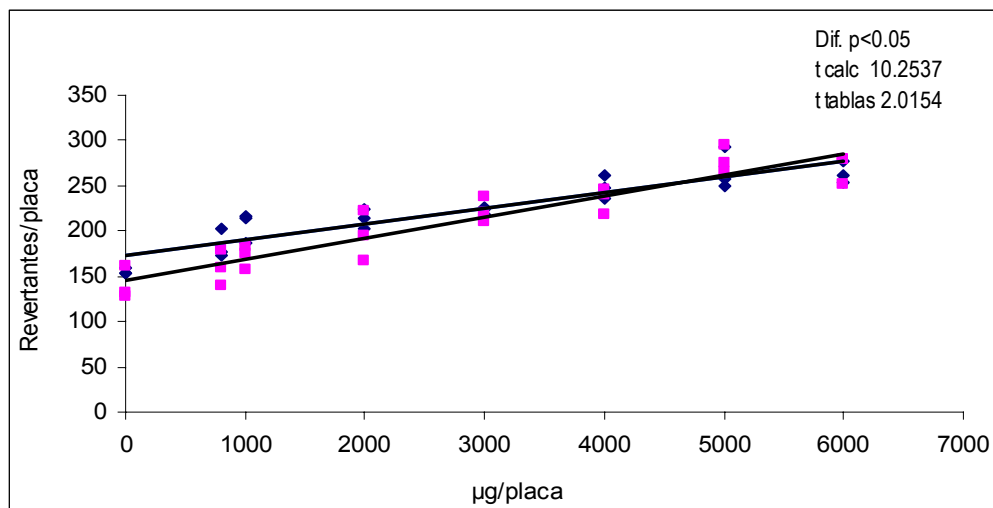
^aPromedio de 3 ensayos ± E.E.
* Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Folimat sin S9}} = 24.275$, $F_{\text{Folimat con S9}} = 29.905$ y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, $P < 0.001$.



Gráfica 4. Potencia mutagénica de Folimat en la cepa TA100 sin activación metabólica animal.



Gráfica 5. Potencia mutagénica de Folimat en la cepa TA100 con activación metabólica animal.



Gráfica 6. Comparación de las pendientes de los tratamientos de Folimat aplicado de forma directa e indirecta con la cepa TA100

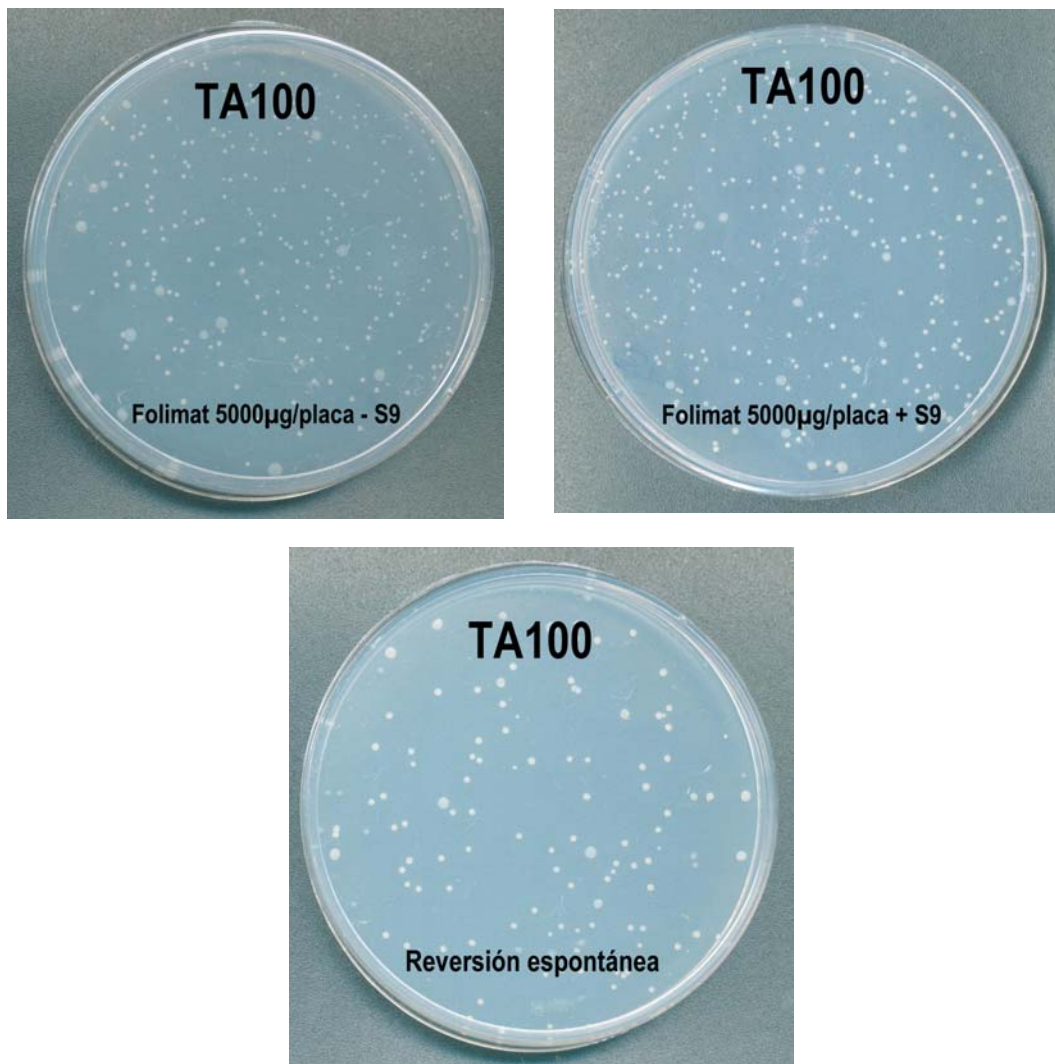


Figura 12. Reversión del genotipo his⁻ a his⁺ de la cepa TA100 producida por Folimat

6.3 Evaluación genotóxica de Foley

Este plaguicida no presentó comportamiento mutagénico de forma directa ni indirecta en ninguna de las concentraciones examinadas con la cepa TA98 (Tablas 5 y 6). De forma directa presentó efecto citotóxico (crecimiento de fondo) a partir de 600 µg/placa (Figura 13) en la indirecta el evento citotóxico se presentó desde 3000 µg/placa.

Con la cepa TA100 se observó comportamiento mutagénico (Figura 14), a partir de 800 µg/placa sin activación metabólica (Tablas 7 y 8) y con activación metabólica a partir de 1000 µg/placa (Tablas 8 y 9), se obtuvieron las pendientes mutagénicas y los resultados obtenidos en el análisis estadístico indican que existe diferencia significativa entre los tratamientos a $p < 0.05$.

TABLA 5: EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DEL PLAGUICIDA FOLEY CON LA CEPA TA98, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

TESTIGOS	Revertantes ^a
1-NP (0.08 µg) - S9	*167 ± 13.5
2AF (1 µg) +S9	*253 ± 22.4

Concentración (µg)	FOLEY (METIL PARATION)	
	Sin S9	Con S9
0	44 ± 7.1	46 ± 4.0
1	47 ± 2.2	49 ± 3.2
2	36 ± 3.2	50 ± 3.5
4	50 ± 4.4	43 ± 6.0
8	42 ± 5.0	45 ± 3.8
10	46 ± 7.1	39 ± 5.0
20	43 ± 0.6	43 ± 2.7
40	41 ± 9.9	51 ± 8.5
80	39 ± 5.7	49 ± 7.4
160	43 ± 7.1	39 ± 3.8
320	48 ± 7.9	45 ± 4.3
640	20 ± 5.9	46 ± 1.8
1000	Toxicidad	51 ± 9.5

^aPromedio de 3 placas ± E.E. * Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Foley sin S9 y con S9}} = 56.255$, $P < 0.001$.

TABLA 6: EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DEL PLAGUICIDA FOLEY EN LA CEPA TA98, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

TESTIGOS	Revertantes ^a
1NP (0.08 µg) - S9	*113 ± 1.5
2AF (2 µg) +S9	*824 ± 99.1

Concentración (µg)	FOLEY (METIL PARATION)	
	Sin S9	Con S9
0	19 ± 1.8	25 ± 2.0
600	11 ± 1.5	24 ± 1.5
800	Toxicidad	24 ± 2.0
1000	Toxicidad	20 ± 3.5
2000	Toxicidad	37 ± 7.6
3000	Toxicidad	Toxicidad
4000	Toxicidad	Toxicidad
5000	Toxicidad	Toxicidad
6000	Toxicidad	Toxicidad

^aPromedio de 3 placas ± E.E. * Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Foley sin S9 y con S9}} = 63.593$, $P < 0.001$.

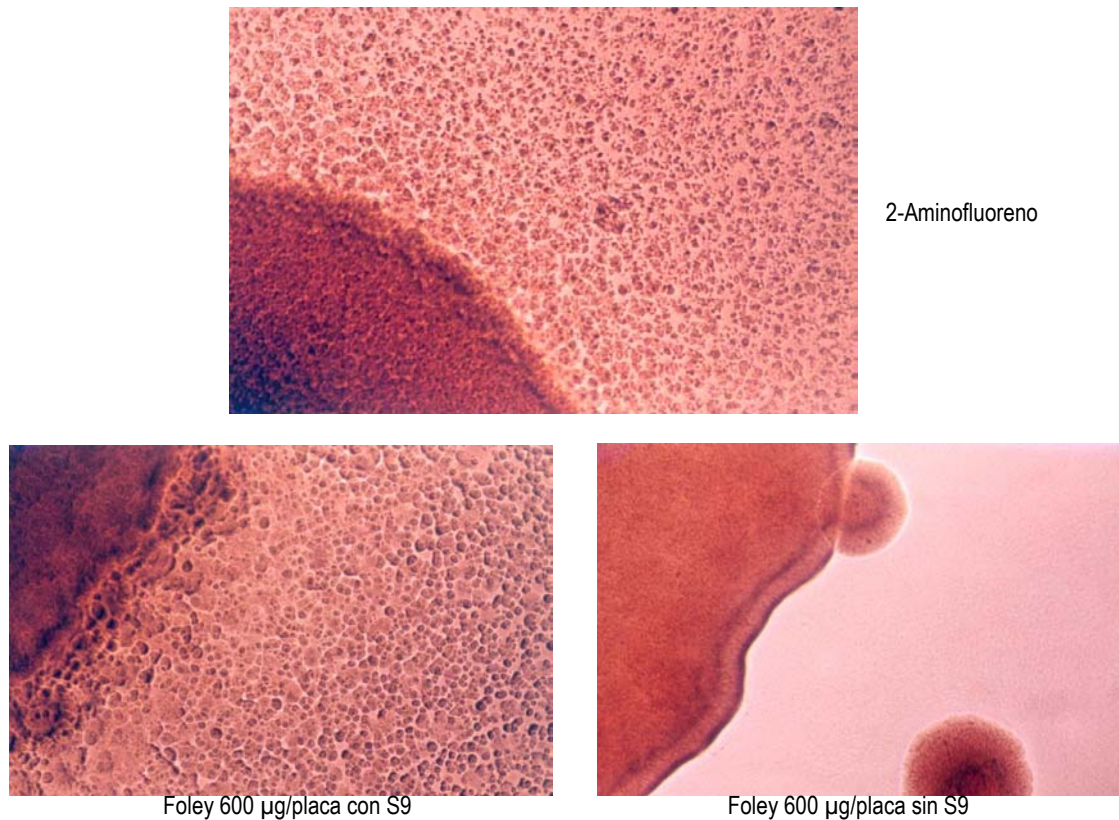


Figura 13. Efecto citotóxico de Foley en la cepa TA100

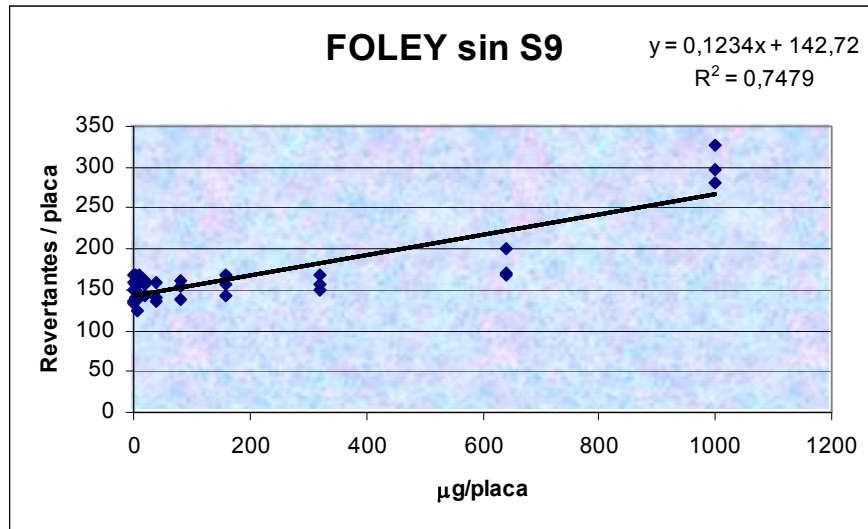
TABLA 7: EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE FOLEY CON LA CEPA TA100, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

TESTIGOS	Revertantes ^a
NaN ₃ (0. 32 µg) - S9	*612 ± 58.2
2AF (8 µg) +S9	*1133 ± 138.4

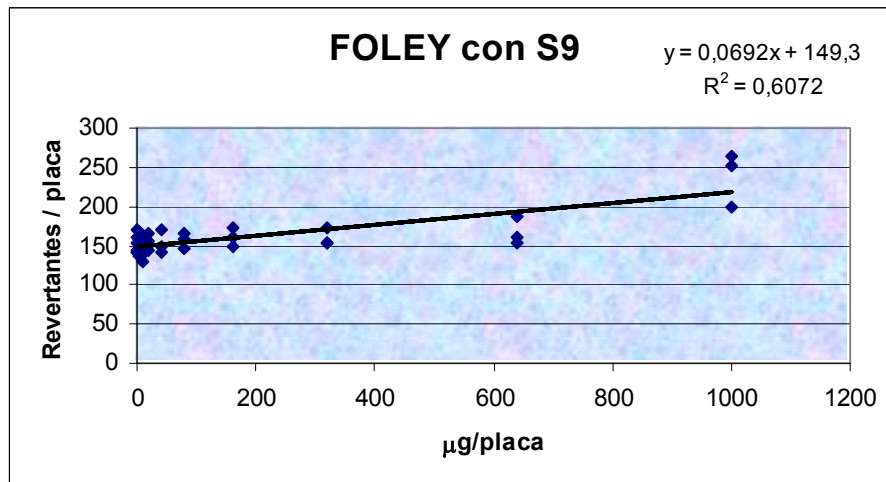
Concentración (µg)	FOLEY (METIL PARATION)	
	Sin S9	Con S9
0	149 ± 6.4	155 ± 8.4
1	146 ± 11.5	148 ± 5.8
2	154 ± 8.3	150 ± 8.9
4	148 ± 4.9	157 ± 3.0
8	137 ± 6.4	148 ± 7.8
10	157 ± 7.6	146 ± 9.5
20	153 ± 5.4	155 ± 6.1
40	145 ± 6.8	154 ± 8.9
80	152 ± 6.8	157 ± 5.5
160	155 ± 7.0	160 ± 6.6
320	158 ± 5,9	156 ± 2.8
640	179 ± 10,2	167 ± 10,5
1000	*301 ± 13,3	*238 ± 20,1

^aPromedio de 3 placas ± E.E. * Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Foley sin S9}} = 27.518$, $F_{\text{Foley con S9}} = 7.061$ y

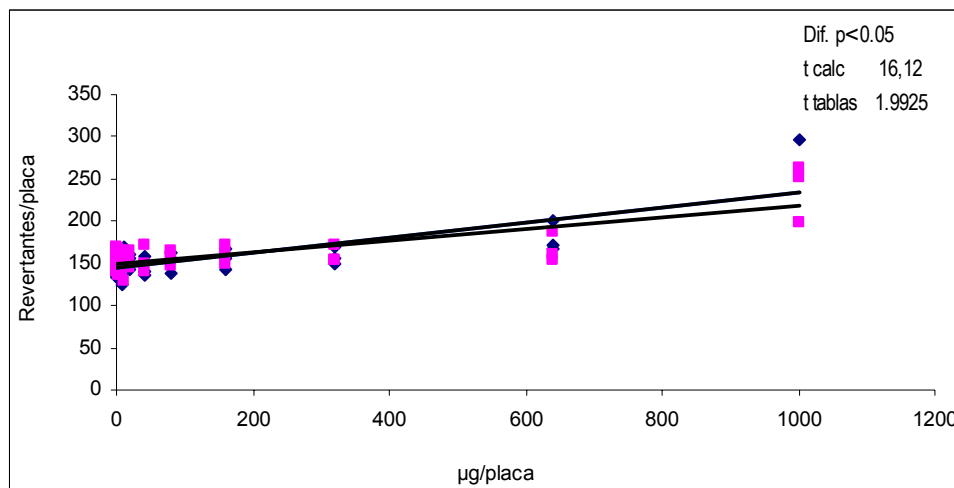
por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, $P < 0.001$.



Gráfica 7. Potencia mutagénica de Foley en la cepa TA100 sin activación metabólica animal.



Gráfica 8. Potencia mutagénica de Foley en la cepa TA100 con activación metabólica animal.



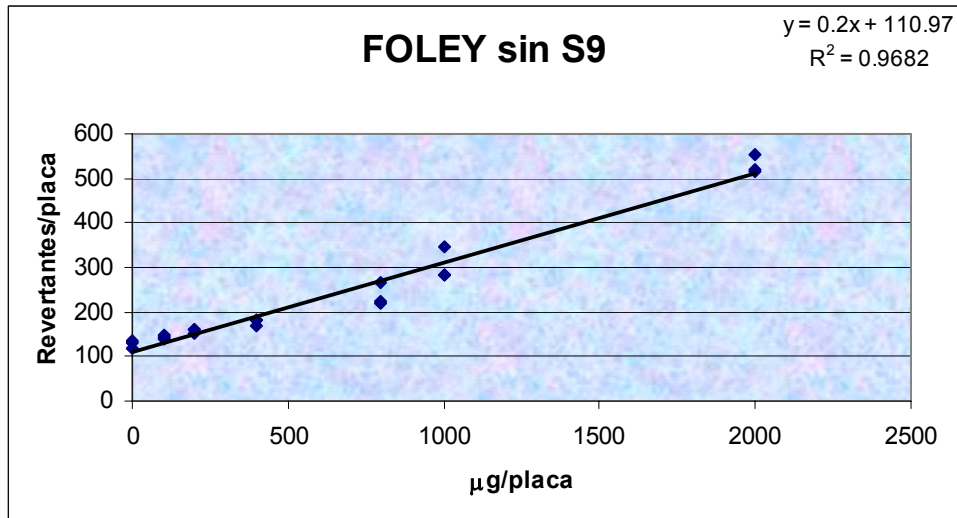
Gráfica 9. Comparación de las pendientes de los tratamientos de Foley de forma directa e indirecta en la cepa TA100. Al obtener resultado mutagénico positivo para Folidol con la cepa TA100, se procedió a la repetición del ensayo (Tabla 8) y se realizó su respectivo análisis de comparación entre las pendientes, corroborando diferencia significativa entre el ensayo de forma directa e indirecta obteniendo $p < 0.05$.

TABLA 8: EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DEL PLAGUICIDA FOLEY EN LA CEPA TA100, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

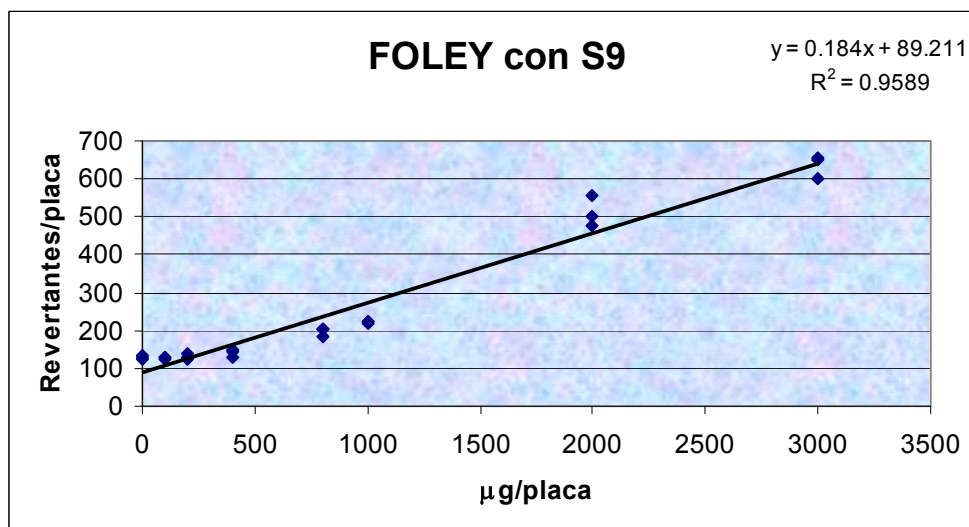
TESTIGOS	Revertantes ^a
NaN ₃ (0.32 µg) - S9	*592 ± 83.6
2AF (8 µg) +S9	*1010 ± 104.5

Concentración (µg)	FOLEY (METIL PARATION)	
	Sin S9	Con S9
0	127 ± 4.7	129 ± 3.3
100	144 ± 2.0	127 ± 2.8
200	157 ± 2.2	131 ± 5.0
400	177 ± 3.2	140 ± 5.9
800	*237 ± 15.2	197 ± 7.4
1000	*304 ± 21.5	*223 ± 1.5
2000	*529 ± 11.3	*510 ± 23.6
3000	208 ± 51.7 Tox	*635 ± 16.7
4000	99 ± 14.6 Tox	*394 ± 64.9 Tox
5000	Toxicidad	312 ± 21.8 Tox
6000	Toxicidad	182 ± 40.8 Tox

^aPromedio de 3 placas ± E.E. * Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Foley sin S9}} = 40.458$, $F_{\text{Foley con S9}} = 62.957$ y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, $P < 0.001$.



Gráfica 10. Potencia mutagénica de Foley en la cepa TA100 sin activación metabólica animal.



Gráfica 11. Potencia mutagénica de Foley en la cepa TA100 con activación metabólica animal.

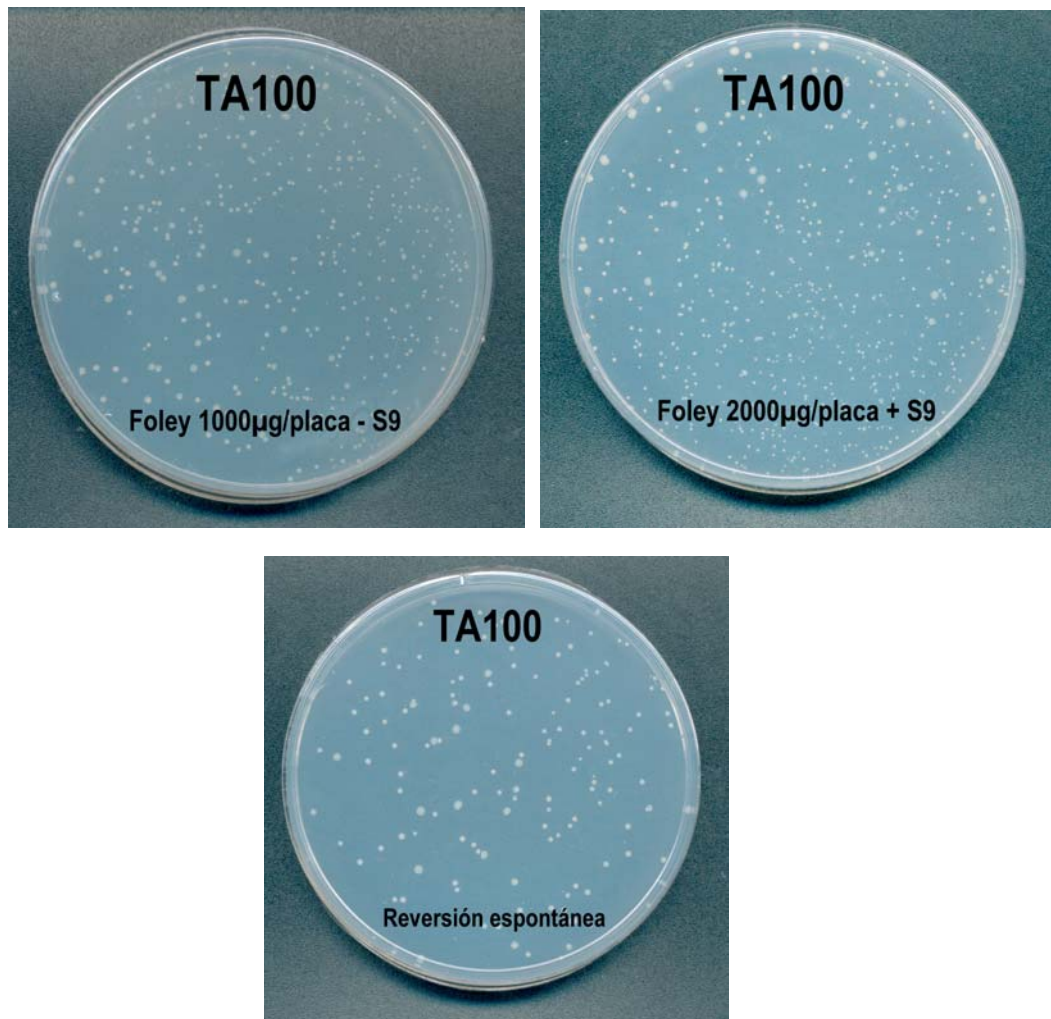
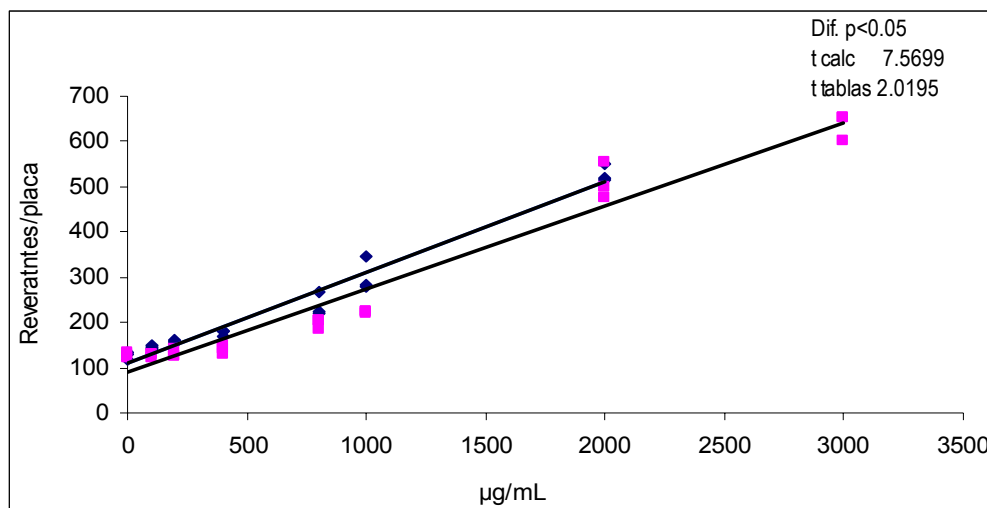


Figura 15. Reversión del genotipo his⁻ a his⁺ de la cepa TA100 producida por Foley.



Gráfica 12. Comparación de las pendientes de los tratamientos de Foley aplicado de forma directa e indirecta con la cepa TA100

6.4 Evaluación genotóxica de Gusatión

Este plaguicida no presentó comportamiento mutagénico de forma directa ni indirecta en ninguna de las concentraciones examinadas con la cepa TA98 y TA100 (Tablas 9 a 12).

Con TA98 en tratamientos directos se observó efecto citotóxico (crecimiento de fondo) a partir de 40 µg/placa y en los indirectos el evento citotóxico se mostró desde 200 µg/placa.

Con la cepa TA100 se presentó efecto citotóxico (crecimiento de fondo) en forma directa a partir de 20 µg/placa y de manera indirecta el evento citotóxico se presentó desde 800 µg/placa.

6.5 Evaluación genotóxica de Tamarón

Este plaguicida no presentó comportamiento mutagénico ni citotóxico de forma directa e indirecta en ninguna de las concentraciones examinadas con las cepas TA98 y TA100 (Tablas 13 a 17).

TABLA 9. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE GUSATIÓN EN LA CEPA TA98, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

TESTIGOS	Revertantes ^a
1-NP (0.08 µg) - S9	165 ± 20.2
2AF (1 µg) +S9	265 ± 35.2

Concentración (µg)	GUSATION (METIL AZINFOS)			
	Sin S9		Con S9	
0	39 ± 5.4		46 ± 0.3	
1	49 ± 3.2		46 ± 1.5	
2	39 ± 4.9		43 ± 2.2	
4	39 ± 5.7		49 ± 7.4	
8	45 ± 5.7		48 ± 2.5	
10	40 ± 5.7		50 ± 2.8	
20	43 ± 0.3		50 ± 3.5	
40	39 ± 3.5	Toxicidad	55 ± 2.3	
80	37 ± 6.2	Toxicidad	41 ± 5.6	
100	45 ± 3.0	Toxicidad	57 ± 6.1	
200	50 ± 4.3	Toxicidad	40 ± 3.0	Toxicidad
400	38 ± 4.2	Toxicidad	30 ± 3.4	Toxicidad
600	Toxicidad	Toxicidad	29 ± 2.8	Toxicidad
800	Toxicidad	Toxicidad	27 ± 4.4	Toxicidad
1000	Toxicidad	Toxicidad	26 ± 3.5	Toxicidad
1200	Toxicidad	Toxicidad	25 ± 2.6	Toxicidad
1400	Toxicidad	Toxicidad	25 ± 1.8	Toxicidad
1600	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad
1800	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad
2000	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad

^aPromedio de 3 placas ± E.E. *Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Gusación sin S9 y con S9}} = 27.649$, $P < 0.05$

TABLA 10. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE GUSACIÓN EN LA CEPA TA98, DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

TESTIGOS	Revertantes ^a
1-NP (0.08 µg) - S9	*157.7 ± 20.2
2AF (1 µg) +S9	*256.3 ± 22.7

Concentración (µg)	GUSATION (METIL AZINFOS)			
	Sin S9		Con S9	
0	43 ± 3.0		45 ± 5.8	
1	37 ± 7.2		39 ± 7.3	
2	33 ± 2.1		50 ± 2.2	
4	38 ± 3.0		41 ± 8.1	
8	42 ± 6.6		47 ± 4.2	
10	40 ± 3.0		54 ± 8.8	
20	34 ± 3.8		61 ± 0.9	
40	31 ± 4.2	Toxicidad	50 ± 5.9	
80	42 ± 2.6	Toxicidad	54 ± 8.5	
100	38 ± 3.5	Toxicidad	37 ± 11.0	
200	30 ± 3.5	Toxicidad	36 ± 5.8	Toxicidad
400	24 ± 1.9	Toxicidad	36 ± 7.1	Toxicidad
600	Toxicidad	Toxicidad	29 ± 2.8	Toxicidad
800	Toxicidad	Toxicidad	33 ± 6.2	Toxicidad
1000	Toxicidad	Toxicidad	28 ± 4.6	Toxicidad

^aPromedio de 3 placas ± E.E. *Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Gusación sin S9 y con S9}} = 73.048$, $P < 0.001$

TABLA 11. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE GUSACIÓN EN LA CEPA TA100, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

TESTIGOS	Revertantes ^a
NaN ₃ (0.32 µg) - S9	592 ± 83.6
2AF (8 µg) +S9	1010 ± 104.5

Concentración (µg)	GUSATION (METIL AZINFOS)	
	Sin S9	Con S9
0	127 ± 4.7	129 ± 3.3
1	134 ± 7.0	125 ± 3.1
2	132 ± 8.3	124 ± 2.8
4	137 ± 8.5	127 ± 7.4
8	119 ± 7.2	121 ± 6.9
10	118 ± 6.2	125 ± 5.2
20	115 ± 3.4	128 ± 4.7
40	101 ± 12.0	124 ± 4.6
80	109 ± 4.4	121 ± 2.4
100	81 ± 16.8	111 ± 6.5
1000	Toxicidad	86 ± 1.5

^aPromedio de 3 placas ± E.E. *Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Gusación sin S9 y con S9}} = 57.608$, $P < 0.001$

TABLA 12. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE GUSATIÓN EN LA CEPA TA100, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

TESTIGOS	Revertantes ^a
NaN ₃ (0.32 µg) - S9	*763 ± 49.3
2AF (8 µg) +S9	*1162 ± 150.6

Concentración (µg)	GUSATION (METIL AZINFOS)	
	Sin S9	Con S9
0	182 ± 7.1	191 ± 3.1
1	184 ± 7.8	141 ± 5.9
2	170 ± 5.3	139 ± 6.4
4	162 ± 5.1	130 ± 10.8
8	163 ± 8.3	133 ± 9.1
10	123 ± 5.8	134 ± 9.0
20	111 ± 4.1	133 ± 6.5
40	93 ± 2.3	105 ± 12.3
80	66 ± 9.3	71 ± 11.5
100	Toxicidad	29 ± 7.8
1000	Toxicidad	Toxicidad

^aPromedio de 3 placas ± E.E. *Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Gusación sin S9 y con S9}} = 54.107$, $P < 0.001$

TABLA 13. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE TAMARÓN EN LA CEPA TA98, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

TESTIGOS	Revertantes ^a
1-NP (0.08 µg) - S9	*154.7 ± 9.3
2AF (1 µg) +S9	*374.7 ± 22.5

Concentración (µg)	TAMARON (METAMIDOFOS)	
	Sin S9	Con S9
0	43.0 ± 1.2	54.0 ± 5.1
1	46.7 ± 9.8	42.3 ± 4.8
2	45.3 ± 9.5	56.6 ± 5.7
4	44.7 ± 5.5	55.6 ± 3.5
8	36.7 ± 2.9	61.3 ± 2.6
10	41.3 ± 3.5	62.3 ± 9.8
20	51.7 ± 0.7	55.7 ± 2.4
40	49.0 ± 2.5	51.7 ± 6.2
80	46.3 ± 4.8	63.0 ± 2.6
100	32.7 ± 0.3	62.0 ± 4.2
200	48.3 ± 2.2	52.7 ± 3.8
400	57.7 ± 6.1	53.7 ± 1.9
600	45.3 ± 3.5	48.0 ± 3.8
800	47.7 ± 0.3	58.3 ± 5.3
1000	50.7 ± 6.2	60.3 ± 7.4
1200	40.0 ± 1.2	42.7 ± 3.0
1400	47.0 ± 4.5	51.7 ± 1.5
1600	35.3 ± 1.7	43.0 ± 2.1
1800	49.0 ± 2.5	47.7 ± 3.4
2000	46.7 ± 1.5	56.7 ± 7.3

^aPromedio de 3 placas ± E.E. *Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Tamarón sin S9 y con S9}} = 152.53$, $P < 0.001$

TABLA 14. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE TAMARÓN CON LA CEPA TA98, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

TESTIGOS	Revertantes ^a
1-NP (0.08 µg) - S9	*139.0 ± 13.9
2AF (1 µg) +S9	*291.0 ± 25.9

Concentración (µg)	TAMARON (METAMIDOFOS)	
	Sin S9	Con S9
0	43.7 ± 2.6	59.7 ± 1.7
2000	45.3 ± 6.7	50.3 ± 5.2
2500	38.7 ± 3.8	52.7 ± 6.4
3000	34.7 ± 3.5	50.3 ± 3.8
3500	44.0 ± 2.1	46.0 ± 3.0
4000	42.3 ± 3.7	51.3 ± 2.2
5000	47.0 ± 2.6	50.0 ± 4.9
6000	37.7 ± 2.8	42.7 ± 2.7

^aPromedio de 3 placas ± E.E. *Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Tamarón sin S9 y con S9}} = 57.213$, $P < 0.001$

TABLA 15. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE TAMARÓN EN LA CEPA TA98, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

TESTIGOS	Revertantes ^a
1-NP (0.08 µg) - S9	*157.7 ± 20.2
2AF (1 µg) +S9	*256.3 ± 22.7

Concentración (µg)	METAMIDOFOS (TAMARON)	
	0	43 ± 3.0
2000	45 ± 4.1	54 ± 2.7
2500	34 ± 2.0	52 ± 1.8
3000	34 ± 1.9	52 ± 8.7
4000	45 ± 4.4	53 ± 2.4
5000	46 ± 2.2	43 ± 4.7

^aPromedio de 3 placas ± E.E. *Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza $F_{\text{Tamarón sin S9 y con S9}} = 72.36$, $P < 0.001$

TABLA 16. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE TAMARÓN EN LA CEPA TA100, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA.

TESTIGOS	Revertantes ^a
NaN ₃ (0.32 µg) - S9	*592 ± 83.6
2AF (8 µg) +S9	*1010 ± 104.5

Concentración (µg)	TAMARON (METAMIDOFOS)	
	Sin S9	Con S9
0	127 ± 4.7	129 ± 3.3
1	131 ± 12.7	140 ± 13.1
10	125 ± 15.7	147 ± 8.3
100	123 ± 5.0	124 ± 4.9
1000	129 ± 8.0	132 ± 6.2
5000	132 ± 15.3	146 ± 3.4

^aPromedio de 3 placas ± E.E. *Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza
 $F_{\text{Tamarón sin S9 y con S9}} = 56.397, P < 0.001$

TABLA 17. EVALUACIÓN MUTAGÉNICA DE TAMARÓN EN LA CEPA TA100, APLICADO DE FORMA DIRECTA E INDIRECTA

TESTIGOS	Revertantes ^a
NaN ₃ (0.32 µg) - S9	*763 ± 49.3
2AF (8 µg) +S9	*1162 ± 150.6

Concentración (µg)	TAMARON (METAMIDOFOS)	
	Sin S9	Con S9
0	182 ± 7.1	191 ± 3.1
1	179 ± 5.8	190 ± 5.4
10	174 ± 10.4	186 ± 6.4
100	177 ± 19.0	198 ± 5.6
1000	180 ± 6.1	182 ± 10.5
5000	183 ± 10.6	195 ± 3.0

^aPromedio de 3 placas ± E.E. *Se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados y el promedio de los testigos por un análisis de varianza
 $F_{\text{Tamarón sin S9 y con S9}} = 55.841, P < 0.001$

7. DISCUSIÓN

En México el problema que causa el uso anárquico de plaguicidas se agrava ya que existiendo leyes, reglamentos de protección ambiental y dependencias gubernamentales especializadas en el área, se hace caso omiso a éstas y el mal ejercicio del poder aunado a la ignorancia y a los intereses de empresas transnacionales desemboca en catástrofes (Restrepo 1992). El segundo problema generalizado en nuestro país es el inadecuado manejo y disposición de los envases de plaguicidas y el tercer inconveniente es el hecho de que muchos de los plaguicidas empleados hasta la fecha, se han prohibido en otros países debido a su toxicidad, sin embargo, el número de estos se incrementa a razón de 10 % al año y esto ha permitido que la cantidad de productos que entran en contacto con la población se incremente (INE 2005b). Por todos estos motivos el conocimiento de los plaguicidas organofosforados es un componente esencial, ya que al evaluar los mecanismos bioquímicos que pueden seguir dichos compuestos, se está al tanto de sus implicaciones en la salud humana y es posible tomar decisiones sobre la seguridad en su uso (Romero 2003).

7.1 Metabolismo de Organofosforados

La Biotransformación de Organofosforados puede producir metabolitos altamente tóxicos, incluso si la suma de los productos formados en estas reacciones es muy baja, lo cual, puede ser altamente significativo en el aspecto toxicológico. La biotransformación de compuestos organofosforados no tóxicos a metabolitos activos tóxicos ocurre principalmente a través de cinco reacciones químicas: la primera es por desulfuración oxidante ($-P=S \rightarrow -P=O$), como ocurre con el Metil azinfos y Metil paratión, la segunda reacción se realiza por la oxidación del grupo tioeter ($-S \rightarrow -SO \rightarrow -SO_2-$), la tercera sobreviene por oxidación de grupos amino, la cuarta ocurre por hidroxilación de grupos alquilo y la quinta por otras reacciones no oxidantes (Jokanovic 2001).

Está ampliamente descrito que de forma directa diversos plaguicidas organofosforados pueden originar efectos mutagénicos (Karabay y Oguz 2005), sin embargo también se tiene conocimiento de que las enzimas provenientes de la fracción enzimática S9 son capaces de potencializar el efecto mutagénico de estos plaguicidas, debido a la existencia de sitios electrofilicos en dichos compuestos o en sus intermediarios, los cuales son capaces de unirse en sitios nucleofilicos del DNA (Sierra-Torres *et al.* 1998).

Las enzimas citocromo P450 desempeñan diferentes papeles en la naturaleza, en organismos superiores son importantes intermediarios en procesos biológicos, actúan como reguladores hormonales, están involucradas en el metabolismo de sustancias liposolubles de origen tanto interno como externo, por lo que son indispensables en la eliminación de contaminantes ambientales de determinadas características en el caso de xenobióticos. Están presentes en organismos de los 5 reinos y presentan isoformas. También son proteínas altamente conservadas en los organismos, es decir, que las secuencias proteicas entre distintos organismos (que pueden o no estar alejados en la escala evolutiva) son altamente similares, y por esta razón se han utilizado como instrumentos para estudios de tipo filogenético. Al mismo tiempo esto aporta la ventaja de emplear Citocromos P450 de rata como un excelente modelo en el análisis de

plaguicidas, ya que gracias a dicha similitud se puede inferir una actividad afín (Lewis 2001, Ioannides 2002, Escobar 2003).

La activación de organofosforados ocurre principalmente en el hígado, ya que la mayor concentración de Citocromos-P450 está localizada en ese tejido, aunque diversas formas de P450 están localizadas en otros tejidos diferentes al hígado y algunos estudios han indicado que ciertos compuestos organofosforados pueden ser activados metabólicamente en cerebro, pulmón, piel y riñón (Jokanovic 2001).

Existen distintos factores involucrados en la desintoxicación de plaguicidas organofosforados. Las proteínas son estructuras anfotéricas y contienen sitios reactivos aniónicos y catiónicos, asimismo, pueden participar en otras interacciones con xenobióticos a través de la formación de puentes de hidrógeno, polaridad y fuerzas electrostáticas Van der Waals. De forma viable puede ocurrir unión de proteínas con sustancias que son ionizadas a pH biológico y que son liposolubles como es el caso de los organofosforados. Algunos de estos pueden unirse a proteínas presentes en sangre y de esta forma decrecer la concentración de inhibidores de la ACE, preservando la actividad de los sitios blanco. Otro factor involucrado en la desintoxicación es la acumulación de dichos compuestos en tejido graso, particularmente de fosforotioatos, y de este modo decrecer la concentración del compuesto en el torrente sanguíneo previniendo la inhibición de la ACE. En la literatura también se ha reportado acumulación en músculo, diafragma, pulmones y piel (Jokanovic 2001).

7.2 Plaguicidas organofosforados formulados

Es imprescindible mencionar que en la gran mayoría de los estudios reportados en la literatura se realizan análisis de los ingredientes activos que contienen los plaguicidas, mientras que en el presente trabajo se evaluaron plaguicidas formulados de marcas comerciales. Es importante no perder de vista que frecuentemente los efectos tóxicos de estos compuestos se potencializan por los ingredientes inertes y aditivos, que en ocasiones pueden ser tanto o más dañinos que los ingredientes activos; como es el caso de los disolventes orgánicos de toxicidad conocida (CICOPLAFEST 2004).

El Plaguicida formulado Miral®, cuyo ingrediente activo es Isazofos, es ampliamente utilizado en Colombia para fumigar las plantaciones de café y mostró capacidad para inducir aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratón albino CD1, del mismo modo resultó positivo en el sistema de mutación reversa de *Salmonella typhimurium* con la cepa TA98 en presencia y ausencia de la fracción enzimática S9 (Sierra-Torres *et al.* 1998).

7.3 Folimat

Los resultados del este estudio reflejaron que el plaguicida Folimat produjo efecto mutagénico débil por el mecanismo de sustitución de pares de bases, en presencia y ausencia de la fracción enzimática S9 (Tabla 3 y Figura 12). En la literatura se ha mencionado que el ingrediente activo Ometoato incrementa la frecuencia de Intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos conforme aumenta la dosis (Dolara *et al.* 1992) y en otro estudio se evidencia un incremento en la proliferación de células MCF-7 a bajas concentraciones, sugiriendo posible inducción de cáncer de seno (Isoda *et al.* 2005). Farmacológicamente los organofosforoditioatos o compuestos P=S tal como el Dimetoato o disulfotón requieren activación oxidante para producir inhibidores de ACE más tóxicos y sus análogos organofosforotioatos o P=O como: Ometoato y Demetón, no la requieren, por lo que se dice que estos últimos son potentes inhibidores de ACE por si solos (Jokanovic 2001, Anderson y Zhu. 2004). Al aplicar el análisis estadístico de comparación múltiple de Tukey-Kramer se observa un desfase de la significancia en las dosis que contiene la fracción enzimática S9 con respecto a las que no lo tienen (Tablas 3 y 4) atribuyendo dicho fenómeno a las enzimas presentes en la fracción S9.

7.4 Foley

Se ha descrito que en los tratamientos en células meristemáticas de raíz de *Vicia faba* el Metil paratión produce aberraciones cromosómicas estructurales en células en metafase manifestados únicamente por fragmentos. También muestra un fuerte efecto c-mitótico. En tiempos de recuperación después del tratamiento, se presentaron células tetraploides y pincosis (Gómez-Arroyo *et al.* 1985). En ensayos posteriores se observa que también provoca intercambio de cromátidas hermanas en cultivos de linfocitos humanos (Gómez-Arroyo *et al.* 1987).

Se conoce que Metil paratión es altamente tóxico después de ser convertido a Metil Paraxón a través de desulfuración mediada por CYP's. El Metil paraoxón se une estrechamente al grupo hidroxilo del residuo ²³⁰Ser presente en la ACE y su inhibición da como resultado la acumulación de dicho neurotransmisor, lo cual desemboca en toxicidad aguda tanto en mamíferos como en insectos (Albores *et al.* 2001). Sams *et al.* (2000) reportan al analizar microsomas de hígado humano que el paratión es bioactivado por vía de Citocromos P450 y los resultados indican que los CYP's implicados en dicha activación fueron CYP2D6 y CYP3A4. Posteriormente Buratti *et al.* (2002) evidencian, que tanto Metil paratión como Metil azinfos, son bioactivados por reacciones de desulfuración por CYP1A2 y CYP2B6 presentes en microsomas de hígado humano. Asimismo, se observó activación de Metil paratión en extractos de cerebro de rata y se presume que es realizada

por CYP2B (Albores *et al.* 2001) y en hígado de rata dicho compuesto fue un potente inhibidor y activador de 3A4 y 2C11 (Jokanovic 2001). Por otro lado, se conoce que las fosfotriesterasas están involucradas en la degradación de paraxón por medio de reacciones de hidrólisis (Costa *et al.* 2005).

Cho *et al.* (2000) evaluaron al Metil paratión con el ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* con la cepa TA100 (\pm S9) y los resultados fueron positivos en concentraciones de ingrediente activo similares a las reportadas en el presente trabajo, lo cual sugiere que el efecto mutagénico del plaguicida Foley corresponde a dicho ingrediente (Tabla 7 y 8, Figura 14). En los experimentos realizados con este plaguicida se observó aumento en la actividad mutagénica en la cepa TA100 en presencia de la fracción enzimática S9, dicho fenómeno se evidencia en las tablas 7 y 8 y es similar a lo reportado por los autores antes mencionados.

7.5 Gusatión

El Gusatión tiene como ingrediente activo Metil azinfos, el cual ha sido probado en ensayos de mutagenicidad en *Saccharomyces cerevisiae D7* dando resultados negativos (Bianchi *et al.* 1994), pero con la adición del plaguicida organofosforado Diazinón muestra sinergia mutagénica. El ingrediente activo resultó negativo en la producción de intercambio de cromátidas hermanas en cultivos de linfocitos humanos (Gómez-Arroyo *et al.* 1987) aunque en pruebas posteriores se evaluó con la adición de la fracción enzimática S9, resultando clastogénico en dosis de 500 μ g/mL (EPA 1999). Resultó positivo en la formación de aductos en presencia de S9 por el método *in vitro* de pos-marcaje radioactivo con 32 P- (Shah *et al.* 1997).

Los resultados de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* del plaguicida Gusatión en la presente investigación fueron negativos con las cepas TA98 y TA100, y coincidieron con los resultados reportados por la EPA (1999), donde se realizó la evaluación del ingrediente activo con las cepas TA98, TA100, TA1535, TA1537 y TA1538 en ausencia y presencia de activación metabólica. En este estudio también se observó que el plaguicida Gusatión muestra una elevada toxicidad en ambas cepas empleadas, la cual se ve suprimida por la presencia de la fracción enzimática S9 (Tablas 9 a 12), indicando un proceso de desintoxicación.

La degradación o desintoxicación de los organofosforados es la reacción significativa del metabolismo para el organismo y la activación, finalmente, es un proceso que se deriva de la desintoxicación. Uno de las pruebas más importantes en la contribución a la significancia de la reacción fue dada por Fonnum y Sterri (en 1981), quienes reportaron que solamente el 5% de la LD50 de Soman (5 μ g/ kg) reacciona con la ACE causando efectos agudos tóxicos, mientras que el 95% restante conlleva a reacciones biotransformadoras (Jokanovic 2001).

7.6 Tamarón

El ingrediente activo de Tamarón es Metamidofos, y ha sido reportado por la EPA (1998b) como positivo en la búsqueda de plaguicidas organofosforados involucrados en intoxicaciones por polineuropatía retasada evaluada en humanos. También se ha observado que la exposición a Metamidofos está relacionado con incremento en el porcentaje de micronúcleos en células hematopoyéticas. De igual forma induce una alta proporción de aberraciones cromosómicas, así como débil aumento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en células de médula ósea de ratón en ensayos *in vivo* (Amer y Sayed 1986).

Por otro lado, se reportó que la administración de dosis bajas (subcrónicas) de Metamidofos en ratas hembras y machos no afectó su comportamiento cognitivo (Temerowski y Van der Staay 2005).

Los resultados negativos en el presente trabajo en el sistema de mutación reversa con las cepas TA100 y TA98 de *Salmonella typhimurium* (\pm S9) del plaguicida Tamarón coincidieron con lo reportado por la EPA 2000, donde se realizó el análisis del plaguicida formulado Monitor que contiene el mismo ingrediente activo. En contraste, Karabay y Oguz (2005) obtuvieron resultados positivos en la evaluación del plaguicida formulado Tamarón con las cepas TA98 y TA100 logrando resultados mutagénicos de forma directa e indirecta en las mismas cepas empleadas en este trabajo y asimismo observando aumento de revertantes inducidas en presencia de la fracción enzimática S9. Lo cual lleva a suponer que el ingrediente inerte puede estar involucrado en dichos eventos de mutagenicidad.

La evaluación genotóxica para compuestos de nueva síntesis es de carácter obligatorio a nivel internacional (OECD 1997, Curbelo *et al.* 2001). La diversidad de efectos deletéreos a los que está expuesto el material hereditario es imposible de detectar a través de un único sistema de ensayo, por lo que el amplio espectro de mutaciones que puede originarse no sería abarcado en un solo sistema y ofrecería un resultado poco preciso. Además de que un mutágeno puede presentar especificidad por un órgano, tipo celular, o alguna especie, de acuerdo a las transformaciones metabólicas que requiera para convertirse en una forma mutagénicamente activa. De todo lo anterior se deduce que es indispensable realizar una batería de ensayos *in vivo* e *in vitro* que permita una correcta extrapolación del efecto genotóxico de sustancias de interés para poder predecir carcinogenicidad con mayor certeza (López de Ceraín 1998, De la Peña *et al.* 1990).

8. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se observó que el plaguicida Folimat no presentó comportamiento mutagénico ó citotóxico de forma directa e indirecta con ninguna de las concentraciones examinadas en la cepa TA98, sin embargo, presentó efecto mutagénico en la cepa TA100, a partir de 1000 $\mu\text{g/placa}$ con y sin activación metabólica y se determinó que existe diferencia significativa entre los tratamientos de forma directa e indirecta mostrando que en presencia de la fracción enzimática S9 ocurre un proceso de desintoxicación.
- Foley no presentó comportamiento mutagénico de forma directa ni indirecta en ninguna de las concentraciones examinadas con la cepa TA98. De forma directa mostró efecto citotóxico a partir de 600 $\mu\text{g/placa}$ y en la forma indirecta el evento tóxico se evidenció desde 3000 $\mu\text{g/placa}$. Con la cepa TA100 se observó comportamiento mutagénico, a partir de 800 $\mu\text{g/placa}$ sin activación metabólica y con activación metabólica a partir de 1000 $\mu\text{g/placa}$. Los resultados obtenidos en el análisis estadístico indican que existe diferencia significativa entre ambos tratamientos evidenciando incremento de mutagenicidad con la adición de mezcla enzimáticas S9.
- Gusatión no mostró comportamiento mutagénico de forma directa e indirecta en ninguna de las concentraciones examinadas con las cepas TA98 y TA100, no obstante en ambas se observó efecto citotóxico mostrando desintoxicación en presencia de la fracción enzimática S9.
- Con la cepa TA98 de forma directa se evidenció dicho efecto a partir de 40 $\mu\text{g/placa}$ y de forma indirecta desde 200 $\mu\text{g/placa}$. Con la cepa TA100 de forma directa se presentó efecto citotóxico a partir de 20 $\mu\text{g/placa}$ y de forma indirecta desde 800 $\mu\text{g/placa}$.
- Tamarón no demostró comportamiento genotóxico de forma directa e indirecta en ninguna de las concentraciones examinadas con las cepas TA98 y TA100.
- Se sugiere que el mecanismo por el cual actúa Folimat y Foley es por sustitución de pares de bases que identifica la cepa TA100.

9. REFERENCIAS

Albores A., Ortega-Mantilla G., Sierra-Santoyo A., Cebrián M.E., Muñoz-Sánchez J.L., Calderón-Salinas J.V. y Manno M. (2001). Cytochrome P450 2B (CYP2B)-mediated activation of methyl-parathion in rat brain extracts. *Toxicol. Lett.* 124, 1-10.

Amer S.M. y Sayed M.A. (1986). Cytogenetic effects of the insecticide metamidophos in mouse bone marrow and cultures mouse spleen cells. *Z. Naturforsch.* 42c, 21-30.

Ames B.N., Lecan F.D. y Durster W.E. (1973). An improved bacterial test system for detection and clasification of mutagens and carcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci. (EUA)* 70, 782-786.

Anderson T. D. y Zhu K.Y. (2004). Synergistic and antagonist effects of atrazine on the toxicity of organophosphoroditioate and organophosphorothioate insecticides to *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 80, 54-64.

Banks E.K., Hunter D.H. y Wachal D.J. (2005). Chlorpyrifos in surface waters before and after a federally mandated ban. *Environ. Int.* 31, 351-356.

Bello-Ramírez A.M., Carreón-Garabito B.Y. y Nava-Ocampo A.A. (2000). A theoretical approach to the mechanism of biological oxidation of organophosphorus pesticides. *Toxicology* 149, 63-68.

Ballesteros E. y Parrado M.J. (2004). Continuous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in natural and drinking waters. *J. Chromatog. A.* 12,1029, 267-73.

Blasco C., Fernández M., Peña A., Lino C., Silveira M., Font G. y Picó Y. (2003). Assessment of pesticide residues in honey from Portugal and Spain. *J.Agric.Food Chem.* 51, 8132-8138.

Boletín 0443 de la Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM). Publicación trimestral. Amado Nervo 22, Col. San Juanito, Texcoco, Estado de México.

Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543, 251-272.

Bianchi L., Zannoli A., Pizzala R., Stivala L.A. y Chiesara E. (1994). Genotoxicity assay of five pesticides and their mixtures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 223. 287-293.

Buratti M.F., Volpe M.T., Meneguz A., Vittozi L. y Testai E. (2003). CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186, 143-154

Childe G.V. (1992). Los orígenes de la civilización. 19ª reimpresión. Serie Breviarios del Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 289 p.

Cho T.H, Wild J. R. y Donnelly K. C. (2000). Utility of organophosphorus hydrolase for the remediation of mutagenicity of methyl parathion. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2022–2028.

Cocker J., Mason H.J., Garfitt S.J. y Jones K. (2002). Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicol. Lett.* 134, 97-103.

CICOPLAFEST. (2004). (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas). Catálogo de Plaguicidas.

Cope W.G., Leidy R.B. y Hodgson E. (2004). *A Textbook of Modern Toxicology* 3ª. Hudgson E. John (Ed.). Wiley. Nueva Jersey.

[Cortés-Eslava J.](#), [Gómez-Arroyo S.](#), [Villalobos-Pietrini R.](#) y [Espinosa-Aguirre J.J.](#) (2001). Metabolic activation of three arylamines and two organophosphorus insecticides by coriander (*Coriandrum sativum*) a common edible vegetable. *Toxicol. Lett.* 15, 39-49.

Cortés-Eslava J. (2002). Regulación de la activación vegetal de insecticidas organofosforados y aminas aromáticas en presencia de extractos vegetales. Relación entre mutagenicidad y antimutagenicidad. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Costa L. G., Cole T.B., Vitalote A. y Furlong C.E. (2005). Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potencial biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin. Chim. Acta* 2005, 37-38.

Cremlyn R. (1989). *Plaguicidas Modernos y su Acción Bioquímica*. Limusa. 3ª reimpresión. Wiley. México D.F.

Curbelo A., Remigio A. C., Pérez G., Fernández N., Rivero Y., Bada A. M., Ruiz T. y Ocaña R. (2001). Evaluación genotóxica *in vivo* de dos insecticidas biológicos con el ensayo de micronúcleos. En: 4. Taller Nacional y 2. Taller Internacional sobre Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis. Ed: CNIC, 30 p.

De Blaquiére G.E., Waters L., Blain P.G. y Williams F.M. (2000). Electrophysiological and biochemical effects of single and multiple doses of the organophosphate diazinon in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 166, 81-91.

De la Peña E., Barrueco C., Herrera A., García P. (1990). Ensayos de genotoxicidad: una alternativa a la experimentación animal. *Res. Exp. Anim.* 1, 41-52.

[Dolara P.](#), [Salvadori M.](#), [Capobianco T.](#) y [Torricelli F.](#) (1992). Sister-chromatid exchanges in human lymphocytes induced by dimethoate, omethoate, deltamethrin, benomyl and their mixture. [Mutat. Res.](#) 283, 113-118.

El Universal de Puebla. Puebla, Miércoles 25 de mayo de 2005. Desalojan área de urgencias de hospital en Puebla.

Escobar-García D.M. (2003). La mezcla del ciclohexanol y el alendazol como inductora de los citocromos P450 en hígado de roedores. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México..

Erdinger L., Dorr I., Durr M. y Hopker K.A. (2004). Analysis of mutagenic activity of airborne particulate matter standar reference materials and reference compounds using base pair-specific *Salmonella typhimurium* tester strains. *Mutat. Res.* 564, 149-157.

Espinosa-Aguirre J.J., Yamada M., Matsui K., Watanabe M., Sofuni T. y Nohmi T. (1999). New O-acetyltransferase-deficient Ames *Salmonella* strains generated by specific gene disruption. *Mutat. Res.* 439, 159-169.

EPA (US Environmental Protection Agency). (1998a). Health effects test guidelines OPPTS 870.5100 Bacterial reverse mutation test. www.epa.gov

EPA (US Environmental Protection Agency). (1998b). FQPA safety factor recommendations for the Organophosphates. A combined report of the hazard identification assessment review committee and the FQPA safety factor committee.

EPA (US Environmental Protection Agency). (1999). Human health risk assessment. *Azinphos-Methyl*. Office of Pesticide Programs Health Effects Division (7509C). Catherine Eiden, Risk Assessor.

EPA (US Environmental Protection Agency). (2000). Revised Toxicology Chapter For RED. Methamidophos. Nancy E. McCarroll y Alberto Protzel.

Eyer P. (2003). The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol. Rev.* 22, 165-90.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (1997). *Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos*. Por E.D. Ongley

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2001). Bomba de tiempo: los vertederos de plaguicidas tóxicos. <http://www.fao.org/NOTICIAS/2001/010502-s.htm>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2002a). Situación Epidemiológica de las Intoxicaciones Agudas por Plaguicidas en el Istmo Centroamericano, 1992-2000. Tomado del [Boletín Epidemiológico, Vol. 23 No. 3, septiembre 2002](#)

FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud) (2002b). Información estadística sobre enfermedades transmitidas por los alimentos en Europa peligros microbiológicos y químicos. Conferencia Paneuropea de FAO/OMS sobre inocuidad y calidad alimentaria, Budapest, Hungría, 25 – 28 de febrero de 2002.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2003). Versión Revisada del Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. *Adoptado por el 123º periodo de sesiones del Consejo de la FAO, noviembre 2002.*

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2004a). Los residuos de plaguicidas son una bomba de tiempo para los países pobres. <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2004/50119/index.html>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2004b). Los niños corren mayores riesgos de intoxicación por plaguicidas. <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2004/51018/index.html>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2005a). Agravamiento de la situación alimentaria en el Sahel. <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2005/102396/index.html>

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2005b). Más de 30 000 toneladas de pesticidas tóxicos contaminan América Latina. <http://www.fao.org/countryprofiles/index.asp?iso3=BOL&lang=es>

Fortes C.A., Aiub F.A, Alves E.C., Sodré E., Ribeiro L.F. y Felzenszwalb I. (2002). Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet. Mol. Res.* 1, 159-166.

Frías-Villegas A. (2005). Mutagenicidad producida por diversas fracciones del material orgánico extraído de las partículas menores o iguales a diez micrómetros. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Gómez-Arroyo S., Baiza A.M. y Villalobos-Pietrini R. (1985). A comparative study of the cytogenetic effects of the insecticidas Heptachlor, Malathion and Methyl Parathion in *Vicia faba*. *Contam. Ambient.* 4, 7-16.

Gómez-Arroyo S., Noriega Aldana N., Juárez-Rodríguez D. y Villalobos-Pietrini R. (1987). Sister chromatid exchanges induced by the organophosphorus insecticidas Methyl Parathion, Dimethoate, Phoxim and Methyl Azinfos in cultured human lymphocytes. *Contam. Ambient.* 3, 63- 70.

Gómez-Arroyo S., Castillo-Ruiz P., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini R. (1985). *Vicia faba*- Sister Chromatid Exchanges of the Organophosphorus insecticides Methyl Parathion, Dimethoate, Oxydemeton methyl, Azinphos methyl y Phoxim. *Cytologia* 53, 627-634.

Henaos H. S. y Corey O.G. (1986). Plaguicidas Organofosforados y Carb micos. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Metepec, México. 194p.

Hernández J., Robledo N.R., Velasco L., Quintero R., Pickard M.A. y Vázquez-Duhalt R. (1998). Chloroperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus insecticides. *Pesticide Bioch. Physiol.* 61, 87-94.

INE (Instituto Nacional de Ecología) (2004). Los plaguicidas y su transporte en el ambiente [www.ine.gob.mx/dgicurg/plaguicidas/ download/pytransporte.pdf](http://www.ine.gob.mx/dgicurg/plaguicidas/download/pytransporte.pdf)

INE (Instituto Nacional de Ecología) (2005a).  Qu  son los plaguicidas?. <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/folletos/94/94.html>

INE (Instituto Nacional de Ecología) (2005b). Fuentes de contaminación en México. http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/372/fuentes.html?id_pub=372

Ioannides C. (2002). Xenobiotic metabolism: an overview. En: Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics. Ioannides C. (Ed.). Wiley. West Sussex, U.K. 578 p.

Jonsson N.N, Davis R. y De Witt M. (2001). An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. Aust. Vet. J. 79, 826-31.

Karabay N.U y Oguz M.G. (2005). Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. Genetics and Mol. Res. 4, 653-662.

Lewis D.F.V. (2001). Guide to Cytochromes P450. En: Structure and Function. Taylor y Francis, Londres y Nueva York. 215 p.

London L., Flisher A.J., Wesseling C., Mergler D. Y y Kromhout H. (2005). Suicide and exposure to organophosphates insecticides: cause or effect?. Am. J. Ind. Med. 47, 308-321.

López de Ceraín A., Pérez C., Jiménez A., Ezpeleta O., Bello J. y Monge A. (1998). Evaluación mutagénica de medicamentos. En: de la Peña E, Burguete, I y Guadaño A. Evaluación Mutagénica y Genotóxica. (Ed.) Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental, pp. 263- 270.

MacCanne J. y Ames B.N. (1976). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 950-954.

Maron D.M. y Ames B.N. (1984). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Handbook of mutagenicity test procedures. En: Kilbey B.J., Legator M. y Ramel C. (Ed.) Elsevier Holanda. pp 94-140.

Mitsuchi S. y Taizou T. (2004). Applicability of headspace solid-phase microextraction to the determination multi-class pesticides in waters. J. Chromat. A. 63-74.

Mortelmans K. y Zeiger E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Mutat. Res, 455, 29- 60.

Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA1-1993. Plaguicidas. Productos para uso agrícola, forestal, pecuario, de jardinería, urbano e industrial. Etiquetado.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (2003). OECD Guidelines for testing of chemicals. Overview of currently available test guidelines. www.oecd.org

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2003). Respuesta de la salud pública a las armas biológicas y químicas. Guía de la OMS. Segunda Edición. <http://www.paho.org/Spanish/DD/PED/armasbiologicas.pdf>

OMS/CPEET/PEPOMS (Organización Mundial de la Salud/Control, Prevención y Erradicación de las Enfermedades Transmisibles/ Plan de Evaluación de Plaguicidas de la Organización Mundial de la Salud) (2003). Directrices sobre la gestión de los plaguicidas para la salud pública. Informe de la Consulta Interregional de la OMS. Chiang Mai, Tailandia 25-28 de febrero de 2003. Organización Mundial de la Salud.

Oesch-Bartlomowich B. y Oesch F. (2004) Modulation of mutagenicity by phosphorylation of mutagen-metabolizing enzymes. Archives of Biochemistry and Biophysics, 423, 31-36.

OPS/OMS/HEP/MASICA/PLAGSALUD (Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud/ División de Salud y Ambiente/ Programa Medio Ambiente y Salud en el Istmo Centroamericano/ Proyecto Aspectos Ocupacionales y Ambientales de Exposición a Plaguicidas en el Istmo Centroamericano) (2001). Fichas técnicas de plaguicidas a prohibir o restringir incluidos en el acuerdo No. 9 de la XVI Reunión del Sector Salud de Centroamérica y República Dominicana (RESSCAD).

Orozco-De Los Ríos I., Sánchez-Vizcaino P.M., González-Ramírez D. y García-Piñón J. (2005). Neuropatía periférica y deterioro de las funciones cognitivas asociados a exposición crónica a organofosforados. Rev. Med. Inst. Mex. Seg. Soc. 43, 479-486.

Ortega C.J., Espinosa-Torres F. y Lopez-Carrillo L. (1994). El control de los riegos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: retos ante el tratado libre comercio. Salud Pública Méx. 36, 624-632.

Palacios-Nava M. y Moreno-Tetlacuilo L. (2004) Diferencias en la salud de jornaleras y jornaleros agrícolas migrantes en Sinaloa México. Salud Publica Mex. 46, 286-293.

Palacios-Nava M., Paz-Román P., Hernández-Robles S. y Mendoza-Alvarado L. (1999). Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. Salud Pública Méx. 41, 55-61.

Restrepo I. (1992). Los plaguicidas en México. Comisión Nacional de Derechos Humanos, México D.F. 296 p.

Reigart J.R. y Roberts J.R. (1999). Recognition and management of pesticide poisonings. Publicado por EPA USA. Washington DC.

Roberts D.M., Karunaratna A., Buckley N.A., Manuweera G., Rezvi-Sheriff M.H. y Eddleston M. (2003). Bulletin of the World Health Organization. 81, 789-798.

Romero Martínez I. (2003). Evaluación del daño al ADN en linfocitos humanos a través del ensayo de electroforesis unicelular alcalina provocado por el herbicida Asulam activado metabólicamente por *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Sankararamkrishnan N., Kumar A. S. y Sanghi R. (2005). Organochlorine and organophosphorous pesticide residues in ground water and surface waters of Kanpur, Uttar Pradesh, India. Environment Internacional. 31, 113– 120

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2003). Informe de la situación del medio ambiente en México 2002. Compendio de estadísticas ambientales. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México D.F. 272p.

Shah R.G., Lagueux J., Kapur S., Levallois P., Ayote P., Tremblay M., Zee J. y Porier G.G. (1997). Determination of genotoxicity of the metabolites of the pesticides Guthion, Sencor, Lorox, Reglone, Daconil and Admire by ³²P-postlabeling. Mol. Cel. Biochem. 169, 177-184.

Sams C., Mason J.H. y Rawbore R. (2000). Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. Toxicol. Lett. 116, 217-221.

Sierra-Torres. C.H., Cajas-Salazar N., Hoyos L.S., Zuleta M., Whorton E.B. y Au W.W. (1998) In vitro and in vivo genotoxic activity of Miral, an organophosphorus insecticide used in Colombia, Mutat. Res. 415, 59–67.

Sogorb M.A., Vilanova E. y Carrera V. (2004) Future applications of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisonings. Toxicol. Lett. 151, 219–233

Song A., Seidler F., Saleh J., Zhanh S., Padilla S. Y Slotking T. (1997). Cellular mechanism for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 158-174.

Temerowski M. y Van der Staay F.J. (2005). Absence of long-term behavioral effects after sub-chronic administration of low doses of methamidophos in male and female rats. *27*, 279-297.

Timbrell J.A (1997). Principles of Biochemical Toxicology. En: Genetic toxicity. Taylor y Francis. Londres. 415 p.

Van Eerd L.L., Hoagland R.E., Zablotowich R. M. y May C.J. (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Sci.* 51, 472-495.

Wesseling C., Corriols M. y Bravo V. (2005). Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. *Toxicol. App. Pharmacol.* 207, 697 – 705.