



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

INDUCCIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS
POR LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS
METIL PARATIÓN O FOLIDOL Y DIMETOATO O
ROGOR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

GEORGINA LILÍ CONTRERAS BUCIO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

MÉXICO D.F.

OCTUBRE 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.

DEDICADO:

A mi hijo Tarek que me ha acompañado durante todos estos años.

A mi abuela María de Jesús (Chuchita) que me enseñó el valor del trabajo

A mi abuelo Efraín que me educó con amor, libertad, justicia e hizo cotidianos juegos con utopías.

A mis mamas Olga y Blanca, Blanca y Olga, que se han turnado para amarme.

A mis profundas y fuertes raíces matriarcales: Vespertina, China, Celia, Esperanza y Marina. Y a mi tío abuelo Arturo que me recibió en su casa.

A mi presente calido que me ha premiado con unos hermanos maravillosos: Olga y Christian; Poncho y Susan; Christian y Jill y los lejanos Michel y Mónica.

Al futuro luminoso de mis sobrinos que inició con un Sol: María y ahora disfrutamos varias constelaciones: Miguelito, mi ahijado Matthew, Emily; Andrew y Nicolás; Michel y Marcel; y el bebecito en camino.

Este trabajo fue posible gracias a la Dra. Sandra Gómez Arroyo quien me acogió en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis Ambiental, del Centro de la Atmósfera, en donde crecieron unos hermosos cromosomas. Y fue terminado por su infinita sabiduría y paciencia al esperarme con las puertas abiertas durante tantos años.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo por sus amplios conocimientos y experiencia sobre genotoxicidad inducida por contaminantes ambientales, así como por el análisis crítico y profundo con que ha enriquecido el presente trabajo.

A la Dra. María Elena Calderón Segura, la Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón, el Dr. Luis Felipe Jiménez García y al Dr. Rafael Villalobos Pietrini:

Mi más sincero agradecimiento por la ardua labor de análisis, sus valiosos comentarios y aportaciones con las que han contribuido en la etapa final de este estudio.

A el M. en C. Alfonso Reyes, del Servicio de Estadística e Investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez y al M. en C. Leonel Hernández Mena por su amable apoyo en la parte estadística.

A Tarek Peregrina Contreras por su apoyo técnico en Informática.

Dr. Alfonso Abizaid Bucio por su apoyo en el envío de artículos.

M. en R.I. Olga Abizaid Bucio y Dr. Christian Abizaid Bucio por la revisión final del trabajo.

Portada
Índice
Resumen
Abstract
Introducción
Justificación
Objetivo
Material y métodos
Resultados
Discusión y conclusiones
Anexo I (Figuras)
Anexo II (Tablas)
Referencias

Palabras clave: plaguicidas organofosforados, metil paratión, dimetoato, aberraciones cromosómicas, índice mitótico.

RESUMEN

Los insecticidas organofosforados son ampliamente usados en la agricultura, la industria y el control de enfermedades, sin embargo también han representado un costo muy elevado en problemas ambientales y de salud. La valoración de los efectos genotóxicos es de importancia en salud pública. Los diversos datos experimentales dan evidencia de la capacidad genotóxica de los insecticidas organofosforados en animales de laboratorio y en sistemas *in vitro* utilizando dosis agudas y crónicas, así como en personas expuestas ocupacionalmente o por intento de suicidio. Sin embargo, para algunos plaguicidas la información sobre su efecto genotóxico es limitada e inconsistente. En el presente trabajo se evalúa la capacidad de dos insecticidas organofosforados metil paratión y dimetoato en producir aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos de sangre periférica de 4 donadores sanos. Con el objeto de determinar si existen sitios en los cromosomas donde las aberraciones ocurran preferentemente se realizó la tinción de bandas GTG. Las células fueron incubadas con 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$ de metil paratión y con 100, 300, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de dimetoato durante 24 y 48 horas de tratamiento.

Dentro del rango de concentraciones probadas en este estudio no se encontró variación significativa en las aberraciones cromosómicas producidas en los cultivos de linfocitos a los que se les aplicaron diferentes concentraciones de metil paratión y dimetoato al analizarlas con respecto a los testigos negativos tampoco al comparar los diferentes tratamientos por pares. El compuesto probado como testigo positivo (mitomicina C) produce incrementos estadísticamente significativos para todo tipo de

aberraciones. En los grupos testigos y para las diferentes concentraciones estudiadas las aberraciones más frecuentes fueron rompimientos cromosómicos. En el presente trabajo las aberraciones cromosómicas se localizaron en centrómeros (3.6 %), sitios frágiles no centroméricos (2 %) y en otras partes del cromosoma (94 %). La frecuencia de aberraciones cromosómicas entre donadores no mostró diferencia significativa a 24 ni a 48 horas para las diferentes concentraciones de los insecticidas estudiados. La cantidad de aberraciones cromosómicas por metafase en los cultivos tratados con los dos insecticidas así como en el grupo de los testigos fue baja, de 1 a 2 aberraciones. En las aneuploidías, al analizar por cromosomas, el cromosoma X fue el que preferentemente se perdía.

Si bien el índice mitótico es una medida indirecta del efecto citotóxico y citostático está dentro de los indicadores sugeridos para valorar la integridad y crecimiento celular. Para las concentraciones más altas probadas en el presente estudio hubo evidencia de reducción importante en la actividad mitótica y muerte celular. El análisis del índice mitótico a 24 horas de tratamiento con metil paratión y dimetoato para los cuatro donadores muestra un comportamiento muy semejante; en las primeras concentraciones se observa un aumento del índice mitótico y después decrece tomando valores estadísticamente significativos respecto a los testigos a partir de 30 mg/mL para metil paratión y de 600 mg/mL para dimetoato. En los tratamientos a 48 horas se encontró una progresiva inhibición del índice mitótico de manera dosis dependiente siendo significativa a partir de 10 mg/mL y 300 mg/mL para metil paratión y dimetoato respectivamente. No se encontró diferencia significativa en el índice mitótico entre donadores.

ABSTRACT

Organophosphorus insecticides have been widely used in agriculture, industry and in the control of disease. Their use, however, has had an important impact both on the environment and on health. It is thus important to assess their genotoxic activity on public health.

A number of studies based on research data have illustrated the genotoxic activity of organophosphorus insecticides on laboratory animals; on in-vitro environments using large, chronic doses; as well as on people who have been lived occupational exposure or who have attempted suicide. However, the results regarding the genotoxic activity of some insecticides are limited and inconsistent.

In this study, the capacity to create chromosome aberrations of two organophosphorus insecticides —methyl parathion and dimethoate— will be assessed. For that purpose a cult of lymphocytes from peripheral blood from four healthy donors was performed. In order to determine whether there were areas within the chromosomes where aberrations were more likely to appear, a GTG-banding technique was used. Cells were incubated for 24 and 48 hours at concentrations of 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 and 200 µg /mL of methyl parathion, and at 100, 300, 500, 600, 700, 800, 900 and 1000 µg /mL of dimethoate.

No significative variation in the lymphocytes cult in any of the different concentrations of both methyl parathion and dimethoate was found with regards to chromosome

aberrations when analysing them against negative witness, or when comparing the different treatments by pairs.

Mitomycin-C, the compound used as positive witness, produces statistically significant increases for all types of aberrations. The most frequent ones within the witness groups, and for all the different concentrations, were chromosome ruptures. Within this study, aberrations were localized in centromeres (3.6 %); non-centromere fragile sites (2 %); and in other areas of the chromosome (94 %). The aberration frequency among donors did not present a significant difference at 24 nor 48-hours in any of the concentrations of the two insecticides under study. The quantity of chromosome aberrations by metaphase was low (1-2 aberrations) in the cults treated with the insecticides, as well as in the witness group. In the cases of aneuploidies, results showed that the chromosome X was the one that disappeared in most cases.

Although the mitotic index—an indirect measure of cytotoxic and cytostatic effects—was within the suggested indicators to assess cell integrity and growth, at higher concentrations there was evidence of an important reduction in the mitotic activity and cell death. After 24 hours, the analysis of the mitotic index with methyl parathion and dimethoate showed a very similar behavior; in the first concentrations an increase of the mitotic index was observed, which decreased to statistically significant levels with respect to the witnesses from 10 µg /mL and 300 µg /mL on for methyl parathion and dimethoate respectively. No significant differences in the mitotic index were found among the donors.

INTRODUCCIÓN

En la práctica de la agricultura moderna, silvicultura, industria y el hogar se utilizan gran cantidad de agentes químicos para erradicar, controlar o incluso prevenir vectores de enfermedades que atacan plantas, animales y humanos. Son por lo tanto uno de los grupos de sustancias más ampliamente usadas y van asociadas al estilo de vida moderno. Entre los plaguicidas más extensamente empleados se encuentra el grupo de los organofosforados (OF) debido, por una parte a su eficiencia para eliminar plagas y por otro lado porque en ambientes agrícolas controlados y abiertos son degradados más rápido que los insecticidas organoclorados (OCL), cuya estabilidad media en el ambiente es de varios años. En su mayoría son insecticidas, aunque también son usados como acaricidas, raticidas, herbicidas y fungicidas (WHO 1986).

La gran desventaja de su empleo es su elevada toxicidad. Los OF tienen su origen en la búsqueda de venenos con fines militares durante la Segunda Guerra Mundial donde fueron utilizados por sus importantes propiedades neurotóxicas, debido a su capacidad de inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa de manera irreversible lo que altera la transmisión neuromuscular (Moutschen *et al.* 1984, WHO 1986). En 1995 durante el atentado terrorista en Tokio, se empleó sarin, un gas neurotóxico con efecto semejante a los OF sólo que más tóxico. En la Guerra del Golfo, los Estados Unidos de América (EUA) aplicaron OF como agentes “profilácticos” que se sospecha pueden ser la causa de algunos de los síntomas del Síndrome de la Guerra del Golfo (Dyro 2005).

Muchos estudios prospectivos evalúan el riesgo sobre la salud en humanos y otros organismos. En algunos de ellos se ha documentado el paso de tecnología referente al empleo de plaguicidas en países en desarrollo, sin que esto vaya acompañado de una legislación nacional que regule su etiquetación, venta, modo de aplicación, distribución y almacenamiento. Aunado a esto se encuentran las diferencias existentes en la forma de cultivar así como las necesidades locales del tipo de plaguicida (Igbedioh 1991, Eddleston *et al.* 2002).

En países desarrollados, si bien existen leyes que regulan la manufactura, distribución, mezcla y aplicación de plaguicidas, continúan presentándose casos de daño por exposición ocupacional, accidentes, suicidios y por uso ilegal (Esteban *et al.* 1996, Edwards y Tchounwou 2005).

El metil paratión es un insecticida OF clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA) como extremadamente tóxico, su utilización está restringida a zonas abiertas y por personal certificado, sin embargo es relativamente barato y fácil de obtener, por lo que fue utilizado para rociar amplias zonas de EUA de manera ilegal durante fines 1980 hasta 1997 por agencias de control de plagas sin licencia (Jaga y Dharmani 2006). En Mississippi compañías no autorizadas aplicaron, durante 8 años, metil paratión para controlar insectos domésticos. Posteriormente se realizaron estudios en 353 habitantes, aparentemente sanos que pasaron al menos 15 horas en sus casas, se observó aumento en los síntomas de toxicidad subcrónica y un incremento en la cantidad de síntomas neuropsiquiátricos (Cox *et al.* 2005). En Lorain, Ohio en EUA, Esteban *et al.* (1996) muestrearon 64 casas e investigaron a 147 habitantes en los que se encontró para-nitrofenol en orina (metabolito de metil paratión). De enero

de 1991 a noviembre de 1994 en esta misma ciudad, se detectaron evidencias de metil parati6n, qu6mico que haba sido rociado de manera ilegal 3 a1os atr6s, por lo que se tuvieron que muestrear 9,000 residencias y descontaminar 1,000 propiedades (Clark *et al.* 2002). En 1997 ocurrieron accidentes similares en Nueva York, Mahatan y Brooklyn (Cox *et al.* 2005).

No s6lo en pa6ses desarrollados hay accidentes. En 1967 el 25 de noviembre en Chiquinquir6, Colombia, murieron decenas de ni1os intoxicados por consumir pan contaminado con parati6n. Durante 1984 en Bophal, India 16,000 personas fallecieron al escapar 27 toneladas de gas t6xico metil isocianato de una planta de elaboraci6n de plaguicidas (Union Carbide Corporation). En el Salvador se report6 exposici6n ocupacional de trabajadores agr6colas y sus familias. Durante 1999 en Per6 ocurri6 una tragedia por envenenamiento en 24 ni1os de la Sierra Taucamarca. En 2003 muri6 un ni1o en Paraguay por intoxicaci6n con plaguicidas. Estas tragedias evidencian el serio problema para la salud que representa el uso de plaguicidas y en especial de los OF, as6 como la negligencia de los vendedores y exportadores de plaguicidas (Rosenthal 2003, Edwards y Tchounwou 2005, Jaga y Dharmani 2006).

Los ni1os est6n particularmente expuestos, sobre todo aquellos que viven en la pobreza y que est6n en contacto con plaguicidas tanto de aplicaci6n legal como ilegal (Landrigan *et al.* 1999). En 1998 en EUA fue prohibido el empleo de metil parati6n en lugares cerrados con el objeto de proteger el ambiente, a humanos y en especial a los ni1os. Tambi6n se indica la necesidad de realizar mayor cantidad de investigaciones sobre estos plaguicidas. La estructura qu6mica de los organofosforados se muestra en la Figura 1 (ver anexo I).

De esta estructura se derivan sus características más importantes, entre las que están sus propiedades de fosforilación, producto de un ataque preferencial en la unión P-X y las de alquilación en los átomos de carbono (radicales R¹ y R²). La capacidad de alquilación les permite reaccionar con las bases y los grupos fosfato del ADN principalmente con el N7 de la guanina (Wild 1975). La fosforilación está relacionada con su capacidad de reaccionar con el sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa y bloquear de esta manera la transmisión neuronal (Moutschen–Dahmen *et al.* 1984).

Dentro de este grupo el metil paratión y el dimetoato son dos insecticidas organofosforados de amplio espectro que son comúnmente utilizados (Orme y Klegey 2006).

Metil Paratión

Características físico- químicas:

El metil paratión (O,O-dimetil O-4 nitrofenil fosforotionato) pertenece al grupo de los ésteres de tiofosfato, fue desarrollado en 1940 por el químico alemán Schrader y fue introducido en forma comercial en 1947. Se sintetiza por reacción de O, O-dimetil fósforo clorhidrotioato con una sal de sodio 4 nitrofenol (WHO1993). La estructura química se muestra en la Figura 2 (ver anexo I).

En 1954 se registró en EUA para su utilización indiscriminada. En 1978 después de varios accidentes se restringió su empleo. Basándose en su toxicidad oral, está clasificado por la Organización Mundial de la Salud (WHO 1993) como categoría 1a extremadamente tóxico, y por la EPA como tóxico categoría I (los insecticidas más tóxicos), por lo que sólo puede ser utilizado por trabajadores certificados y en espacios abiertos. En su forma pura es un sólido cristalino de color blanco con olor a ajo o huevo

podrido y en grado técnico es un líquido que puede ser incoloro o algo oscuro (WHO 1993, ATSDR 2004, UNEP/FAO 2005). Sus características físico-químicas se resumen en la Tabla 1 (ver anexo II).

Las formulaciones de concentrados en emulsión de metil paratión contienen 19.5 %, 40 %, 50 %, 60 % de ingrediente activo (i.a.), se consideran dentro de la clasificación Clase Ib desde 19.5 % hasta el 50 % de i.a (WHO 1993). Las presentaciones en polvo tienen 1.5 %, 2 % y 3 % de i.a. y están dentro de la categoría Clase III (WHO 1993, FAO 1997). Sus nombres comerciales son: A-Gro, Azofos, Bladan-M, Cekumetion, Dalf, Devition, dimetil paratión, Drexel Metil paratión, 4E&601, Digun, Dipar, E-601, Ekatox, Folidol M, M40&80, Fosferno M, Fostox Metil, Gearfos, Kilex paratión, Kriss Líquido M, Metafos, metil paratión, Metil-bladan, Metilfosferno, Metiltiofos, Metron, Mepaton, Mepatox, Metacido, Niletar, Niram M-4, Nitran, Nitros, Nitros 80, Oleovofotox, Parapeste M50, Parataf, Paratox, Paratron, Paridol, Pararon M, Pencap M&MLS, Pentox MS, Sinafid M-48, 63 especial EC, Tekwaisa, Tiofenit, Trilpar M-50, Unidol, Vertac Metil paratión, Wolfatox y Wofatox. (FAO 1997). Origen del estándar analítico: All India Medical Co.(India), Bayer India, Bayer México, Cheminova (Dinamarca), Rallis India Ltd. (India), Sundat (S) Pte. Ltd. (Singapur) y Velpol Company (México) (FAO 1997).

Dimetoato

Características físico-químicas

El dimetoato (O,O-Dimetil S-[N-metilcarbamoilmetil] fosforoditioato) fue descubierto y desarrollado de manera independiente por American Cyanamid Company, Fisons y Monetecatini. Se prepara por interacción del ácido O;O-dimetilfosforoditioico

más N-metil-2-cloroacetamida. Está clasificado como categoría IIa (moderadamente tóxico) y por la EPA como Tóxico Categoría II (moderadamente tóxicos) (WHO 2002). Su estructura química se muestra en la Figura 3 (ver anexo I).

En su grado puro es un sólido cristalino blanco con olor a mercapto o alcanfor, el grado técnico tiene aproximadamente 93 % de pureza y son cristales de color blanco opaco a material semicristalino gris (IPCS 1988). Las características físico-químicas se resumen en la Tabla II (ver anexo II).

Sus nombres comerciales son: American Cianamid 12,880, Cigon, DeFend, Dimetogeno, O, O-Dimetil S-Metil, carbamoil metil fosforoditioato, Dimeton, Dimevur, ELP, Fosfotox, Fastion M.N., Lurgo, Perfektion, Fosfamide, Racusan, Rogor, Roxion, Sharatox, Sistoate 00216 (código químico del Departamento de Regulación de Plaguicidas de California por sus siglas en inglés CA DPR), 035001 (Código químico para plaguicidas de EPA PC), 216 (código químico CA DPR), 60-51-5 (número CAS), 60515 (número CAS), DeFend, Dimetoato ANSI, Dimetoato, ENT-24650, O,O-Dimetil fosforoditioato, S-ester con 2-mercapto-N-metilacetamida, O,O-Dimetil S-((metilcarbamoil) metil) fosforoditioato, O,O-Dimetil S-(N-(metilcarbamoil) metil) fosforoditioato, ácido fosforoditioico, S-((metilcarbamoil) metil O,O-dimetil ester, Rebelato (WHO 1989, FAO 2005). El estándar analítico proviene de las empresas: American Cyanamid Company, Agricultural Division Princeton, Nueva Jersey (WHO 1989, FAO 2005). En México es fabricado por Gowan de México, S.A. de C.V.

Uso en agricultura

Son insecticidas de acción sistémica y de contacto. El metil paratión es conocido como veneno del algodón, se utiliza para controlar plagas en campos de algodón, soya, alfalfa, maíz, arroz, trigo, girasol, en huertos de cítricos, manzana y pera, así como en hortalizas (WHO 1993). El dimetoato se emplea sobre granos, frutos (cítricos, mangos, plátanos y manzanas), en hortalizas (brócoli, calabaza, pepinos, papa, espinacas) y en sembradíos de tomate, algodón, alfalfa y tabaco (WHO 1989, Orme y Kegley 2006). En los campos Mexicanos se aplica principalmente en cultivos de alfalfa, algodón, apio, brócoli, cártamo, chícharo, chile, coliflor, frijol, jitomate, lechuga, maíz, melón, papa, sandía, sorgo, soya y trigo.

Distribución en el ambiente.

Aire: debido a que para su aplicación se rocían desde un aeroplano o con equipo especial sobre el follaje, es el aire la zona de mayor concentración de los plaguicidas (Woodrow *et al.* 1977). El análisis de muestras provenientes de áreas donde se realiza la aplicación de metil paratión, indica que las concentraciones dependen, por una parte del tamaño del área rociada, del tiempo, de la temperatura ambiental, así como de la velocidad del viento. Las concentraciones de metil paratión en el aire posteriores al rociado, declinan rápidamente a los 3 días no encontrándose a los 9 días. Cuando se utiliza la fórmula encapsulada de metil paratión, las concentraciones en el aire son menores y varían dependiendo de la estación del año, observándose un pico en la época de cosecha, el cual se mantiene en un rango de 100-800 ng/m³. En días calurosos el dimetoato se puede encontrar a 300 metros de distancia del área de rociado, las

concentraciones oscilan entre 61 y 142 ng/m³ decreciendo 10 veces a los 4 días. En condiciones brumosas las cantidades en el aire se incrementan, debido a la absorción del compuesto sobre la superficie de evaporación del agua. Cuando llueve hay un lavado eficiente (WHO 1989, 1993).

Agua: Los insecticidas pueden ser aplicados directamente sobre superficies de agua, pero no en repetidas ocasiones. Son transportados por el aire y el agua desde zonas agrícolas y bosques. Al estudiar los procesos de degradación del metil paratión usado a concentración de 0.2 % mg/L en aguas provenientes del lago Albufera (España) y agua de laboratorio se observó que había una rápida degradación química en aguas naturales con un tiempo de vida media de 1 a 3 días, mientras que en aguas de laboratorio fue de 13.4 días. Esta diferencia se atribuye a la degradación por microorganismos (Ferrando *et al.* 1992). En aguas de mar el metil paratión es más estable que en aguas dulces y no se encuentra degradación biótica (WHO 1993).

El dimetoato también es degradado rápidamente por hidrólisis especialmente en un medio alcalino donde a pH 11, se elimina el 87 % en 2 horas, produciendo desmetil dimetoato. La hidrólisis es catalizada por iones de metales (WHO 1989).

Tierra: Forman complejos y prácticamente no hay movimiento de insecticidas OF a través del suelo. Su vida media depende del tipo de tierra, del pH y de la temperatura. En el caso del metil paratión, se pierde más rápido en barros arcillosos (5 días a 20 °C y 10 días a 10° C), que en arenosos (9 días a 20 °C 15 días a 10 °C pH de 5.5 a 7.5) debido a la gran cantidad de microorganismos que poseen los primeros (WHO 1993).

El dimetoato tiene una baja permanencia en suelos. Las principales rutas de degradación son la hidrolítica mediada por microorganismos y la oxidante en suelos aeróbicos. En condiciones no estériles, Kolbe *et al.* (1991) reporta una vida media de 9 a 11 días y en suelos de laboratorio estériles de 16 a 18 días. En procesos de degradación aeróbica se han encontrado bajas concentraciones de los metabolitos O-desmetil dimetoato y ácido O,O-dimetiltiofosfórico, en campos del suelos del sureste europeo se encontró ometoato como metabolito anaeróbico (EFSA 2006).

Fotodegradación: El metil paratión es uno de los insecticidas más sensibles a la luz, Baker y Applegate (1970) observaron fotodegradación utilizando luz en el rango de 300-400 nm durante 8 horas. Debido a la degradación oxidante el metil paratión pasa a su derivado paraoxón por acción de la luz UV o del sol (WHO 1993). No hay fotodegradación del dimetoato en suelos (EFSA 2006). Oller *et al.* (2006) estudiaron en una planta piloto la degradación foto catalítica con óxido de titanio y con foto Fenton, de varios plaguicidas, entre ellos el dimetoato. En estas condiciones se logró la desaparición total de los compuestos y su casi completa mineralización. Con este sistema se pretende estudiar los parámetros necesarios para posteriormente aprovechar los rayos UV de la luz solar.

Bioacumulación: la persistencia de residuos de OF en el follaje depende de la formulación empleada, el método de aplicación, la lluvia y la temperatura. Kido *et al.* (1975) encuentran en la superficie de hojas tratadas con metil paratión que se pierde en 90% un día después de su aplicación; al estudiar el interior de la hoja, el insecticida se había eliminado 99 % posterior al quinto día. En condiciones experimentales utilizando

brotos de trigo se describe que el insecticida inhibe la actividad de transporte de electrones en el fotosistema II (Moorthy *et al.* 1992).

El dimetoato también es rápidamente absorbido y degradado en la superficie de la planta por hidrólisis y oxidación. Su tiempo de vida media varía entre 2 a 5 días y decrece completamente de 15 a 30 días en función del tipo de planta y de las condiciones climáticas. Se ha observado que su descomposición aumenta con la temperatura (WHO 1989).

En animales acuáticos, la sensibilidad a metil paratión varía ampliamente entre especies. Los crustáceos tanto de agua dulce como de mar son sensibles al metil paratión con una concentración efectiva media (EC50) entre 0.002-0.050 mg/L. Estudios realizados en laboratorio han determinado la toxicidad aguda del metil paratión para los peces. Los síntomas de envenenamiento son oscurecimiento de la piel, hiperactividad, temores, parálisis y muerte (WHO 1993). El dimetoato tiene un rango de toxicidad aguda, de moderada a muy elevada para anfibios, anélidos, crustáceos, insectos, moluscos y zooplancton (Orme y Kegley 2006). Ramana *et al.* (1992), reportan que el dimetoato es dañino para peces y afecta su reproducción, mientras que Orme y Kegley (2006) encuentran toxicidad desde ligera a alta. Las abejas son particularmente sensibles a estos insecticidas y el néctar de plantas rociadas con 0.1% de dimetoato es letal durante por lo menos 2 a 10 días después de su aplicación (WHO 1989). El metil paratión estuvo principalmente involucrado al estudiar abejas muertas por residuos de insecticidas. Para ambos insecticidas las abejas africanas mostraron una tolerancia mucho mayor (WHO 1989, 1993).

Los pájaros se encuentran sensiblemente afectados por la aplicación de metil paratió. Se ha encontrado que la acetilcolinetrasa en los pájaros está alterada como resultado de la alimentación y residencia en ambientes contaminados por OF (WHO 1993).

Por su alta toxicidad, actualmente sólo pueden ser aplicados por personal autorizado y en ambientes naturales abiertos donde pueden ser degradados relativamente rápido (6 días o una semana), primero fotolizados por la luz UV y luego biodegradados por microorganismos que se encuentran en el agua y en la tierra , por lo que teóricamente el riesgo se limitaría a las personas que trabajan en la manufactura, mezcla y aplicación, así como los habitantes de las áreas cercanas a las zonas de fumigación ya que el metil paratió, el dimetoato y sus derivados pueden ser transportados por los vientos, lluvias y niebla (WHO 1989, 1993). Las prácticas agrícolas que se apegan a las normas de protección en la aplicación de OF permiten una exposición menor. Jirachaiyabhas *et al.* (2004) al estudiar la calidad del aire respirado por trabajadores agrícolas con técnicas tradicionales y los que utilizan métodos de manejo integrado de plaguicidas en Tailandia, encontraron que los trabajadores que laboran de manera tradicional, están expuestos a concentraciones mayores ya que los absorben más por inhalación.

Por sus propiedades físico-químicas ambos insecticidas son hidrolizados rápidamente. En la práctica agrícola trabajar siguiendo las normas de seguridad permite que la contaminación potencial sea mínima, por lo que el paso a través de la cadena alimenticia se reduce. Sin embargo, se ha documentado la exposición a la población general por residuos de insecticidas sobre vegetales y granos. En Singapur, 150 personas sufrieron intoxicación por consumir hojas crudas contaminadas; los que requirieron

hospitalización presentaron concentraciones muy bajas de colinesterasa en sangre y se confirmó la presencia de metamidofos y protenofos en los alimentos (Goh *et al.* 1990). Con la intención de evaluar la presencia de insecticidas OF, entre ellos el metil paratión en leche de vaca en el valle de Mondigo en Portugal, Lino y da Silveira (1992) realizaron un estudio en el que encontraron paraoxón, insecticida de alta toxicidad cuya concentración máxima permisible es cero. No se determinaron residuos de los otros dos insecticidas.

En una investigación realizada en muestras individuales de alimentos provenientes de diferentes centros comerciales de EUA, se detectaron muy bajas concentraciones de metil paratión y sólo algunas exceden los límites máximos permisibles, la preparación, cocción y almacenamiento de los alimentos causan la descomposición de los OF (WHO 1989, 1993).

TOXICIDAD en animales de laboratorio

Aguda:

El metil paratión es muy tóxico por vía oral. En ratas se reporta una dosis letal media (LD50) de 6 a 50 mg/kg de peso, en ratones es de 14.5 a 19.5 mg/kg y en conejos es de 420 mg/kg. Por vía dérmica también es altamente tóxico, con una LD50 en ratas de 67 mg/kg, en ratones de 120 mg/kg y en conejo de 300 mg/kg. Por inhalación durante 1 hora la LD50 en ratones es de 0.24 mg/kg (UNEP/FAO 2005).

El dimetoato tiene una toxicidad aguda moderada en ratas, con una LD50 oral de 150-400 mg/kg de peso (IPCS 1988), LD50 dérmica mayor de 7000 mg/Kg de peso (FAO 2005).

Crónica:

En estudios realizados con voluntarios sobre la actividad de la enzima colinesterasa se encontró que cantidades de metil paratión de 22 mg/kg de peso diarios no provocan efecto al incrementar el tiempo a 4 semanas se observa inhibición enzimática a dosis de 24, 26 , 28 y 30 mg/kg de peso diarios (UNEP/FAO 2005).

Las dosis subaguda a crónica de dimetoato: en conejos por ruta dérmica durante 21 días fue de 1000 mg/kg de peso; en ratas con aplicaciones orales basadas en niveles de concentraciones en las que no se nota efecto (NOAEL) de 1.2 mg/kg de peso diarias, mostraron toxicidad a nivel de la reproducción; en ratas tratadas con cantidades repetidas por vía oral de 6 mg/kg de peso diaria se encontró toxicidad materna y a 40 mg/kg de peso diario no hubo evidencias de teratogénesis (FAO 2005).

Toxicocinética**Absorción:**

Las rutas primarias de entrada al cuerpo por exposición a OF son por inhalación, a través de la boca, y por la piel al tener contacto con equipo y material contaminado. La absorción es rápida y se puede detectar inmediatamente en sangre, donde las máximas concentraciones se presentan en 1 a 3 horas. En niños chilenos, Hannig *et al.* (1987), reportan que el tiempo transcurrido entre la ingesta del OF y los primeros síntomas fue entre 10 minutos y 4 horas, cuando la aplicación se realizó a través de la piel osciló entre 13 y 24 horas.

Distribución:

Una vez que han entrado al organismo, las concentraciones más altas de metilparatión, y en general cualquier otro OF, se encuentran en tejido adiposo. Ahí se acumulan y posteriormente pasan a través de la circulación a las diferentes partes del cuerpo en donde pueden causar daño al transformarse enzimáticamente en sus derivados oxón y reaccionar con la enzima acetilcolinesterasa afectando entonces al sistema nervioso (WHO 1989, 1993; Kamel y Hoppin 2004).

Abu-Qare *et al.* (2000), al estudiar ratas Sprague-Dawley con 14 a 18 días de gestación, a las que se les aplicó una dosis dérmica de 10 mg/kg de peso de metilparatión marcado radiactivamente con ^{14}C , detectaron radioactividad tanto en tejido materno como en el fetal. Las dosis máximas se observaron a las 2 horas en sangre materna y en los demás tejidos a las 12 horas. Las concentraciones máximas de radioactividad (ng equivalentes de metilparatión/g) fueron en orden descendiente: en tejido adiposo (67532), riñón (1571), páncreas (1256), espina dorsal (1004), corazón (729), hígado (706), cerebro (546), placenta (389) y en el feto (256).

Modo de Acción:

La enzima acetilcolina se encuentra en el plasma, en los glóbulos rojos, en el sistema nervioso autónomo periférico y el sistema nervioso motor somático, así como en algunas áreas del sistema nervioso central. Normalmente actúan como conductores de los impulsos nerviosos en las sinapsis entre los nervios y sus receptores en músculo. Una vez completa la acción, las acetilcolinas son degradadas por las enzimas acetilcolinesterasas, lo que da por terminada la estimulación muscular. Los OF actúan inhibiendo la acción de

las acetilcolinesterasas de manera irreversible al unirse al sitio activo de la enzima e impidiendo entonces que se degrade la acetilcolina, la cual se acumula en las sinapsis nerviosas, produciendo una constante excitación muscular que hace que el músculo se mueva de manera involuntaria, produciendo temblores, gesticulaciones e interrupciones en la transmisión nerviosa en el sistema nervioso central (WHO 1986, Slapper 1999). La inhibición de la enzima acetilcolinesterasa se realiza por un proceso de fosforilación en el grupo hidroxil de la serina presente en el sitio activo de la enzima (WHO 1986).

Excreción: La eliminación de metil paratión y de sus productos metabólicos ocurre principalmente por orina (75 %) y heces fecales (10 %), después de 72 horas (WHO 1993). Dentro del cuerpo los procesos metabólicos son rápidos y la excreción de metabolitos, compuestos linfáticos y alquilfosfatos inicia de 4 a 8 horas posteriores a la ingesta (Morgan *et al.* 1997). Estudios realizados en personas a las que se les administra ³²P-dimetoato, indican que éste se excreta en orina entre 75 y 100 % durante las siguientes 24 horas (WHO 1989). Los metabolitos de metil paratión excretados en orina son dimetiltiofosfato, dimetilfosfato y p-nitrofenol (Barr *et al.* 2002).

Metabolismo

Al entrar los OF al organismo se metabolizan y distribuyen en diferentes zonas. Son tres los mecanismos principales de biotransformación: la oxidación bioquímica; la hidrólisis y las reacciones que involucran la acción de transferasas.

La oxidación bioquímica: en metil paratión, dimetoato y muchos otros OF es a través de oxidasas presentes en el hígado, intestino, riñón y pulmones, dando como resultado la desulfuración del grupo P=S al grupo P=O. El producto resultante es el

compuesto -oxón (metil paraoxón, dimetoxón u ometoato) que son compuestos más tóxicos ya que actúan como inhibidores directos de la colinesterasa, son menos lipotróficos y más inestables al hidrolizarse más rápido lo que disminuye su acumulación en el cuerpo (WHO 1986, 1989, 1993).

Hidrólisis: Las enzimas más comúnmente involucradas en este proceso son las esterases y fosforil fosfatasas. Éstas se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos de mamíferos como son hígado, plasma e intestino. Los productos resultantes para metil paratión y metil paraoxón son ácido dimetilfosfórico y p-nitrofenol (WHO 1993). Para dimetoato son desmetil dimetoato y p-nitrofenol (WHO 1989).

Transferasas: Los procesos de desintoxicación por reacciones de degradación que requieren glutatión dependen de alquil (alquilación) y de aril (desmetilación) transferasas. Los compuestos resultantes son ácido dimetil fosfórico, desmetil dimetoato y p-nitrofenol que no son tóxicos (WHO 1989, 1993).

Efectos en la salud

Los OF producen daños en la salud al inhibir en el sistema nervioso a las enzimas acetilcolinesterasa, lo que causa su acumulación endógena y como resultado una estimulación nerviosa excesiva cuyas manifestaciones clínicas semejan los efectos muscarínicos y nicotínicos de la acetilcolinesterasa.

En las intoxicaciones agudas por OF, los primeros síntomas están relacionados con el sistema respiratorio: estornudos, dolor en el pecho, dificultades para respirar, exceso de secreción en bronquios y nariz. Cuando la vía de entrada ha sido dérmica, en la zona de contacto hay sudoración, movimientos musculares incontrolados. Si el contacto

se dio a través de los ojos puede causar lagrimeo, dolor ocular, hemorragia, constricción pupilar y visión borrosa. Posteriormente se alteran otros órganos y hay salivación y sudoración excesiva, palidez, náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal, dolores de cabeza, vértigo, visión borrosa, constricción o dilatación de pupilas, confusión mental, falta de coordinación, hablar arrastrado, pérdida de reflejos, temores en lengua y ojos, eventualmente ocurre parálisis de extremidades y músculos respiratorios. En casos extremos hay defecación y micción involuntarias, psicosis y coma, la muerte se produce por falla cardíaca o respiratoria (ATSDR 2004, Dyro 2005).

Neurotoxicidad

Todos los OF son neurotóxicos al producir una sobreestimulación en los receptores colinérgicos post sinápticos. El llamado síndrome intermedio ocurre de 1 a 4 días posteriores a la exposición y se caracteriza por debilidad muscular que en caso de afectar a los músculos respiratorios puede ser fatal. De 2 a tres semanas después algunos pacientes desarrollan polineuropatías asociadas, que involucran anormalidades sensoriales, contracciones musculares, debilidad y parálisis primeramente de piernas, debido a la muerte de los axones. Estudios a largo plazo sobre personas intoxicadas con OF describen disminución en la eficiencia de las funciones cognoscitivas, psicomotoras, en la sensibilidad a vibraciones y disfunciones motoras (Kamel y Hoppin 2004, Dyro 2005).

Los estudios sobre neurotoxicidad producida con bajas dosis de OF son controvertidas e inconsistentes. Algunos autores reportan prevalencia de ciertos síntomas, disfunciones motoras y sensoriales (Kamel y Hoppin 2004). Eddleston *et al.*

(2005) en un estudio con 802 personas que sufrieron intoxicación aguda por intento de suicidio con clorpirifos, dimetoato y fentión y al comparar la concentración del insecticida, la actividad de la colinesterasa y la respuesta al tratamiento, encontraron que los pacientes que ingirieron dimetoato mueren más rápido, frecuentemente por choque hipotenso y que junto con el insecticida fentión, responden pobremente a la terapia con pralidoxima. Los autores concluyeron que la intoxicación con OF no es una entidad única, por lo que cada OF debe ser tratado como un veneno individual. Michotte *et al.* (1989) y Fonseka *et al.* (2003) consideran el desarrollo de ataxia como un resultado a largo plazo de intoxicación por organofosforados.

Efectos en Sistema Hematopoyético

En la sangre la colinesterasa se encuentra en plasma y en el interior de los eritrocitos donde actúa en el control de la permeabilidad de membrana. Si bien la cuantificación de acetilcolinesterasa en plasma representa de manera indirecta lo que ocurre en el sistema nervioso, es una determinación de gran utilidad en el seguimiento ocupacional por exposición a OF y en diagnósticos de toxicidad (Brown *et al.* 1989, Yeary *et al.* 1993). López-Carrillo y López-Cervantes (1993) al estudiar las concentraciones de colinesterasa en plasma de agricultores mexicanos expuestos a OF, encontraron una disminución significativa al comparar antes y después de la jornada laboral notando una diferencia marcadamente más acentuada en los individuos jóvenes debido a que realizan las tareas más peligrosas. Los autores resaltan la importancia de las medidas preventivas en el manejo de OF, destacando la identificación de formas de contacto de mayor riesgo, así como la determinación de los tiempos máximos de

exposición. Singh *et al.* (2002) estudiaron en 1000 trabajadores agrícolas y de la industria de plaguicidas expuestos a OF evaluando sus niveles de acetilcolina con respecto a 50 testigos. Los investigadores encontraron niveles mucho más bajos en las personas expuestas, siendo los obreros de las fábricas los que mostraron las concentraciones menores, hallazgo que atribuyen los autores al hecho de que están expuestos diariamente durante años. Singh *et al.* (2006) realizan estudios *in vitro* sobre el efecto de algunos OF, entre ellos el dimetoato en eritrocitos de rata, encontrando una disminución en la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa así como del glutatión reducido. La actividad de las enzimas glutatión-S-transferasa y glutatión reductasa se incrementa. Por otro lado la actividad de las enzimas unidas a membrana como son la acetil colinesterasa, la ATPasa de Na (+)-K (-) y ATPasa de Ca (+) están disminuidas. Según los autores estas alteraciones muestran el aumento en el estrés oxidante posterior al tratamiento.

Efectos Cardiovasculares, en Riñón, en Hígado y Gastrointestinales

Las investigaciones sobre los hallazgos en personas expuestas ya sea por inhalación o intoxicación con metil paratión y dimetoato reportan lesiones cardiovasculares, entre las que destacan segmentación y desfibrilación del músculo cardíaco, edema pulmonar, lesiones en hígado y en riñón, congestión y hemorragias gastrointestinales (Dyro 2005).

Al estudiar los cambios posteriores a la aplicación crónica de dimetoato por vía oral en dosis de 21 mg/ kg de peso durante 2 meses en páncreas de ratas Wistar macho, Hagar *et al.* (2002) encontraron que los niveles de glucosa y la actividad enzimática de la fosfatasa ácida estaban incrementados de manera significativa respecto de los testigos, los

niveles de insulina decrecían de manera importante y no encontraron cambios en la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina ni de la α -esterasa. Los mismos investigadores en las observaciones al microscopio notan cambios degenerativos en las isletas de Langerhans y en células Beta; alteraciones que permanecen después de un mes.

Efectos en el Sistema Reprodutor y en el Desarrollo

Al estudiar las placentas de ratas tratadas con metil paratión se observa degeneración en las células del trofoblasto. Piña-Guzmán *et al.* (2006) investigaron el efecto de metil paratión en espermatozoides maduros de ratones macho, debido a su sensibilidad a daños oxidantes, que a la vez se asocian con disfunciones reproductoras. Las dosis probadas fueron de 3-20 mg / kg, valorando la estructura cromatídica mediante el ensayo SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) y tinción con cromomicina A (3) y para el estrés oxidante se utilizó la prueba de peroxidasa lipídica. A 7 días de tratamiento se observaron alteraciones de estos parámetros en las células en meiosis de manera dosis dependiente y se correlacionaron positivamente con la peroxidasa lipídica. Farag *et al.* (2006) investigaron sobre la capacidad del dimetoato para producir toxicidad en el desarrollo de ratas Fisher embarazadas a las que les administraron por vía oral dosis subletales del insecticida, observando efectos en las ratas tratadas con 15-28 mg/kg diarios que muestran síntomas colinérgicos como temores, diarrea, debilidad, salivación, descenso en los niveles de acetilcolina en cerebro de madres y fetos, disminución en el peso y consumo de alimentos, también consecuencias tóxicas en los fetos como son, reducción significativa en el número de fetos vivos y en el peso. A ninguna de las dosis probada detectaron efectos teratógenos.

Inmunotoxicidad

Se han reportado efectos de los plaguicidas en el sistema inmunológico debido a su toxicidad directa o como una respuesta compensatoria. En estudios *in vivo* Institóris *et al.* (1995) encuentran alteraciones en la cantidad de células formadoras de plaquetas contenidas en páncreas, de células formadoras de placa y en la reacción de hipersensibilidad retardada en 3 generaciones de ratas Wistar con dosis de 1/75 de LD50 de metil paratión y dimetoato. Ündeger *et al.* (2000) estudiaron en el mismo sistema estos parámetros y los relacionaron con el ensayo de aberraciones cromosómicas. Los autores sólo observaron alteraciones en la reacción de hipersensibilidad retardada para dimetoato en dosis de 28.2 mg/kg/día; para metil paratión no encontraron cambios en los parámetros inmunológicos evaluados y consideraron más sensible la prueba de aberraciones cromosómicas. Li (2007) estudió los mecanismos de inmunotoxicidad de los plaguicidas organofosforados y halló que el dimetoato entre otros insecticidas organofosforados produce una disminución significativa en la actividad de las células asesinas naturales (NK natural killer) de manera dosis dependiente, así como en la células asesinas activadoras de linfocinas y linfocitos T citotóxicos altera la producción de anticuerpos, de interleucinas-2, la proliferación de células T, disminución de células CD5 y aumento de células CD6. Sin embargo los artículos de revisión sobre este tema en humanos consideran que aún no hay datos suficientes sobre el efecto de bajas dosis de agroquímicos en el sistema inmune, debido al escaso conocimiento sobre la cantidad de plaguicida usado, la heterogeneidad de los agentes químicos involucrados, así como la dificultad en dar un pronóstico significativo (Colosio *et al.* 2005).

Efectos Carcinogénicos

No hay evidencias contundentes de que el metil paratión o que el dimetoato causen cáncer en individuos que están expuestos a dichos OF (FAO 2005, UNEP/FAO 2005). El dimetoato no se encuentra en las listas de la Agencia internacional de Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (Internacional Agency for Research on Cancer, IARC); del Programa Nacional de Toxicología de EUA (US NTP, por sus siglas en inglés); de la Proposición 65 de Carcinógenos Conocidos de California; en la de Carcinógenos del Inventario de Contaminantes Tóxicos (Toxic Release Inventory). Pero se halla como posible carcinógeno en la lista de carcinógenos de la EPA (Orme y Kegley 2006).

Actividad mutagénica

En las pruebas de actividad mutagénica se mencionan resultados positivos y negativos para metil paratión y dimetoato. Al estudiar la capacidad del metil paratión para producir mutaciones génicas en *Salmonella thyphimurium* utilizando las cepas TA100, TA1535 – 1538 y TA98, con y sin actividad metabólica, a dosis de 50-100 µg/placa, Simmon *et al.* (1977), Carere *et al.* (1978), así como Vijayaraghavan y Nagarajan (1994) encontraron resultados negativos. En el trabajo realizado por Herbold (1986), utilizando las cepas TA1535, TA 1537-TA1538 y TA100 con y sin actividad metabólica, fue positivo a concentraciones mayores de 250 µg/placa, el mismo resultado informan Rashid y Mumma (1984) con dosis de 250-1250 µg/placa. En la prueba de reversión bacteriana en *Escherichia coli* (*E. coli*), Dean (1972) y Rashid y Mumma

(1984) describen resultados negativos para metil parati6n. El ensayo de mutaciones puntuales para resistencia a estreptomicina en *E. coli* a dosis de 0.3 mM fue negativo (Wild 1975) y en resistencia a 5 metil triptofano fue positiva (Mohn 1973) en dosis probablemente t6xicas (10 mM). Griffin III y Hill (1978) en *E. coli* describen resultados positivos en la prueba de rompimiento de plasmado a dosis 0.1mg/mL. Fahrigr (1974) en la prueba de conversi6n g6nica en levaduras encuentra que el metil parati6n a dosis de 114 mM durante 30 horas es un mut6geno d6bil. El estudio de mutaciones alelo especificas en *Schizosaccharomyces pombe* es negativo a dosis de 11-228 mM /L de metil parati6n con y sin actividad metab6lica (Gilot –Delhalle *et al.* 1983) (Tabla III).

En los estudios realizados por Moriya *et al.* (1983) el dimetoato no tuvo actividad mutag6nica en *S. thyphimurium* para las cepas TA98, TA1535, TA1537, TA1538 y la cepa T100 fue positiva a concentraciones de 5000 mg /placa con y sin actividad metab6lica. En la prueba de mutaciones g6nicas reversas en *E. coli* Ashwood- Smith *et al.* (1972) reportan resultados negativos con 1 mg mientras que Moriya *et al.* (1983) encuentran resultados positivos con 5000 µg/placa con y sin actividad metab6lica. La prueba de resistencia a estreptomicina en dosis de 30-300 mM durante 4 horas fue positiva para Wild (1975). La prueba de resistencia a 5 metil–triptofano tambi6n fue positiva para dimetoato en las investigaciones de Mohn (1973) y Wild (1975). En la prueba de conversi6n g6nica a dosis de 30-300 mM por 5 horas sin actividad metab6lica es positivo (Fahrigr 1974). En el ensayo de corrimiento del marco de lectura en *Schizosaccharomyces pombe* a concentraci6n de 1.3-131 mM por 30 horas con y sin actividad metab6lica resulta negativo en la investigaci6n de Gilot-Delhalle *et al.* (1983) (Tabla IV).

Al estudiar la actividad mutagénica en *Salmonella thyphimurium*, en muestras de aguas contaminadas con plaguicidas y utilizando los concentrados de los diferentes plaguicidas extraídos mediante el método de resina XAD y extracción líquido-líquido, Rehana *et al.* (1995) encontraron actividad mutagénica en las cepas TA98, TA97 y TA100, con y sin actividad metabólica en concentrados de metil paratión de 0.16-0.50 ppb y dimetoato de 0.41-0.56 ppb en aguas del Río Ganges, entre Kachla y Kannauj en India. Un año después, los mismos investigadores estudiaron las cepas TA100, TA102 y TA98 con y sin actividad metabólica de concentrados de metil paratión y dimetoato provenientes del mismo río pero en Narora, India y observaron que los concentrados extraídos con resina XAD fueron positivos a 0.20 ppb de metil paratión y 0.41 ppb de dimetoato (Rehana *et al.* 1996). Aleem y Malik (2005) estudiaron aguas provenientes del Río Yamura en Okhla, India, contaminadas con varios plaguicidas OF y OCL, entre ellos detectándose concentraciones de metil paratión de 1.7 ng/L y de dimetoato de 0.9 ng/L, las muestras fueron extraídas con los métodos de resina XAD y líquido-líquido. Los investigadores encontraron resultados significativamente positivos en la prueba de Ames con y sin actividad metabólica, una disminución significativa en *E. coli*, de mutantes deficientes en la reparación de DNA y la sobrevivencia del bacteriofago λ muestra decremento significativo (Tabla III y IV).

En cuanto a la inducción de aberraciones cromosómicas producidas *in vivo* por metil paratión en células de médula ósea, espermatogonias y espermatocitos primarios de ratones, Huang (1973), Degraeve y Moutschen (1984) y Degraeve *et al.* (1984 a, b, 1985) informan resultados negativos aplicando dosis agudas, subcrónica y mezclado con triclorfon. Tampoco Nehéz *et al.* (1994) y Nehéz y Dési (1996) encuentran efecto en ratas

Wistar utilizando dosis de 1/100, 1/75 y 1/50 de la dosis letal media (LD50) cada 5 días por 6 semanas. En contraposición otros investigadores observan aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas de manera dosis dependiente. Malhi y Grover (1987) en células de médula ósea de ratones tratados por vía oral con dosis de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/ kg de peso durante 7 semanas, y Vijayaraghavan y Nagarajan (1994) en ratas Wistar a las que se les aplicó dosis de 3 y 5 mg/kg del mismo insecticida por vía intraperitoneal describen elevación en las aberraciones cromosómicas. Ündeger *et al.* (2000) no encuentran aberraciones cromosómicas estructurales en ratas Wistar con tratamientos por vía oral con dosis de 0.872, 0.436 y 0.218 mg/kg al día, pero sí reportan aumento en las aberraciones numéricas (hipo e hiperdiploidías). En *Entropilus suratensis* (crómido verde) tratados con 0.05, 0.1 y 0.2 ppm de metil paratión durante 96 horas en su ambiente acuático, Das y John (1999) observan resultados positivos en aberraciones cromosómicas y en la prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) (Tabla V).

La presencia de micronúcleos en estudios *in vivo* fue observada: en eritrocitos poli-cromáticos en médula ósea de ratas Wistar tratadas por vía oral con dosis del 1.2 a 4 mg/kg de peso de metil paratión (Grover y Malhi 1985); en ratones suizos con una dosis oral de 9.4, 18.9, 37.5 y 75 mg/kg de peso (Mathew *et al.* 1990) y en sangre periférica de ratas Wistar a las que se les aplicó por vía intraperitoneal 5 mg/kg de peso (Vijayaraghavan y Nagarajan 1994).

En la prueba de dominantes letales en ratones macho, utilizando metil paratión, Simmon *et al.* (1977) encuentran efecto negativo en células CRLST con tratamientos orales de 20, 40, y 80 mg/kg de peso. Degraeve y Moutschen (1984) y Degraeve *et al.* (1984 b) no observan incremento en la frecuencia de pérdidas fetales postimplantación al

aplicar dosis de 10 mg/kg y 0.15 ppm respectivamente, tampoco reportan aumento en las pérdidas fetales preimplantación. Al investigar mutaciones somáticas y recombinaciones (SMART) en *Drosophila melanogaster*, Cakir y Sarikaya (2005) describen resultados positivos con 3, 5, 7, 10 ppm de metil paratión (Tabla V).

En las investigaciones realizadas por Nehéz *et al.* (1983, 1994) y Nehéz y Dési (1996) en ratas CFLP tratadas con dimetoato se muestra efecto en el incremento de aberraciones cromosómicas numéricas posteriores a tratamientos agudos de 60 mg/kg de peso, a dosis subcrónicas de 9.33 y 14 mg/kg de peso, así como con dosis subcrónicas durante varias generaciones. En el mismo sentido Hoda y Sinha (1993) observan aumento en las aberraciones con 0.6 µL/kg de peso de dimetoato por 10 días en ratones suizos. En las investigaciones de Degraeve y Moutschen (1983) y Degraeve *et al.* (1984 a, b, 1985) no observan inducción de aberraciones cromosómicas en células de médula ósea, de espermatogonia ni en espermatoцитos primarios de ratas a dosis únicas de 10 mg/kg de peso ni con diarias de 0.06 mg/kg por 5 días a la semana durante 7 semanas. Al estudiar las células de médula ósea de criceto sirio macho a los que se les aplicaron por vía intraperitoneal 16, 32, 80 y 160 mg/kg, Dzwonkowska y Hübner (1986) sólo reportan aumento significativo en el número de células con aberraciones cromosómicas. Dési *et al.* (2000) y Ündeger *et al.* (2000) no encuentran elevación en las aberraciones cromosómicas estructurales pero sí la observan en las aberraciones cromosómicas numéricas al estudiar células de médula ósea de ratas con dosis de dimetoato a 1/100, 1/75, 1/50 de la dosis letal media (Tabla VI).

El dimetoato también produce micronúcleos a dosis de 51.7 mg/kg de peso 2 veces al día en médula ósea de ratón (Usna Rani *et al.* 1980) (Tabla VI). En Tradescantia,

Mohammed y Ma (1999) observan incremento respecto al testigo en el número de micronúcleos, así como una disminución en la cantidad de estambres por filamento.

En la investigación de Hoda y Sinha (1993) en *Drosophila melanogaster*, el dimetoato causa efecto positivo en la producción de dominantes letales. En el mismo estudio el índice meiótico (dato no incluido en la tabla) en células de testículos de ratones intubados con 0.6 mg/kg de peso y el índice mitótico en células de cebolla se encuentran disminuidos (Tabla VI).

En los cultivos celulares realizados para investigar si el metil paratión produce aberraciones cromosómicas se observa efecto negativo en células de 3 líneas linfoides humanas y médula ósea de ratón (Huang 1973) y en linfocitos de humanos (Rupa *et al.* 1990). Al aplicar 0.16 mg de metil paratión a cultivos de linfocitos humanos provenientes de fumadores y alcohólicos, Sunil Kumar *et al.* (1993) encuentran aumento de casi el doble de aberraciones cromosómicas con respecto a las muestras testigo (Tabla VII).

El metil paratión a concentraciones 20-200 mg/mL fue un efectivo inductor de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en células V79 de criceto chino y en 3 líneas linfoides de humanos en el estudio llevado a cabo por Chen *et al.* (1981). Los autores observan también un retardo en el ciclo celular. En líneas celulares humanas linfoides LNZ-007 y RIMP-7191 sin actividad metabólica, Sobti *et al.* (1982) y Singh *et al.* (1984) describen resultados positivos. Gómez-Arroyo *et al.* (1987) y Rupa *et al.* (1990) al investigar en cultivos de linfocitos humanos tratados con metil paratión encuentran efecto positivo. Gómez-Arroyo *et al.* (1985, 1988) al estudiar este insecticida en células de raíz de *Vicia faba* muestran que induce ICH. Para la prueba de micronúcleos, Grover y Malhi en células de médula ósea (1985) y See *et al.* (1990), al estudiar células CHO de criceto

chino, reportan que se incrementa la frecuencia de micronúcleos después del tratamiento con metil paratión (Tabla VII).

El dimetoato produce resultados positivos al aumentar la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células mitóticas y meióticas de *Hordeum vulgare* (Kaur y Grover 1985a, b). En la prueba de ICH los resultados son positivos en criceto chino y en células linfoides de humano (Chen *et al.* 1981, Sobti *et al.* 1982) así como en linfocitos humanos y células de *Vicia faba* (Gómez- Arroyo *et al.* 1987, 1988) (Tabla VIII).

Utilizando ensayo cometa en linfocitos de sangre periférica de humanos, Jamil *et al.* (2004) prueban concentraciones de 4, 6, 8 y 10 mg/mL de dimetoato y Ündeger y Basaran (2005) de 10, 50, 100 y 200 mg/mL de metil paratión y dimetoato. Ambos grupos de investigadores mencionan que los insecticidas causan incremento significativo en la longitud de la cauda del cometa con respecto a los observados en las muestras de los mismos donadores no tratadas, indicando con esto daño en el ADN (Tablas VII y VIII).

Los estudios en personas ocupacionalmente en contacto con varios plaguicidas o que han sufrido intoxicación aguda muestran aumento en las aberraciones cromosómicas, algunos investigadores, sin embargo, no encuentran elevación en dicha prueba. Yoder *et al.* (1973), al estudiar en cultivos celulares de muestras provenientes de 42 personas expuestas ocupacionalmente a OF (entre ellos dimetoato y metil paratión), organoclorados (OCL) y carbamatos, encontraron incremento significativo en la cantidad de aberraciones cromosómicas en los trabajadores expuestos a herbicidas (7.2 %) y a insecticidas (6.2 %) con respecto a los testigos (1.7 %). En la investigación realizada en cultivos celulares de muestras provenientes de personas intoxicadas con metil paratión,

dimetoato y otros OF, Van Bao *et al.* (1974) describen aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas de 1 % en aberraciones estables y de 17.8 % en inestables con respecto a los testigos (0.1 %). Al estudiar individuos que trabajaban aplicando aerosoles y realizando las mezclas de OF, OCL con 10 años de exposición sin protección en edades entre 11 y 78 años, Dulout *et al.* (1985) y Rupa *et al.* (1989 a, b) evidencian elevación significativa de las aberraciones cromosómicas. De Ferrari *et al.* (1991), también observan resultados positivos en 64 personas (fumadores y consumidores de alcohol) que trabajaban mezclando plaguicidas y aplicando aerosoles. See *et al.* (1990) estudiaron 22 personas dedicadas a rociar OF, organoclorados y carbámicos, reportan diferencia significativa de aberraciones cromosómicas producidas antes (4.9 %) y después (19.9 %) del rociado. Garaj-Vrhovac y Zeljezic (2001, 2002) así como Zeljezic y Garaj-Vrhovac (2001) en empleados de la producción de plaguicidas encontraron resultados positivos para aberraciones cromosómicas. Paz y Miño *et al.* (2002) hallan incremento de aberraciones cromosómicas y cromatídicas (18.29 %) respecto a los testigos (2.66 %) en muestras de personas que cultivan flores, así como aumento en el número de endoreduplicaciones y de hiper e hipoploidías (2.229 %) en relación a los no expuestos (0.07 %). Castillo-Cadena *et al.* (2006) notifican aumento significativo de aberraciones cromosómicas en 52 personas en contacto con metil paratión y otros insecticidas al comparar con los cultivos de 46 individuos que habitan en las cercanías del lugar de aplicación y de 38 testigos negativos. Por otro lado, de Cassia Stocco *et al.* (1982) no detectan elevación significativa en la frecuencia de aberraciones al estudiar 15 pacientes que laboran durante periodos de 1 semana a 15 años con metil paratión.

Tampoco observan variación significativa Scarpato *et al.* (1997), D' Arce y Colus (2000) y Costa *et al.* (2006) (Tabla IX).

La prueba de intercambio de cromátidas hermanas muestra resultados positivos. Dulout *et al.* (1985), De Ferrari *et al.* (1991), Rupa *et al.* (1991 b), Garaj-Vrhovac y Zeljezic (2001) así como Zeljezic y Garaj-Vrhovac (2002) y Costa *et al.* (2006) muestran aumento en ICH de personas que realizan las mezclas o aplican aerosoles. Gómez-Arroyo *et al.* (2000) estudiaron 30 trabajadores de la flor, expuestos a diferentes plaguicidas OF entre ellos metil paratión, OCL, carbámicos y otros, utilizando las técnicas de ICH en linfocitos; micronúcleos en células de la mucosa bucal; cinética de proliferación celular, índice de replicación e índice mitótico, encontrando una diferencia significativa en ICH al comparar con el grupo testigo. Lo mismo observaron con la cinética de proliferación celular, índice mitótico y frecuencia de micronúcleos. En poblaciones expuestas a plaguicidas, la prueba de micronúcleos muestra resultados positivos y negativos. Garaj-Vrhovac y Zeljezic (2001, 2002) estudiaron en Croacia a trabajadores de la industria de plaguicidas y hallaron diferencia significativa respecto del grupo testigo en la frecuencia y distribución de micronúcleos. Sailaja *et al.* (2006) y Costa *et al.* (2006) muestran resultados positivos en la pruebas de micronúcleos en células epiteliales de la boca y cultivos de linfocitos en 54 y en 33 trabajadores agrícolas respectivamente. Sin embargo, Titenko-Holland *et al.* (1997) reporta resultados negativos en linfocitos de 38 trabajadores esporádicos en California (EUA). En 84 trabajadores húngaros en contacto moderado o elevado con plaguicidas, Pastor *et al.* (2002) no notan aumento significativo en la presencia de micronúcleos. (Tabla IX).

Las investigaciones de daño al ADN mediante la prueba de electroforesis en gel (SCGE) o ensayo cometa son positivas al analizar linfocitos de individuos expuestos a mezclas de plaguicidas. Garaj-Vrhovac y Zeljezic (2000, 2002) y Zeljezic y Garaj-Vrhovac (2001) estudiaron a trabajadores de la manufactura de plaguicidas en Croacia, encontrando daño al ADN durante el periodo de exposición máxima así como en los 6 y 8 meses posteriores. Bhalli *et al.* (2006) investigaron a 29 pakistaníes empleados en la producción de organofosforados carbamatos y piretroides y observaron daño en el ADN asociado a la exposición.

Los estudios de mapeo génico han permitido identificar polimorfismos asociados con capacidades individuales diferentes para metabolizar químicos como son drogas y plaguicidas. Los genes que codifican las isoformas de enzimas involucradas en los sistemas de desintoxicación estudiados principalmente son: los genes de la familia del citocromo P450 (CYP2E1) vinculados con el metabolismo de carcinógenos indirectos; los del sistema glutation S-transferasa, en el que los genotipos nulos de los genes GSTT1 y GSTM1 se asocian con un riesgo incrementado a cáncer del sistema de paraoxonasas en suero, en el que individuos con genotipo PON1 de baja actividad metabolizan menos los insecticidas organofosforados y los del sistema de N-acetil transferasas expresado en humanos por dos genes NAT1 y NAT2, relacionado este último con la característica de metabolizar rápido o lento e incrementar la susceptibilidad a cáncer. Au *et al.* (1999) estudiaron polimorfismos en los genes CYP2E1, GSTT1, GSTM1 y PON 1 de 30 trabajadores agrícolas en Costa Rica y los relacionaron con los resultados obtenidos en los ensayos de aberraciones cromosómicas, de reparación de AND y sonda de FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia) para rompimientos en el cromosoma 1. Los autores

concluyeron que las personas que han heredado el genotipo llamado desfavorable metabolizan menos y son más susceptibles a daño genotóxico, sin embargo el genotipo desfavorable esta poco representado y la prueba de aberraciones cromosómicas y de FISH no son estadísticamente significativas. Costa *et al.* (2006) investigaron en 31 trabajadores portugueses el efecto de los polimorfismos génicos de CYP2E1, GSTT1, GSM1 y los compararon con la frecuencia de micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas y observaron el genotipo GSTT1 asociado con aumento al daño citogenético. Los hallazgos sobre la influencia de los polimorfismos génicos en la producción de daño citogenético aún son muy limitados debido a la escasa representación de los polimorfismos llamados desfavorables y la diferente genotoxicidad de los plaguicidas (Bolognesi 2003)

Los estudios de daño citogenético utilizando como criterio de evaluación las aberraciones cromosómicas, la prueba de micronúcleos y de intercambio de cromátidas hermanas han constituido herramientas importantes para estimar la exposición a agentes genotóxicos (Nordic Study Group 1990, De Ferrari *et al.* 1991, Kirkland 1993, Zeljezic y Garaj-Vrhovac 2001). La prueba de aberraciones cromosómicas esta contemplada como uno de los sistemas de ensayo para valorar genotoxicidad por las organizaciones que regulan el uso de sustancias tóxicas en EUA, Canadá, México, la Unión Europea, Japón, etc. y su protocolo se contempla en las guías 473 (Organización de Cooperación Económica y del Desarrollo, por sus siglas en inglés OECD) y 870.5375 (EPA/OPPTS Oficina de Prevención de Contaminantes y Tóxicos de la Agencia de Protección Ambiental de EUA. por sus siglas en inglés EPA/OPPTS) para la prueba de aberraciones cromosómicas *in vitro* en mamíferos (Cimino 2006). Dentro de las técnicas para estudiar

aberraciones cromosómicas *in vitro*, el cultivo de linfocitos humanos es utilizado frecuentemente por la facilidad en la toma de muestras, así como porque con un pequeño volumen se obtienen poblaciones numerosas de células a partir de las cuales se logra una cantidad adecuada de mitosis de buena calidad (Watt y Stephen 1986). En los estudios de genotoxicidad mediante el análisis de aberraciones cromosómicas se utiliza tinción homogénea. Cuando se requiere identificar los cromosomas involucrados en las aberraciones simétricas (translocaciones, inserciones e inversiones) y asimétricas (dicéntricos, anillos y fragmentos) se usa la técnica de bandeo cromosómico (Savage 1977, Tawn y Whitehouse 2001).

El bandeo cromosómico con bandas GTG (bandas G utilizando tripsina y Giemsa) es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para identificar cromosomas humanos en la mayoría de los laboratorios de citogenética. Tiene la ventaja de que se obtienen preparaciones permanentes de buena calidad y con un contraste adecuado de bandas claras y oscuras que permiten identificar cada cromosoma (Jonasson 1986). En los últimos años también se utiliza la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) que permite identificar rápidamente ambos tipos de aberraciones cromosómicas (Tawn y Whitehouse 2001).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que en la agricultura mexicana se emplean con mucha frecuencia los insecticidas organofosforados metil paratión (folidol) y dimetoato (rogor) y dado que los datos sobre su efecto genético son contradictorios, este trabajo pretende evaluar si estos insecticidas provocan daño sobre los cromosomas de linfocitos humanos mediante el análisis de aberraciones cromosómicas y el efecto sobre el índice mitótico producido *in vitro*.

OBJETIVO

Valorar el efecto citogenético de los insecticidas metil paratión y dimetoato en la producción de aberraciones cromosómicas y en el índice mitótico

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto genotóxico de los insecticidas organofosforados metil paratión (folidol) y dimetoato (rogor) mediante el análisis de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos.
2. Identificar si existen sitios en determinados cromosomas o grupos de cromosomas donde preferentemente se provoquen dichas aberraciones, utilizando la técnica de bandeo cromosómico GTG.
3. Valorar el efecto que tienen las diferentes concentraciones de metil paratión y de dimetoato sobre el índice mitótico.
4. Valorar si existe diferencia interindividual en el índice mitótico posterior a la aplicación de los insecticidas metil paratión y dimetoato.

MATERIAL Y MÉTODO

Donadores

Se utilizaron muestras de sangre periférica heparinizada procedentes de 4 individuos sanos, entre 23 y 30 años (media 26.5). Se excluyeron fumadores, personas que consumen alcohol y con historia reciente de infecciones virales, tratamientos de quimioterapia y radiaciones.

Preparación de sustancia a probar

Los insecticidas se obtuvieron de Bayer. Las diluciones se prepararon inmediatamente antes de ser aplicadas y como disolvente se utilizó agua destilada y posteriormente se filtraron con membrana Millipore 0.45 μm . Para metil paratión las concentraciones probadas fueron 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$. En el caso del dimetoato, se estudiaron concentraciones de 100, 300, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Cultivo celular

El inóculo de sangre periférica se sembró por duplicado en tubos estériles (Corning) con 4 ml de medio RPMI 1640 (Gibco), suplementado con fitohemaglutinina al 2 % (Gibco). No se usaron antibióticos ni suero fetal (Mutchinick *et al.* 1981). Después de 24 horas de incubación a 37 °C, se iniciaron los tratamientos con los diferentes insecticidas durante 24 y 48 horas. El número de repeticiones independientes fue de 2 por tratamiento para cada uno de los cuatro donadores. A los testigos negativos no se les agregó insecticida y como testigo positivo se utilizó mitomicina C (MMC) (CAS no. 50-07-7 Sigma) a concentración de 8 ng/ mL.

Preparación de cromosomas

Cada cultivo celular fue cosechado y procesado separadamente para la preparación de cromosomas. Las células fueron detenidas en metafase agregando colchicina (Sigma) a concentración final de 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 2 horas. Posteriormente se centrifugaron a 1000 rpm y al precipitado se le agregó solución hipotónica (0.075M de KCl), se centrifugaron, se removió el sobrenadante y las células se fijaron con Carnoy modificado (3 de metanol absoluto: 1 de ácido acético glacial). Se realizaron cambios de fijador hasta que éste apareció limpio. El botón celular se guardó en el congelador hasta la elaboración de las laminillas,

Preparación de laminillas

Los botones celulares fueron resuspendidos y centrifugados a 1000 rpm durante 8 minutos, posteriormente se descartó el fijador y se le agregó una pequeña cantidad de fijador recién hecho. Las laminillas se realizaron por goteo sobre portaobjetos prelavados y se secaron al aire. Se valoraron las preparaciones en microscopio de contraste de fase, en cuanto a la cantidad y la calidad de las metafases, realizando las modificaciones necesarias en el secado de la muestra sobre la laminilla. Los restos de botón celular se guardaron en congelación hasta terminar el análisis. La tinción homogénea se realizó con Giemsa 10 % durante 10 a 15 minutos. Para el bandeado cromosómico con bandas GTG se utilizó tripsina al 0.03 % (Difco 1:250) en cloruro de sodio al 0.9 % (J.T.Backer) ajustando a pH 7.5 con bicarbonato al 7 % (J.T.Backer) y Giemsa al 10 % (Merck) durante 8 minutos (Tawn y Holdsworth 1992, Clouston 2001, Tawn y Whitehouse 2001).

Criterios de análisis

Todas la laminillas incluidos los testigos positivos y negativos fueron codificadas de manera independiente con doble código, con objeto de que el analista no supiera su origen. El análisis de aberraciones cromosómicas se llevó a cabo en 100 metafases, con 46 ± 2 centrómeros (EPA 1996), 75 metafases con tinción sólida y 25 con bandas GTG, para cada testigo, concentración y sus réplicas. En el caso de MMC solo se analizaron 30 células debido al escaso número de metafases y a la gran cantidad de aberraciones por célula. Todas las metafases analizadas se registraron en una hoja de lectura indicando las coordenadas y los hallazgos encontrados.

Para la clasificación del tipo de aberraciones cromosómicas se utilizaron los criterios de Savage y las indicaciones de ISCN para nomenclatura en aberraciones cromosómicas (Savage 1976, 1977, 2004; ISCN 1985, 1995 y 2005).

Definición de aberraciones:

Aberraciones cromatídicas (cht): involucran sólo una cromátida de un cromosoma. Pueden ser: un hueco (chtg), cuando es una región no teñida de una cromátida con una mínima falta de alineación en la misma; un rompimiento (chtb) cuando hay una discontinuidad de una cromátida en la cual hay una clara falta de alineamiento, o un intercambio (chte) que es el resultado de dos o más lesiones en la cromátida y con un rearrreglo subsecuente.

Aberraciones cromosómicas (chr): involucran ambas cromátidas de un cromosoma en el mismo locus. Se incluyen en este tipo de aberraciones: los huecos cromosómicos (chrg), regiones no teñidas en el mismo locus en ambas cromátidas de un mismo cromosoma donde hay una falla mínima en la alineación en las cromátidas; los

rompimientos cromosómicos (chr_b) que son discontinuidades en el mismo locus de ambas cromátidas de un mismo cromosoma dando la posibilidad de un fragmento acéntrico (ace) y un cromosoma monocéntrico anormal; los intercambios cromosómicos (chr_e) son el resultado de 2 o más lesiones y la subsecuente ubicación diferente de ambas cromátidas de un mismo cromosoma a una nueva posición en el mismo o en otro cromosoma.

Cromosomas bandeados

Para la nomenclatura de cromosomas bandeados se utilizaron las recomendaciones del Sistema Internacional para la Nomenclatura en Citogenética Humana (ISCN 1995 y 2005). Los datos sobre aberraciones cromosómicas se dan en por ciento de células con aberraciones estructurales. Los diferentes tipos de aberraciones cromosómicas o cromatídicas se encuentran listados por frecuencia, número de células con aberraciones cromosómicas y tipo de aberraciones cromosómicas dadas por separado para cada tratamiento y testigos.

Datos de toxicidad

El índice mitótico (IM) se calculó como el número de metafases en 2000 linfocitos (Rojas *et al.* 1992). Los resultados se muestran como por ciento del índice mitótico.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para el índice mitótico se valoraron con las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk. Posteriormente se realizó un

análisis de varianza (ANOVA) de una vía, la prueba de T pareada y la prueba de Regresión Linear.

El número de células con aberraciones de cada grupo tratado se comparó con el grupo testigo y entre los grupos. Para ello los datos obtenidos sobre las aberraciones cromosómicas fueron de inicio analizados con una prueba de normalidad la cual no cumplieron, por lo que se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de pruebas no paramétricas de Friedman. Posteriormente para investigar si existía diferencia significativa entre pares se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, utilizando una corrección de ajuste de Bonferroni. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa de computo SPSS versión para Windows 13.0.

Criterios para evaluar los resultados

Se consideran que producen respuesta positiva las sustancias probadas si cumplen con las siguientes condiciones:

1. Si se observa un incremento significativo en la frecuencia de metafases con cromosomas aberrantes (excluyendo huecos) en una o más de las concentraciones probadas.
2. Si el aumento es superior al rango encontrado en los testigos negativos utilizados en este estudio.
3. Si el incremento es reproducible entre las replicas de los cultivos.
4. Si la elevación no está asociada a cambios de pH ó extrema toxicidad.

Los insecticidas estudiados son considerados con respuesta negativa si no se encuentra incremento significativo en el número de aberraciones encontradas en los tratamientos con respecto a las encontradas en los grupos testigo.

RESULTADOS

Todos los donadores tuvieron un cariotipo normal. Los resultados sobre las aberraciones cromosómicas producidas *in vitro* están referidos como frecuencias promedio en 100 células de cada donador y su réplica. Del conteo final se excluyeron los huecos cromosómicos y cromatídicos. El testigo positivo de todos los donadores mostró gran cantidad de aberraciones principalmente intercambios, que involucraron de manera preferente a los cromosomas 1, 9, 16 y Y.

Los datos de cada experimento encontrados con 24 y 48 horas de tratamiento a diferentes concentraciones de metil paratión y dimetoato fueron analizados con la prueba no paramétrica de Friedman y posteriormente con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para dos muestras relacionadas utilizando la corrección de Bonferroni. Al analizar las cifras obtenidas con metil paratión a 24 horas no se observó incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas de los cultivos tratados con respecto a los testigos (Tabla X) ni al comparar los testigos negativos y las diferentes concentraciones por pares.

En los tratamientos a 48 horas con metil paratión, las aberraciones cromosómicas tampoco mostraron diferencia significativa al relacionar el testigo negativo con las distintas concentraciones probadas (Tabla XI), así como en el análisis por pares de los diversos tratamientos utilizados y testigos negativos.

En el caso del dimetoato, la frecuencia de aberraciones cromosómicas tuvo un comportamiento estadístico similar. Con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon no se encontró diferencia significativa entre el testigo y las distintas concentraciones,

tampoco en el análisis por pares para ninguno de los tratamientos a 24 horas ni a 48 horas. Los resultados se muestran en las Tablas XII y XIII.

Las aberraciones observadas fueron rompimientos cromatídicos y cromosómicos con o sin fragmento acéntrico y deleciones. No se observaron dicéntricos, inversiones, isocromosomas, anillos ni figuras radiales, en los cultivos tratados con los dos insecticidas probados ni en los testigos negativos. Los rompimientos cromatídicos que se encontraron involucraron principalmente a los cromosomas del grupo A; cromosomas 1 (12.65 %), 2 (9.64 %) y 3 (8.43 %); del grupo B, cromosomas 4 (7.2 %) y 5 (6 %), del grupo C; cromosomas 9 (19.88 %), 7 (5.9 %), X (6.2 %) y 10 (4.8 %), del grupo D; cromosoma 14 (3 %). Las aberraciones cromosómicas fueron: rompimientos en los cromosomas del grupo A, cromosomas 1 (10 %), 2 (9 %) y 3 (6.3 %); grupo C; 9 (21.3 %), 7 (7 %), 10 (6.3 %) y X (7.5 %) y deleciones (cromosoma 1, 7, 10). En una metafase se observó una translocación entre un cromosoma del par 7 y un cromosoma del par 14 (Figuras 4 y 5).

El cromosoma que se encontró preferentemente involucrado fue el 9 a nivel de la banda 9q12. Los diferentes puntos donde se localizaron las aberraciones estructurales encontradas fueron en centrómeros (3.6 %); sitios frágiles no centroméricos (2 %) y en otras partes del cromosoma (94.4 %).

Las hiper e hipoploidías fueron vistas de manera esporádica, tanto en los testigos como en las diferentes concentraciones probadas y no están incluidas en el conteo final de aberraciones. El cromosoma extra perteneció al grupo G. En el caso de pérdidas, todos los cromosomas estuvieron involucrados excepto el cromosoma Y. Las hipodiploidías

que se encontraron con una frecuencia mayor comprometieron a los cromosomas X (23 %), 21 (18 %), 22 (9 %), 19 (7 %) y 20 (6 %).

No hubo diferencia significativa en la frecuencia de aberraciones cromatídicas y cromosómicas a 24 ni a 48 horas con ninguno de los insecticidas probados al ser analizados con la prueba de Mann-Whitney (Tablas XIV, XV, XVI y XVII). Tampoco se observó diferencia al comparar las aberraciones cromosómicas y cromatídicas encontradas a 24 horas con las de 48 horas utilizando la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para cada una de las concentraciones utilizada de metil paratión y de dimetoato.

La frecuencia de aberraciones cromosómicas entre donadores no mostró diferencia significativa a 24 y 48 horas con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para las diferentes concentraciones de los insecticidas estudiados.

El número de aberraciones cromosómicas por metafase en los cultivos tratados con los dos insecticidas, así como en el grupo de los testigos fue de 1 a 2 aberraciones. En todas las concentraciones de los insecticidas así como en los testigos se observaron asociaciones entre cromosomas acrocéntricos.

El índice mitótico de los cultivos de linfocitos tratados con metil paratión y dimetoato están referidos en porcentaje del índice mitótico. Con el objeto de determinar si existe una diferencia significativa entre las concentraciones se aplicó a los resultados las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk y posteriormente la prueba estadística ANOVA (análisis de varianza), T pareada y Regresión Lineal con la corrección de ajuste automático para comparaciones múltiples de Bonferroni. Los resultados de la prueba T pareada al analizar los hallazgos de los testigos con los de las

distintas concentraciones de metil paratión en 24 horas se observan en la Tabla XVIII. Se encontró variación significativa a partir de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al comparar los 4 donadores en conjunto el índice mitótico decrece a partir de la concentración 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 6). El estudio para cada donador independiente muestra también una disminución dependiente de la dosis (Figura 7).

En los tratamientos durante 48 horas, el índice mitótico del testigo mostró una diferencia significativa con las distintas concentraciones probadas (Tabla XIX). Al estudiar los tratamientos por pares también se encontró diferencia significativa dependiente de la dosis. La figura 8 muestra el comportamiento de los 4 donadores analizados en conjunto, observándose una disminución gradual en el índice mitótico. El estudio de dicho parámetro con la prueba de regresión lineal para cada donador independiente se muestra en la figura 9.

En el estudio de la relación lineal entre el índice mitótico y los diversos tratamientos con dimetoato para 24 horas se encontró diferencia significativa a partir de la concentración 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla XX). En la gráfica de la figura 10 se muestra el comportamiento del índice mitótico de los 4 donadores mediante la prueba de regresión lineal y se observa que a la concentración de 100 mg/mL hay un incremento significativo en el número de metafases, posteriormente el decremento es gradual dependiendo de la dosis. Los resultados de la prueba de regresión lineal para cada donador independiente se encuentran en la figura 11, presentando una relación lineal inversa entre las dosis y el índice mitótico.

Para los tratamientos de 48 horas con dimetoato, la prueba estadística fue significativa a partir de la concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los datos se muestran en la

Tabla XXI. La gráfica de la figura 12 presenta el comportamiento del índice mitótico de los donadores con respecto al aumento en las dosis del insecticida. La figura 13 señala la misma relación para cada donador independiente.

Al comparar si existe diferencia significativa entre donadores respecto a los resultados obtenidos en el índice mitótico se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk, y posteriormente se aplicó ANOVA de un factor. Las pruebas de comparaciones múltiples utilizando la HSD de Tukey y Games-Howell no mostraron diferencia significativa entre donadores, en los tratamientos a 24 ($p = 0.149$) y 48 ($p = 0.078$) horas con metil paratión. Tampoco se encontró diferencia significativa entre donadores para el índice mitótico a 24 horas ($p = 0.631$) ni para 48 horas ($p = 0.570$) de tratamiento con dimetoato (Figura 14).

El índice mitótico en los cultivos de 48 horas (24 horas de tratamiento) fue mayor que en los de 72 horas (48 horas de tratamiento) para ambos insecticidas. Con la finalidad de determinar si en el presente estudio hay variación en el índice mitótico de los cultivos a 24 horas y los de 48 horas se aplicó la prueba T de análisis estadístico de muestras relacionadas. Para metil paratión se encontró diferencia significativa a partir de la concentración de 20 mg/mL ($p = 0.006$) (Tabla XXII).

Se valoró mediante la prueba T si existía una variación significativa entre el índice mitótico encontrado a 24 y 48 horas para las distintas concentraciones probadas de dimetoato en los 4 donadores. Se observó diferencia significativa a partir de la concentración 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.005$) (Tabla XXIII). A las concentraciones más elevadas de ambos insecticidas hubo lisis sobre todo de eritrocitos y finalmente muerte celular.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El uso de plaguicidas está vinculado a grandes beneficios en la agricultura, la industria y el control de enfermedades, paradójicamente también representa un costo muy elevado en problemas ambientales y de salud. Los insecticidas organofosforados son utilizados ampliamente en la producción agrícola, en casas, escuelas y lugares de trabajo, aumentando el número de personas que están en contacto con ellos. Por ello su estudio es de especial importancia. La caracterización de riesgo mediante pruebas de genotoxicidad en células germinales y somáticas han relacionado la presencia de mutaciones con enfermedades hereditarias, cáncer, anemias con células falciformes, enfermedades cardiovasculares, efectos en el desarrollo, la reproducción, el sistema nervioso y el envejecimiento (Dearfield *et al.* 1991, Cimino 2006, Norppa *et al.* 2006). Las pruebas para valorar la potencialidad de los agroquímicos para producir daño genotóxico se enfocan principalmente en evaluaciones citogenéticas de aberraciones cromosómicas (Bolognesi 2003).

En la actualidad la serie de análisis y ensayos para estimar los efectos en los tres puntos finales más importantes de daño genético asociado con enfermedades en humanos son las de mutaciones génicas, las de clastogenicidad y aneuploidías. En la segunda categoría, la prueba de aberraciones cromosómicas ha sido usada por más de 30 años como biomarcador de diagnóstico genotóxico temprano en estudios ocupacionales y ambientales (Mateuca *et al.* 2006), su protocolo está definido por la guía 473 de la OECD 1997 y tiene una posición clave en las investigaciones realizadas para valorar compuestos genotóxicos.

El presente estudio fue establecido para evaluar la capacidad de los insecticidas organofosforados metil paratión y dimetoato en la incidencia de alteraciones cromosómicas. No se encontró variación significativa en las aberraciones cromosómicas producidas en los cultivos de linfocitos a los que se les aplicaron diferentes concentraciones de metil paratión y dimetoato al analizarlas con respecto a los testigos negativos ni al comparar los diferentes tratamientos por pares. Esta observación está en concordancia con los datos reportados para metil paratión en las investigaciones realizadas por Huang (1973) en 3 líneas linfoides humanas y en médula ósea de ratón. De igual manera, Chen *et al.* (1981) tampoco encuentran aumento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en líneas celulares de linfoma Burkitt y linfocitos normales de humanos así como en la línea celular V79 de criceto chino, Rupa *et al.* (1990) en linfocitos humanos cultivados con 0.02, 0.04, 0.08 y 0.16 $\mu\text{g/mL}$ de metil paratión tampoco observan incremento en alteraciones cromosómicas. En estudios *in vivo* con ratas, utilizando dosis agudas y crónicas de metil paratión y dimetoato, Degraeve y Moutschen (1983, 1984) y Degraeve *et al.* (1984 a, b, 1985), no hallan elevación en la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Por lo contrario, Nehéz *et al.* (1983, 1994) y Nehéz y Dési (1996) en ratas tratadas con dimetoato, observan aumento significativo en las alteraciones cromosómicas numéricas y en las estructurales sólo son significativas con tratamientos agudos. Para metil paratión el aumento no es significativo. Los tres estudios incluyen huecos en el conteo final de aberraciones. Vijayaraghavan y Nagarajan (1994) encuentran una clara inducción de aberraciones por metil paratión en células de médula ósea aún sin incluir huecos cromosómicos. Ündeger *et al.* (2000) observan aumento estadísticamente significativo en las aberraciones cromosómicas numéricas pero no en las

estructurales. Los estudios con personas ocupacionalmente en contacto con plaguicidas describen resultados generalmente positivos, sin embargo algunos autores no encuentran diferencia en las aberraciones cromosómicas al comparar con los testigos. En individuos que sufren intoxicación con plaguicidas por intento de suicidio o accidente, las aberraciones cromosómicas son más elevadas de manera estadísticamente significativas que las reportadas en los mismos pacientes meses después, ya que se observan rompimientos cromatídicos y aberraciones cromosómicas estables en 5 individuos intoxicados con metil paratión un mes después de la ingestión (Van Bao *et al.* 1974). La prueba de intercambio de cromátidas hermanas también muestra elevación significativa en este tipo de población (Alptekin *et al.* 2006). Para trabajadores que están expuestos en forma crónica a mezclas complejas de plaguicidas en los diferentes procesos de utilización, la mayoría de las investigaciones muestran resultados que asocian de manera positiva el aumento en las aberraciones y el uso de plaguicidas. Los estudios de Yoder *et al.* (1973) en trabajadores agrícolas expuestos a varios plaguicidas entre ellos metil paratión informan aumento en los rompimientos cromosómicos y huecos, así como la presencia de figuras radiales, durante el periodo de fumigación; en los de Dulout *et al.* (1985) sobre floricultores expuestos a organofosforados, organoclorados y carbamatos no hallan correlación entre los síntomas de intoxicación y el número de las aberraciones cromosómicas, pero sí notan aumento significativo de intercambios de tipo dicéntricos (expuestos 0.43 % y testigos 0.10%). Al estudiar a empleados de la producción de plaguicidas, Zeljezic y Garaj-Vrhovac (2001) documentan elevación significativa en la inducción de daño al ADN mediante el ensayo cometa y la presencia de aberraciones cromosómicas, cromatídicas, dicéntricos y fragmentos, así como en el número de

aberraciones por célula aún después de 8 meses del tiempo de exposición máxima. Sailaja *et al.* (2006) reportan resultados positivos en las pruebas de aberraciones cromosómicas en 54 trabajadores. Otros investigadores fallan en encontrar dicha asociación. de Cassia Stocco *et al.* (1982) al estudiar a trabajadores de una planta producción de plaguicidas no observan elevación de las aberraciones cromosómicas. Tampoco muestran variación significativa los estudios de Scarpato *et al.* (1997) en 30 trabajadores de la flor; los de D'Arce y Colus (2000) en personas expuestas a mezclas de plaguicidas en Brasil ni los de Costa *et al.* (2006) en individuos que laboran con diversos insecticidas entre ellos dimetoato durante periodos de 0.5 a 43 años.

Los ensayos de micronúcleos y de intercambio de cromátidas hermanas también reflejan divergencia en sus resultados. Titenko-Holland *et al.* (1997) y Sailaja *et al.* (2006) mostraron inducción de micronúcleos por plaguicidas, en linfocitos de 38 fumigadores esporádicos en California EUA y en células epiteliales de la boca de 54 operadores. Mientras que en 84 trabajadores de Hungría en contacto moderado o elevado con plaguicidas Pastor *et al.* (2002) no observan aumento significativo en la presencia de micronúcleos. En la prueba de intercambio de cromátidas hermanas Chen *et al.* (1981) en células de criceto y en células linfoides humanas con metil paratión y en células de médula ósea de criceto tratadas con dimetoato reportan incremento en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas siendo el primero el más efectivo inductor a dosis de 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y causa del retardo celular más evidente. En el caso de dimetoato solo fue positivo a las más altas concentraciones probadas 40 y 80 mg/mL . Sobti *et al.* (1982) describen incremento significativo en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas para metil paratión y dimetoato a dosis de 2 y 20 mg/mL . Rupa *et al.* (1991 b)

describen aumento significativo aun a dosis tan bajas como 0.04 µg/mL de metilparati6n.

En estudios ocupacionales la discrepancia en los resultados tanto de aberraciones cromos6micas, micron6cleos e intercambio de crom6tidas hermanas puede ser debida a la variabilidad en las poblaciones estudiadas en cuanto al tipo de exposici6n, el plaguicida utilizado, su genotoxicidad potencial, el uso de mezclas complejas, la cantidad, tiempo, v1a de entrada al organismo, utilizaci6n de medidas de protecci6n, tiempos de descanso entre aplicaciones, trabajo en invernadero o en espacios abiertos, tipo de cultivo, t6cnicas de aplicaci6n, extensi6n del 1rea y condiciones ambientales (Garry *et al.* 1989, Joksic *et al.* 1997, Zeljezic y Garaj-Vrhovac 2002, Bolognesi 2003). Los trabajadores de plantas de producci6n y los que aplican aerosoles est1n expuestos adem1s a otros qu1micos como son: gas fosfina (CAS 7803-51-2), solventes, impurezas y productos generados durante el almacenamiento (Garry *et al.* 1989, Joksic *et al.* 1997). Las f6rmulas de los plaguicidas contienen ingredientes inertes que no pasan por las pruebas requeridas para su registro y que pueden incrementar de manera significativa su toxicidad, absorci6n y movilidad en el ambiente (Cox y Sorgan 2006). Con respecto a la metodolog1a se han estudiado factores que pueden interferir en el efecto genot6xico de los plaguicidas como son diferencias en el tiempo de toma de muestra y de exposici6n m1xima, edad, g6nero, h1bito de fumar, consumo de alcohol, cafe1na y dieta (Garry *et al.* 1992, Yadav y Kaushik 2002, Bolognesi 2003). Algunos autores, sin embargo, no encuentran injerencia en el tiempo de exposici6n (Rupa *et al.* 1989 a, b, Kourakis *et al.* 1992, Scarpato *et al.* 1997) ni en el h1bito de fumar (Kourakis *et al.* 1992, Scarpato *et al.*

1997, D'Arce y Colus 2000) ni entre ninguno de los parámetros antes mencionados (Sailaja *et al.* 2006).

El compuesto probado como testigo positivo (MMC) produce incrementos estadísticamente significativos para todo tipo de aberraciones, lo mismo es observado por Richardson *et al.* (1984). En los grupos testigos y para las diferentes concentraciones estudiadas las aberraciones más frecuentes fueron rompimientos y huecos que son consideradas lesiones primarias críticas en la formación de aberraciones estructurales y que pueden ser producidas por agentes externos o de manera espontánea durante el ciclo celular. El cromosoma que estuvo preferentemente involucrado en estas aberraciones fue el cromosoma 9 a nivel de la banda 9q10-q12, dicho rompimiento se considera como un artefacto de cultivo (Mamuris *et al.* 1998). En el presente estudio las aberraciones cromosómicas se localizaron en centrómeros (3.6 %), sitios frágiles no centroméricos (2 %) y en otras partes del cromosoma (94 %). Wojda *et al.* (2006) mencionan hallazgos semejantes en el grupo más joven (21 a 30 años) estudiado. Se observó una translocación entre los cromosomas 7 y 14, las translocaciones que involucran estos cromosomas pueden ocurrir en el útero, en rearreglos que se acumulan de manera progresiva o pueden reflejar exposición a agentes ambientales (Priour *et al.* 1988), dicho evento se encontró una sola vez y a la dosis más baja de metil paratión. Debido a que ciertos plaguicidas entre ellos organofosforados han sido asociados con un riesgo incrementado a cáncer, algunos autores han investigado los sitios en los cromosomas donde se producen las aberraciones utilizando técnicas de cultivo normales y con afidicolina, diferenciando los cromosomas mediante bandeo (GTG y RTG) y relacionado los sitios de rompimiento con sitios frágiles comunes, encuentran una alta frecuencia de sitios frágiles en especial

puntos de rompimiento relacionados con procesos neoplásicos y en bandas donde se encuentran genes supresores de tumores y oncogenes (Garry *et al.* 1992 y 1996, Sbrana y Musio 1995, Musio y Sbrana 1997 y Webster *et al.* 2002). Los puntos de rupturas cromosómicas con sitios frágiles reportados por estos autores solo coinciden con 1p34 hallado por Sbrana *et al.* (1998) y fue encontrado una sola vez.

En el presente trabajo no se encontraron dicéntricos en 3 200 células de los testigos negativos ni tampoco en los cultivos tratados con metil paratión ni dimetoato, dicha aberración es rara en cultivos no tratados. Richardson *et al.* (1984), en 21 570 células de donadores no tratados o con aplicaciones de disolventes utilizados como testigos negativos, no encuentran intercambios cromosómicos y en el caso de dicéntricos, observan menos de uno en 10 000 células.

La frecuencia de aberraciones cromosómicas entre donadores no mostró diferencia significativa a 24 y 48 horas con la prueba no paramétrica de Mann- Whitney para las diferentes concentraciones de los insecticidas estudiados. Estos hallazgos están de acuerdo con los reportados por Rupa *et al.* (1991 a) en muestras de trabajadores del algodón.

La cantidad de aberraciones cromosómicas por metafase en los cultivos tratados con los dos insecticidas así como en el grupo de los testigos fue bajo, de 1 a 2 aberraciones. Wojda *et al.* (2006) encontraron un máximo de 1 a 3 en grupos de individuos normales de distintas edades incluidos ancianos.

Las hiperdiploidías fueron vistas de manera esporádica, el cromosoma extra fue del grupo G. En las hipodiploidías, al analizar por cromosomas, el cromosoma X fue el

que preferentemente se perdía. Wojda *et al.* (2006) reportan que las hipodiploidías del cromosoma X son más frecuentes que las de cualquier otro cromosoma.

Yadav y Kaushik (2002) encuentran una mayor asociación entre cromosomas acrocéntricos, en cultivos de linfocitos de trabajadores expuestos al insecticida organofosforado Baytex-1000 con respecto a los testigos, en el presente estudio se observaron asociaciones entre cromosomas acrocéntricos en todas las concentraciones de los insecticidas así como en los testigos negativos.

Se concluye que las sustancias probadas metil paratión y dimetoato no muestran evidencias de inducir aberraciones cromosómicas bajo las condiciones dadas en éste trabajo.

En cultivos de linfocitos se requieren estudiar varias concentraciones de la sustancia por probar que permitan definir el efecto observado. La norma OPPTS 870.5375 (EPA 1996) recomienda determinar además las dosis más altas estimando parámetros como actividad citotóxica, entre otros. Si bien el índice mitótico es una medida indirecta del efecto citotóxico y citostático está dentro de los indicadores sugeridos para valorar la integridad y crecimiento celular. Para las concentraciones más altas probadas en el presente trabajo hubo evidencia de reducción importante en la actividad mitótica y muerte celular.

En el presente estudio el análisis del índice mitótico a 24 horas de tratamiento con metil paratión y dimetoato para los cuatro donadores utilizando la prueba estadística de regresión lineal, se observa que ambos insecticidas muestran un comportamiento muy semejante, en las primeras concentraciones hay aumento del índice mitótico y después decrece tomando valores estadísticamente significativos respecto a los testigos a partir de

30 mg/mL para metil paratión y de 600 mg/mL para dimetoato. En los tratamientos a 48 horas se encuentra una progresiva inhibición del índice mitótico de manera dosis dependiente siendo significativa a partir de 10 mg/mL y 300 mg/mL para metil paratión y dimetoato. Dzwonkowska y Hübner (1986) reportan en células de médula ósea de criceto sirio un mayor índice mitótico al aumentar las concentraciones de dimetoato (16, 32, 80 y 160 mg/kg de peso). Rupa *et al.* (1989) también notan aumento significativo en el índice mitótico en trabajadores expuestos durante 10 años a mezclas de plaguicidas incluidos organofosforados y en trabajadores con 11 a 25 años declina de manera significativa. Gómez–Arroyo *et al.* (2000) en floricultores que utilizan metil paratión entre otros plaguicidas describen índices mitóticos significativamente mayores que en los testigos. Yadav y Kaushik (2002) al comparar el índice mitótico en trabajadores expuestos al insecticida organofosforado Baytex-1000 con el del grupo de testigos muestran que durante los primeros 5 años hay aumento y después de los 15 años declina de forma significativa. Chen *et al.* (1981) documentan retardo en el ciclo celular en la línea celular V79 de criceto chino y en menor medida en las líneas celulares de linfoma Burkitt y linfocito normal de humanos a las que se les aplicó metil paratión. Sobti *et al.* (1982) informan inhibición en la replicación de células linfocitos humanas tratadas con 0.002, 0.2, 2 y 20 µg/mL de metil paratión, dimetoato y otros organofosforados, en el rango de 35 % al 60 % respectivamente al comparar con el testigo de manera dosis dependiente, efecto que es confirmado por citometría de flujo. Hoda y Sinha (1993) encuentran disminuido el índice mitótico de células de raíz de cebolla tratadas con 30 µg/mL de dimetoato. Alptekin *et al.* (2006), también observan reducción en el índice mitótico de manera significativa en individuos intoxicados con agroquímicos.

El efecto de los plaguicidas organofosforados sobre la integridad del sistema inmune ha tomado en los recientes años considerable interés. Dentro de los ensayos recomendados para estudiar el efecto inmunotóxico de los químicos se encuentran la valoración de la proliferación de células T activadas con fitohemaglutinina, concanavalina A o con interleucina 2 (IL-2) (EPA1998). En este campo y utilizando animales de laboratorio, Lima y Vega (2005) reportan que metil paratión reduce de manera significativa la proliferación de linfocitos T estimulados con fitohemaglutinina y cultivados durante 48 horas con medio RPMI, los autores realizaron una corrección tomando en cuenta la viabilidad celular y también encuentran disminución en la secreción de IL-2. Videira *et al.* (2001) observan que el metil paratión puede dañar la membrana celular al alterar las propiedades fisicoquímicas de los lípidos. Alluwaimi *et al.* (1999) encuentran que el dimetoato disminuye en forma significativa las interleucinas 2 y 4. Li (2007) muestra al dimetoato como inhibidor de la actividad de las células asesinas naturales de manera dosis dependiente. Tarkowski *et al.* (2004) reportan que la inhibición de la acetilcolinesterasa producida por los plaguicidas organofosforados es el resultado de la fosforilación de la serina en el sitio activo de la enzima la cual parece estar relacionada con diversas funciones inmunológicas entre las que se incluyen la activación del complemento, de las células asesinas activadas por linfocitos, de las células asesinas naturales y de las interleucinas 2, influyendo de esta manera sobre la proliferación de linfocitos.

En las condiciones utilizadas en el presente estudio no se encontró diferencia significativa en el índice mitótico entre donadores y el índice mitótico para ambos insecticidas fue mayor a 48 que a 72 horas. Rupa *et al.* (1991a) notan índices mitóticos

más bajo en los cultivos de 48 horas que en los de 72 horas en muestras de empleados de los campos de algodón.

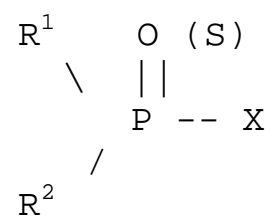
Anexo I. Figuras

Figura 1. Fórmula general de la estructura química de los plaguicidas organofosforados (WHO 1986). Donde R^1 y R^2 son radicales generalmente grupos alquilo, principalmente metilo y etilo. X es ocupado por radicales de gran variedad cuya característica es una unión P-X lábil. O es oxígeno que puede ser sustituido por azufre (S) en los tiofosfatos.

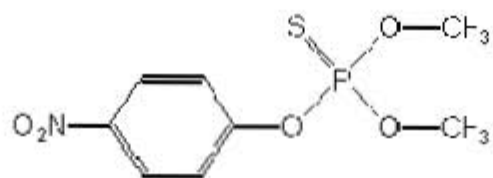


Figura 2. Estructura química del metil paratión (WHO 1993).

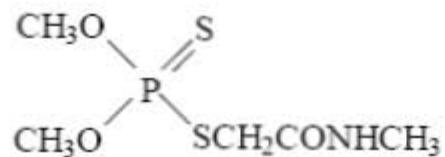


Figura 3. Estructura química del dimetoato (FAO 2005)

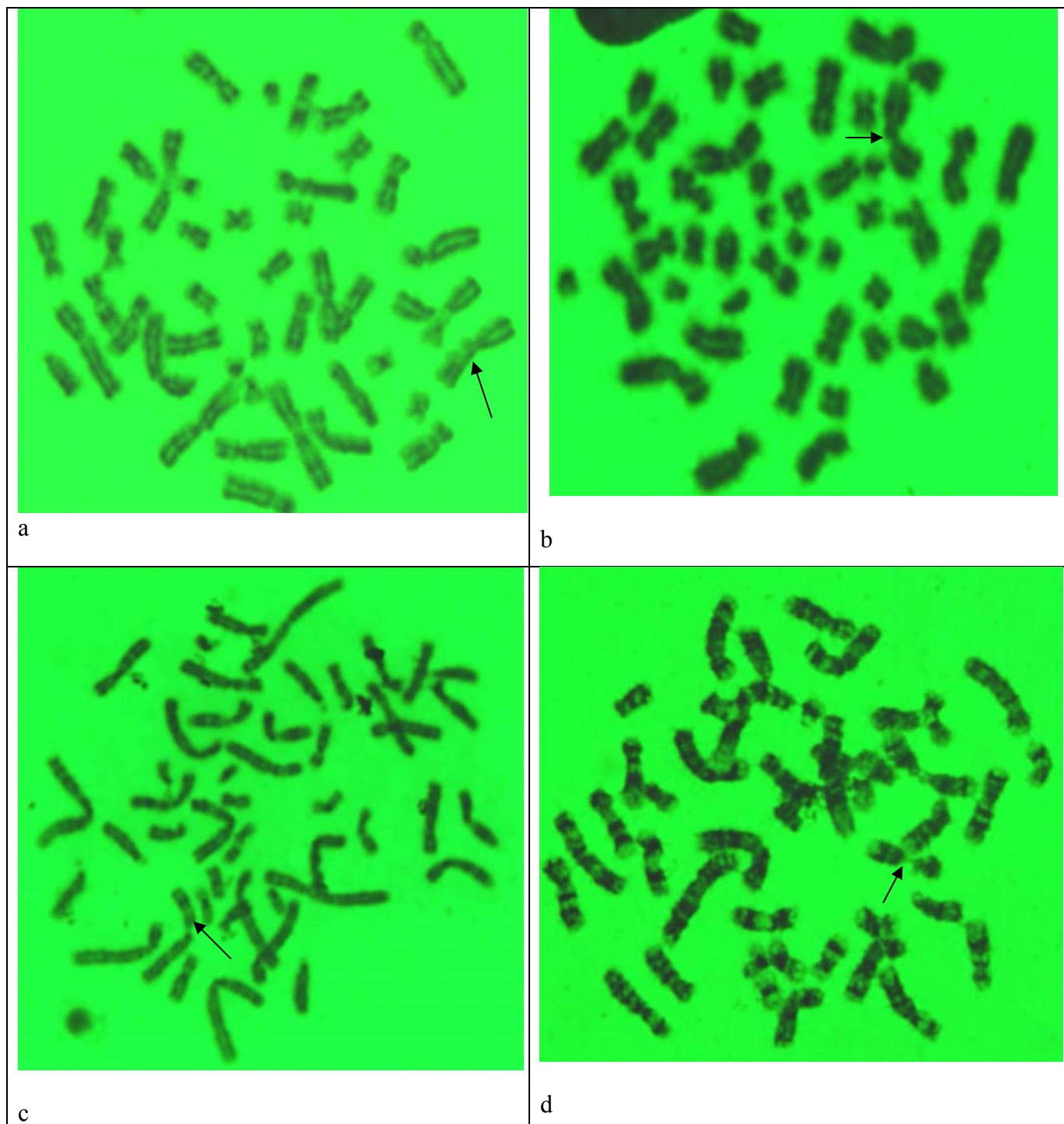


Figura 4. Metafases en donde se observan rompimientos cromatídicos en diferentes cromosomas: a) en un cromosoma del par 2 en la banda 2q11; b) en un cromosoma del par 1 en la banda 1q21; c) en un cromosoma del par 3 en la banda 3p12; d) en un cromosoma del par 9 a nivel de la banda 9q12.

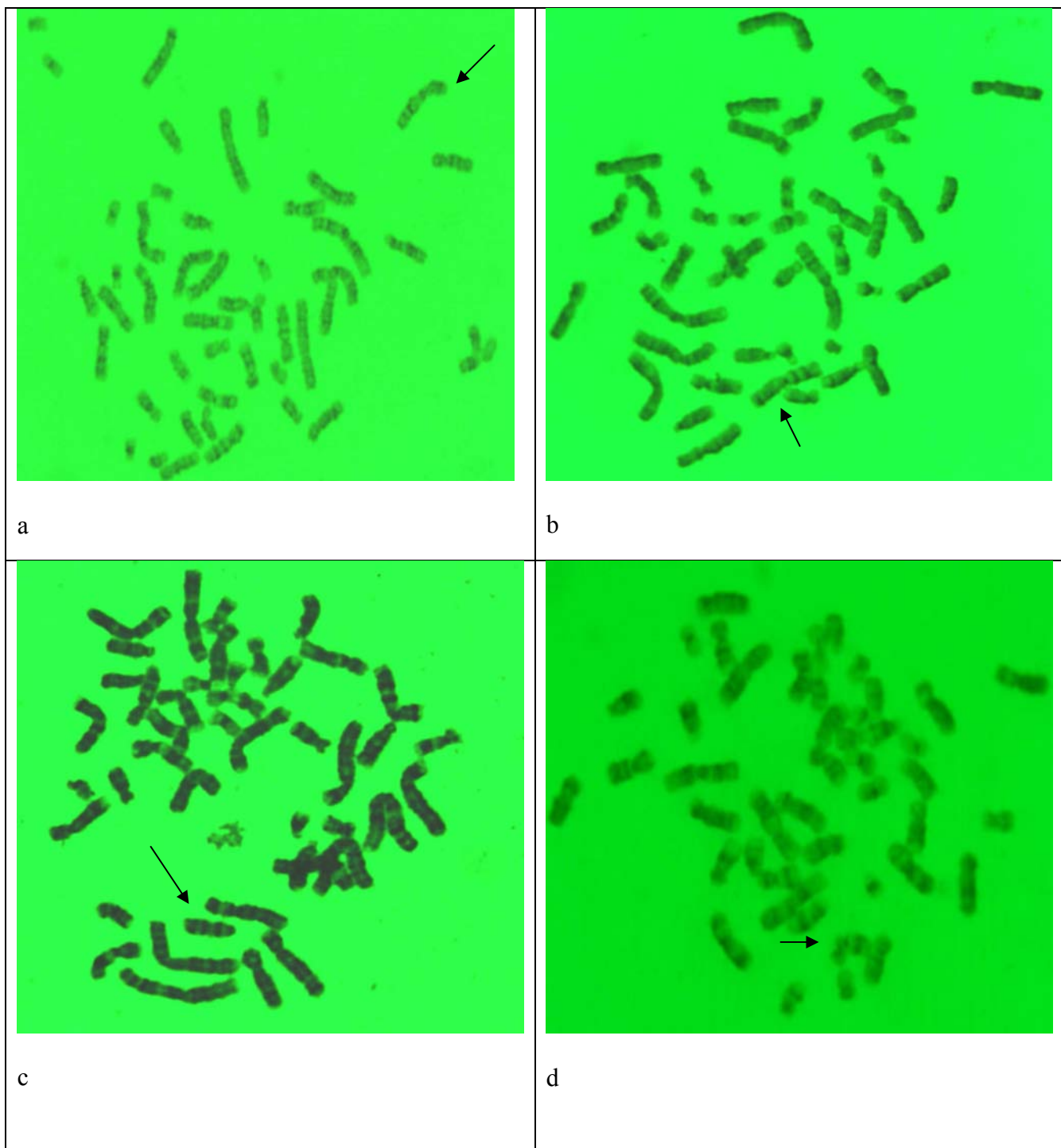


Figura 5. a) Metafase con una deleción en un cromosoma del par1, en la banda 1p34, b) metafase donde se observa una tranlocación entre los cromosomas 7 y 14 en las bandas 7p15 y 14q13. c) metafase con una deleción en un cromosoma 10 en 10p10. d) metafase con un rompimiento cromatídico en el cromosoma 11 en la banda 11p13.

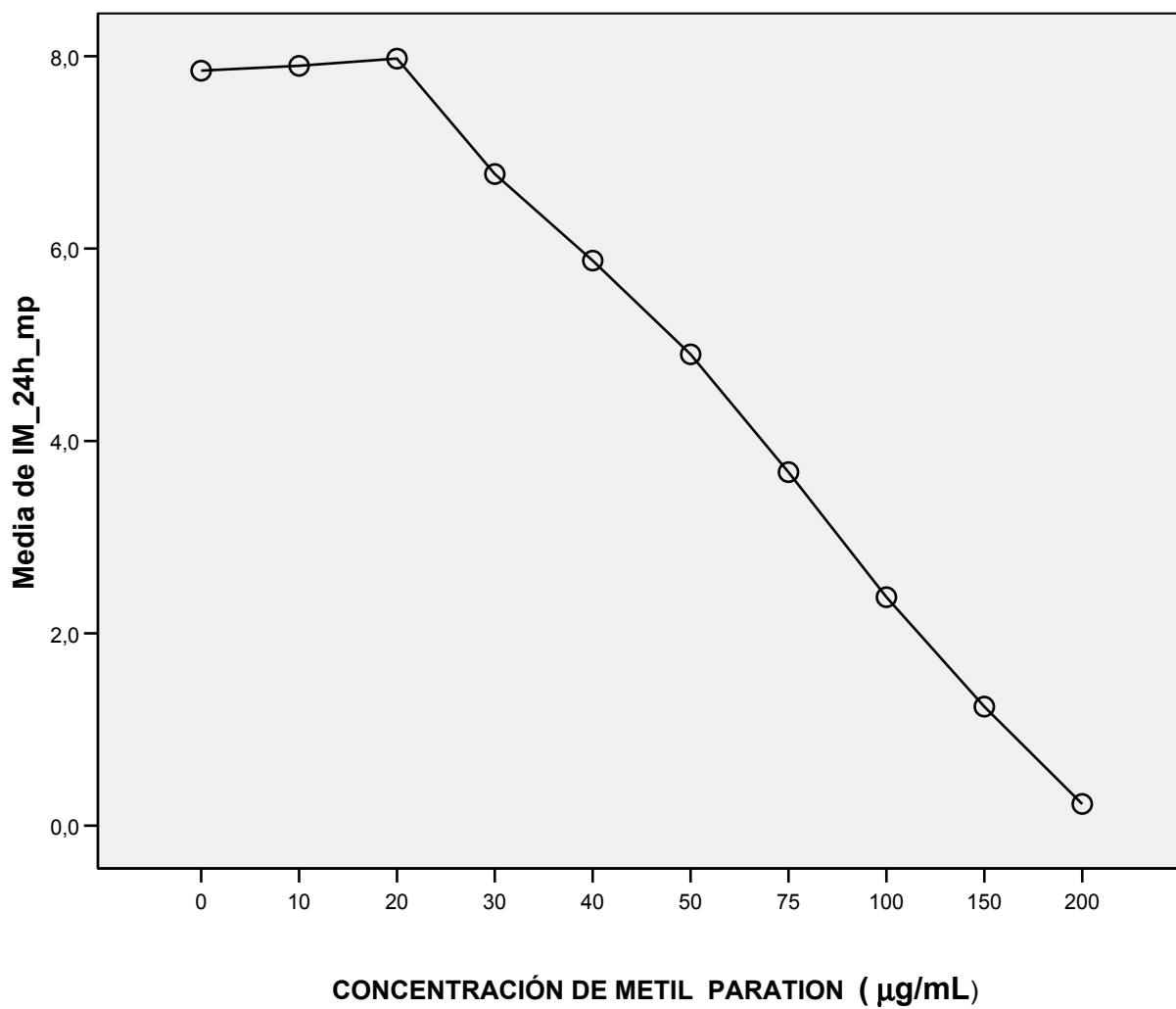


Figura 6. Gráfica resultante del análisis mediante la prueba de regresión lineal del índice mitótico de los cuatro donadores y los diferentes tratamientos con metil paration durante 24 horas.

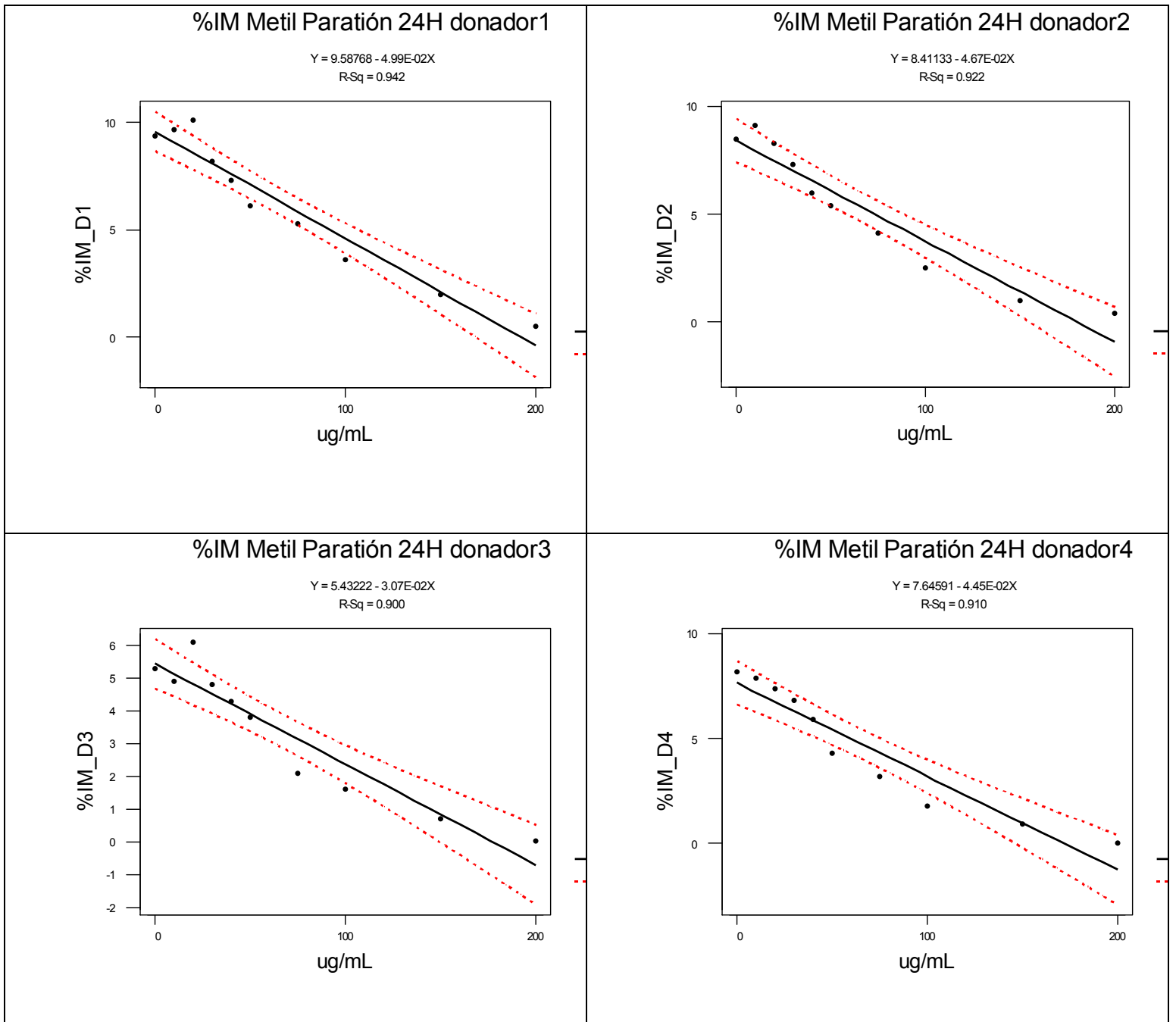


Figura 7. Resultado del análisis mediante la prueba de regresión lineal del índice mitótico (%) de cada donador con respecto a las diferentes concentraciones de metil paratión en tratamientos de 24 horas. La línea punteada representa el índice de confianza de 95 %.

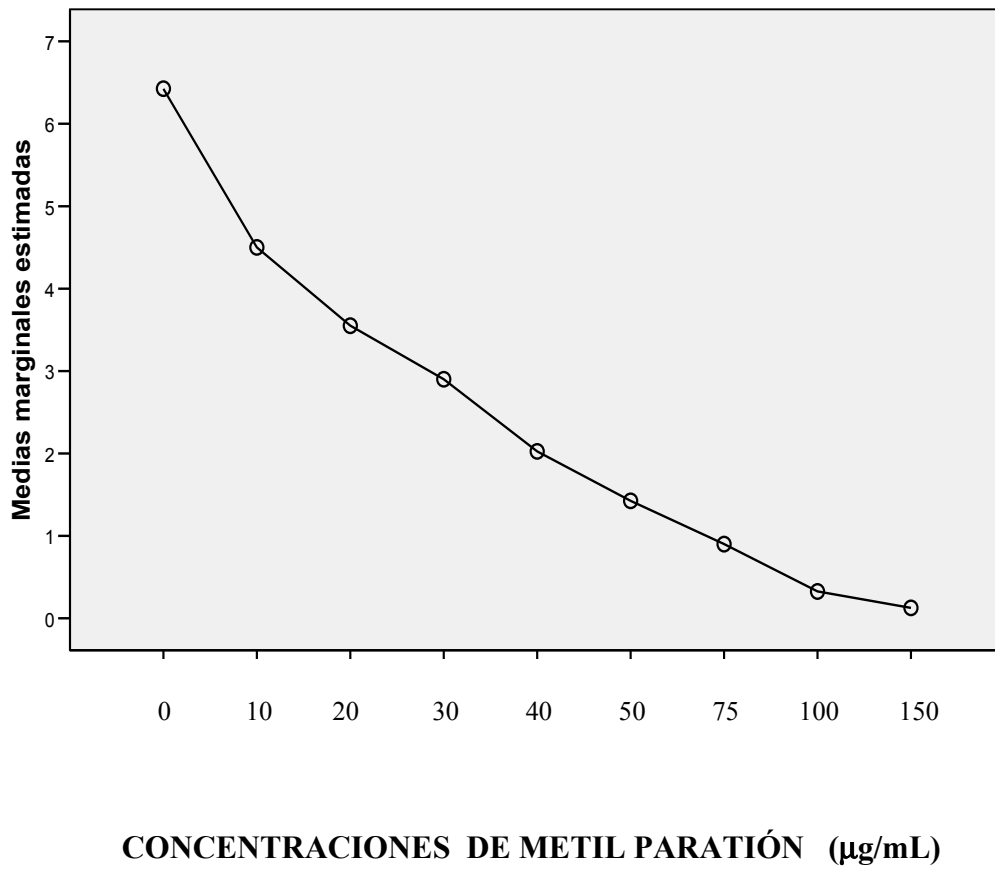


Figura 8. Resultado de la correlación lineal entre las medias del índice mitótico (%) del grupo de donadores y los distintos tratamientos con metil paratión durante 48 horas.

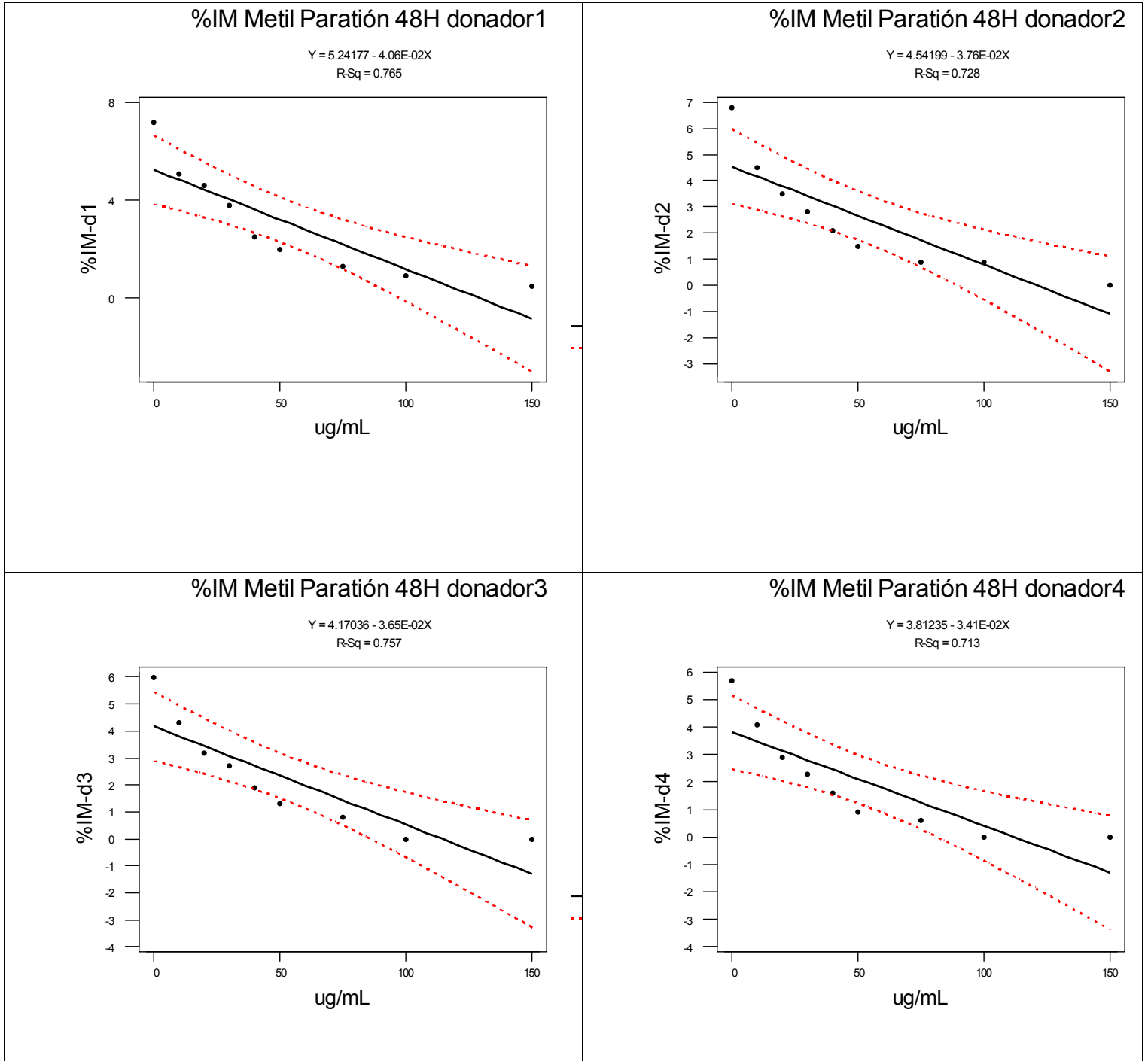


Figura 9. Gráficas del análisis de regresión lineal entre el índice mitótico y los distintos tratamientos a 48 horas con metil paratión, para cada uno de los cuatro donadores.

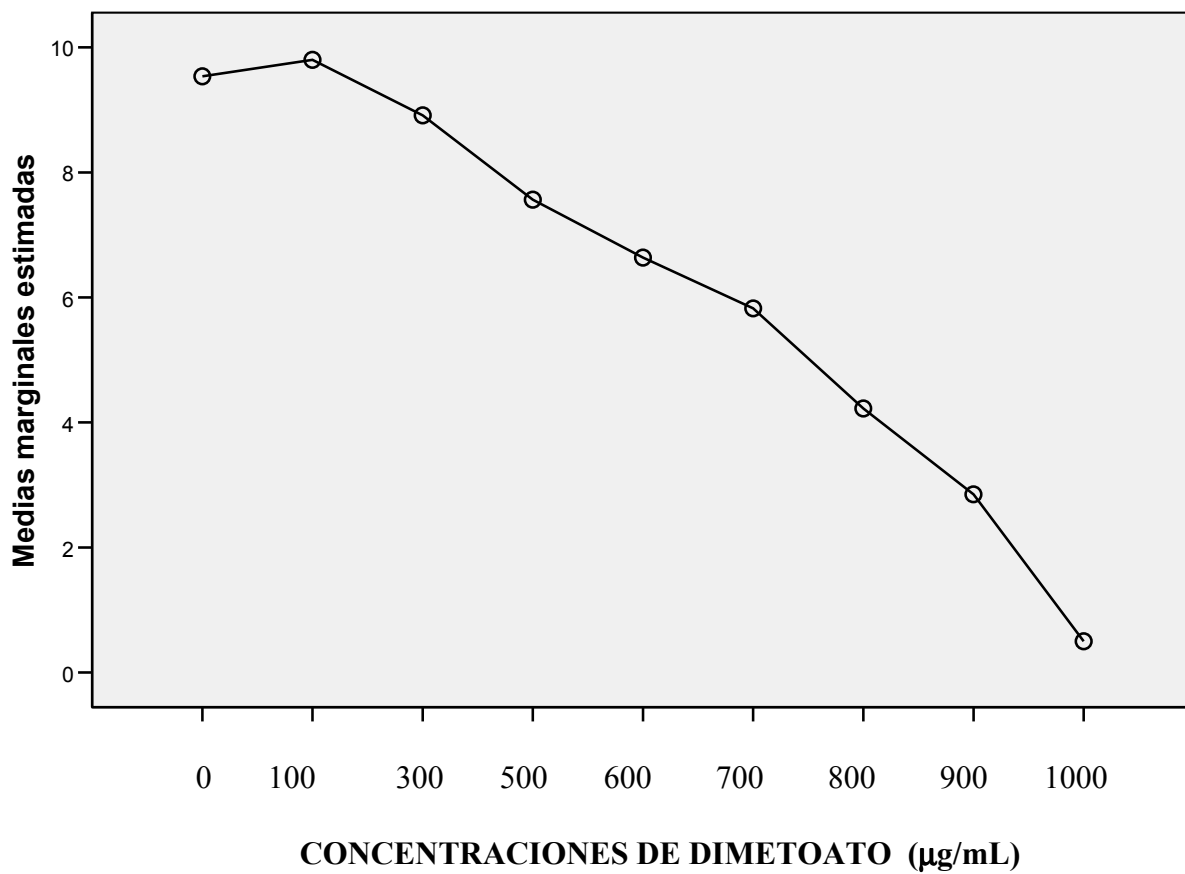


Figura 10. Gráfica del resultado del análisis de la prueba de regresión lineal para las medias del índice mitótico (%) de los 4 donadores y las diferentes concentraciones de dimetoato aplicadas durante 24 horas.

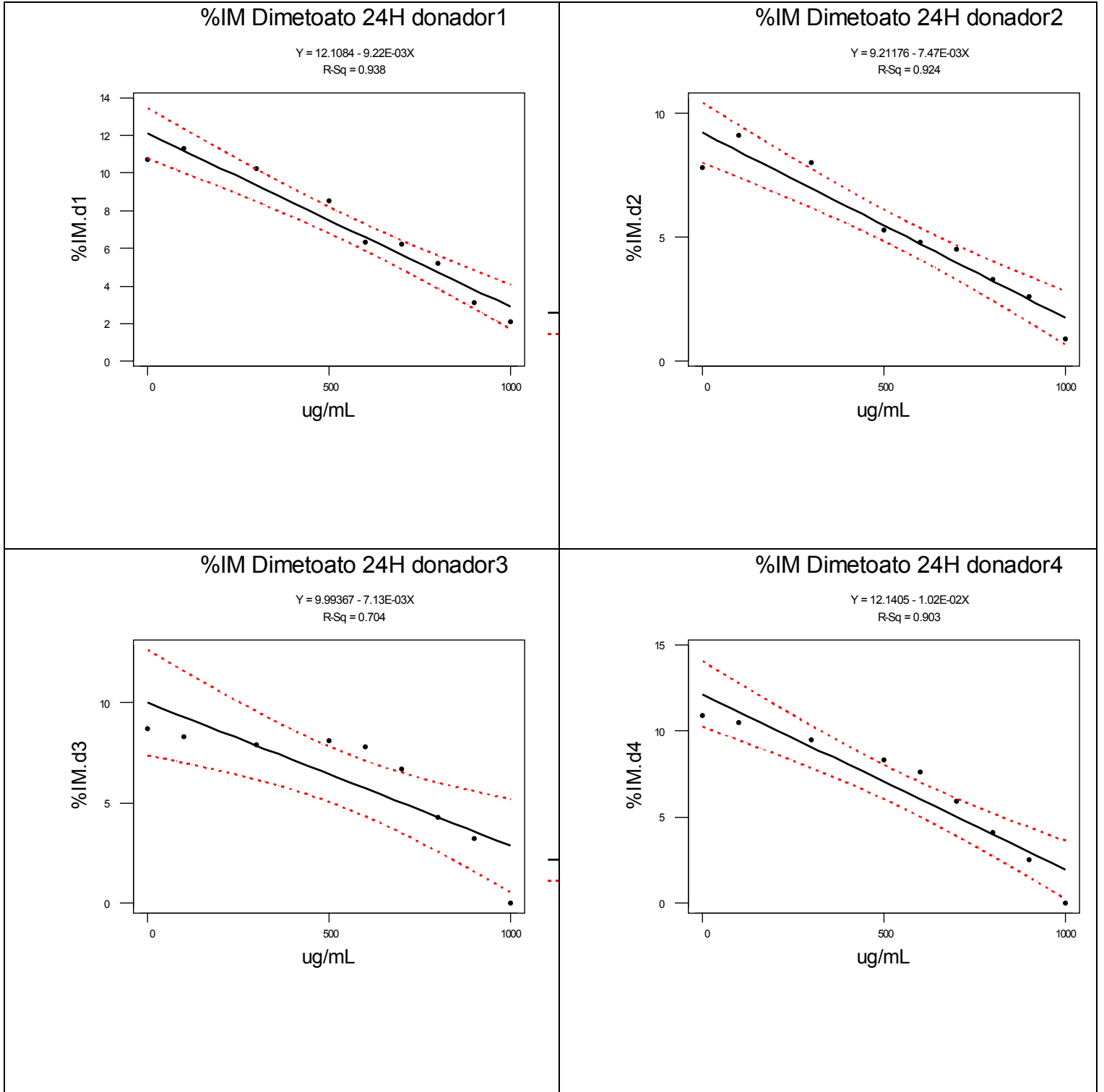


Figura 11. Resultado del análisis mediante la prueba de regresión lineal del índice mitótico (%) de cada donador con respecto a las diferentes concentraciones de dimetoato en tratamientos de 24 horas. La línea punteada representa el índice de confianza de 95 %.

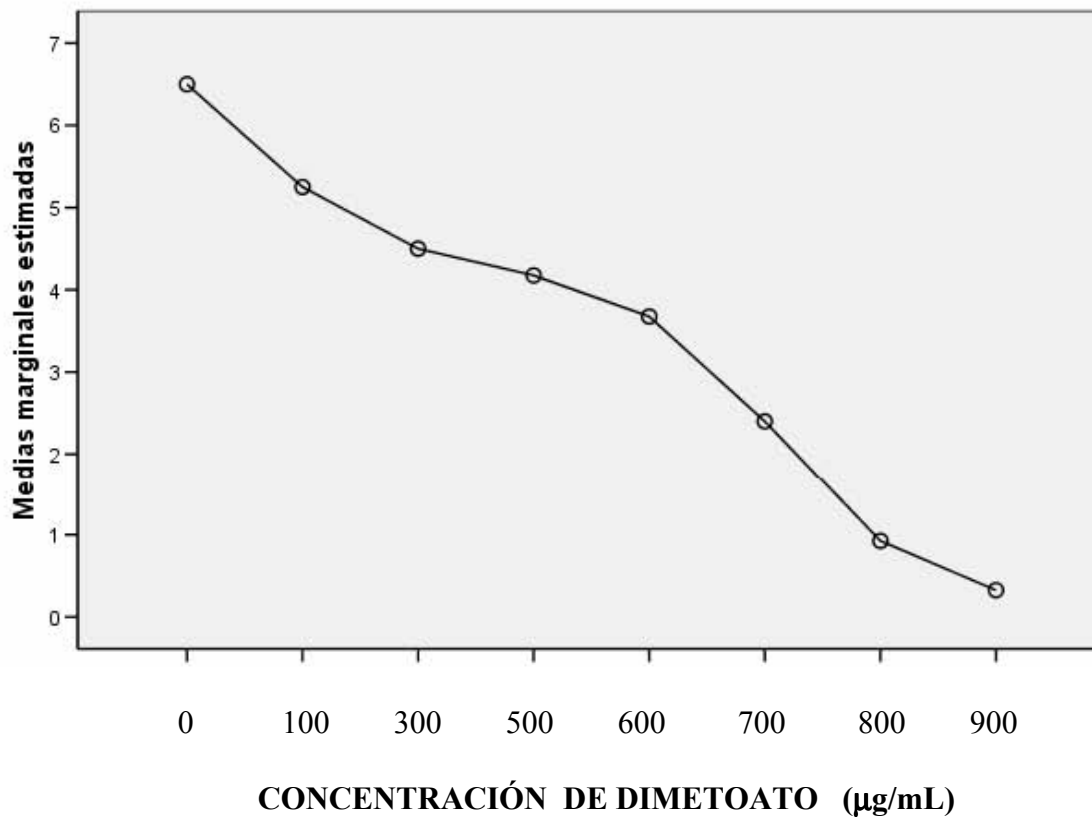


Figura 12. Gráfica de los resultados obtenidos al aplicar la prueba de regresión lineal al índice mitótico (%) de células tratadas durante 48 horas con dimetoato para los cuatro donadores.

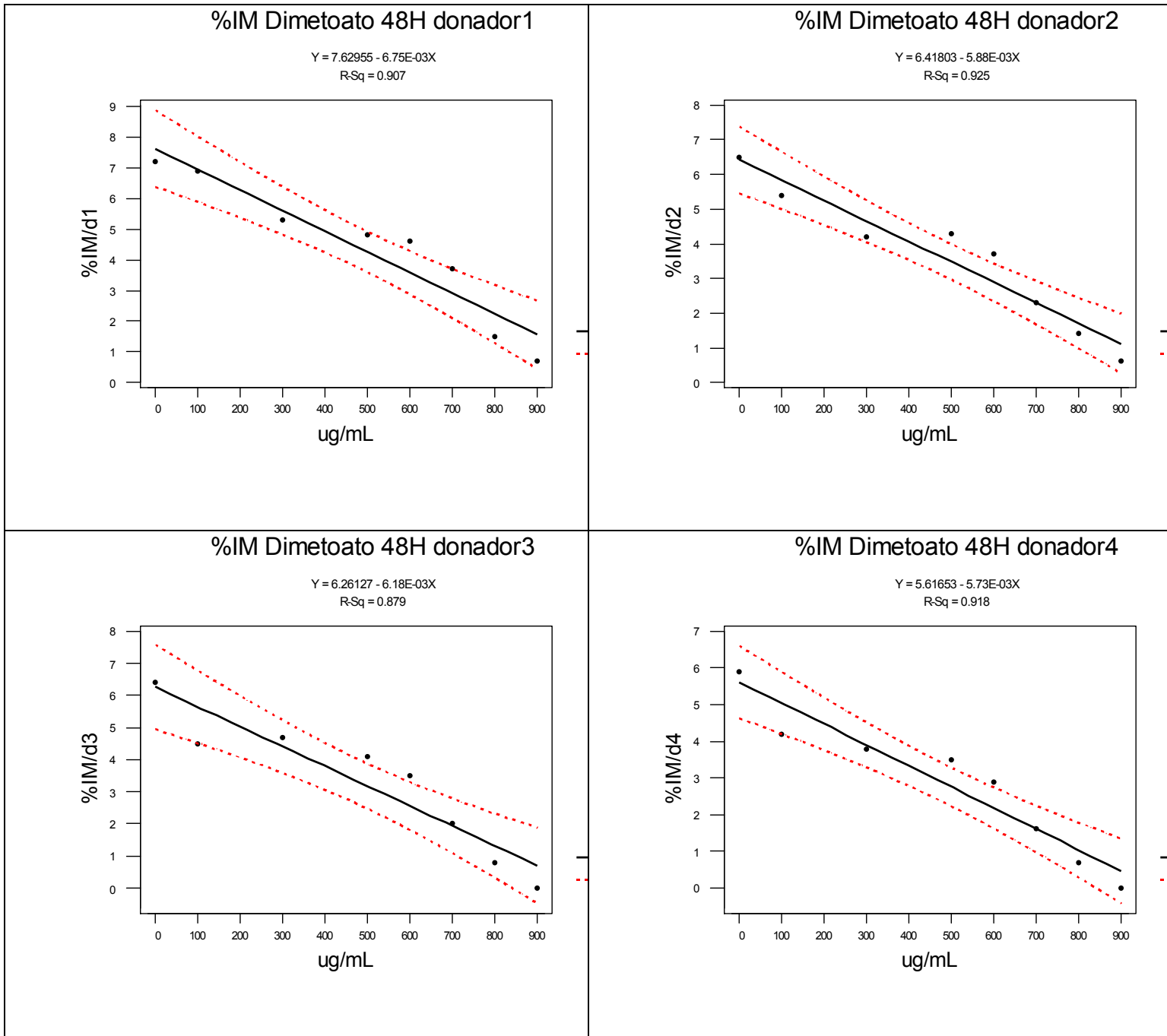


Figura 13. Resultados de la prueba estadística de regresión lineal para cada donador al comparar el % del índice mitótico con los distintos tratamientos a 48 horas con dimetoato.

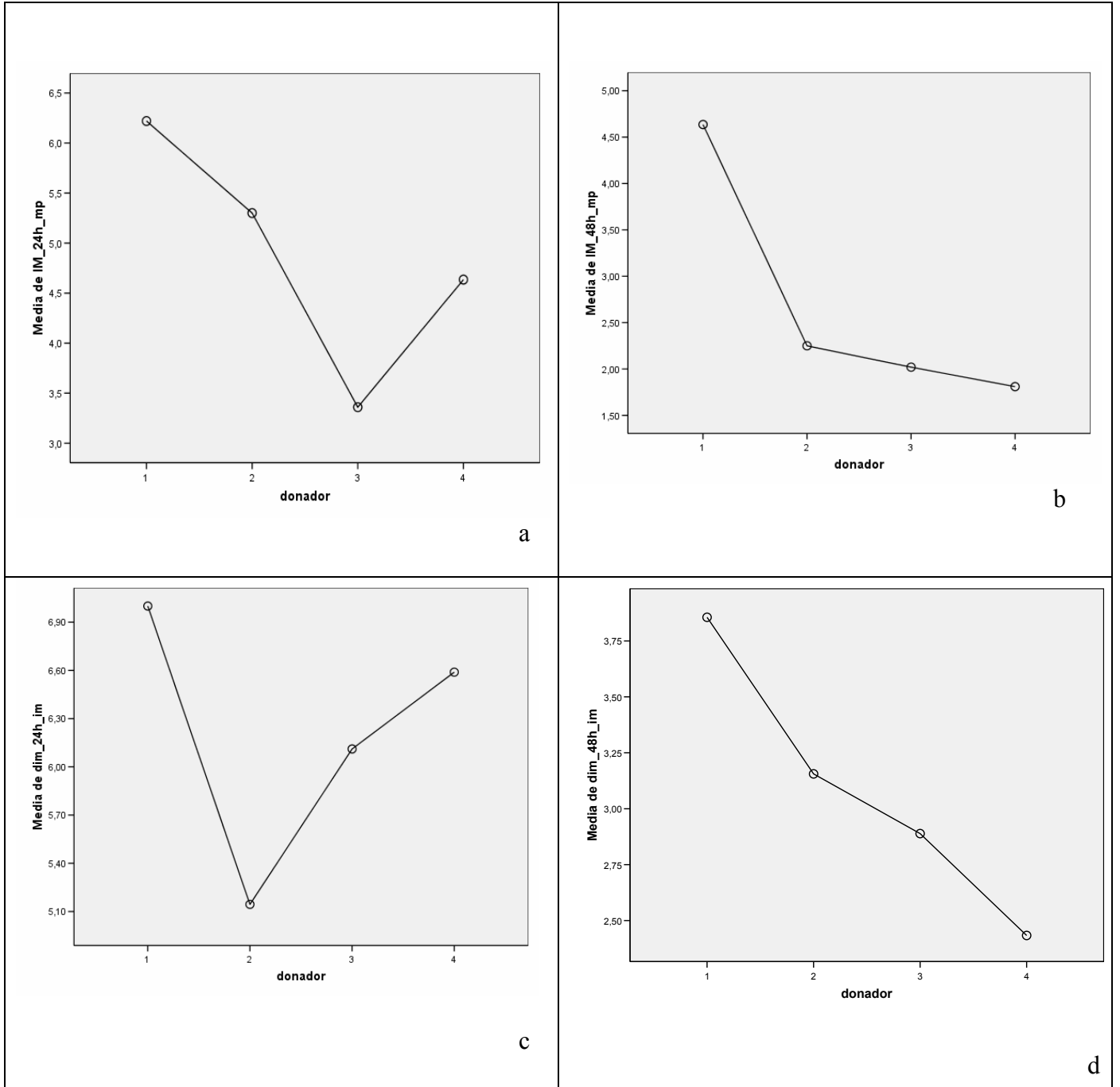


Figura 14. Gráficas de las medias resultantes del análisis de regresión lineal al comparar el índice mitótico de los distintos donadores durante tratamientos de 24 y 48 horas con metil paratión (a y b) y con dimetoato (c y d).

Anexo II. Tablas

Tabla I. Características fisico-químicas del metil paratión

Propiedades	Características	Referencias
Número registro CAS	298-00-0	WHO 1993
Sinónimos	Paratión metilo	FAO 1997
Peso molecular	263.23	WHO 1993
Color	Ingrediente activo: cristales blancos Grado técnico: líquido amarillo café	FAO 1997
Estado fisico	Sólido	FAO 1997
Punto de fusión	35-38 °C	FAO 1997
Punto de ebullición	143 °C	FAO 1997
Olor	Ingrediente activo: sin olor Grado técnico: a huevo podrido o ajo	FAO 1997
Solubilidad en agua	55-60 mg/L (25 °C)	FAO 1997
Solubilidad en disolventes orgánicos	En la mayoría: etanol, cloroformo, entre otros	WHO 1993 FAO 1997

Tabla II. Propiedades físico-químicas del dimetoato

Propiedades	Características	Referencias
Número de registro CAS	60-51-5	IPCS1988, WHO1989
Peso molecular	229.2800	WHO 1989
Color	Blanco	IPCS 1988, WHO 1989
Estado físico	Sólido	WHO 1989
Punto de fusión	45- 47 °C	FAO 2005
Punto de ebullición	117 a 0.1 mmHg	FAO 2005
Olor	Mercapto o alcanfor	WHO 1989
Solubilidad en agua	39 mg/mL	FAO 2005
Vapor de presión	1.85 x 10 ⁻⁶ mmHg (25 °C)	FAO 2005
Solubilidad en disolventes orgánicos	Muy soluble en: cloroformo, cloruro de metileno, benceno, tolueno, alcoholes, éteres y cetonas	IPCS 1988
Formulaciones	Concentrados en emulsión, polvos húmedos, gránulos y formulación para aplicación con equipo ULV (ultra-low-volume)	IPCS 1988

Tabla III. Actividad Mutagénica de Metil Paratión

Prueba	Especies	Dosis	Actividad Metabólica	Efecto	Referencia
Mutación revertante Ames	<i>S. thyphimurium</i> TA100, TA1535 TA1536-38	?	+/-	-	Simmon <i>et al.</i> 1977
	<i>S. thyphimurium</i>	?	+/-	-	Carrere <i>et al.</i> 1978
	<i>S. thyphimurium</i> TA98, TA1538	250-1250 µg/Placa	+	+	Rashid y Mumma 1984
	<i>S. thyphimurium</i> TA1535 TA100 TA1537-38	20-250 µg/Placa	+/-	+	Hebold <i>et al.</i> 1986
	<i>S. thyphimurium</i> TA100NR	50- 100 µg/mL	+/-	-	Vijayarag havan y Nagarajan 1994
	<i>S. thyphimurium</i> TA97,TA98,TA100	0.16-0.50 ppb (a y b)	+/-	+	Rehana <i>et al.</i> 1995

Tabla III. (Continuación)

	<i>S. thyphimurium</i> TA102, 100,98	O.20 ppb (a y b)	+/-	+	Rehana <i>et al.</i> 1996
	<i>S. thyphimurium</i> TA98 , TA97a , TA100 ,TA102 , TA104	1,5,10,20 y 40 μ l/placa (a) 5, 10, 20, 50 y 100 μ l/placa (b)	+/-	+	Aleem y Malik 2005
Reversión Bacteriana	<i>E. coli</i> WP2WP2UVRA	1 cristal = micro gota	-	-	Dean 1972
	<i>E. coli</i>		+/-		Rashid y Mumma 1984

Tabla III. (Continuación)

	<i>E. coli</i> K-12	20 μ L (a y b)	+/-	+	Aleem y Malik 2005
Resistencia a estreptomicina	<i>E. coli</i>	0.3mM		-	Wild 1975
Resistencia a 5- metil triptofano	<i>E. coli</i> CK-12/galK18	1x10 ⁻² M	-	+ dosis tóxica	Mohn 1973
Rompimiento Plásmido	<i>E. coli</i>	0.1 mg/mL	-	+	Griffin III y Hill 1978
Mutantes deficientes (<i>recA</i> , <i>lexA polA</i>) <i>bacteriogafo</i> λ	<i>E. coli</i> K-12 (AB1157,AB2463, AB2494, KL400, KL403)	20 μ L (a y b) 20 μ L/mL		+ +	Aleem y Malik 2005
Conversión génica (levadura)	<i>S. cerevisiae</i>	114 mM 30 horas	?	+ débil	Fahrig 1974
Mutación Alelo especifica	<i>Schizosaccharomyces</i> <i>pombe</i>	11-228 mM x 1 hora	+/-	-	Gilot- Delhalle <i>et al.</i> 1983

a = Concentrados de aguas mediante técnica de extracción con resina XAD b = Concentrados de agua mediante técnica de extracción líquido-líquido. *E. coli* = *Escherichia coli*.

Tabla IV. Actividad Mutagénica de Dimetoato

Prueba	Especie	Dosis	Actividad mutagénica	Efecto	Referencia
Mutación Revertante AMES	<i>S. thyphimurium</i> TA98 TA100 TA1535 TA1537 TA1538	5000 µg/mL	- -/+ - - -	- + - - -	Moriya <i>et al.</i> 1983
	<i>S. thyphimurium</i> TA 98, TA97a, TA100	0.41-56 ppb (a y b)	+/-	+	Rehana <i>et al.</i> 1995
	<i>S. thyphimurium</i> TA98, TA100 TA102	0.20 ppb (a y b)	+/-	+	Rehana <i>et al.</i> 1996
	<i>S. thyphimurium</i> TA98	1.7 ng/L extractos agua Río Yamura	+/-	+	Alem y Malik 2005
Reversión bacteriana	<i>E. coli</i>	1 mg	-	-	Ashwood-Smith <i>et al.</i> 1972

Tabla IV. (Continuación)

Reversión bacteriana	<i>E. coli</i> Wp2her	5000 µg/placa	+/-	+	Moriya <i>et al.</i> 1983
Resistencia 5-metilriptofano	<i>E. coli</i>	1-6x10 M	-	+	Mohn 1973
Resistencia estreptomicina	<i>E. coli</i>	30-300 mM x 4 horas	-	+	Wild 1975
Conversión génica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30-300 mM x 5 horas	-	+	Fahrig 1974
Corrimiento del marco de lectura	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1-3-131 mM x 1 horas	+/-	-	Gilot-Delhalle <i>et al.</i> 1983

E. coli –*Escherichia coli*. a- Concentrados de aguas extraídos mediante la técnica de resina –XAD. b- Concentrados de aguas utilizando el método de extracción líquido-líquido.

Tabla V. Efectos citogenéticos producidos por metil paratión en tratamiento *in vivo*.

Prueba	Especie (cepa)	Tipo Celular	Ruta	Dosis mg/kg	Resultado	Referencia
Aberraciones cromosómicas	ratón macho	a b	i.p.	10	-	Degraeve <i>et al.</i> 1984 b
		médula ósea a	i.p.	10	-	Degraeve y Moutschen 1984
	ratón macho	médula ósea a y b	oral	0.15 ppm 5 días a la semana x 7 semanas	-	Degraeve <i>et al.</i> 1984 b
	ratón macho	médula ósea a y b	i.p.	10 dos dosis + triclorfón	-	Degraeve <i>et al.</i> 1985
	ratón	médula ósea	oral	0.5/ 1 / 2 x 7 semanas	+ d.d.	Malhi y Grover 1987
	rata Wistar	médula ósea	Gar gan ta	0.25, 0.3, 0.50 6 semanas	-	Nehéz <i>et al.</i> 1994

Tabla V. (Continuación)

	rata Wistar	médula ósea	i.p.	3 5	+	Vijayaraghavan y Nagarajan 1994
	rata Wistar		oral	0.872 0.432 0.218	- + numéricas	Ündeger <i>et al.</i> 2000
	crómido verde (pez)		H ₂ O	0.05 0.1 0.2 ppm x 96 horas	+	Dass y John 1999
ICH	crómido verde (pez)		H ₂ O	0.05 0.1 0.2 ppm x 96 horas	+	Dass y John 1999
Micronúcleos	rata Wistar	eritrocitos policromá- ticos en médula ósea	oral	1.2- 4	+ d.d.	Grover y Malhi 1985
	ratón		oral	5-10	-	Herbold <i>et al.</i> 1982

Tabla V. (Continuación)

	ratón suizo		oral	9.4 ,18.9, 37.5 y 75	+ d.d.	Mathew <i>et al.</i> 1990
	rata Wistar	sangre periférica	i.p	5	+	Vijayaraghavan Nagarajan 1994
Dominantes Letales	ratón	células CRLSI	oral	20 / 40 80	-	Simmon <i>et al.</i> 1977
	ratón	fetal	i.p.	10	-	Degraeve y Moutschen 1984
	ratón	fetal	oral	0.15 ppm	-	Degraeve <i>et al.</i> 1984 b
	ratón	fetal	i.p.	10 x 2 triclorfón	-	Degraeve <i>et al.</i> 1985
Mutaciones somáticas y recombinación SMART	mosca de la fruta		oral	3, 5,7 10 ppm	+	Cakir y Sarikaya 2005

a= espermatozoides primarios. b= espermatogonia. d.d. = dosis dependiente.
ppm = partes por millón. i.p. = intra peritoneal.

Tabla VI. Efectos citogenéticos producidos por Dimetoato en tratamientos *in vivo*

Prueba	Organismo	Tipo celular	Ruta	Dosis mg/kg de peso	Efecto	Referencia
Aberraciones cromosómicas	ratón	médula	i.p.	20	-	Nehéz <i>et al.</i>
	CELP	ósea		60	+ + numéricas	1983
	ratón	médula ósea <i>a</i>	oral	0.6 ppm (x 7 semanas)	-	Degraeve <i>et al.</i> 1983
	ratón	<i>a</i>	i.p.	10 única	-	Degraeve <i>et al.</i> 1984 a
	ratón	médula ósea <i>a y b</i>	oral	0.6 ppm x 7 semanas	-	Degraeve <i>et al.</i> 1984 b
	Criceto Sirio	médula ósea	i.p.	16, 32 80 y 160	+ débil	Dzwonkowska y Hübner 1986
	ratón suizo	médula ósea	intubado	0.6 µL/Kg (10 días)	+	Hoda y Sinha 1993
	rata Wistar	médula ósea	garganta	9.3, 14.0 (x 6 semanas)	+ + numéricas	Nehéz <i>et al.</i> 1994

Tabla VI.(Continuación)

	rata Wistar	médula ósea	garganta	7.0, 9.33, 14.0 (x 6 semanas)	+ células aberrantes + numéricas	Nehéz y Dési 1996
	rata Wistar	médula ósea		0.872 0.436 0.218	- estructurales + numéricas	Ündeger <i>et al.</i> 2000
Micronúcleos	ratón	médula ósea	oral	51.7	+	Usna Rani <i>et al.</i> 1980
Dominantes letales	mosca de la fruta		en alimento	0.006%	+	Hoda y Sinha 1993
Índice mitótico	cebolla	células raíz	agua	30ppm	+	Hoda y Sinha 1993

a. = espermatocitos primarios. *b* = espermatogonia. ppm = partes por millón. i.p. = intra peritoneal.

Tabla VII. Efectos citogenéticas producidos por Metil Paratión en tratamientos *in vitro*

Prueba	Organismo	Tipo celular	$\mu\text{g/mL}$	Resultado	Referencia
Aberraciones cromosómicas	haba	raíces	0.5-2.0	+	Gómez Arroyo <i>et al.</i> 1985
	humanos	linfocitos	0.02	-	Rupa <i>et al.</i> 1990
			0.04		
			0.08		
0.16					
Humanos	linfocitos	0.08	-	Sunil Kumar <i>et al.</i> 1993	
		0.16	-		
+alcohol +fumador		0.16	+		
ICH	Criceto	V79	10-40	+	Chen <i>et al.</i> 1981
	humanos	linfoma Burkitt y linfoide		ciclo celular retardado	
	humanos	células linfoide	2-20	+	Sobti <i>et al.</i> 1982
humanos	linfoide RIMP-7191		+	Singh <i>et al.</i> 1984	
				d.d.	

Tabla VII. (Continuación)

ICH	humanos	linfocitos	4-10	+	Gómez-Arroyo <i>et al.</i> 1987
	haba	raíces	0.50-2.0	+	Gómez-Arroyo <i>et al.</i> 1988
	humanos	linfocitos	0.04 0.08 0.16	+	Rupa <i>et al.</i> 1990
Micronúcleos	critón chino	CHO		+	See <i>et al.</i> 1990
	ratas	médula ósea		+	Grover y Malhi 1985
Ensayo cometa	humanos	linfocitos periféricos	10 50 100 200 x 0.5 horas	+	Ünderger y Basaran 2005

Tabla VIII . Efectos citogenéticos producidos por Dimetoato en tratamientos *in vitro*

Prueba	organismo	Tipo celular	Actividad metabólica	DEMB $\mu\text{g/mL}$	resultado	referencia
Aberraciones cromosómicas	cebada	mitóticas y meióticas			+	Kaur y Grover 1985
ICH	criceto chino	V79	-	20	+	Chen <i>et al.</i> 1981
	humanos	linfoide LAZ	- +	2-20	+ +	Sobti <i>et al.</i> 1982
	humanos	linfocitos	-	20 -100	+	Gómez-Arroyo <i>et al.</i> 1987
	haba	raíz	-	1.0 - 2.0	+	Gómez-Arroyo <i>et al.</i> 1988
Ensayo cometa	humanos	linfocitos	-	4,6,9,10	+	Jamil <i>et al.</i> 2004
	humanos	linfocitos		10,50,100 y 200	+	Ündeger y Basaran 2005

Tabla IX . Estudios citogenéticos en personas expuestas a plaguicidas

Prueba	M P	D	otros	Tipo exposición	Tiempo exposición	Edad	Número personas	Efecto	Referencia
AC	+	+	+	fumigador	1-25	18-70	42	+	Yoder <i>et al.</i> 1973
	+	+	+	oral	aguda		31	+	Van Bao <i>et al.</i> 1974
	+			elaboración	0.02 – 7	19-49	15	-	de Cassia Stocco <i>et al.</i> 1982
	+	+	+	floricultor	10	11-78	36	+	Dulout <i>et al.</i> 1985
	+	+	+	floricultor floricultor + Ca. vejiga	ND	<50 >50	64	+	De Ferrari <i>et al.</i> 1991
		+	+	horticultor	3 días x 15 semanas	40	22	+	See <i>et al.</i> 1990
			+	productor	22.5 años		10	+	Garaj-Vrhovac y Zeljezic 2002

Tabla IX. (Continuación)

			+	fumigador agricultor	6-66 semanas	29.54	41	+	Paz-y- Miño <i>et al.</i> 2002
		+	+	fumigador agricultor	0.5-48	22-56	33	-	Costa <i>et al.</i> 2006
ICH			+	fumigador	10	11-78	36	+	Dulout <i>et al.</i> 1985
		+	+	horticultor	5-38		25	+	Rupa <i>et al.</i> 1989
	+	+	+	floricultor + Ca. vejiga	ND	<50 >50	32 32	+	De Ferrari <i>et al.</i> 1991
	+	+	+	fumigador	1-10 11-20	20-47	62	+	Rupa <i>et al.</i> 1991b
	+		+	fumigador de flor	1.5-10 años	18-61	30	+	Gómez-Arroyo <i>et al.</i> 2000
			+	productor			10	+	Zeljezic y Garaj-Vrhovac 2002
		+	+	fumigador	0.5-48 años	22-56	33	+	Costa <i>et al.</i> 2006

Tabla IX. (Continuación)

			+	suicidio accidente	aguda	0 - <23	49	+	Alptekin <i>et al.</i> 2006
Micro núcleos	+		+	fumigador de flor	1.5-10 años	18-63	30	+	Gómez-Arroyo <i>et al.</i> 2000
		+	+	fumigador agricultor	0.5-48 años	22-56	33	+	Costa <i>et al.</i> 2006
Ensayo cometa			+	productor	4-30		20	+	Garaj-Vrhovac y Zeljetic 2000
			+	productor	4-30		10	+	Garaj-Vrhovac y Zeljetic 2002
			+	productor	4-30		20	+	Zeljetic y Garaj-Vrhovac 2001

Tabla X. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos a los que se les agregaron diferentes concentraciones de metil paratión durante 24 horas

	Células con aberraciones excluyendo huecos							
	Valores individuales (%)							
	Donador	Donador	Donador	Donador	Media	Desviación	Valor	Significado
	1	2	3	4		típica	p	
concentración µg/mL								
0	2	1	1	2	1.5	0.577		
10	1	1	0	1	0.75	0.500	1.000	n.s.
20	1	1	2	2	1.5	0.577	1.000	n.s.
30	1	1	0	3	1.25	1.258	1.000	n.s.
40	4	2	2	3	2.75	0.957	0.984	n.s.
50	4	3	3	0	2.50	1.732	0.997	n.s.
75	2	2	0	4	2.00	1.633	1.000	n.s.
100	5	3	2	3	3.25	1.258	0.869	n.s.
150	3	2	1	1	1.75	0.957	1.000	n.s.
200	1	1	mc	mc	0.50	0.577	0.997	n.s.
MMC	39 ^b	36 ^b	30 ^b	34 ^b	34.75	3.775	0.000	*

mc = muerte celular. n.s. = no significativa para la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon con el ajuste para comparaciones múltiples ($p = 0.0009$).

^b = solo se analizaron 30 células debido al escaso crecimiento.

Tabla XI. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos después de agregar diferentes concentraciones de metil paratión durante 48 horas

	aberraciones excluyendo huecos				Resultados estadísticos			
	Valores individuales (%)				Media	Desviación típica	Valor de p	Significado
	Donador 1	Donador 2	Donador 3	Donador 4				
Concentración µg/mL								
0	1	2	0	0	0.75	0.957		
10	2	2	1	1	1.50	0.577	1.000	n.s.
20	2	1	2	2	1.75	0.500	1.000	n.s.
30	4	2	1	2	2.25	1.258	1.000	n.s.
40	3	4	2	2	2.75	0.957	0.984	n.s.
50	4	3	1	2	2.50	1.291	0.997	n.s.
75	2	2	1	1	1.50	0.577	1.000	n.s.
100	1	1	mc	mc	0.50	0.500	0.869	n.s.
150	1	mc	mc	mc	0.25	0.577	1.000	n.s.
MMC	24 ^b	21 ^b	20 ^b	19 ^b	21.0	2.160	0.000	*

n.s.= no significativa para la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon con el ajuste manual de comparaciones múltiples (p=0.00111). * significativo. mc = muerte celular.
^b = sólo se analizaron 30 metafases debido al escaso crecimiento

Tabla XII. Frecuencia de aberraciones cromosómicas después de aplicar diferentes concentraciones de dimetoato durante 24 horas

	Aberraciones excluyendo huecos				Datos estadísticos			
	Valores individuales (%)							
	Donador 1	Donador 2	Donador 3	Donador 4	Media	Desvia- ción típica	Valor de p	Significado
Concentración $\mu\text{g/mL}$								
0	1	1	2	2	1.5	0.577		
100	1	1	0	1	0.75	0.500	0.995	n.s.
300	1	1	0	2	1.00	0.816	1.000	n.s.
500	3	2	1	3	2.25	0.957	0.995	n.s.
600	3	2	4	2	2.75	0.957	0.873	n.s.
700	2	3	2	2	2.25	0.500	0.995	n.s.
800	2	3	3	3	2.75	0.500	0.873	n.s.
900	3	2	2	1	2.00	0.816	1.000	n.s.
1000	2	3	mc	mc	1.25	1.500	1.000	n.s.
MMC	35 ^b	32 ^b	29 ^b	34 ^b	32.5	2.646	0.000	*

MMC = mitomicina C. n.s. = no significativo para la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon ($p=0.00111$). mc = muerte celular. ^b = sólo se analizaron 30 metafases debido al escaso crecimiento.

Tabla XIII. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos a los que se les administró *in vitro* diferentes concentraciones de dimetoato durante 48 horas

Aberraciones excluyendo huecos								
Valores individuales (%)								
	Donador	Donador	Donador	Donador	Media	Desvia	Valor	Significado
	1	2	3	4		ción	p	
						típica		
Concentración								
µg/mL								
0	0	1	2	2	1.25	0.957		
100	1	1	1	0	0.75	0.500	0.999	n.s.
300	1	1	2	2	1.50	0.577	1.000	n.s.
500	3	3	2	2	2.50	0.577	0.788	n.s.
600	2	2	3	2	2.25	0.500	0.930	n.s.
700	2	3	2	2	2.25	0.500	0.930	n.s.
800	2	3	2	0	1.75	1.258	0.999	n.s.
900	3	2	m.c	mc	1.25	1.500	1.000	n.s.
MMC	23 ^b	20 ^b	19 ^b	18 ^b	20	2.160	0.000	*

n.s. = no significativo con la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon con ajuste manual ($p=0.00138$). mc = muerte celular. ^b = solo 30 células fueron analizadas debido al escaso crecimiento. * significativo $p < 0.00138$

Tabla XIV. Frecuencia de distribución por tipo de aberraciones cromosómicas y cromatídicas después de agregar las diferentes concentraciones de metil paratión durante 24 horas

	Aberraciones									Total	Número de células con aberraciones
	cromatídicas			cromosómicas				huecos			
	chtb	chte	total	chrb	chre	otras	total	chtg	chrg		
$\mu\text{g/mL}$											
0	4	0	4	2	0	0	2	1	0	6	6
10	2	0	2	1	0	0	1	2	0	3	3
20	4	0	4	2	0	0	2	1	1	6	6
30	3	0	3	2	0	0	2	0	0	5	5
40	8	0	8	3	0	0	3	0	0	11	11
50	8	0	8	2	0	0	2	1	0	10	10
75	7	0	7	1	0	0	1	0	0	8	8
100	11	0	11	2	0	0	2	0	0	13	11
150	7	0	7	0	0	0	0	0	0	7	7
200	2	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2

chtb = rompimiento cromatídico; chte = intercambio cromatídico

chrb = rompimiento cromosómico; chre = intercambio cromatídico; chtg = hueco cromatídico; chrg = hueco cromosómico

Tabla XV. Frecuencia de distribución por tipo de aberraciones posteriores al tratamiento con metil paratión durante 48 horas para los cuatro donadores.

	Aberraciones (%)									Total menos huecos	Número de células con aberraciones
	cromatídicas			cromosómicas				huecos			
	chtb	chte	total	chrb	chre	otras	total	chtg	chrg		
$\mu\text{g/mL}$											
0	2	0	2	1	0	0	1	1	0	3	3
10	3	0	3	3	0	0	3	0	0	6	6
20	5	0	5	1	1	0	2	1	0	7	7
30	5	0	5	4	0	0	4	2	1	9	9
40	8	0	8	3	0	0	3	2	0	11	11
50	7	0	7	3	0	0	3	0	0	10	10
75	5	0	5	1	0	0	1	0	0	6	6
100	1	0	1	1	0	0	1	0	0	2	2
150	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1

chtb = rompimiento cromatídico; chte = intercambio cromatídico
 chrb = rompimiento cromosómico; chre = intercambio cromosómico
 chtg = hueco cromatídico; chrg = hueco cromosómico

Tabla XVI. Incidencia de aberraciones cromosómicas y cromatídicas en cultivos de linfocitos a los que se les administró diferentes concentraciones de dimetoato durante 24 horas.

	Aberraciones (%)									Tota menos huecos	Número de células con aberraciones
	cromatídicas			cromosómicas				huecos			
	chtb	chte	total	chrb	chre	otras	total	chtg	chrg		
µg/mL											
0	3	0	3	3	0	0	3	1	0	6	5
100	2	0	2	1	0	0	1	1	1	3	3
300	2	0	2	2	0	0	2	2	0	4	4
500	5	0	5	4	0	0	4	1	0	9	9
600	6	0	6	5	0	0	5	2	0	11	11
700	5	0	5	4	0	0	4	1	0	9	9
800	7	0	7	4	0	0	4	0	0	11	10
900	6	0	6	2	0	0	2	0	0	8	8
1000	5	0	5	0	0	0	0	0	0	5	5

chtb = rompimiento cromatídico; chte = intercambio cromatídico
 chrb = rompimiento cromosómico; chre = intercambio cromatídico
 chtg = hueco cromatídico; chrg = hueco cromosómico

Tabla XVII Frecuencia de aberraciones cromosómicas por tipo en cultivos de linfocitos a los que se les administró *in vitro* diferentes concentraciones de dimetoato durante 48 horas

	Aberraciones (%)									Total menos huecos	Número de células con aberraciones
	cromatídicas			cromosómicas				huecos			
	chtb	chte	total	chrb	chre	otras	total	chtg	chrg		
µg/mL											
0	2	0	2	3	0	0	3	1	0	5	5
100	2	0	2	1	0	0	1	2	0	3	3
300	3	0	3	3	0	0	3	0	0	6	5
500	6	0	6	4	0	0	4	0	0	10	10
600	5	0	5	4	0	0	4	1	0	9	9
700	6	0	6	3	0	0	3	0	0	9	8
800	5	0	5	2	0	0	2	0	0	7	7
900	5	0	5	0	0	0	0	0	0	5	5

chtb = rompimiento cromatídico; chte = intercambio cromatídico
 chrb = rompimiento cromosómico; chre = intercambio cromatídico
 chtg = hueco cromatídico; chrg = hueco cromosómico.

Tabla XVIII. Índice mitótico después de 24 horas de tratamiento con metil paratión dado en % y resultados del análisis estadístico con la prueba de T pareada.

	Donador	Donador	Donador	Donador	Media	Desviación	Valor	Significado
	1	2	3	4		típica	p	
$\mu\text{g/mL}$								
0	9.4	8.5	5.3	8.2	7.850	1.7748		
10	9.7	9.1	4.9	7.9	7.900	2.1354	0.848	n.s.
20	10.1	8.3	6.1	7.4	7.975	1.6800	0.765	n.s.
30	8.2	7.3	4.8	6.8	6.775	1.4385	0.012	*
40	7.3	6.0	4.3	5.9	5.875	1.2285	0.010	*
50	6.1	5.4	3.8	4.3	4.900	1.0424	0.010	*
75	5.3	4.1	2.1	3.2	3.675	1.3574	0.002	*
100	3.6	2.5	1.6	1.8	2.375	0.9032	0.003	*
150	2.0	1.0	0.7	0.9	1.24	0.591	0.002	*
200	0.5	0.4	0	0	0.225	0.2630	0.002	*

n.s.= no significativa * = La diferencia de las medias es significativa para la prueba de regresión lineal con ajuste para comparaciones múltiples de Bonferroni ($p = 0.05$).

Tabla XIX. Índice mitótico (%) obtenido en los diferentes tratamientos durante 48 horas con metil paratión

	Donador	Donador	Donador	Donador	Media	Desviación típica	Significado
	1	2	3	4			
$\mu\text{g/ mL}$							
0	7.2	6.8	6.0	5.7	6.425	0.6946	
10	5.1	4.5	4.3	4.1	4.500	0.4320	*
20	4.6	3.5	3.2	2.9	3.550	0.7416	*
30	3.8	2.8	2.7	2.3	2.900	0.6377	*
40	2.5	2.1	1.9	1.6	2.025	0.3775	*
50	2.0	1.5	1.3	0.9	1.425	0.457	*
75	1.3	0.9	0.8	0.6	0.900	0.2944	*
100	0.9	0.4	0	0	0.325	0.4272	*
150	0.5	0	0	0	0.125	0.2500	*

* = significativa para la prueba de regresión lineal con ajuste automático para comparaciones múltiples de Bonferroni ($p = 0.05$), al comparar con el grupo de testigos.

Tabla XX. Índice mitótico en los tratamientos con dimetoato durante 24 horas

	Donador 1	Donador 2	Donador 3	Donador 4	Media	Desviación típica	Significado
Concentraciones $\mu\text{g/mL}$							
0	10.8	7.8	8.7	10.9	9.5375	1.53263	
100	11.3	9.1	8.3	10.5	9.800	1.3515	n.s.
300	10.3	8.0	7.9	9.5	8.9125	1.15353	n.s.
500	8.6	5.3	8.1	8.3	7.5625	1.51953	n.s.
600	6.4	4.8	7.8	7.6	6.6375	1.38286	*
700	6.2	4.5	6.7	5.9	5.825	0.9430	*
800	5.2	3.3	4.3	4.1	4.225	0.7805	*
900	3.1	2.6	3.2	2.5	2.850	0.3512	*
1000	1.1	0.9	0	0	0.500	0.5831	*

* = significativa para la prueba de regresión lineal con ajuste automático para comparaciones múltiples de Bonferroni ($p = 0.05$), al comparar con el grupo de testigos.

n.s. = no significativa .

Tabla XXI. Índice mitótico posterior al tratamiento durante 48 horas con dimetoato

	Donador 1	Donador 2	Donador 3	Donador 4	Media	Desviación típica	Significado
Concentraciones $\mu\text{g/mL}$							
0	7.2	6.5	6.4	5.9	6.500	0.5354	
100	6.9	5.4	4.5	4.2	5.250	1.2124	n.s.
300	5.3	4.2	4.7	3.8	4.500	0.6481	*
500	4.8	4.3	4.1	3.5	4.175	0.5377	*
600	4.6	3.7	3.5	2.9	3.675	0.7042	*
700	3.7	2.3	2.0	1.6	2.400	0.9129	*
800	1.5	1.9	0.8	0	0.925	0.6898	*
900	0.7	0.6	0	0	0.325	0.3775	*

n.s. = no significativa. * = significativa para la prueba de regresión lineal con ajuste automático para comparaciones múltiples de Bonferroni ($p = 0.05$), al comparar con el grupo de testigos.

Tabla XXII. Comparación entre el % del índice mitótico de 24 y 48 horas de tratamientos con metil paratió. n.

	Donadores				Valores estadísticos	
	1	2	3	4	Valor de p	Significancia
Concentración mg/mL						
mp 24 0	9,4	8,5	5,3	8,2	0.182	n.s.
mp 48 0	7.2	6,8	6	5,7		
mp 24 10	9,7	9,1	4,9	7,9	0.060	n.s.
mp 48 10	5.1	4,5	4,3	4,1		
mp 24 20	10,1	8,3	6,1	7,4	0.006	*
mp 48 20	4.6	3,5	3,2	2,9		
mp 24 30	8,2	7,3	4,8	6,8	0.030	*
mp 48 30	3.8	2,8	2,7	2,3		
mp 24 40	7,3	6	4,3	5,9	0.021	*
mp 48 40	2.5	2,1	1,9	1,6		
mp 24 50	6,1	5,4	3,8	4,3	0.008	*
mp 48 50	2.0	1,5	1,3	0,9		
mp 24 75	5,3	4,1	2,1	3,2	0.011	*
mp 48 75	1.3	0,9	0,8	0,6		
mp 24 100	3,6	2,5	1,6	1,8	0.000	*
mp 48 100	0.9	0,4	0	0		
mp 24 150	2	1,4	0,7	0,85	0.007	*
mp 48 150	0.5	0	0	0		

mp = metil paratió. n.s. = no significativa. *= significativa para la prueba de regresión lineal con ajuste automático de Bonferroni ($p = 0.05$).

Tabla XXIII. Resultados del análisis estadístico al comparar los índices mitóticos obtenidos a 24 y 48 horas con los diferentes tratamientos de dimetoato

	Donadores				Valores estadísticos	
	1	2	3	4	Valor de p	Significado
Concentración mg/mL						
24horas-0	10,8	7,8	8,7	10,9	0.32	n.s.
48horas-0	7,2	6,5	6,4	5,9		
24horas-100	11,3	9,1	8,3	10,5	0.005	*
48horas-100	6,9	5,4	4,5	4,2		
24horas-300	10,3	8	7,9	9,5	0.004	*
48horas-300	5,3	4,2	4,7	3,8		
24horas-500	8,6	5,3	8,1	8,3	0.026	*
48horas-500	4,8	4,3	4,1	3,5		
24horas-600	6,4	4,8	7,8	7,6	0.045	*
48horas-600	4,6	3,7	3,5	2,9		
24horas-700	6,2	4,5	6,7	5,9	0.012	*
48horas-700	3,7	2,3	2	1,6		
24horas-800	5,2	3,3	4,3	4,1	0.006	*
48horas-800	1,5	1,4	0,8	0		
24horas-900	3,1	2,6	3,2	2,5	0.002	*
48horas-900	0,7	0,6	0	0		

n.s. = no significativa. * = significativo con ajuste de Bonferroni ($p = 0.05$).

REFERENCIAS

- Abu-Qare A.W., Abdel-Rahman A.A., Kishk A.M. y Abou-Donia M.B. (2000). Placental transfer and pharmacokinetics of a single dermal dose of [¹⁴C] methyl parathion in rats. *Toxicol. Sci.* 53, 5-12.
- Aleem A. y Malik A. (2005). Genotoxicity of the Yamuna River water at Okhla (Delhi), India. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 404-412.
- Alluwaimi A. M. y Hussien Y. y Abu El zein E.M. (1999). Levels of inteleukin-2 and inteleukin-4 markers for dimethoate immunotoxicity in mice. *Alex. J. Vet. Sci.* 703-707.
- Alptekin D., Lüleyap H.U., Yilmaz L., Demirhindi H., Gokel Y., Pazarbasi A., Dokur M., Kasap M. y Kasap H. (2006). The sister-chromatid exchange and acetylcholine esterase enzyme levels among patients with insecticide intoxication in the Cukurova region, Turkey. *Acta Med. Okayama* 60, 121-126.
- Ashwood-Smith M.J., Treviño J. y Ring R. (1972). Mutagenicity of dichlorvos. *Nature* 24, 418-449.
- ATSDR (Agency for Toxic Substance and Disease Registry. Toxicological). (2004). Toxicological profile information sheet. Atlanta EUA. Disponible en: [<http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.htmj>]. Consultado 16 enero 2007.

- Au W.W., Sierra-Torres C.H., Cajas-Sazar N., Shipp B.K. y Legator M.S. (1999). Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environ. Health Perspect.* 107, 501-505.
- Baker R.D. y Applegate H.G. (1970). Effect of temperature and ultraviolet radiation on the persistence of methyl parathion and DDT in soils. *Agron. J.* 62, 509-512.
- Barr D.B., Turner W.E., Di Pietro E., McClure P.C., Baker S.E., Barr J.R., Gehle K., Grissom R.E., Bravo R., Driskell W.J., Patterson D.G., Hill R.H., Needham L.L., Pirkle J.L. y Sampson E.J. (2002). Measurement of p-nitrophenol in the urine of residents whose homes were contaminated with methyl parathion. *Environ. Health Perspect.* 110, 1085-1091.
- Bhalli J.A., Khan Q.M. y Nasim A. (2006). DNA damage in Pakistani pesticide-manufacturing workers assayed using the comet assay. *Environ Mol. Mutagen.* 47, 587-593.
- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543, 251-272.
- Brown S.K., Ames R.G. y Mengle D.C. (1989). Occupational illnesses from cholinesterase-inhibiting pesticides among agricultural applicators in California, 1982-1985. *Arch. Environ. Health* 44, 34-39.

- Cakir S. y Sarikaya R. (2005). Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. *Food Chem. Toxicol.* 43, 443-450.
- Carere A., Ortavli V.A., Cardamone G. y Morpugo G. (1978). Mutagenicity of dichlorvos and other structurally related pesticides in *Salmonella* and *Streptomyces*. *Chem. Biol. Interact.* 2, 297-308.
- Castillo-Cadena J., Tenorio-Vieyra L.E., Quintana-Carabia A.I., García-Fabila M.M., Ramírez-San Juan E. y Madrigal-Bujaidar E. (2006). Determination of DNA damage in floriculturists exposed to mixtures of pesticides. *J. Biomed. Biotechnol.* Artículo I.D. 2006, 97896. Consultado 2 mayo 2007.
- Chen H.H., Hsueh J.L., Sirianni S.R. y Huang C.C. (1981). Induction of sister-chromatid exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cell treated with eight organophosphorus pesticides. *Mutat. Res.* 8, 307-316.
- Cimino M. (2006). Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purpose. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 362-390.
- Clark J.M., Bing-Canar J., Renninger S., Dollhop R., El-Zein J., Star D., Zimmerman D., Anisuzzaman A., Boylan K., Tomaszewski T., Pearce K., Yacovac R., Erlwein B. y Ward J., (2002). Methyl parathion in residential properties: relocation and decontamination methodology. *Environ. Health Perspect.* 110, 1061-1070.

- Clouston J.H. (2001). Lymphocyte culture. En: *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis. A practical Approach*. (D. E. Rooney Ed). Oxford University Press, Nueva York, cap. 2, pp. 33-54.
- Colosio C., Birindelli S., Corsini E., Galli C.I. y Maroni M. (2005). Low level to chemicals and immune system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 320-328.
- Costa C., Teixeira J.P., Silva S., Roma-Torres J., Coelho P., Gaspar J., Alves M., Laffon B., Rueff J. y Mayan O. (2006). Cytogenetic and molecular biomonitoring of Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis* 21, 343-350.
- Cox R.D., Kolb J.C., Galli R.L., Carlton F.R. y Cook A.M. (2005). Evaluation of potential adverse health effects resulting from chronic domestic exposure to the organophosphate insecticide methyl parathion. *Clin. Toxicol.* 43, 243-253.
- Cox C. y Sorgan M. (2006). Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ. Health Perspect.* 114, 1803-1806.
- D' Arce J. y Colus I. (2000). Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 20, 161-170.

- Das P. y John G. (1999). Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations *in vivo* in *Etropplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicol. Lett.* 104,111-116.
- de Cassia Stocco R., Becak W., Gaeta R. y Rabello-Gay M.N. (1982). Cytogenetic study of workers exposed to methyl-parathion. *Mutat. Res.* 103, 71-76.
- De Ferrari M., Artuso M., Bonassi S., Bonatti S., Cavalieri Z., Pescatore D., Marchini E., Pisano V. y Abbondandolo A. (1991). Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister chromatid exchange analysis in peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 260, 105-113.
- Dean B.J. (1972). The mutagenic effects of organophosphorus pesticides on microorganism. *Arch. Toxicol.* 2, 67-74.
- Dearfield K.L., Auletta A.E., Cimino M.C. y Moore M.N. (1991). Considerations in the U.S. Environmental protection Agency 's testing approach for mutagenicity. *Mutat. Res.* 330, 71-99.
- Degraeve N. y Moutschen J. (1983). Genotoxicity of an organophosphorus insecticide, dimethoate, in the mouse. *Mutat. Res.* 119, 331-337.

- Degraeve N. y Moutschen J. (1984). Absence of genetic and cytogenetic effects in mice treated by organophosphorus insecticides parathion, its methyl analogue and paraoxon. *Toxicology* 32, 177-183.
- Degraeve N., Chollet M.C. y Moutschen J. (1984a). Cytogenetic effects induced by organophosphorus pesticides in mouse spermatocytes. *Toxicol. Lett.* 21, 315-319.
- Degraeve N., Chollet M.C., Moutschen J. (1984b). Cytogenetic and genetic effects of subchronic treatments with organophosphorus insecticides. *Arch. Toxicol.* 56, 66-70.
- Degraeve N., Chollet M.C., Moutschen J. (1985). Mutagenic efficiency of organophosphorus insecticides used in combined treatments. *Environ. Health Perspect.* 60, 395-398.
- Dési I., Nehéz M., Soroki O. y Naqymajtenyi L. (2000). Small subchronic dose of the pesticide dimethoate and/or cadmium and lead treatment cause disturbances in the chromosomes of young rats. *Cent. Eur. J. Public Health* 8, 59-60.
- Dulout F.N., Pastori M.C., Olivero O.A., González Cid M., Loria D., Matos E., Sobel N., de Brujan E.C. y Albiano N. (1985). Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 143, 237-244.
- Dyro M.F. (2005). Organophosphates. eMedicine. Actualizado 9 agosto 2005. Disponible en: [<http://www.emedicine.com/neuro/topic286.htm>]. Consultado 8 enero 2007.

- Dzwonkowska A. y Hübner H. (1986). Induction of chromosomal aberrations in the syriam hamster by insecticides tested *in vivo*. *Arch. Toxicol.* 58, 152-156.
- Eddleston M., Karalliedde L., Buckley N., Fernando R., Hutchinson G., Konradsen F., Murray D., Piola J.C., Senanayake N., Sheriff R., Singh S., Siwach S.B. y Smit L. (2002). Addressing pesticide poisoning in the developing world-A minimum pesticides list. *Lancet* 360, 1163-1167.
- Eddleston M., Eyer P., Worker F., Mohamed F., Senarathna L., von Meyer L., Juszczak E., Hittarage A., Azhnar S., Dissanayake W., Sheriff M.H., Szinicz L., Dawson A.H. y Buckley N.A. (2005). Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. *Lancet* 366, 1452-1459.
- Edwards L.F. y Tchounwou B.P. (2005). Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure -A scientific review. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 2, 430-441.
- EFSA (European Food Safety Authority)(2006). Conclusion regarding the peer review of dimethoate. Scientific Report, EFSA 84, 1-102.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency)(1996). OPPTS 870.5375 *In vitro* mammalian cytogenetics. Health effects test guideline. Disponible en: [www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Drafts/870-5375]. Consultado 7 enero 2007.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency)(1998). Health Effects Test Guidelines: OPPTS 870.7800. Immunotoxicity. Disponible en: [www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Drafts/7800]. Consultado 30 septiembre 2007.

Esteban E., Rubin C., Hill R., Olson D. y Pearce K. (1996). Association between indoor residential contamination with methyl parathion and urinary para-nitrophenol. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 6, 375-387.

Fahrig R. (1974). Comparative mutagenicity studies with pesticides. *IARC Sci. Publ.* 10, 161-181.

FAO (Food Agriculture Organization). (1997). Decision guidance documents: Methyl parathion. Food Agriculture Organization, Roma, pp. 1-13.

FAO (Food Agriculture Organization). (2005). Specifications and evaluations for agricultural pesticides: dimethoate O,O-dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate.

Food Agriculture Organization (FAO), Roma, pp.1-27. Disponible en: [http://www.fao.org/ag/agp/agpp/pesticid/]. Consultado 13 agosto 2006.

Farag A.T., Karkour T.A. y El Okazy A. (2006). Developmental toxicity of orally administered technical dimethoate in rat. *Birth Defects. Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 77, 40-46.

Ferrando M.D., Alarcon V., Fernández. Casalderrey A., Gamon M. y Andreu-Moliner E. (1992). Persistence of some pesticides in the aquatic environment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 747-755.

Fonseka M.M., Medagoda K., Tillakaratna Y., Gunatilake S.B. y de Silva H.J. (2003). Self-limiting cerebellar ataxia following organophosphate poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 107-109.

Garaj-Vrhovac V. y Zeljezic D. (2000). Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutat. Res.* 469, 279-285.

Garaj-Vrhovac V. y Zeljezic D. (2001). Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicol.* 28, 153-162.

- Garaj-Vrhovac V. y Zeljezic D. (2002). Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. *Appl. Toxicol.* 22, 249-255.
- Garry V.F., Griffith J., Danzel T.J., Nelson R.L. , Whornton E.B., Krueger L.A. y Cervenka J. (1989). Human genotoxicity: pesticide applicators and phosphine. *Sci.* 246, 251-255.
- Garry V.F, Danzl T.J, Tarone R., Griffith J., Cervenka J., Krueger L., Whornton E.B. y Nelson R.L. (1992). Chromosome rearrangements in fumigant applicators: possible relationship to non-Hodgkin's lymphoma risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1, 287-291.
- Garry V.F, Taraone R.E., Long L., Griffith J., Kelly J.T. y Burroughs B. (1996). Pesticide applicators with mixed pesticide exposure: G-banded analysis and possible relationship to non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5, 11-16.
- Gilot-Delhalle J., Colizzi A., Moutschen J. y Moutschen-Dhamen M. (1983). Mutagenicity of some organophosphorus compounds at the *ade 6* locus of *Schizosaccharomyces phombe*. *Mutat. Res.* 117, 139-148.
- Goh K.T., Yew F.S., Ong H.K. y Tan K.I. (1990). Acute organophosphorus food poisoning caused by contaminated green leafy vegetables. *Arch. Environ. Health* 45, 180-184.

- Gómez-Arroyo S., Baíza A. M., López G. y Villalobos-Pietrini R. (1985). A comparative study of the cytogenetic effects of the insecticides heptachlor, malathion, and methyl parathion in *Vicia faba*. *Contam. Ambient.* 1, 7-16.
- Gómez-Arroyo S., Noriega Aldana N., Juárez Rodríguez D. y Villalobos-Pietrini R. (1987). Sister-chromatid exchange induced by the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, phoxim and methyl azinphos in cultured human lymphocytes. *Contam. Ambient.* 3, 67-70.
- Gómez-Arroyo S., Castillo Ruiz P., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini R. (1988). *Vicia faba*-Sister chromatid exchanges of the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, oxydemeton methyl, azinphos methyl and phoxim. *Cytologia* 53, 627-634.
- Gómez-Arroyo S., Díaz Sánchez Y., Meneses-Pérez M. A., Villalobos-Pietrini R. y De León Rodríguez J. (2000). Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 466, 117-124.
- Griffin III D. E. y Hill W.E. (1978). *In vitro* breakage of plasmid DNA by mutagens and pesticides. *Mutat. Res.* 52, 161-169.
- Grover I.S. y Malhi P.K. (1985). Genetoxic effects of some organophosphorus pesticides. I. Induction of micronuclei in bone marrow cells in rats. *Mutat. Res.* 155, 131-134.

- Hagar H.H., Azza H. A.y Fahmy H. (2002). A biochemical, histochemical and ultrastructural evaluation of the effect of dimethoate intoxication on rat pancreas. *Toxicol. Lett.* 133, 161-170.
- Hannig S., del Valle M., Aspillaga M., Sánchez I., Cerda M. y Peña S. (1987). Intoxicación grave por insecticidas organofosforados en niños. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 44, 265-269.
- Herbold B. (1986). [E 120, C.N. methyl parathion *Salmonella* microsome test to evaluate for point mutagenic effect.] Wuppertal-Elberfeld, Bayer A.G. Institute of Toxicology (Unpublished report n155306, submitted to WHO by Bayer A.G Leverkusen Germany. En WHO ECH 145 . Methyl Parathion 1992).
- Hoda Q. y Sinha S.P. (1993). Vitamin C-mediated minimisation of Rogor-induced genotoxicity. *Mutat. Res.* 299, 29-36.
- Huang C.C. (1973). Effect on growth but not on chromosomes of the mammalian cells after treatment with three organophosphorus insecticides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142, 36-40.
- Igbedioh S.O. (1991). Effects of agricultural pesticides on humans, animals, and higher plants in developing countries. *Arch. Environ. Health* 46, 218-224.

- Institóris L., Siroki O. y Dési I. (1995). Immunotoxicity study of repeated small doses of dimethoate and methylparathion administered to rats over three generations. *Hum. Exp. Toxicol.* 14, 879-883.
- IPCS (International Programme of Chemical Safety) (1988). Health and Safety Guide No. 20, Dimethoate Health and Safety Guide. INCHEM. pp.1-12. Disponible en: [<http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg020.htm>]. Consultado 12 enero 2007.
- ISCN (1985). International System for Human Cytogenetic Nomenclature (D.G Harnden y H.P. Klinger, Eds.), S. Karger, Basilea, Suiza. pp. 66-69.
- ISCN (1995). International System for Human Cytogenetic Nomenclature (F. Mitelman, Ed), S. Karger, Basilea, Suiza. pp. 75-78.
- ISCN (2005). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. (L.G. Shaffer y N. Tommerup, Eds.), S. Karger, Basilea, Suiza.
- Jaga K. y Dharmani C. (2006). Methyl parathion: an organophosphate insecticide not quite forgotten. *Rev. Environ. Health* 21, 57-67.
- Jamil K., Shaik A.P., Mahboob M. y Krishna D. (2004). Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chlorpyriphos, dimethoate and endosulfan) on human lymphocytes *in vitro*. *Drug Chem. Toxicol.* 27, 133-144.

Jirachaiyabhas V., Visuthismajarn P., Hore P. y Robson M.G. (2004). Organophosphate pesticide exposure of traditional and integrated pest management farmers from working air conditions: a case study in Thailand. *Int. J. Occup. Environ. Health* 10, 289-295.

Joksic G., Vidakovic A. y Spasojevic-Tisma V. (1997). Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. *Environ. Res.* 75, 113-118.

Jirachaiyabhas V., Visuthismajarn P., Hore P. y Robson M.G. (2004). Organophosphate pesticide exposure of traditional and integrated pest management farmers from working air conditions: a case study in Thailand. *Int. J. Occup. Environ. Health* 10, 289-295.

Joksic G., Vidakovic A. y Spasojevic-Tisma V. (1997). Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. *Environ. Res.* 75, 113-118.

Jonasson J.A. (1986). Analysis and interpretation of human chromosome. Preparation. En: *Human Cytogenetics a practical approach*. (D.E. Rooney y B.H. Czepulkowsky, Eds.), IRL Press, Oxford, Washington D. C.

Kamel F. y Hoppin J.A. (2004). Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environ. Health Perspec.* 112, 950-958.

- Kaur P. y Grover I.S. (1985a). Cytological effects of some organophosphorus pesticides I. Mitotic effects. *Cytologia* 50, 187-197.
- Kaur P. y Grover I.S. (1985b). Cytological effects of some organophosphorus pesticides II. Meiotic effects. *Cytologia* 50, 199-211.
- Kido H., Bailey J.B., McCalley N.F., Yates W.E. y Cowden R.E. (1975). The effect of overhead sprinkler irrigation on methyl parathion residue on grape leaves. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 209-213.
- Kirkland D.J. (1993) Genetic toxicology testing requirements: official and unofficial views from Europe. *Environ. Mol. Mutagen.* 21, 8-14.
- Kolbe A., Bernasch A., Stock M., Schutte H.R. y Dedek W. (1991). Persistence of the insecticide dimethoate in three different soils under laboratory conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 492-498.
- Kourakis A., Mouratidou M., Kokkinos G., Barbouti A., Kotsis A., Kotsis A., Mourelatos D. y Dozi-Vassiliades J. (1992). Frequencies of chromosomal aberrations in pesticides sprayers working in plastic green house. *Mutat. Res.* 279, 145-148.

- Landrigan P. J., Claudio L., Markowitz S.B., Berkowitz G.S., Brenner B.L., Romero H., Wetmur J.G., Matte T.D., Gore A.C., Godbold J.H. y Wolfm S. (1999). Pesticides and inner-city children: exposure, risks and prevention. *Environ. Health Perspect.* 107, 431-437.
- Li Q. (2007). New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. *J. Nippon Med. Sch.* 74, 92-105.
- Lima A. y Vega L. (2005). Metil-parathion and organophosphorus pesticide metabolites modify the activation status and interleukin-2 secretion of human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Letters.* 158, 30-38.
- Lino C.M. y da Silveira M.I. (1992). Organophosphorus pesticide residues in cow's milk: levels of cis-mevinfos, methyl parathion, and paraoxon. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 211-216.
- López-Carrillo L. y López-Cervantes M. (1993). Effect of exposure to organophosphate pesticides on serum cholinesterase levels. *Arch. Environ. Health* 48, 359-362.
- Malhi P.K. y Grover I.S. (1987). Genotoxic effects of some organophosphorus pesticides. II. *In vivo* chromosomal aberration bioassay in bone marrow cells in rat. *Mutat. Res.* 188, 45-51.

Mamuris Z., Aurias A. y Dutrillaux B. (1998). Identification of a break-phrase structure in the 9q1 heterochromatic region. *Hum. Genet.* 86, 261-264.

Mateuca R., Lombaert N., Aka P.V., Decordier I. y Kirsh-Volders M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection, methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.* 88, 1515-1531.

Mathew G., Rahiman M.A. y Vijayalaxmi K.K. (1990). *In Vivo* genotoxic effects in mice metacid 50, an organophosphorus insecticide. *Mutagenesis* 5, 147-149.

Michotte A., Van Dijck I., Maes V. y D' Haenen H. (1989). Ataxia as the only delayed neurotoxic manifestation of organophosphate insecticide poisoning. *Eur. Neurol.* 29, 23-26.

Mohammed K.B. y Ma T.H. (1999). Tradescantia-micronucleus and –stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. *Mutat. Res.* 426, 193-199.

Mohn G. (1973). Mutagenic activity of monofunctional alkylating agents including organophosphorus insecticides. *Mutat. Res.* 20, 7-15.

- Moorthy P., Gopinandhan T.N., Santhanam R., Balakumar T. y Anbudurai P.R. (1992). Phytotoxicity of methyl parathion with special reference to photosynthesis in wheat seedlings. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 138-143.
- Morgan P. D., Hetzler L.H., Slach F.E. y Lino I.L. (1997). Urinary excretion of paranitrophenol and alkyl phosphates following ingestion of methyl or ethyl parathion by human subjects. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 6, 159-173.
- Moriya M., Ohta T., Watanabe K., Miyazawa T., Kato K. y Shirasu Y. (1983). Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. *Mutat. Res.* 116, 185-216.
- Moutschen-Dahmen J. y M. y Degraeve N. (1984). Mutagenicity, Carcinogenicity, and Teratogenicity of Insecticides. En: *Carcinogenicity and Teratogenicity of Industrial Pollutants*. (M. Kirsch- Volders, Ed.) Plenum Press, Nueva York, pp. 127-203.
- Musio A. y Sbrana I. (1997). Aphidicolin-sensitive specific common fragile sites: a biomarker of exposure to pesticides. *Environ Mol Mutagen.* 29, 250-255
- Mutchinick O., Ruz L. y Casas L.(1981). Time of first-generation metaphases. I. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 72, 127-134.

- Nehéz M., Selypes A., Scheufler H. y Fischer G.W. (1983). Effect of dimethoate and O-demethyldimethoate on bone marrow cells of CFLP mice. *Regul. Toxicol. and Pharmacol.* 3, 349-354.
- Nehéz M., Tóth C.S. y Dési I. (1994). The effect of dimethoate, dichlorvos, and parathion-methyl on bone marrow cell chromosomes of rats in subchronic experiments *in vivo*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29, 365-371.
- Nehéz M. y Dési I. (1996). The effect of dimethoate on bone marrow cell chromosomes of rats in subchronic four- generation experimets. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 103-109.
- Nordic Study Group. (1990). The health risk of chromosome damage: a Nordic database on somatic chromosome damage in humans. *Mutat. Res.* 241, 325-337.
- Norppa H., Bonassi S., Hansteen I.L., Hagmar L., Stromberg U., Rossner P., Boffetta P., Lindholm C., Gundy S., Lazutka J., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Sram R.J. Knudsen L.E., Barale R. y Fucic A. (2006). Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat. Res.* 600, 37-45.
- OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (1997). Guideline for the testing of chemicals No.473. In vitro mammalian chromosome aberration test. Disponible en: [www.oecd.org/dataoecd/18/33/1948434.pdf]. Consultado 10 enero 2007.

- Oller I., Gemjak W., Maldonado M.I., Pérez-Estrada L.A., Sánchez- Pérez J.A. y Malato S. (2006). Solar photocatalytic degradation of some hazardous water-soluble pesticides at pilot-plant scale. *J. Hazard Mater.* 138, 507-517.
- Orme S. y Kegley S. (2006). An Overview of the PAN Pesticide Chemical Database, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA.). *California Agriculture* 54, 14-19. Disponible en: [<http://www.pesticideinfo.org>]. Consultado 10 enero 2007.
- Pastor S, Creus A., Xamena N., Siffel C. y Marcos R. (2002). Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 40, 101-109.
- Paz-y-Miño C., Bustamante G., Sánchez M.E. y Leone P.E. (2002). Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environ. Health Perspect.* 110, 1077-1080.
- Piña-Guzmán B., Solís-Heredia M.J., Rojas-García A.E., Urióstegui-Acosta M. y Quintanilla-Vega B. (2006). Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse espermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 216-224.

Prieur M., Al Achkar W., Aurias A., Couturier J., Dutrillaux A.M., Dutrillaux B., Flüry-Herard A., Gerbault-Seureau M., Hoffschir F., Lamoliatte E., Lefrançois D., Lombard M., Muleris M., Ricoul M., Sabatier L. y Viegas-Péquignot E. (1988). Acquired chromosome rearrangements in human lymphocytes: effect of aging. *Hum. Genet.* 79, 147-150.

Ramana Y.V., Pandey A.K. y Singh S. (1992). Dimethoate toxicity to gestational embryonic ovary of a live bearing fish, *Lebistes reticulatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 907-913.

Rashid K.A. y Mumma R.O. (1984). Genotoxicity of methyl parathion in short-term bacterial test systems. *J. Environ. Sci. Health B.* 19, 565-577.

Rehana Z., Malik A. y Ahmad M. (1995). Mutagenic activity of the Ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj (U.P.), *India*. *Mutat. Res.* 343, 137-144.

Rehana Z., Malik A. y Ahmad M. (1996). Genotoxicity of the Ganges water at Narora (U.P.), *India*. *Mutat. Res.* 367, 187-193.

- Richardson C.R, Howard C.A., Sheldon T., Wildgoose J. y Thomas M.G. (1984). The human lymphocyte *in vitro* cytogenetic assay: positive and negative control observations on approximately 30000 cells. *Mutat. Res.* 141, 59-64.
- Rojas E., Montero R., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt M.E., Rodríguez R. y Ostrosky-Wegman P. (1992). Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? *Mutat. Res.* 282, 283-286.
- Rosenthal E. (2003). The tragedy of Taucamarca: a human rights perspective on the pesticide poisoning deaths of 24 children in the Peruvian Andes. *Int. J. Occup. Environ. Health* 9, 53-58.
- Rupa D.S., Reddy P.P. y Reddi O.S. (1989a). Analysis of sister-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticide sprayers. *Mutat Res.* 223, 253-258.
- Rupa D.S., Reddy P.P. y Reddi O.S. (1989b). Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of cotton field workers exposed to pesticides. *Environ Res.* 49, 1-6.
- Rupa D.S., Reddy P.P. y Reddi O.S. (1990). Cytogeneticity of quinaphos and methyl parathion in human peripheral lymphocytes. *Human Exp. Toxicol.* 9, 385-387.
- Rupa D.S., Reddy P.P. y Reddi O.S. (1991a). Clastogenic effect of pesticides in peripheral lymphocytes of cotton-field workers. *Mutat. Res.* 261, 177-180.

- Rupa D.S., Reddy P.P., Sreemannarayana K. y Reddi O.S. (1991b). Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. *Environ. Mol. Mutagen.* 18, 136-138.
- Sailaja N., Chandrasekhar M., Rekhadevi P.V., Mahboob M., Rahman M.F., Vuyyuri S.B., Danadevi K., Hussain S.A. y Grover P. (2006). Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat. Res.* 609, 74-80.
- Savage J. R. (1976). Clasification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 13, 103-122.
- Savage J. R. (1977). Application of chromosome banding techniques to the study of primary chromosome structural changes. *J. Med. Genet.* 14, 362-370.
- Savage J. R. (2004). On the nature of visible chromosomal gaps and breaks. *Cytogenet Genome Res.* 104, 46-55.
- Sbrana I. y Musio A. (1995). Enhanced expression of common fragile site with occupational exposure to pesticides. *Cancer Genet. Cytogenet.* 82, 123-127.

Sbrana I., Zavattari P., Barale R. y Musio A. (1998). Common fragile sites on human chromosomes represent transcriptionally active regions: evidence from camptothecin. *Hum. Genet.* 102, 409-414.

Scarpato R., Hirvonen A., Migliore L., Falck G. y Norppa H. (1997). Influence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes of smokers and pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat. Res.* 389, 227-235.

See R.H., Dunn B.P. y San R.H.C. (1990). Clastogenic activity in urine of workers occupationally exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 241, 251-259.

Simmon V.F., Mitchell A.D. y Jorgenson T.A. (1977). Evaluation of selected pesticides as chemical mutagens *in vitro* and *in vivo* studies. Mento Park California, Standford Research Institute En: *WHO Environmental Health Criteria 145. Methyl parathion.* World Health Organization. Ginebra, Suiza 1993, pp. 201.

Singh S., Lehmann-Grube B. y Goedde H.W. (1984). Cytogenetic effects of paraoxon and methyl-parathion on cultured human lymphocytes: SCE, clastogenic activity and cell cycle delay. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 54, 195-200.

- Singh B., Dogra T.D. y Tripathi C.B. (2002). A study of serum cholinesterase activity in agricultural and industrial workers occupationally exposed to organophosphates insecticides. *Int. J. Med. Toxicol.* 5, 2-9.
- Singh M., Sandhir R. y Kiran R. (2006). Erythrocyte antioxidant enzymes in toxicological evaluation of commonly used organophosphates pesticides. *Indian J. Exp. Biol.* 44, 580-583.
- Slapper D. (1999). Toxicity, organophosphate and carbamate. eMedicine. Actualizado 24 diciembre 1999. Disponible en: [<http://members.aol.com/DonationDrive/organophostoxemedicine.html>]. Consultado 15 enero 2007.
- Sobti R.C., Krishan A. y Pfaffenberger C.D. (1982). Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells in vitro: organophosphates. *Mutat. Res.* 102, 89-102.
- Sunil Kumar K.B., Ankathil R. y Devi K.S. (1993). Chromosomal aberrations induced by methyl parathion in human peripheral lymphocytes of alcoholics and smokers. *Human. Exp. Toxicol.* 12, 285-288.

- Tarkowski M., Lutz W. y Birindelli S. (2004). The lymphocytic cholinergic system and its modulation by organophosphorus pesticides. *Int. J. Occup. Med. Environ Health.* 17, 325-337.
- Tawn E.J. y Holdsworth D. (1992). Mutagen-induced chromosome damage in human lymphocytes. En: *Human Cytogenetics A practical Approach. Malignancy and Acquired Abnormalities.* (D. E. Rooney y B.H. Czepulkowski, Eds.), IRL Press, Oxford. Vol. II, Cap 7, pp.189-208.
- Tawn E.J. y Whitehouse C.A. (2001) *In vivo* mutagen-induced chromosome damage in human lymphocytes. En: *Human Cytogenetics A practical Approach. Malignancy and Acquired Abnormalities.* (D.E.Rooney, Ed.), IRL Press, Oxford, Vol. II, Cap 8, pp. 210-211.
- Titenko-Holland N., Windham G., Kolachana P., Reinisch F., Parvatham S., Osorio A.M. y Smith M.T. (1997). Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutat. Res.* 388, 85-95.
- Ündeger Ü., Institóris L., Siroki O., Nehéz M. y Dési I. (2000). Simultaneous geno-and immunotoxicological investigations for early detection of organophosphate toxicity in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 43-48.

Ündeger Ü. y Basaran N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage. *Arch. Toxicol.* 79, 169-176.

UNEP/FAO (United Nations Environment Programme/ Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2005). Rotterdam Convention on the Prior Informed Consent Procedure for Certain Hazardous Chemicals and Pesticides in International Trade Chemical Review Committee. *Methyl Parathion: supporting documentation from Brazil*. UNEP/FAO. Ginebra, Suiza. pp.11-18.

Usna Rani M.V., Reddy O.S. y Reddi P.P. (1980) Mutagenicity studies involving aldrin, endosulfan, dimethoate, phosphamidon, carbaryl and ceresan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 277-282.

Van Bao T., Szabo I., Ruzicska P. y Czeizel A. (1974). Chromosome aberrations in patients suffering acute organic phosphate insecticide intoxication. *Humangenetik* 24, 33-57.

Vijayaraghavan M. y Nagarajan B. (1994). Mutagenic potential of acute exposure to organophosphorus and organochlorine compounds. *Mutat. Res.* 321, 103-111.

Watt J.L. y Stephen R. (1986). Lymphocyte culture for chromosome analysis. En: *Human Cytogenetics a Practical Approach*. (Rooney D.E. y Czepulkowsky B.H. Eds.) IRL Press. Oxford-Washington D.C.

- Webster L.R., McKenzie G.H. y Moriarty H.T. (2002). Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 133, 112-117.
- Wild M. (1975). Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutat. Res.* 32, 133-150.
- Wojda A., Zietkiewicz E., Mossakowska M., Pawloski W., Skrzypezak K. y Witt M. (2006). Correlation between the level of cytogenetic aberrations in cultured human lymphocytes and the age and gender of donors. *J. Gerontol. Biol. Sci.* 61, 763-772.
- Woodrow J. E., Seiber J. N., Crosby D. G., Moilanen K. W., Soderquist C. J. y Mourer C. (1977). Airbone and surface residues of parathion and its conversion products in a treated plum orchard environment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 6, 175-179.
- WHO (World Health Organization). (1986). Environmental Health Criteria 63. Organophosphorus insecticides: A general Introduction. World Health Organization. Ginebra, Suiza.
- WHO (World Health Organization). (1989). Environmental Health Criteria 90. Dimethoate. World Health Organization. Ginebra, Suiza.
- WHO (World Health Organization). (1993). Environmental Health Criteria. 145. Methyl parathion. World Health Organization. Ginebra, Suiza.

WHO (World Health Organization). (2002). Dimethoate in drinking water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. Ginebra, Suiza.

Yadav J.S. y Kaushik V.K. (2002). Studies on the genotoxicity of an organophosphorus pesticide Baytex-100. *Int. J. Hum. Genet.* 2, 19-25.

Yeary R.A., Eaton J., Gilmore E., North B. y Singell J.C. (1993). A multiyear study of blood cholinesterase activity in urban pesticide applicators. *J. Toxicol. Environ. Health* 39, 11-25.

Yoder J., Watson M. y Benson W.W. (1973). Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. *Mutat. Res.* 21, 335-340.

Zeljezic D. y Garaj-Vrhovac V. (2001). Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis* 16, 359-363.

Zeljezic D. y Garaj-Vrhovac V. (2002). Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Chemosphere* 46, 295-303.