



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MUTAGENICIDAD INDUCIDA EN *Salmonella typhimurium*

POR LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

GUSATIÓN Y METAMIDOFOS

ACTIVADOS POR LA FRACCIÓN S10 DE *Vicia faba*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

LILIANA SÁNCHEZ ESTRADA

TUTORA

DRA. SANDRA LUZ GOMEZ ARROYO

LABORATORIO DE CITOGÉNÉTICA AMBIENTAL DEL CENTRO DE
CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno.

Sánchez
Estrada
Liliana
0445527595548
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología

2. Datos del Tutor.

Doctora
Sandra Luz
Gómez
Arroyo

Datos del Sinodal 1

Doctor
Villalobos
Pietrini
Rafael

Datos del Sinodal 2

Doctora
Judith Isabel
Guzmán
Rincón

Datos del Sinodal 3

Doctora
María del Carmen
Calderón
Ezquerro

Datos del Sinodal 4

Doctora
Josefina
Cortes
Eslava

Datos del trabajo escrito.

MUTAGENICIDAD INDUCIDA EN *Salmonella typhimurium* POR LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS GUSATIÓN Y METAMIDOFOS ACTIVADOS POR LA FRACCIÓN S10 DE *Vicia faba*
62 páginas
2008

"No es sabio el que sabe muchas cosas, sino el que sabe cosas útiles."

Esquilo

"Lo maravilloso de aprender algo, es que nadie puede arrebatárnoslo".

B.B. King

"Soy gran creyente en la suerte, y he descubierto que mientras más duro trabajo, más suerte tengo".

Stephen Leacock

"No basta con adquirir sabiduría, es preciso además saber usarla."

Cicerón

En el sin fin de personas que han nutrido mis experiencias con su conocimiento y compañía no me alcanzan las hojas del mundo para decirles cuanto agradezco su presencia.

Dedico este trabajo a mis amados padres **Agustín Sánchez López** y **Sara Estrada Elizondo** por darme su amor, confianza y apoyo incondicionales, a mis hermanas Sara y María de Lourdes por ser mis mejores amigas y mayor ejemplo, a mis sobrinos Lourdes y Edgar por ser mis niños hermosos, a Eréndira por esos 20 años de amistad incondicional, confianza y diversión, a la Dra. Sandra Gómez Arroyo por ser una persona que enriqueció mi vida con su consejo y amistad, a mis amigos Mariana, Pamela, Ruli, Dany, Toño y Andy por su entrañable cariño y compañía en todo momento, al amor de mi vida Israel, porque con amor lo material y lo intelectual se vuelven constructivos.

A TU MEMORIA HERMANITA

AGRADECIMIENTOS

El más sincero agradecimiento y admiración para mi querida Directora de tesis:

Dra. Sandra Gómez Arroyo

Por el tiempo dedicado a mi formación académica, por su brillante dirección de este trabajo y por su estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A mis sinodales por dedicar su valioso tiempo y consejo para la revisión de éste trabajo:

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Dra. Josefina Cortés Eslava

Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón

Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro

A Israel García Villafuerte por su amor e impulso.

A los Biólogos Raúl Luna Ramos y Mariana Hernández Leal sin cuya inigualable amistad no habría entendido la importancia del trabajo en equipo y de la unión de disciplinas.

Al Dr. José Antonio Benjamín Ordóñez Díaz por enseñarme que el que sabe comparte y por su amistad incondicional.

A la Dra. Josefina Cortes Eslava por su valioso asesoramiento científico y calidad humana.

A la Dra. Maria Elena Calderón Segura por su apoyo y consejo académico en el Laboratorio de Citogenética Ambiental.

Al Biólogo Rodrigo López González por compartir conmigo conocimientos de valiosa utilidad para la realización de éste trabajo.

A mis compañeros y personal del Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera porque hicieron que mi trabajo se aligerara con su compañía y amistad.

Agradezco el apoyo financiero brindado por PAPITT proyecto No. IN 227305

ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Plaguicidas	3
Historia de los plaguicidas	3
Plaguicidas organofosforados	5
Toxicidad de los plaguicidas organofosforados	6
Gusatión o Metil Azinfos	8
Metamidofos o Tamarón	9
2-amino-fluoreno	11
4-nitro-<i>o</i>-fenilendiamina (4-NOP)	11
Metabolismo de los plaguicidas organofosforados	12
Metabolismo animal	14
Metabolismo vegetal y agentes xenobióticos	16
<i>Vicia faba</i>	18
Ensayo de Ames	21
OBJETIVOS	23
HIPÓTESIS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Preparación de las bacterias para el ensayo de mutagenicidad	25
Ensayo de mutagenicidad (Prueba de Ames)	25
Fracción Enzimática Vegetal S10	26
Preparación de extractos de raíces de <i>V. faba</i>	26
Activación de la mezcla	27
Cuantificación del contenido de proteínas	28
Determinación de la actividad de peroxidasa	28

Análisis estadístico	29
RESULTADOS	30
Cuantificación de proteínas la fracción enzimática S10 de V. faba incubada con los plaguicidas gusatión y metil azinfos durante 48 horas.	30
Ensayos de mutagenicidad	30
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	39
CUADROS	53
FIGURAS	56

RESUMEN

Los plaguicidas, por su amplia aplicación, representan una fuente muy importante de agentes tóxicos y posiblemente mutagénicos para el ser humano. En algunos casos, la activación metabólica en las plantas permite la expresión de la mutagenicidad de dichos plaguicidas. Gusatión (Metil Azinfos) y Metamidofos (Tamarón) son insecticidas organofosforados de gran toxicidad muy usados en la agricultura mexicana, por lo que es de gran importancia realizar estudios sobre su efecto genotóxico. Tomando en cuenta que su uso representa un grave problema para la salud humana, en este trabajo se investigó la influencia del metabolismo vegetal de *Vicia faba* (mezcla S10) para biotransformar al Gusatión y al Metamidofos de promutagenos a mutágenos. Se empleó como sistema de prueba el ensayo de Ames, utilizando como criterio del efecto genético, la mutación reversa de las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*. Como testigo negativo se usó amortiguador de fosfatos de sodio (pH 7.4) y como testigos positivos 4-nitro-*o*-fenilendiamina (4-NOP) y 2-aminofluoreno (2-AF), compuestos cuya actividad mutagénica aumenta significativamente por acción del metabolismo vegetal. Cuando se probaron las diferentes concentraciones de Tamarón (10, 100, 1000 y 5000 $\mu\text{g/placa}$) y de Gusatión (20, 40, 80, 100, 200 $\mu\text{g/placa}$) se agregaron a las bacterias de manera directa y con la mezcla S10 de *V. faba*, la cual activó eficientemente a los testigos positivos, elevando significativamente su mutagenicidad. El Metamidofos no indujo mutaciones de manera directa ni al adicionar la mezcla S10. El Gusatión en forma directa no indujo mutaciones, sin embargo, al ser activado metabólicamente causó mutaciones por corrimiento de marco de lectura y por sustitución de pares de bases, mecanismos característicos de las cepas utilizadas.

INTRODUCCIÓN

Las plantas tienen un papel primordial en la alimentación del ser humano y de muchos otros animales. Participan en el metabolismo y bioacumulación de gran cantidad de compuestos en el ambiente. Al formar parte importante de la dieta humana contribuyen al desarrollo de actividades de importancia económica como la agricultura (Sandermann *et al.* 1990, Coleman *et al.* 1997).

La agricultura es señalada como la clave para entender el inicio de las civilizaciones. Su surgimiento tuvo un impacto evidente: por primera vez era posible influir en la disponibilidad de los alimentos y las consecuencias de este descubrimiento fueron las primeras aldeas y que los recolectores nómadas se transformaron en campesinos sedentarios. La actividad agrícola fue predominante para las economías durante miles de años antes de la Revolución Industrial y hoy en día es la principal actividad económica de México (Carrasco 1981, Garrabou *et al.* 1985).

La actividad agrícola requiere cada vez más del uso de plaguicidas, ya que las cosechas se ven afectadas por gran diversidad de plagas, así como por la competencia de las malas hierbas. Pero no solamente este sector se encuentra expuesto a plaguicidas, la población en general también está en contacto con ellos, aunque en distinto grado. Uno de los riesgos principales es la exposición a largo plazo provocada por la presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos como consecuencia de los tratamientos fitosanitarios, así como por los contaminantes ambientales (Ledesma y Delgado 1994).

Plaguicidas

Un plaguicida se define como una sustancia o mezcla en cualquier estado físico cuya finalidad sea la de controlar, combatir y/o prevenir plagas o enfermedades y en general tienen el objetivo de proteger al hombre de organismos que afectan su ambiente, animales y/o alimentos (Ortiz-Hernández *et al.* 1997, Estrada 1998).

Historia de los plaguicidas

A principios del siglo XIX se comenzó a utilizar la acción plaguicida de algunos elementos naturales y el uso de los derivados del petróleo. En 1922, se inició el empleo de diferentes aceites insecticidas y poco más tarde los primeros productos sintéticos. En 1940 con el descubrimiento de las propiedades insecticidas del dicloro-difenil-tricloroetano, mejor conocido como DDT se marcó el origen de los plaguicidas organosintéticos. Sin embargo, la aplicación intensa de estos compuestos empezó a producir enormes problemas de contaminación ambiental y daños a la salud (Estrada 1998).

Desde entonces se han elaborado potentes venenos contra los diferentes organismos plaga (Fig. 1), siendo la mayoría: organoclorados que tienen átomos de carbono, cloro, hidrógeno y en ocasiones oxígeno y son muy estables en el ambiente y organofosforados (derivados del ácido fosfórico) que tienen un átomo central de fósforo en la molécula y son los más tóxicos y menos estables en el ambiente en relación con los organoclorados (Cremllyn 1979).

Estos componentes causan susceptibilidad a la toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad y este hecho ha provocado interés público por la salud. Esto ha llevado al desarrollo de otros plaguicidas "menos tóxicos" como son los carbamatos (cuya estructura química está basada en un alcaloide de la planta *Physostigma venenosum*) y componentes organofosforados. Estos últimos se empezaron a sintetizar en 1948. Los nuevos compuestos desarrollados han reemplazado gradualmente a la mayoría de los plaguicidas clorados. Actualmente los carbamatos y organofosfatos son los ingredientes activos de la mayoría de los insecticidas y algunos de los herbicidas en uso (Chapalamadugu y Chaudhry 1992).

La peligrosidad de los plaguicidas está dada en función a la dosis letal media (DL_{50}) que representa la cantidad capaz de matar a 50 de 100 animales de laboratorio y que es equivalente al grado de toxicidad aguda (Fukuto 1979).

En México, los plaguicidas de mayor importancia están representados por los carbámicos, los organoclorados y los organofosforados, éstos últimos utilizados principalmente como insecticidas (DGEIE 1995). El uso difundido de plaguicidas organofosforados para el control de plagas en el ámbito doméstico, agrícola y veterinario contribuye a su disponibilidad por alta demanda (Ortiz-Hernández *et al.* 1997).

Plaguicidas organofosforados

Son ésteres orgánicos del ácido fosfórico y sus derivados, son sólidos cristalinos o líquidos translúcidos de color amarillo parduzco y muchos de ellos tienen olor desagradable, son más pesados que el agua y solubles tanto en disolventes orgánicos (aceites y grasas) como en el agua. Se hidrolizan en medios alcalinos y a elevadas temperaturas, la mayoría de las veces son sumamente volátiles. La exposición puede darse por contacto dérmico, inhalación, ingestión de agua, suelo o vegetales contaminados (Fukuto 1971).

Durante la Segunda Guerra Mundial, los técnicos alemanes encargados del estudio de materiales que podrían ser empleados en la guerra química, descubrieron y sintetizaron compuestos orgánicos del fósforo. Posteriormente, el químico alemán Gerhard Schrader en 1947, con sus trabajos en el campo de la agricultura, permitió comprobar que muchos de los compuestos orgánicos del fósforo presentaban alta toxicidad contra insectos perjudiciales. Schrader también produjo gases nerviosos muy activos como el tabún y el sarín (Bismuth 1987, Ware 2000).

Como experiencias se iniciaron el estudio y la aplicación de una nueva serie de materiales en el control de plagas agrícolas. Desde la publicación de las investigaciones hechas por Schrader, se han preparado y probado en el campo muchos compuestos organofosforados de diversos tipos, los cuales son cada vez más prometedores debido a sus propiedades físicas y químicas. El primer compuesto organofosforado producido en forma industrial fue el Bladan ó TEPP (tetraetilpirofosfato) que pertenece al tipo de ésteres sencillos del ácido fosfórico y otros, a los que se agregó después el paratión, que a pesar de su antigüedad sigue siendo de uso común en todo el mundo (Córdoba 1986).

En la actualidad el empleo de los plaguicidas organofosforados es estimado en varios miles de toneladas en todo el mundo, desplazando a los insecticidas organoclorados por su menor persistencia en el ambiente (Fernández 1970, Burger 1995).

Los compuestos organofosforados presentan dos características básicas, son más tóxicos para vertebrados que los organoclorados y no son persistentes en el medio, principal causa que motivó la sustitución de éstos por los organofosforados.

Tanto en insectos como en mamíferos el efecto de los organofosforados y carbamatos es principalmente afectar el sistema nervioso central, desde la unión neuromuscular no colinérgica. La única sinapsis colinérgica conocida en insectos es en el sistema nervioso central y la unión neuromuscular química transmitida es ácido glutámico. La toxicidad de los organofosforados en mamíferos, está asociada con la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (ACE). Esta esterasa cataliza la hidrólisis de la acetilcolina (AC, transmisor químico sináptico) a colina y ácido acético, a gran velocidad (Fukuto 1971, Ware 2000). La mayoría de los compuestos están hechos para seleccionar ciertos organismos y todos intervienen en el bloqueo de algunos procesos metabólicos y en ocasiones no se conoce el modo de acción exacto, ya que varios insecticidas presentan más de un modo de acción (Forgash 1984).

Toxicidad de los plaguicidas organofosforados

Con referencia a la toxicidad de los compuestos organofosforados, es necesario compararlo con otros insecticidas como el cianuro de sodio (NaCN), avermectina, sulfato de nicotina y cipermetrina, como se muestra en el cuadro 1.

Dentro del grupo de los organofosforados existe un intervalo muy amplio de toxicidad como se aprecia en el cuadro 2 y la amplitud de dicho intervalo de toxicidad, también conlleva gran gama de usos de este grupo de insecticidas.

En términos generales, la constitución química de los derivados fosfóricos guarda relación con su comportamiento tóxico, especialmente para mamíferos. De los que se han estudiado, hay varios que presentan forma oxo y tio; en general, la toxicidad de la primera es inferior a la segunda. Otra diferencia bien establecida, es la que presentan los derivados con grupo-metilo, los cuales son menos tóxicos en mamíferos que los etilo, cuando se comparan compuestos de estructuras idénticas. En general, los derivados oxo ditiofosfatos son muy activos *in vitro*, por poseer mayor reactividad. Sin embargo, son más hidrosolubles, lo que ocasiona que al mezclarse con agua, pierdan su actividad más rápidamente (Gow 1988, Cremllyn 1990, Ortega *et al.* 1994).

Sus vías de ingreso al organismo generalmente son las pulmonares o respiratorias (por inhalación del agente tóxico cuando se presenta en forma de vapores o partículas), por vía dérmica (cuando está en polvos o líquidos liposolubles) y digestiva (por falta de higiene en las manos, ropa, pelo, etc.). Cuando el organismo absorbe el producto tóxico, éste pasa al hígado, se oxida de paratión a paraxón, de malatión a malaxón, etc, resultando los metabolitos intermedios que son igual o más tóxicos que la sustancia original. En este último caso tienen acción inhibitoria sobre las esterasas, fundamentalmente la colinesterasa. El neurotransmisor acetilcolina se acumula en las terminales nerviosas y se interrumpe el impulso nervioso, afectando al sistema nervioso central y periférico (Fernández 1970, Fest y Schmidt 1973).

Los efectos que de una manera general se observan como consecuencia de la exposición a organofosforados son, en gran parte, resultado de la combinación del tipo de exposición (aguda/crónica), la intensidad (dosis o concentración) y la/s especie/s química/s implicadas (categoría toxicológica) (Sultatos 1994).

Cuando los plaguicidas ingresan en las cadenas alimenticias se distribuyen a través de ellas, se concentran en cada nicho ecológico y se acumulan sucesivamente hasta que alcanzan una concentración letal para algún organismo constituyente de la cadena, o bien hasta que llegan a niveles superiores de la red trófica (Campbell 1987, Gow 1988).

A los plaguicidas se les relaciona con patologías cancerígenas, mutagénicas, teratogénicas o alteraciones de la reproducción, inmunológicas, endocrinas, renales y hepáticas, afecciones neurotóxicas y potenciadores de y por acción de otros agentes tóxicos, así como diversos efectos retardados tales como reacciones alérgicas: vomito, dolor de cabeza, conjuntivitis, diarrea, calambres abdominales, dificultad para respirar, entre otros (Secretaría de Salubridad y Asistencia 1974, Ortega *et al.* 1994).

Gusatión o Metil Azinfos

Este insecticida organofosforado fue descubierto por la Casa Bayer en 1953 (Fig. 3), es extremadamente tóxico, su DL50 oral es de 15 mg/kg y dérmico de 16 mg/kg. Se obtiene de la N-clorometil benzasimida. Se le puede encontrar bajo los nombres: Gusatión M 35 %, Azifón, Azinfos Metil 35, Cotnión, INIA 82.4. Su fórmula molecular es $C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$ y

su nombre químico es O,O-dimetil-S-(4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-il)metil fosforoditioato (EPA 1980).

Es utilizado en más de 30 cultivos, destacando su control contra el picudo o barrenillo del chile, palomilla de la papa, picudo o tortuguilla del tabaco, gusano del cuerno, “trips”, pulga saltona, chinche apestosa verde, picudos, gusano rosado, chinche Lygus y palomilla de la manzana (Robledo 1998).

Es uno de los plaguicidas de más alto riesgo, según el registro de intoxicaciones agudas notificadas por la Secretaria de Salubridad y Asistencia, ingresa al organismo predominantemente por contacto, los efectos agudos son a nivel de sistema nervioso y es muy tóxico para los riñones. En algunos estudios se ha demostrado cierto grado de interferencia en la fertilidad masculina y femenina, testículos atrofiados, pequeños o de forma anormal en aves y efectos teratogénicos en mamíferos. Sin embargo, su acción mutagénica sobre todo en lo referente a carcinogénesis aún es debatible. Como efecto ambiental severo se sabe que reduce la vida silvestre. Se encuentra prohibido en Bulgaria, India y la ex Unión Soviética (FAO 1996).

Metamidofos o Tamarón

Es un insecticida y acaricida organofosforado cuya constitución química se presenta en la figura 2, su ingreso a los organismos es sistémico y por contacto, es muy tóxico, a un DL50 oral de 25 a 33 mg/kg y dérmico de 183 mg/kg. Sus nombres comerciales son: Metamidofos 60SL, Monitor 600, MTD 600 LS, Stanza 600 LE y Tamarón 600. Su

fórmula molecular es $C_2H_8NO_2PS$ y su nombre químico es *O*, *S*-dimetil fosforamidotoato (EPA 1980).

El metamidofos, de marcas comerciales Monitor y Tamarón, es un plaguicida organofosforado efectivo para combatir gran cantidad de plagas. Fue sintetizado en 1964 y posteriormente se comercializó como insecticida y acaricida. Está disponible en el mercado local como concentrado emulsificable a una concentración de 600 g de ingrediente activo por litro. El metamidofos es muy soluble en agua y tiene una presión de vapor de 3.7×10^{-4} mm Hg a 30 °C. En mamíferos la administración oral es eliminado a través de la orina. En las ratas, es metabolizado por desaminación y desmetilación. En las plantas la degradación es por medio de hidrólisis con la pérdida de amino *S*-metil del grupo *O*- metil. Desde el punto de vista ambiental, su descomposición tanto en suelo como en agua, es rápida (NIOSH 1983).

Por su alta toxicidad puede ser fatal si se inhala o es absorbido a través de la piel. Como organofosforado inhibe a la acetil colinesterasa, sustancia necesaria para el funcionamiento del cerebro y el sistema nervioso. Provoca efectos residuales en aves, es tóxico para peces, abejas y otros animales. También causa la muerte de ganado que ingiere forraje en campos tratados (Tomlin 1994). Su uso está prohibido en China, Gran Bretaña y Sri Lanka y es restringido en Bangla Desh, India y Estados Unidos de América. Fue incluido en la lista del Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (CIP) en 1995 (FAO 1996).

2-amino-fluoreno

Es una amina aromática policíclica (Fig. 4) de las que se tienen amplias pruebas de su promutagenicidad y procarcinogenicidad en mamíferos, dependiente del metabolismo para producir efecto mutagénico. Es activada por peroxidasas de los sistemas vegetales y ha sido útil en los sistemas de prueba, ya que es transformado a mutágeno y se ha evaluado mediante la cepa TA100 de *Salmonella typhimurium* (Plewa *et al.* 1983, Sandermann 1988). La activación de dicho compuesto por las oxidasas de función múltiple y las peroxidasas, fue demostrada con la activación metabólica de *Persea americana* fracción S117 (Chiapella *et al.* 1995).

4-nitro-*o*-fenilendiamina (4-NOP)

Es una amina aromática monocíclica derivada de la anilina (Fig. 5) y es un mutágeno de acción directa para la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* que incrementa su efecto a través del metabolismo vegetal. Es utilizada como testigo positivo (Zeiger *et al.* 1981). Es usada en la industria para la producción de plaguicidas, colorantes, explosivos, fármacos, entre otros (EPA 1980).

Diversos estudios han demostrado que induce aberraciones cromosómicas en células de mamífero en cultivo (Perry y Searle 1977). La NOP no produce aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos ni aumenta la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en ratones (Niedziela *et al.* 1991)

La 4-NOP es útil como modelo para el estudio de la activación de anilinas (que son productos de degradación de muchos plaguicidas) por sistemas enzimáticos de plantas. La fracción S2 de *Zea mays* es capaz de activar metabólicamente a la 4-NOP cuyo efecto es evaluado en el ensayo de Ames (Ysern *et al.* 1993) y se ha probado que es un mutágeno y promutágeno directo en la cepa TA98, para la cepa TA100 aumenta significativamente la mutagenicidad pero no se eleva tanto como en la cepa TA98. Estos resultados coinciden con los reportados por Maron y Ames (1983), Gentile *et al.* (1986) y Cortés-Eslava (1993, 2004).

Metabolismo de los plaguicidas organofosforados

La mayoría de los organofosforados son insecticidas de contacto, fumigantes y de acción estomacal, pero también se encuentran compuestos cuya vía de ingreso es sistémica, que cuando se aplican al suelo y a las plantas son absorbidos por hojas, tallos, corteza y raíces, circulan en la savia haciéndola tóxica para los insectos que se alimentan al succionarla, pero además al tener contacto con los organismos, entran en sus vías metabólicas. Se trata de compuestos, en general, marcadamente apolares, lo que significa que desde el punto de vista químico la mayoría son escasamente solubles en agua, aunque con grandes diferencias de un compuesto a otro, y desde el punto de vista biológico tienden a disolverse en grasas. Por tal motivo, la piel, donde se encuentra una importante capa de tejido con elevado contenido en lípidos, puede constituirse en una importante vía de entrada. La estabilidad de los compuestos organofosforados depende del pH del medio;

cuando éste es fuertemente alcalino se descomponen, por lo que dicho factor puede ser utilizado para destruirlos (Cremlyn 1990).

Se conoce como metabolismo al conjunto de reacciones químicas a las que son sometidas las sustancias absorbidas por los seres vivos, ya sea para la obtención de energía o para la construcción de elementos conformacionales. La estructura química de los compuestos nutritivos naturales y de los metabolitos intermedios es muy variada, de modo que la célula está provista de numerosos catalizadores, o enzimas, que hacen frente a esta diversidad de productos químicos. Este conjunto de enzimas también lo emplea la célula para eliminar compuestos tóxicos potencialmente nocivos. La capacidad de desintoxicación celular tiene un límite que está dado por la concentración de la sustancia (Grover y Cessna 1991).

Después de que un agente xenobiótico ha sido absorbido por el organismo, éste es biotransformado (Fig. 6). Por lo general, los productos del metabolismo son más solubles en agua, lo que facilita su eliminación y hace desaparecer su toxicidad; en otras ocasiones se obtiene una sustancia como producto intermedio del metabolismo, la cual es más reactiva que la original y puede interactuar con otras macromoléculas celulares. Las enzimas que realizan las reacciones químicas relacionadas con la biotransformación se encuentran en el citoesqueleto, en el retículo endoplásmico, en las mitocondrias y en el caso de los mamíferos, en las células hepáticas (Albert 1988, Cremlyn 1990).

Como ya se mencionó, estas reacciones producen metabolitos estables nucleofílicos más solubles en agua, por lo que algunas reacciones se realizan en presencia de este líquido, lo cual recibe el nombre de hidrólisis. Otras se realizan en presencia de oxígeno (oxidación) y algunas más de hidrógeno (reducción). Si el compuesto tiene un grupo

funcional, es decir grupos de átomos unidos a la cadena de carbono, éste puede combinarse con enzimas en el fenómeno llamado conjugación y así se produce un compuesto polar, soluble en agua, que se elimina (Albert 1988).

Las enzimas que intervienen en la bioactivación de los agentes xenobióticos realizan esencialmente las mismas funciones generales. El producto intermedio del metabolismo resulta ser iónico y potencialmente muy reactivo, lo que puede producir daño a los tejidos, despertar reacciones inmunológicas o interactuar con los ácidos nucleicos (Plewa y Wagner 1993).

Metabolismo animal

El catabolismo (descomposición en sustancias más sencillas) de los compuestos organofosforados una vez absorbidos tiene lugar, en parte, a través de las llamadas esterases “A”, enzimas que los hidrolizan a una velocidad considerable, actuando como desintoxicadoras. Las esterases “B” no tienen, en general, esta función, por el contrario, son las moléculas diana sobre las que los organofosforados actúan en el organismo, ejerciendo así su acción tóxica, como es el caso de la acetilcolinesterasa cuya actividad bioquímica resulta inhibida, con una rapidez e intensidad que dependen de la naturaleza del propio compuesto, además de su concentración. La butirilcolinesterasa, también llamada pseudocolinesterasa o colinesterasa sérica, por encontrarse en el suero, es de características análogas a la anterior pero con función desintoxicadora frente a los organofosforados (Maluszynska y Juchimiuk 2005).

El catabolismo de los compuestos organofosforados sigue las dos fases habituales de desintoxicación de los xenobióticos en el organismo en general, las denominadas fase I y fase II. En ocasiones, el organofosforado requiere que se metabolice antes de convertirse en un compuesto biológicamente activo y por tanto nocivo en el organismo (Sultatos 1994).

El metabolismo de estos compuestos ocurre principalmente en el hígado, y como resultado final de la transformación de la molécula se originan los “grupos salientes” que son característicos de cada organofosforado en particular (por acción de citocromos P-450) produciendo un total de hasta 8 alquilfosfatos diferentes (por acción de las esterasas A), que son comunes para estas sustancias. De estos últimos, los 6 más frecuentes son los siguientes: el dimetilfosfato (DMP), dietilfosfato (DEP), dimetiltiofosfato (DMTP), dietiltiofosfato (DETP) dimetilditiofosfato (DMDTP), dietilditiofosfato (DEDTP); el dimetilfosforotiolato (DMPTh) y el dietilfosforotiolato (DEPTh) son menos frecuentes. La figura 7 representa el esquema básico del metabolismo de los organofosforados. Todos los compuestos resultantes son solubles en agua y se eliminan por la orina y las heces (Albert 1988, Maluszynska y Juchimiuk 2005).

En términos generales, entre el 75 y el 100 % de los organofosforados administrados por vía oral se transforma en compuestos solubles, entre los que se encuentran los alquilfosfatos, ya mencionados, retardando su eliminación urinaria por un periodo que oscila entre las 24 y las 48 horas tras la administración (experimental). No obstante debe tenerse en cuenta, que la absorción por vía dérmica puede ser más lenta, extenderse durante un periodo más largo y, en consecuencia, la eliminación prolongarse más allá del plazo referido, puesto que representa el resultado de la integración de todo el proceso de absorción (Sultatos 1994, Maluszynska y Juchimiuk 2005).

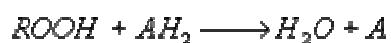
Metabolismo vegetal y agentes xenobióticos

Las plantas tienen participación importante en la liberación de xenobióticos y sus intermediarios. El sistema vegetal es capaz de biotransformar agentes xenobióticos por oxidación, transformación química y conjugación e incorporarlos en sus tejidos (Fig. 8) (Maluszynska y Juchimiuk 2005). El término activación metabólica vegetal connota el proceso por el cual un promutágeno o mutágeno indirecto es transformado por la acción biológica de una planta en un mutágeno (Plewa 1978, Gentile *et al.* 1982, 1986, Plewa y Gentile 1982, Plewa *et al.* 1988, GómezArroyo *et al.* 1995).

Se ha observado que los sistemas vegetales adquieren grupos reactivos tipo $-OH$, $-SH$, $-COOH$ ó $-NH_2$ que sirven como sitios funcionales para su posterior conjugación. De manera muy general se conocen 3 fases para el metabolismo vegetal. Las reacciones de la fase I (o primarias), donde ocurren reacciones de sulfoxidación y N-desalquilación, las de fase II (secundarias), en la que se realiza la conjugación con glutatión, azúcares o aminoácidos y por último la fase III (reacciones terciarias), en la que se incorporan a productos naturales de la planta (Shimabukuro *et al.* 1981, Grover y Cessna 1991, Plewa y Wagner 1993). Las reacciones de las 3 fases mencionadas se resumen en la figura 9.

Existen varias enzimas vegetales de importancia durante el metabolismo de los xenobióticos en plantas, las que más sobresalen son las peroxidasas que participan en reacciones de oxidación (peroxidación y oxidación con oxígeno molecular). En las plantas desempeñan un papel catalítico en el proceso de lignificación del xilema, expresándose también en la epidermis de los órganos aéreos (Sandermann *et al.* 1990)

Las peroxidasas de los sistemas vegetales son las principales enzimas involucradas en el mecanismo de activación de compuestos. Éstas catalizan la oxidación de fenoles y de gran cantidad de sustancias mediante la reducción del peróxido a agua. En los vegetales, la peroxidasa con sus diferentes formas isoenzimáticas, parece estar relacionada con la oxidación de numerosos compuestos (Plewa y Gentile 1982). Las peroxidasas son enzimas que catalizan la siguiente reacción:



Ésta es la principal, sin embargo existen tres tipos de reacciones en las que puede intervenir: peroxidantes, oxidantes e hidroxilantes. Para la primera se requiere de un peróxido orgánico o de agua. La cantidad de compuestos que pueden ser aceptores de hidrógenos para algunas peroxidasas es pequeña. Los compuestos donadores de hidrógenos pueden ser fenoles, aminas u otros compuestos orgánicos. En las plantas el tipo de enzima peroxidasa es ferriprotoporfirina peroxidasa (que contiene el grupo el grupo heme y puede reducir el peroxido, mientras un electrón donador es oxidado) éste tipo cataliza la oxidación de un gran número de fenoles y compuestos aromáticos. El mecanismo de la reacción se basa en la formación de complejos de enzima-donador de hidrógenos y dos pasos de oxidación univalente (Reed 1975).

Hay poca información acerca del destino metabólico de los compuestos organofosforados en las plantas superiores y en los animales de los residuos y/o de los productos y tampoco hay estudios suficientes de la identidad de las enzimas específicas que modifican la estructura de estos compuestos, por ello el desarrollo de ensayos que determinen dichos destinos y sus efectos es primordial (Plewa y Wagner 1993). Los

experimentos de activación vegetal se pueden realizar *in vivo* o *in vitro*, en la primera situación, el agente químico que se prueba es aplicado a una planta viva intacta que semeja las condiciones de los campos agrícolas y cuyos extractos son agregados a un cultivo celular y en la segunda, el agente es coincubado con un homogeneizado vegetal o en un cultivo de células del tejido de la planta (Plewa y Gentile 1982, Plewa et al. 1984, 1988).

En ambos métodos la acción del metabolismo vegetal sobre un mutágeno potencial se prueba en un microorganismo indicador como *Salmonella typhimuriurn*, *Escherichia coli*, *Aspergillus nidulans*, etc. o en células en cultivo de mamífero tales como linfocitos humanos periféricos, células de ovario de criceto dorado, etc., analizando la inducción de mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas, para evaluar así las propiedades genotóxicas de los agentes químicos y/o sus metabolitos (Plewa 1978, Plewa y Gentile 1982, Takehisa *et al.* 1982, Plewa *et al.* 1984, 1988 , Plewa y Wagner 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995).

Vicia faba

Nombre científico: *Vicia faba*, nombre común: “haba”, “habichuela”. Es una especie dicotiledónea, perteneciente a la familia de las fabáceas (papilionáceas). Es una planta herbácea, anual, de porte recto de 0.6 a 1.6 m de altura. Su lugar de origen es el continente asiático (cuenca del mediterráneo), Asia Central y la región mediterránea (Aizpuru *et al.* 1999)

Los principales países productores a nivel mundial son: China, Etiopía, Egipto y Australia, que en conjunto aportan aproximadamente el 78 % de la producción mundial; en Europa: Italia, Portugal, España y Alemania, en África: Marruecos y en América Latina: Brasil, Perú y Bolivia.

Las habas son hortalizas resistentes, se cultivan especialmente en zonas frías, pero en las templadas también se pueden desarrollar durante todo el año.

Los frutos poseen una vaina de consistencia carnosa, alargada y las semillas dispuestas en fila, la vaina tiene un color verde en estado no maduro y negra, de textura opaca y peluda al secarse. La forma de la semilla es subcilíndrica, elíptica, angulosa y generalmente reniforme. Su tamaño varía entre 1.5 y 3 cm de largo. El color de la semilla es verde amarillento, aunque las hay de coloraciones más oscuras.

En ella se distinguen tres variedades botánicas, todas cultivadas, las cuales se diferencian fundamentalmente en el tamaño de sus semillas. Estas son: *Vicia faba* L. Var. Minor (Harz) Beck. *Vicia faba* L. Var. Equina y *Vicia faba* L. Major. (Harz) Beck. Los cultivares más utilizados que corresponden al tipo aguadulce, pertenecen a esta última variedad botánica (Martínez *et al.* 2005a).

El haba no es una hortaliza de gusto masivo, debido seguramente al sabor fuerte que presenta, pero, como otras leguminosas, debe ser considerada en la dieta por su composición nutritiva, ya que aporta cantidades importantes de carbohidratos y proteínas. Además, es rica en minerales (P y Fe) y vitamina B1 (Martínez *et al.* 2005b).

En el mundo el principal uso de haba es como leguminosa de grano, pero en varios países, incluido Chile, su empleo más importante es como hortaliza. Ocasionalmente se consume la vaina en estado muy inmaduro. De manera industrial se procesa como producto

enlatado y como congelado. En la alimentación humana, se consume en forma fresca como legumbre o en grano seco como menestra, su calidad proteica es superior a la del trigo, arroz, quinoa y kiwicha y su riqueza vitamínica es elevada. La leguminosa de menor calidad se emplea en alimentación animal (Schmidt-Hebbel *et al.* 1990).

El sistema radical presenta una raíz primaria pivotante, muy desarrollada y bastante profundizadora, pues puede alcanzar hasta 1.5 m y numerosas raíces secundarias y terciarias con nódulos que fijan nitrógeno, que son aprovechadas en un 80 % por la misma planta.

En 1913, *Vicia faba* fue utilizada en experimentos de radiación y desde 1930 le siguieron el uso de *Allium*, *Crepis*, *Tradescantia* y otros géneros en este tipo de experimentos, ampliándose luego este esquema para evaluar posibles mutágenos químicos (Grant 1999).

Actualmente, los bioensayos con plantas superiores son recomendados para su uso en monitoreo de posibles efectos genotóxicos de compuestos como los plaguicidas y *V. faba* es muy sensible a dichos compuestos (Plewa y Gentile 1982, Gómez-Arroyo *et al.* 1992, 1995; Gómez-Arroyo y Villalobos Pietrini 1995, Wulff y Andrioli 2006).

Vicia faba es una especie vegetal considerada metabólicamente activa debido a que contiene enzimas localizadas en la fracción enzimática S10, microsomas del retículo endoplásmico con múltiples enzimas citocromos CYP450 y peroxidasas, obtenidos de las células meristemáticas a 10 000 X g y es óptima para experimentos de metabolismo *in vitro* y de activación a promutagenos (Takehisa *et al.* 1982, 1988, Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1995, Gómez-Arroyo *et al.* 2000, Flores-Maya *et al.* 2005).

Ensayo de Ames

En los últimos años, las investigaciones en el campo de la biología molecular, la genética y la toxicología permitieron ampliar el conocimiento sobre la relación entre agentes físicos, químicos y biológicos y las alteraciones en el ADN. Estos agentes, llamados mutagénicos, aumentan la frecuencia de mutación espontánea y actualmente su presencia en el entorno humano está asociada a distintos efectos (Wulff y Andrioli 2006).

La mutagenicidad es una forma de evaluar la toxicidad asociada a la exposición crónica de compuestos. Las mutaciones pueden ser evaluadas en ensayos bacterianos y otros sistemas celulares (Valkova *et al.* 2004). La identificación de sustancias capaces de inducir mutaciones se ha convertido en un procedimiento importante como medida de seguridad. Los agentes químicos capaces de inducir mutaciones, pueden potencialmente dañar la línea germinal, repercutiendo en problemas de fertilidad y mutaciones a las futuras generaciones. Los mutágenos químicos son también capaces de inducir cáncer (Wulff y Andrioli 2006).

El ensayo de Ames es una prueba de reversión bacteriana a corto plazo, específicamente diseñada para detectar un amplio rango de agentes químicos capaces de producir daño genético (Mortelmans y Zeiger 2000).

Estos ensayos de reversión o retromutación evalúan la producción de mutaciones inversas que suprimen el efecto de una mutación original sobre un rasgo fenotípico claramente observable. Sin duda alguna, el ensayo más conocido y empleado de este tipo es el de reversión de la auxotrofia para histidina de cepas de *S. typhimurium*, mejor conocido

con el nombre de ensayo de Ames. Si las cepas de *S. typhimurium* auxótrofas para histidina son expuestas a sustancias mutagénicas, se producirá una reversión a la prototrofia de las mismas, que puede ser evaluada mediante recuento en un medio mínimo carente de histidina (Ames *et al.* 1973, Maron y Ames 1983). Con objeto de simular la posible incidencia de estas sustancias en mamíferos y, por consiguiente, en seres humanos, suele incluirse en el ensayo el empleo de la fracción microsómica (S9) de hígado de rata o humano (Shaw y Chadwick 1998).

Antes de llevarse a cabo los ensayos biológicos, mediante la prueba de Ames se confirma la presencia de los marcadores genéticos en la cepa empleada, es decir, las mutaciones que de origen deben presentar las cepas bacterianas. Las cepas TA100 y TA98 de *Salmonella typhimurium* deben presentar la mutación correspondiente (sustitución de pares de bases y corrimiento del marco de lectura, respectivamente) en el operón histidina/biotina que no permite la síntesis del aminoácido de histidina y por lo tanto la cepa es incapaz de crecer y formar colonias en su ausencia (auxótrofa a la histidina). La mutación (rfa) que afecta la pared de lipopolisacáridos, permitiendo que sea más permeable a moléculas grandes, la introducción de plasmido pKM101 que potencia la mutagénesis inducida por la luz UV y la delección en los genes UVR-B-bio que elimina el mecanismo de reparación por escisión, evitando que se corrijan lesiones al ADN.

Este ensayo fue validado en un análisis de 300 agentes químicos y es un método eficaz para la detección de agentes mutagénicos ya que se obtienen resultados en muy poco tiempo, con bajos costos y con alta fidelidad (McCann y Ames 1976, 1977).

OBJETIVOS

Evaluar si los plaguicidas organofosforados Gusatión y Metamidofos en diferentes concentraciones tienen efecto mutagénico directo en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*.

Determinar la capacidad metabólica de la fracción S10 de *Vicia faba* para activar a los insecticidas organofosforados Gusatión y Metamidofos observando el efecto genético en la mutación reversa de la bacteria *Salmonella typhimurium*, cepas TA98 y TA100.

HIPÓTESIS

Se ha establecido que los vegetales pueden activar con sus sistemas enzimáticos a las aminas aromáticas produciendo de esta manera metabolitos mutagénicos. Se espera que la fracción enzimática S10 de *Vicia faba*, active y/o aumente metabólicamente, la mutagenicidad de los compuestos organofosforados Gusatión y Metamidofos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las bacterias para el ensayo de mutagenicidad

A partir de una placa patrón de la cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* se tomó una porción de la colonia y se colocó en medio líquido nutritivo Oxoid No. 2, en agitación constante (125 rpm) durante 16 horas a 37 °C para promover la proliferación de las bacterias.

Se verificó la presencia de los marcadores genéticos en las cepas TA98 y TA100, mediante las pruebas correspondientes. Para la mutación rfa la prueba de cristal violeta y para el factor R de resistencia a la ampicilina, con medio nutritivo suplementado con histidina, biotina y ampicilina. El requerimiento de histidina en las bacterias (y que es la base de la reversión espontánea para las cepas TA98 y TA100) fue comprobado por el crecimiento en estrías en placas con un exceso de histidina (0.1ml 0.1M) y biotina (0.1 ml 0.05 mM), en comparación con las placas testigo que solo contienen biotina y en las que no hay crecimiento (Ames *et al.* 1973, Maron y Ames 1983)

Ensayo de mutagenicidad (Prueba de Ames)

Los ensayos se basaron en la prueba de Ames empleando las cepas TA98 y TA100 de la bacteria *S. typhimurium*, con y sin activación metabólica vegetal, adicionando la mezcla S10 de *Vicia faba*, preparada de acuerdo a Calderón-Segura et al. (1999).

La reversión espontánea de las cepas de prueba, se midió en los ensayos de mutagenicidad (cada cepa por triplicado), en cada uno se probaron las cepas de manera directa e indirecta y se expresaron como el número de revertantes espontáneos por caja de medio mínimo.

En un tubo con 2 ml de agar de superficie fundido se adicionaron las diferentes concentraciones de cada insecticida, la mezcla S10 y la cepa TA98 ó TA100. Se agitó y se vertió en placas de agar mínimo y se incubó a 37 °C durante 48 horas en oscuridad. En los tratamientos directos se omitió la fracción enzimática. Se registró la cantidad de colonias revertantes por placa.

Se probaron para ambas cepas (TA100 y TA98) diferentes concentraciones de Metamidofos (10, 100, 1000 y 5000 µg/placa) y de Gusatión (20, 40, 80,100, 200 µg/placa) y se agregaron a las bacterias de manera directa y con la mezcla S10 de *V. faba*.

Como testigo negativo se empleó amortiguador de fosfatos de sodio (pH 7.4) y como testigos positivos 4-nitro-*o*-fenilendiamina (4-NOP) y 2-amino-fluoreno (2-AF).

Fracción Enzimática Vegetal S10

Preparación de extractos de raíces de *V. faba*

Se sumergieron las semillas en agua durante 24 horas, se sembraron entre dos capas de algodón húmedo (agua de la llave) y se colocaron en oscuridad y a 20 °C aproximadamente para que germinaran. Aproximadamente a los 5 días cuando la plántula

alcanzó de 4-6 cm se cortaron los 2 cm terminales de la raíz colocándolas en una cámara húmeda sobre hielo.

Posteriormente se homogeneizó en proporción 1:1 con una solución de fosfato de sodio monobásico y dibásico 0.1M a un pH de 7.4, 1mM de ditioneitol (Sigma), 1mM de EDTA, 0.6 M de Manitol (Baker), polivinilpolipirrolidona al 10% (peso/volumen) (PVPP, Sigma), se maceraron en un mortero frío y se homogeneizaron en un macerador de tejidos vegetales durante 2 min aproximadamente a 4 °C (Takehisa *et al.* 1988).

El homogeneizado fue centrifugado por 30 minutos a 11500 rpm (10 000 x g) a 4 °C y el sobrenadante esterilizado por filtración miliporo (0.22 µm) (Takehisa *et al.* 1988) Inmediatamente después se determinó el contenido de proteínas por el método de Biorad (Bradford 1976) y se usó para la activación metabólica *in vitro* de los dos plaguicidas y de los testigos negativo y positivo.

Activación de la mezcla

Se toma una parte de la fracción en relación 1:9 (volumen/volumen) con una mezcla de amortiguador de fosfatos (pH 7.4) con MgCl_2 8×10^{-3} M (Baker), KCl 3.3×10^{-2} M (Baker), Glucosa 6-fosfato 5×10^{-3} M (Sigma) y NAD 4×10^{-3} M (Sigma) (Calderón-Segura *et al.* 1999).

La determinación del contenido total de proteínas y de la actividad peroxidasa se realizó para la mezcla S10 intacta y al finalizar su incubación con los plaguicidas, durante un periodo de 48 horas.

Cuantificación del contenido de proteínas

Se llevó a cabo por el método de Bradford (1976). En celdas para espectrofotómetro se colocaron 10 µl del extracto, se le adicionaron 200 µl de reactivo de Bradford y se llevó a un volumen final de 1 ml. Posteriormente se cuantificaron por triplicado en un espectrofotómetro (Spectronic Genesis) a 595 nm.

Determinación de la actividad de peroxidasa

Una muestra de la fracción S10 se evaluó mediante la oxidación de guayacol a tetraguayacol monitoreando la absorbancia a 470 nm durante 5 minutos cada 60 segundos en un espectrofotómetro (Spectronic Genesis).

La reacción de la peroxidasa se realizó con:

1 mL de H₂O₂ AL 3%

1 mL de guayacol al 1%

10 µl de la muestra S10

990 µl de amortiguador de fosfato de potasio 10 µM a pH 7.4

Se mezclaron todos los componentes arriba mencionados, agregando al final el guayacol y se determinó la absorbancia a 470 nm.

La tasa de la actividad peroxidasa se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación (Gichner *et al.* 1994):

$$\frac{[(A470/E470 \times l) V/P]}{t \text{ min}}$$

Donde:

A470 es la absorbencia a 470 nm.

E470 es el coeficiente de extinción del tetraguayacol (26.6/Mm/cm)

l es la longitud de trayectoria de la cubeta (1cm)

V es el volumen en reacción en litros

P es el contenido de proteínas en μg

t min es el tiempo en minutos

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cada tratamiento se evaluaron mediante tres criterios:

- 1 El doblaje de la frecuencia de reversión espontánea sobre los testigos.
- 2 La comparación estadística que se aplicó fue un análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls.
- 3 Una respuesta de concentración-efecto.

RESULTADOS

Cuantificación de proteínas de la fracción enzimática S10 de *V. faba* incubada con los plaguicidas Gusatión y Metamidofos durante 48 horas.

El contenido de proteínas totales en los extractos de la fracción S10 de *V. faba* incubadas durante 48 horas con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 5000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Metamidofos y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Gusatión no variaron significativamente con respecto al valor testigo. Sin embargo para 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Gusatión disminuyeron significativamente al ser comparados con el valor testigo y a lo largo del tiempo de registro (Cuadro 3).

Ensayos de mutagenicidad

Las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* fueron sembradas con un crecimiento eficiente y presentaron los marcadores genéticos característicos: la mutación rfa y del factor R, al realizar su correspondiente prueba de marcadores genéticos (cristal violeta y prueba para factor R) así como el requerimiento de histidina en las bacterias.

En el cuadro 4 se muestran los valores de los testigos positivos 4-NOP y 2-AF para las cepas TA98 y TA100, respectivamente, así como los resultados del ensayo de mutagenicidad inducida en ambas cepas por los plaguicidas Gusatión y Metamidofos de manera directa e indirecta.

En el ensayo de mutagenicidad para la cepa TA98 con el plaguicida Gusatión (Fig. 10) los tratamientos directos no causaron efecto mutagénico, sin embargo con el metabolismo vegetal (fracción S10) se observó un aumento significativo en la cantidad de colonias revertantes.

En la figura 12 se muestra la gráfica del promedio de colonias revertantes por placa, resultantes del ensayo de mutagenicidad inducida en la cepa TA100 de *S. typhimurium* por el insecticida Gusatión sin activación y con activación metabólica por *Vicia faba*. El Gusatión de manera directa no tiene efecto mutagénico, pero al ser metabolizado por la fracción enzimática S10, la frecuencia de mutación reversa se incrementa considerablemente (F= 102.499 con un valor de $P < 0.001$).

El promedio de las colonias revertantes que resultan de la mutagenicidad inducida en las cepas TA98 y TA100 de *S. typhimurium* por el insecticida Metamidofos (Tamarón), se muestra en las figuras 11 y 13.

El Metamidofos evaluado en ambas cepas (cuadro 4) no indujo mutaciones de manera directa ni al adicionar la mezcla S10 de *Vicia faba* (F= 19.74 con un valor de $P > 0.001$).

DISCUSIÓN

Las plantas superiores son reconocidas como excelentes indicadores de genotoxicidad, por tal razón son utilizadas en bioensayos para el monitoreo *in situ* (Latuzka *et al.* 2003) y para la detección de mutágenos ambientales (Grant 1999). Asimismo, son recomendables por el bajo costo de mantenimiento, equipamiento, insumos y cuidados. Por otro lado, permiten trabajar fácilmente con meristemos y tejidos reproductores para analizar efectos asociados a modificaciones en la dinámica del ciclo celular o de la meiosis, así como detectar alteraciones cromosómicas producto del efecto directo de diferentes agentes sobre el ADN ó proteínas asociadas al mismo. Los datos son comparables a los obtenidos con animales (Wulff y Andrioli 2006) y se ha demostrado una correlación positiva entre los resultados encontrados en plantas y en humanos, lo que indica que los resultados del monitoreo citogenético en plantas puede ser extrapolado al hombre (Boturina *et al.* 2001).

El conteo total de proteínas de la mezcla S10 prueba que la cantidad de proteínas contenidas es considerable y eficiente para realizar los ensayos de mutagenicidad correspondientes. Comprobar la presencia de enzimas peroxidasas es importante, ya que éstas en los sistemas vegetales son las principales enzimas involucradas en el mecanismo de activación de compuestos (Plewa y Wagner 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995). Las plantas al igual que el ser humano se encuentran expuestas continuamente a sustancias potencialmente tóxicas, su capacidad para bioconcentrar compuestos del ambiente y activar promutágenos en metabolitos tóxicos es significativa si se considera la gran variedad de xenobióticos a los que están expuestas (Plewa *et al.* 1993, Coleman *et al.* 1997). Las plantas sembradas, principalmente para consumo humano, representan un factor de alto

riesgo para la salud, especialmente si son asperjadas con compuestos como los plaguicidas. La contaminación del ambiente por este tipo de sustancias se da por aplicaciones directas en los cultivos agrícolas, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y residuos descargados y disponibles en el suelo. Los restos de estos plaguicidas se dispersan en el ambiente y se convierten en contaminantes para los sistemas bióticos (animales y plantas principalmente) y abióticos (suelo, aire y agua) amenazando su estabilidad y representando un peligro de salud pública (Ortiz-Hernández *et al.* 1997).

El estudio de los efectos de los plaguicidas en el material genético tiene un papel fundamental para la prevención y el tratamiento de problemas que a corto, mediano o largo plazos el hombre enfrentará, dado que son productos con auge en el mercado y de importancia para actividades económicas, principalmente la agricultura. Para evaluar las características genotóxicas de los agentes químicos y sus metabolitos se utilizan diferentes sistemas biológicos, que se ponen en contacto directo con el plaguicida o son sometidos a extractos vegetales conteniendo el agente químico (*in vivo*) o también en coinubación con un homogeneizado vegetal o en un cultivo de células del tejido de la planta (*in vitro*) (Plewa y Gentile 1982, Takehisa *et al.* 1982, Plewa y Wagner 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995).

Un ejemplo de éstos son los estudios realizados en presencia de extractos de *V. faba* con linfocitos humanos tratados con insecticidas carbámicos (Calderon-Segura *et al.* 1999) que demuestran la activación metabólica de plaguicidas por éste tipo de extractos.

Con relación a la genotoxicidad se han establecido pruebas citogenéticas rápidas y sensibles para detectar la inducción de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) así

como alteraciones en la cinética de proliferación linfocitaria (CPL) y en los índices mitóticos (IM) y de replicación (IR) (Latt 1973, 1974, Kato 1977, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura y Espinosa-Ramírez 1998).

La respuesta mutagénica diferencial de *Salmonella typhimurium* al metabolismo vegetal para las cepas TA100 y TA98, ha sido demostrada en ensayos de coincubación célula vegetal microorganismo (Gómez-Arroyo *et al.* 2007).

El proceso de la actividad celular, donde la expresión o la represión de los genes estimulan su activación y progresión, se ha tomado como un criterio importante en la evaluación genotóxica de los agentes químicos (Sandermann 1988, Pagano *et al.* 1992). Los resultados sobre el efecto de algunos plaguicidas, entre los que se encuentra el Gusatión, en estudios *in vitro* y en personas expuestas, han demostrado que provocaron el retraso en el ciclo de proliferación celular y la disminución en el índice mitótico (Sobti *et al.* 1982, Rupa *et al.* 1991).

La actividad metabólica de *V. faba* tanto *in vivo* como *in vitro* fue evidente por el incremento en la mutagenicidad producida por ambos testigos positivos (4-NOP y 2-AF) en las dos cepas al ser transformados por el haba.

En el presente estudio en la cepa TA98, el Gusatión aplicado directamente en el ensayo de Ames, no provocó efectos pero fue tóxico a concentraciones altas inhibiendo el crecimiento de fondo. Al incluir el metabolismo, la frecuencia de mutación reversa se incrementó significativamente. Ésto coincide con un análisis realizado en células de cultivo de linfocitos humanos (CLH), el cual mostró que el Gusatión activado metabólicamente por la fracción S10 de *V. faba*, disminuye los índices mitóticos (IM) y de replicación (IR), hasta inhibir la mitosis. La frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas ICH en CLH

tratados con Gusatión aumenta significativamente, mientras que aplicado de manera directa no tiene efectos significativos en IM, IR e ICH. Los resultados evidenciaron que el Gusatión es genotóxico y citotóxico, además de ser un promutágeno activado por *V. faba*. (Andrade 2001).

Con la cepa TA100, los resultados fueron muy similares a los obtenidos para la TA98.

En reportes previos (Gómez-Arroyo *et al.* 1988) se observó el daño que el plaguicida Gusatión produce en los meristemas de la raíz en *V. faba* y el decremento en el índice mitótico.

El Gusatión aplicado directamente en la cepa TA100, no provocó efecto, pero al incluir el metabolismo, la frecuencia de mutación reversa se incrementó significativamente $F= 127.64$ con un valor de $P > 0.001$.

Esto podría explicarse por la acción de los compuestos aromáticos presentes en su molécula y por efecto de las peroxidasas que catalizan la oxidación de fenoles y otros compuestos aromáticos y los transforman en compuestos fenólicos y radicales libres (principalmente grupos alquilo), los cuales están relacionados a la degradación de las desoxirribosas en el ADN, la abstracción de hidrógeno del ADN produce rompimiento o ligaduras cruzadas de las cadenas y la producción de agentes desaminantes, en particular el ácido nitroso HNO_2 , o compuestos que pueden dar lugar a la formación metabólica del ácido nitroso o nitritos y agentes alquilantes, que transfieren grupos metilo y etilo de los reactivos a las bases nitrogenadas del ADN y lo hacen más susceptible a alteraciones en el mecanismo de apareamiento de bases, lo que favorece nuevas mutaciones y la metilación que participan reparando directamente o interviniendo en el sistema de reparación de las

mutaciones, en este caso por corrimiento de marco de lectura y sustituciones de pares de bases (Starr *et al.* 2004).

Algunos estudios han corroborado la correlación importante de los compuestos fenólicos con la mutagenicidad en las cepas TA97, TA98, TA100 y TA102 de *S. typhimurium*, así como de otros compuestos aromáticos policíclicos en ensayos de mutagenicidad con la fracción animal S9 en estudios de calidad de aire con presencia de este tipo de compuestos (Franke-SIR *et al.* 2004, Amador-Muñoz *et al.* 2001).

Los resultados obtenidos con las cepas TA100 y TA98 en el presente trabajo muestran que es posible considerar al plaguicida organofosforado Gusatión como un compuesto mutagénico con activación metabólica vegetal y el incremento en la mutagenicidad sugiere que actúa como un promutágeno.

El Metamidofos no indujo efecto mutagénico de manera directa ni indirecta $F=21.257$ con un valor de $P > 0.001$ en ninguna de las cepas. Se ha observado en otros estudios que el Metamidofos no es mutágeno en ensayos con las cepas TA1537, TA1538, TA98 y TA100 de *S. typhimurium* (Machadao *et al.* 1982). No hay indicaciones de oncogenicidad en ratones, ni se han observado aberraciones cromosómicas en células de médula ósea (IPCS 1993). Estos estudios junto con el presente sirven como evidencia de que el plaguicida Metamidofos en un amplio rango de concentraciones no es mutagénico y tampoco un promutágeno activado por el metabolismo vegetal.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo aunados a la revisión de la literatura permiten concluir lo siguiente:

Es posible evaluar la activación de promutágenos a mutágenos a partir de sistemas metabólicos en plantas mediante el ensayo de Ames

El aumento significativo de colonias revertantes en las placas, aunado a la acción citotóxica mostrada por Gusatión, al provocar muerte celular a concentraciones elevadas, muestran que la raíz de *Vicia faba* es un biomonitor de daño genotóxico de plaguicidas promutagenos y que Gusatión es genotóxico en todas las concentraciones probadas y citotóxico a altas concentraciones, además de ser un promutágeno activado por *V. faba* en las cepas TA98 y TA100. Esto demuestra que dicho compuesto induce las mutaciones por corrimiento de marco de lectura y por sustitución de pares de bases, mecanismos característicos de las dos cepas, respectivamente.

El plaguicida organofosforado Metamidofos no es mutagénico por sí solo y tampoco sus metabolitos, al ser transformado por el metabolismo vegetal (mezcla S10 de *V. faba*). Estos resultados fueron similares para las cepas TA98 y TA100.

Gusatión es un plaguicida que es asperjado en nuestro país de manera irracional en los cultivos y bajo condiciones inapropiadas de protección por lo que la posibilidad de ser transformados de promutagenos a mutágenos representa un riesgo para la salud de animales y del ser humano.

El problema más serio con el cual se enfrentan países como México, son las limitaciones presupuestarias y la dependencia económica de los países desarrollados, por lo cual se utilizan plaguicidas que ya están prohibidos en los países productores, pero que por su menor precio son los únicos que se pueden adquirir.

La agricultura requiere una gran modernización, pero no solamente en el aspecto de la mecanización, sino también en lograr la producción de alimentos con otras técnicas más naturales basadas en la aplicación de la agroecología en reemplazo de los agroquímicos.

Solo creando una nueva conciencia más humana y menos ligada al simple balance económico se lograrán mejoras para la humanidad y su ambiente.

REFERENCIAS

- Aizpuru I., Aseginolaza C., Uribe-Echebarría P.M., Urrutia P. y Zorrakin I. (1999). Claves ilustradas de la Flora del País Vasco y Territorios Limítrofes. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz.
- Albert, L. A. (1988). Curso básico de toxicología ambiental. Editorial Limusa, México, pp.311-314
- Amador-Muñoz O., Delgado-Rodríguez A., Villalobos-Pietrini R., Munive-Colín Z., Ortiz-Martelo R., Díaz-González G., Bravoi-Cabrera J.L. y Gómez-Arroyo S. (2001). Partículas suspendidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el suroeste de la ciudad de México. Rev. Int. Contam. Ambient. 17: 193-204.
- Ames B.N., Lee F.D. y Durston W.E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogénesis. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70: 782-786.
- Andrade L. S. (2001). Evaluación del efecto genotóxico del insecticida organofosforado Metil Azinfos (Gusatión) en cultivo de linfocitos a través del metabolismo de *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Bismuth C. (1987). Toxicologie Clinique. París: Medecine-Sciences-Flammarion, 52.1.2: 413-21
- Burger M. (1995) Plaguicidas. En: Fogel E. (Ed.). Patología Toxicológica. Montevideo: Oficina del Libro, pp. 171-85.
- Boturina A.K., Kalaev V.N. y Karpova S.S. (2001). Cytogenetic damage of human somatic cells and weeping birch cells in Voronezh Districts with different levels of anthropogenic pollution. Russian J. Ecol. 33: 413–416.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of the microgram quantities utilizing the principle of protein-die binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Burger M. (1995). Plaguicidas. En: Fogel E. (Ed.). Patología Toxicológica. Montevideo, Oficina del Libro, pp. 171-85.
- Calderón-Segura M.E. y Espinosa-Ramírez M. (1998). Efecto de butilate y de molinate sobre la división de los linfocitos humanos en cultivo con y sin activación metabólica *in vivo* e *in vitro* por *Vicia faba*. Rev. Int. Contam. Ambient. 14: 39-47.
- Calderón-Segura M. E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini, R. y Espinosa-Ramírez M. (1999). *In vivo* and *in vitro* promutagen activation of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. Mutat. Res. 438: 81-88.
- Campbell R. (1987). Ecología Microbiana. Limusa, México, 268 p.

- Chapalamadugu S. y Chaudhry G. (1992). Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphate. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12: 357-389.
- Chiapella C., Ysern P., Riera J. y Llagostera M. (1995). A plant metabolic activation system from *Persea americana* with cytochrome P450-dependent peroxidase activities. *Mutat. Res.* 329: 11-18.
- Chung F., Xu Y., Ho C., Desai D. y Han C. (1992) Protection against tobacco specific, nitrosamine-induced tumorigenesis by green tea and its components en: Phenolic Compounds in Food and their Effect on Health: II A nalysis, ocurrente and Chemysry. Ho C., Lee C. Y. y Huang M. (Eds). American Chemical Society, Washington, DC, PP. 284-291.
- Carrasco P. (1981) La sociedad mexicana antes de la conquista, Daniel Cosío Villegas y otros. *Historia General de México*, 3º ed. México, COLMEX. v. I, pp. 165-268.
- Coleman J.O.D., Mechteld M. A., Kalf B. y Davies T. E. G. (1997). Detoxification by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant. Sci.* 24: 144-155.
- Córdoba D. (1986) Inhibidores de colinesterasas. *Toxicología (Colombia)* 5: 83-112.
- Cortés- Eslava J. (1993) Evaluación del daño mutagénico provocado por los insecticidas organofosforados foxim y metil azinfos en *Salmonella typhimurium* a través del metabolismo vegetal. Tesis de Maestria en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Cortés- Eslava J., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinoza-Aguirre J.J. (2004). Antimutagenicity of coriander (*Coriandrum sativum*) juice on the mutagenesis produced by aromatic amines activated by coriander whole cells. *Toxicol. Lett.* 153: 283-292.
- Cremlyn R. (1979). *Pesticides, Preparation and Mode of Action*. John Wiley, Nueva York, 360 p.
- Cremlyn R. (1990). *Plaguicidas Modernos y su Acción Bioquímica*. Limusa, México, 356 p.
- DGEIE (Dirección General de Estadística Informática y Evaluación) (1995). *Informe Anual Agrícola*. México.
- EPA (Environmental Protection Agency) (1980). Sixth report of the Interagency Testing Committee to the Administrator, Receipt of the Report and Request for Comments Regarding Priority List of Chemicals, *Federal Register* 45, p.p. 35897-35910.
- Estrada M. (1998). *Uso moderado de plaguicidas en México*. Memorias, Ciclo de Conferencias "Hacia una renovación ambiental en México". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (1996). *Directrices para la eliminación de grandes cantidades de plaguicidas en desuso en los países en desarrollo*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.

- Fernández G. (1970) Intoxicación por plaguicidas. Montevideo. Monteverde. 27: 211-83.
- Fest C. y Schmidt K.J. (1973). The chemistry of organophosphorus pesticides. Springer Verlag, Berlin.
- Flores-Maya S., Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M. E., Villalobos-Pietrini R., Waliszewski S.M., Gómez de la Cruz L. (2005). Promutagen activation of triazine herbicides metribuzin and ametryn through *Vicia faba* metabolism inducing sister chromatid exchanges in *Vicia faba* root tip meristems. Toxicol In Vitro 19; 243-251.
- Forgash A. J. (1984). History, evolution and consequences of insecticide resistance. Pestic. Biochem. Physiol. 22: 178-186
- Franke SIR, Ckless K, Silveira JD (2004) Estudio de la Actividad Antioxidante y Mutagénica de Diferentes Jugos de Naranja. Nutri. Argentina 88(1):45-55.
- Fukuto T. R. (1971). Relationship between the structure of organophosphorus compounds and their activity as acetylcholinesterase inhibitors. Bull WHO 44: 31.
- Fukuto T. R. (1979). Effect of structure on the interaction of organophosphorus and carbamate esters with acetylcholinesterase. En: Narahashi T. (Ed.) Neurotoxicology of Insecticides and Pheromones. Plenum Press, Nueva York, pp. 277-295.
- Garrabou R., Barciela C. y Jiménez Blanco J.I. (1985). Historia agraria de la España contemporánea 3. El fin de la agricultura tradicional (1900-1960), Crítica, Barcelona, pp. 230-279.

- Gentile J.M., Gentile G.J., Bultman J., Sehriest R., Wagner E.D. y Plewa M.J. (1982). An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* 101: 19-29.
- Gentile J.M., Gentile G.J. y Plewa M.J. (1986). *In vitro* activation of chemicals by plants: a comparison of techniques. *Mutat. Res.* 164: 53-58.
- Gichner T., Cabrera L. G., Wagner E. D. y Plewa M.J. (1994). Induction of somatic mutations in *Tradescantia* clone 4430 by three phenylendiamine isomers an the mutagenesis mechanism of diethylditiocarbamate and ammonium metavanadate. *Mutat. Res.* 316: 164-172.
- Gómez-Arroyo S., Castillo-Ruíz P., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini R. (1988) *Vicia faba*-Sister chromatid exchanges of the organophosphorus insecticidas Metil parathion, dimethoate, oxydemeton Metil, azinphos Metil and phoxim. *Citología* 53: 627-634.
- Gómez-Arroyo S., Rodríguez M. L. y Villalobos Pietrini R. (1992). Chromosomal alterations induced by the thiocarbamate herbicide molinate (ordram) in *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8: 77-80.
- Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M.E. y Villalobos-Pietrini R. (1995). Sister chromatid exchanges in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutagen.* 26: 324-330.

Gómez Arroyo S. y Villalobos-Pietrini R. (1995). Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. En: Butterworth F.M., Corkum L. D. y Guzmán- Rincón J. (Eds.). *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, Nueva York, pp. 95-113.

Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M.E. y Villalobos-Pietrini R. (2000). Biomonitoring of pesticides by plants: an assay based on the induction of sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures and on the promutagen activation by *Vicia faba*. En: Butterworth F.M., Gunatilaka A. and Gonsheff Bonaparte M.E. (Eds.). *Biomonitoring and biomarkers as indicators of Environmental Change*. Vol. 2, Plenum Press, Nueva York, pp. 439-455.

Gómez-Arroyo S., Cortés-Eslava J., Villalobos-Pietrini R., Calderón-Segura M. E., Flores-Márquez A. R. y Espinoza-Aguirre J. J. (2007). Differential mutagenic response of *Salmonella typhimurium* to the plant-metabolized organophosphorous insecticides, phoxim and azinphos methyl. *Toxicol. In Vitro*. 21: 950-955

Gow J.S. (1988). Introduction. En: Richardson M.L. (Ed.) *Risk assessment of chemicals in the environment* Royal Society of Chemistry, Burlington House, Londres, p. 3.

Grant W.F. (1999). Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res*. 426: 107-112.

- Grover R. y Cessna A. J. (1991). Environmental Chemistry of Herbicides. Vol II. CRC. Press, Boca Ratón, Florida, pp. 120-135.
- IPCS. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (1993) Health and Safety Guide No. 79: Methamidophos., IPCS/Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
- Kato H. (1977). Spontaneous sister chromatid exchanges detected by BrdU labelling method. Nature 251: 70-72.
- Latt S. A. (1973). Microfluorometric detection of DNA replication in human metaphase chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.A.) 70: 3395-3399.
- Latt S.A. (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71: 3162-3166.
- Latuzka J.R., Stapulionyte A., Bjerketvedt D.K. y Odland A. (2003). Seasonal variation in the frequency of abnormal anaphases and mitotic index values in wild populations of herb-Paris (*Paris quadrifolia* L., Trilliaceae): implications for genetic monitoring. Mutat. Res. 534: 113-122.
- Ledesma M. J. y Delgado P. (1994). Predicción de la exposición a productos fitosanitarios. Salud y Trabajo 103: 12-19.
- McCann J. y Ames B.N. (1976). Detection of carcinogenesis as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73: 950-954.

- McCann J. y Ames B.N. (1977). The *Salmonella*/microsome mutagenicity test: predictive value for animal carcinogenicity. En: Hiatt H.H., Watson J.D. y Winsten J.A. (Eds.). Origins of human cancer. Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 1431-1450.
- Machadao, M.L., Parker, J.A., & Wong, Z.A. (1982) Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test (Ames test) with Monitor(R) technical. Reporte social sin publicar 1711 de Environmental Health & Toxicology, Chevron. Submitted to WHO by Bayer F.R.G.
- Maluszynska J. y Juchimiuk J. (2005). Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. J. Plant Genotox. 56: 177-184.
- Maron D.M. y Ames B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat. Res. 113: 137-217.
- Martínez A., Pedrol N. y Piñeiro J. (2005a). Cultivares de haboncillo (*Vicia faba* L.) y triticale (*Triticosecale* Wittm.) para producción de forraje invernal en zonas húmedas con mezclas cereal-leguminosa. En: Producciones agroganaderas: gestión eficiente y conservación del medio natural. Actas de la XLV Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos, pp. 673-679.

- Martínez A., De La Roza B., Soldado A. y Argamentería, A. (2005b). Evaluación de producción y valor nutritivo de las habas forrajeras como alternativa al raigrás italiano utilizadas como cultivo de invierno en rotación con el maíz. En: Producciones agroganaderas: gestión eficiente y conservación del medio natural. Actas de la XLV Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos, pp. 681-688.
- Mortelmans K. y Zeiger E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455: 29-60.
- Niedziela L. S., Shi X., Nath J. y Ong T. (1991). Studies on three structurally related phenylendiamines with the mouse micronucleous assay system. *Mutat. Res.* 259: 43-48.
- NIOSH. (Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional) (1983). Registry of Toxic Effects of Chemical Substances. Vol.3, p.127.
- Ortega C., Espinosa T. y López C. (1994). El Control de riesgos para la salud generados por plaguicidas organofosforados en México: Retos ante el Tratado de Libre Comercio. *Salud Pública de México INSP.* 36: 624- 632.
- Ortiz-Hernández M., Sánchez-Salinas E., Vázquez-Duhalt R., y Quintero- Ramírez R. (1997). Plaguicidas organofosforados y ambiente. *Biotecnología. México.* 3: 129-151.
- Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W. y Draetta P. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO. J.* 11: 961-971.

- Perry P. y Searle C. (1977). Introduction of sister chromatid exchange in Chinese hamster cells by the hair dye constitutes 2-nitro-o-phenylenediamine and 4-nitro-o-phenylenediamine. *Mutat. Res.* 56: 207-210.
- Plewa J. M. (1978). Activation of chemical into mutagen by green plants. A preliminary discussion. *Environ. Health Perspect.* 27: 45-50.
- Plewa M.J. y Gentile J.M. (1982). The activación of chemicals into mutagens by green plants. En: De Serres F.J. y Hollaender A. (Eds.). *Chemical Mutagens.Principles and Methods for their Detection.* Plenum Press, Nueva York, Vol 7, pp. 401-423.
- Plewa J. M., Weaver D. L., Blair L. C. y Gentile J. M. (1983) The activation of 2-aminofluorene by cultured plant cells. *Science* 219: 1427-1429.
- Plewa J. M., Wagner D. E., Gentile J. G. y Gentile M. J. (1984). An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutat. Res.*136: 233-245.
- Plewa J.M., Wagner D.E. y Gentile M. J. (1988). The plant cell/microbe coinubation assay for the analysis of plant activated promutagens. *Mutat. Res.*197: 207-219.
- Plewa M.J. y Wagner E. D. (1993) Activation of promutagens by green plants. *Annu. Rev. Genet.* 27: 93-113.
- Pollution Inventory (2007). The Environmental Agency. Inglaterra y Gales, 12 p.
- Reed G. (1975). *Enzymes in food processing.* 2 ed. Academic Press. Lóndres, 573 p.

- Robledo N. (1998). Análisis de residuos de plaguicidas en hortalizas. Memorias, Ciclo de Conferencias "Hacia una renovación ambiental en México". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca Morelos, México.
- Rupa D. S., Reddy P. P., Sreemannarayana K. y Reddi O. S. (1991). Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. *Environ. Molec. Mutagen.* 18: 136-138.
- Sandermann H. Jr. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.* 197: 183-194.
- Sandermann H. Jr., Arjmad M., Gennity I. y Winker R. (1990). Animal bioavailability of defined xenobiotic lignin metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1877-1880.
- Schmidt-Hebbel H., Pennacchiotti L., Masson L. y Mella M. A. (1990). "Tabla de Composición Química de los Alimentos Chilenos". Edit. Universitaria 8 Ed. p. 15.
- Secretaria de Salubridad y Asistencia (1974). El Tratamiento de las intoxicaciones por plaguicidas. Parte I. Consejo Nacional de Prevención de Accidentes, p.18. México.
- Shaw I. C. y Cadwick J. (1998). Principles of environmental toxicology. CRC Press. 216 p.
- Shimabukuro R. H., Lamoreux G. L. y Frear F. S. (1981). Pesticide metabolism in plants: principle and mechanisms. En: Matsumura F. (Ed.). *Biological Degradation of Pesticides*. Plenum Press, Nueva York, pp. 123-145.

- Sobti R.C., Krishna 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.
- Starr C., Taggart R., Aguilar T. y Starr L. (2004). *Biología: La unidad y diversidad de la vida*. Cengage Learning Editores., pp 234-236.
- Sultatos L. G. (1994). Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health* 43: 271-289.
- Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. (1982). Induction of SCEs in CHO cells by extracts from *Vicia faba* roots exposed to ethanol. *Mutat Res* 105: 169-174.
- Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. (1988). Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on the induction of sister chromatids exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 197: 195-205.
- Tomlin C. (1994). *The Pesticide Manual: A World Compendium*. (10th ed.), British Crop Protection Council, Surrey. Reino Unido, pp. 123-140.
- Valkova I., Vracko M. y Basak S.C. (2004). Modeling of structure mutagenicity relationships: counter propagation neural network approach using calculated descriptors. *Anal. Chim. Acta* 509: 179-186.
- Ware G. W. (2000). *The pesticide book*. 5^a edición, Thomson Publications. Nueva York, pp. 1-415.

- Wulff A. y Andrioli N. (2006). Evaluación del daño genético en modelos vegetales. Capítulo 2. Genética Toxicológica. Mudry M.D. y Carballo M.A. (Eds.). Editorial De los Cuatro Vientos. Buenos Aires, 669 p.
- Ysern P., Riera J., Sitjes J. y Llangostera M. (1993). Activation of 4 nitro-o-phenylendiamine by the S2 fraction of *Zea mays* to mutagenic product(s). *Mutat. Res.* 312: 25-31.
- Zeiger E., Pagano D.A. y Robertson I.G.C. (1981). A rapid and simple scheme for confirmation of *Salmonella* tester strain phenotype. *Environ. Mutagen.* 3: 205-209.

CUADROS

Cuadro 1. DL₅₀ ORAL AGUDA EN RATA DE ALGUNOS INSECTICIDAS, COMPARADOS CON ORGANOSFORADOS (tomado de Ortega *et al.* 1994).

Producto	DL ₅₀ OA(mg kg ⁻¹ de rata)
Cianuro de sodio	10
Avermectina	10
Sulfato de nicotina	50-91
Cipermetrina	247
Organofosforados	
TEPP	1-2
Mevinfos	4-7
Paratión	7
Paratión metílico	9-42
Diazinón	108-250
Fentión	225-740
Malatión	885-2800
Stirofos	1125-4000

Cuadro 2. TOXICIDAD ORAL AGUDA DE INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS (tomado de Ortega *et al.* 1994)

Producto	DL ₅₀ OA (mg kg ⁻¹ de rata)	Producto	DL ₅₀ OA (mg kg ⁻¹ de rata)
TEPP	1-2	Clorpirifos	82-245
Diemefox	1-5	Fentión	255-740
Forato	1-5	Dimetoato	250-500
Disulfotón	2-12	Naled	250-430
Mevinfos	4-7	Triclorfon	430-630
Paratión etílico	7	Fenitrotión	250-740
Fonofos	8-16	Malatión	885-2800
Azinfos metílico	11-16	Temefos	1000-13000
Monocrotofos	18-21	Foxim	1891-2077
Paratión metílico	25-50	Clorfoxim	> 2500
Dicrofos	16-150	Stirofos	4000-5000
Diazinón	66-200		

Cuadro 3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN S10 DE *Vicia faba* INCUBADA DURANTE 48 HORAS CON LOS PLAGUICIDAS GUSATIÓN Y METAMIDOFOS.

Fracción S10 de <i>Vicia faba</i> ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Contenido total de proteínas	Actividad peroxidasa ^a	Contenido total de proteínas	Actividad peroxidasa ^a
	^a total $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	nM de tetraguaiacol/min/ μg de proteína	^a total $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	nM de tetraguaiacol/min/ μg de proteína
	Antes de la incubación		Después de la incubación (48 h)	
Sin tratamiento S10	3.63 ± 0.18	0.065 ± 0.08	3.43 ± 0.12	0.056 ± 0.04
Metamidofos				
1	3.56 ± 0.12	0.043 ± 0.07	3.51 ± 0.17	0.039 ± 0.03
100	3.44 ± 0.16	0.042 ± 0.02	3.42 ± 0.25	0.042 ± 0.07
5000	3.58 ± 0.10	0.038 ± 0.09	3.50 ± 0.13	0.043 ± 0.08
Gusatión				
5	3.52 ± 0.23	0.061 ± 0.08	$1.68 \pm 0.42^*$	$0.126 \pm 0.09^*$
40	3.46 ± 0.13	0.054 ± 0.07	$1.23 \pm 0.14^*$	$0.178 \pm 0.06^*$
100	3.34 ± 0.11	0.061 ± 0.04	$1.34 \pm 0.24^*$	$0.149 \pm 0.09^*$

* Diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos, obtenido por análisis de varianza, para el contenido total de proteínas: $F_{\text{metamidofos}} = 435.61$, $F_{\text{gusatión}} = 462.46$, para actividad peroxidasa: $F_{\text{metamidofos}} = 132.13$, $F_{\text{gusatión}} = 58.76$, posteriormente se aplicó el análisis de comparación múltiple Student-Newman-Keuls, $P < 0.0001$.

^a Media de tres experimentos \pm error estándar

Cuadro 4. MUTAGENICIDAD INDUCIDA EN LAS CEPAS TA98 Y TA100 DE *Salmonella typhimurium* POR LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS GUSATIÓN Y METAMIDOFOS SIN Y CON ACTIVACIÓN METABÓLICA POR *Vicia faba*.

	Revertantes por placa ^a			
	TA98		TA100	
Testigo negativo µg/µl	(sin metabolismo)	(con metabolismo)	(sin metabolismo)	(con metabolismo)
	27 ± 4	49 ± 4	148 ± 14	173 ± 11
Testigo positivo				
NOP ^b	659 ± 74*	1685 ± 102*	274 ± 9*	413 ± 18*
2-AF ^c	185 ± 17*	1642 ± 30*	237 ± 02	1517 ± 21*
Tratamientos µg/µl				
Metamidofos				
1	38 ± 5	42 ± 5	164 ± 21	154 ± 08
10	21 ± 2	32 ± 2	126 ± 06	145 ± 13
100	25 ± 3	27 ± 2	114 ± 12	144 ± 06
1000	18 ± 3	28 ± 3	134 ± 08	146 ± 17
5000	19 ± 2	19 ± 2	116 ± 05	166 ± 02
Gusation				
20	19 ± 5	122 ± 31*	79 ± 05	144 ± 06
40	18 ± 4	226 ± 13*†	167 ± 04†	193 ± 03*†
80	19 ± 3	494 ± 24*†	183 ± 13†	314 ± 02*†
100	17 ± 2	492 ± 10*†	165 ± 02†	312 ± 21*†
200	18 †	9 †	114 ± 08†	409 ± 16*†

† Toxicidad

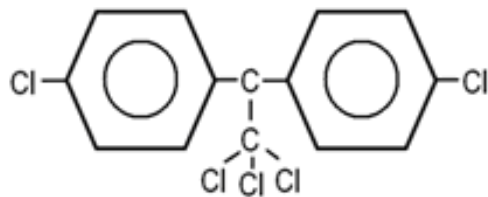
* Diferencias significativas entre el control y los tratamientos, obtenido por análisis de varianza, para TA98: $F_{\text{metamidofos}} = 19.74$, $F_{\text{gusación}} = 102.499$, en el caso de TA100: $F_{\text{metamidofos}} = 21.257$, $F_{\text{gusación}} = 127.64$, posteriormente, se aplicó el análisis de comparación múltiple Student-Newman-Keuls, $P < 0.0001$

^a Media de colonias revertantes obtenida de tres experimentos independientes ± error estándar.

^b NOP, 4-nitro-*o*-fenilendiamina

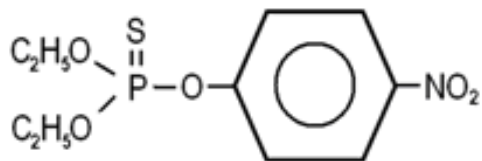
^c 2-AF, 2- aminofluoreno

FIGURAS



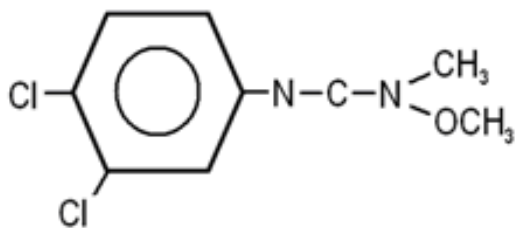
ORGANOCLORADO

Fórmula química del DDT



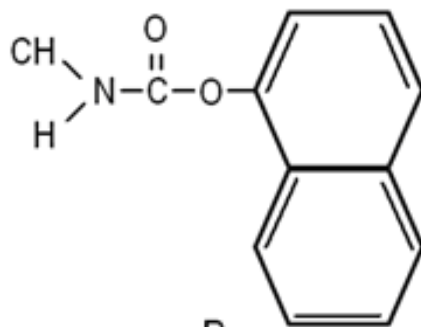
ORGANOFOSFORADO

Fórmula química del Paratión



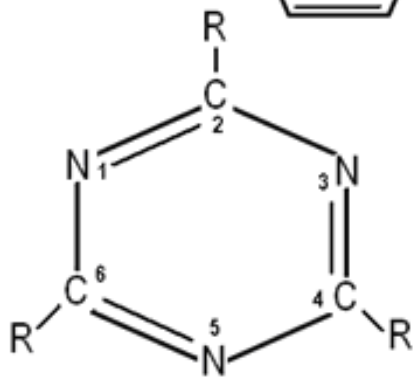
DERIVADO DE LA UREA

Fórmula química del Linurón



DERIVADO DEL ÁCIDO CARBÁMICO

Fórmula química del Sevin



FÓRMULA GENERAL DE TRIAZINAS

Fig. 1. Estructura química de algunos tipos de plaguicidas

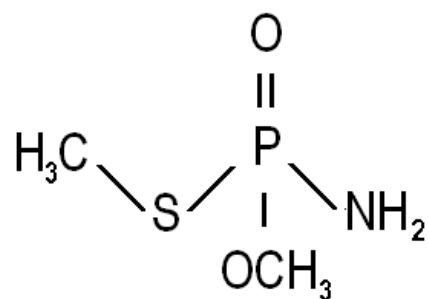


Fig. 2. Fórmula química de Metamidofos ó Tamarón

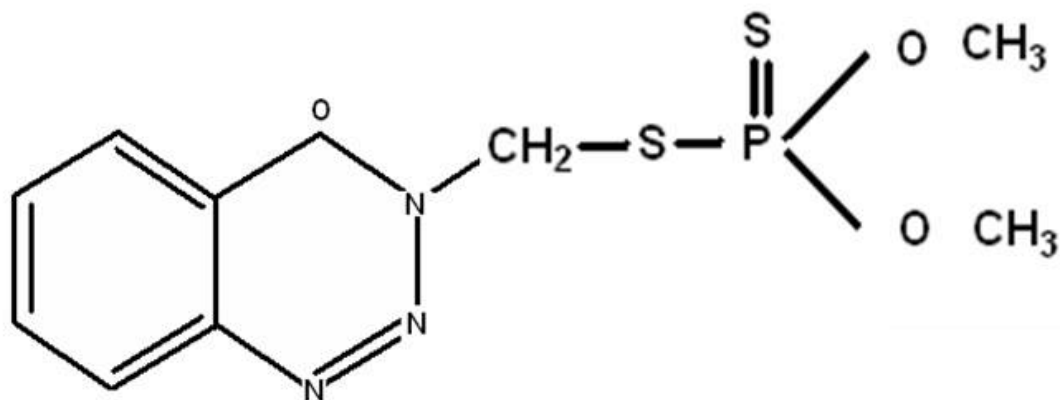


Fig. 3. Fórmula química de Metil Azinfos ó Gusatión

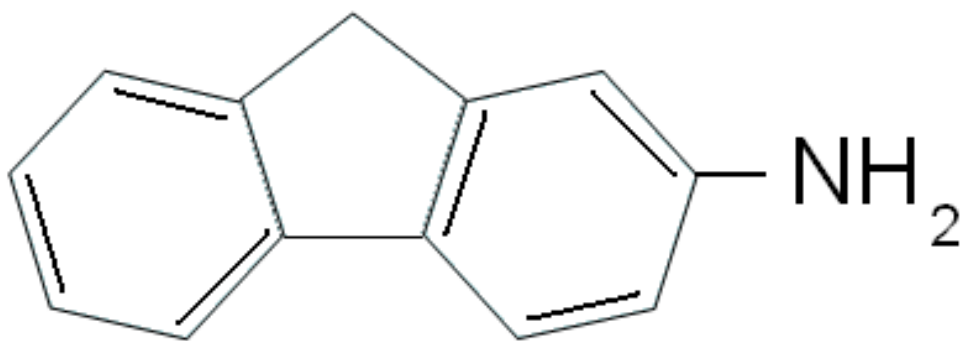


Fig. 4. Estructura de la amina aromática 2- aminofluoreno.

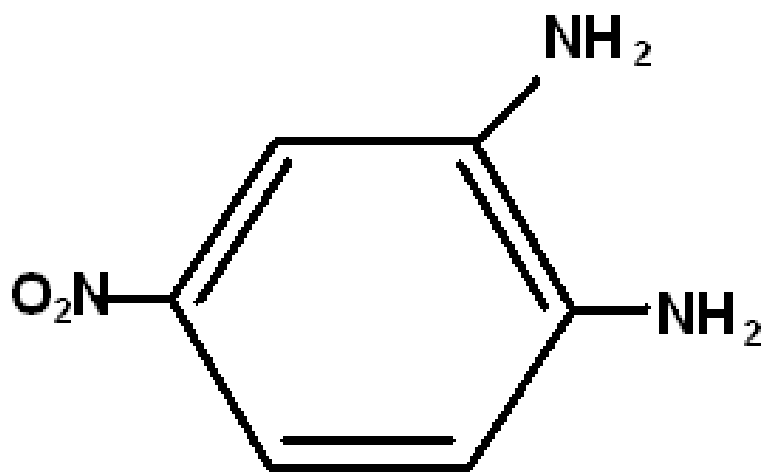


Fig. 5. Estructura química de la amina aromática 4-nitro-o-fenilendiamina.

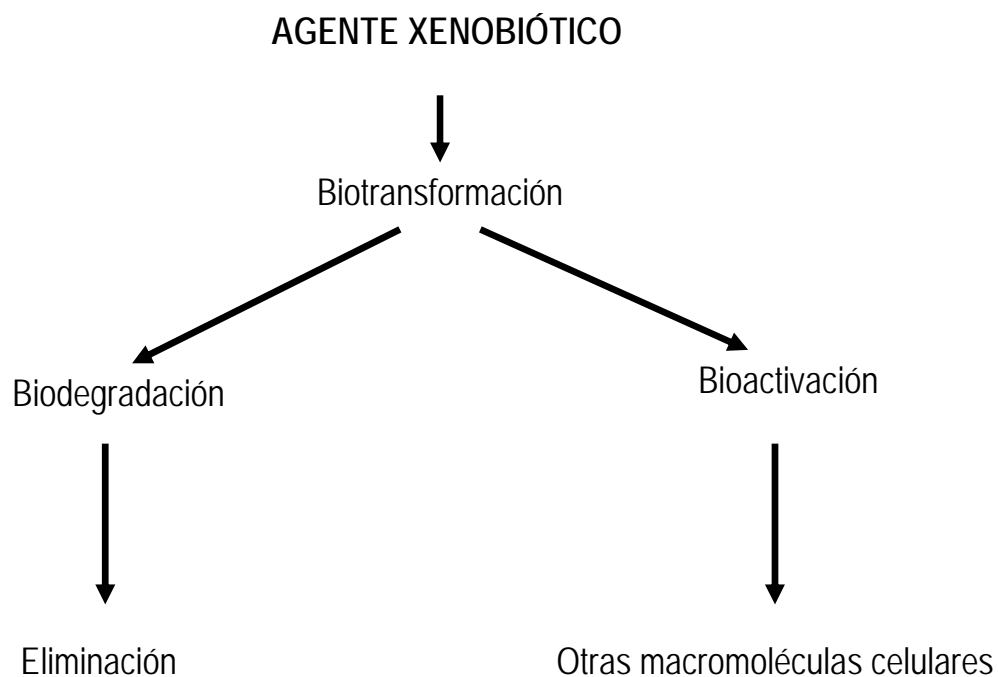


Fig. 6. Esquema de la biotransformación metabólica (tomado de Albert 1988).

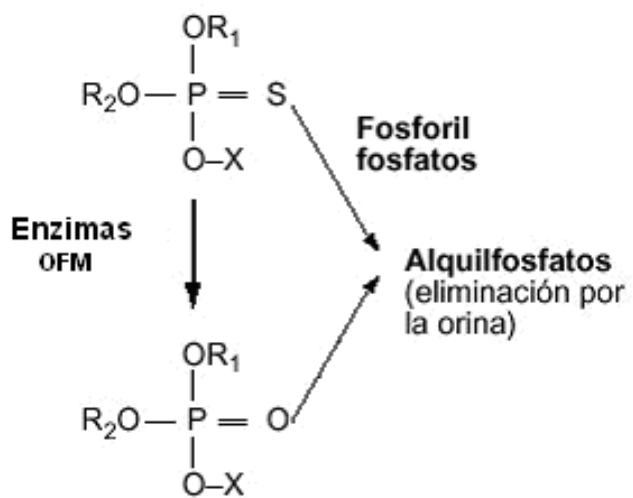


Fig. 7. Esquema elemental del metabolismo de los organofosforados, papel de la OFM (oxigenasa de función múltiple) y transformación final en alquilfosfatos (tomado de Albert 1988).

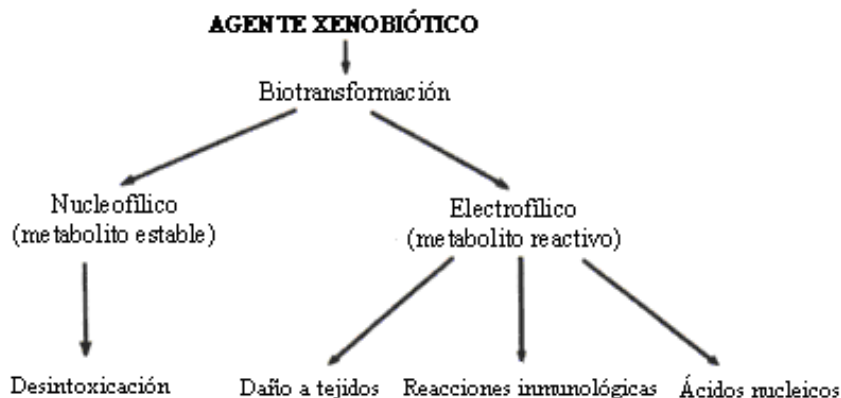


Fig.8 La biotransformación de agentes xenobióticos (tomado de Albert 1988).

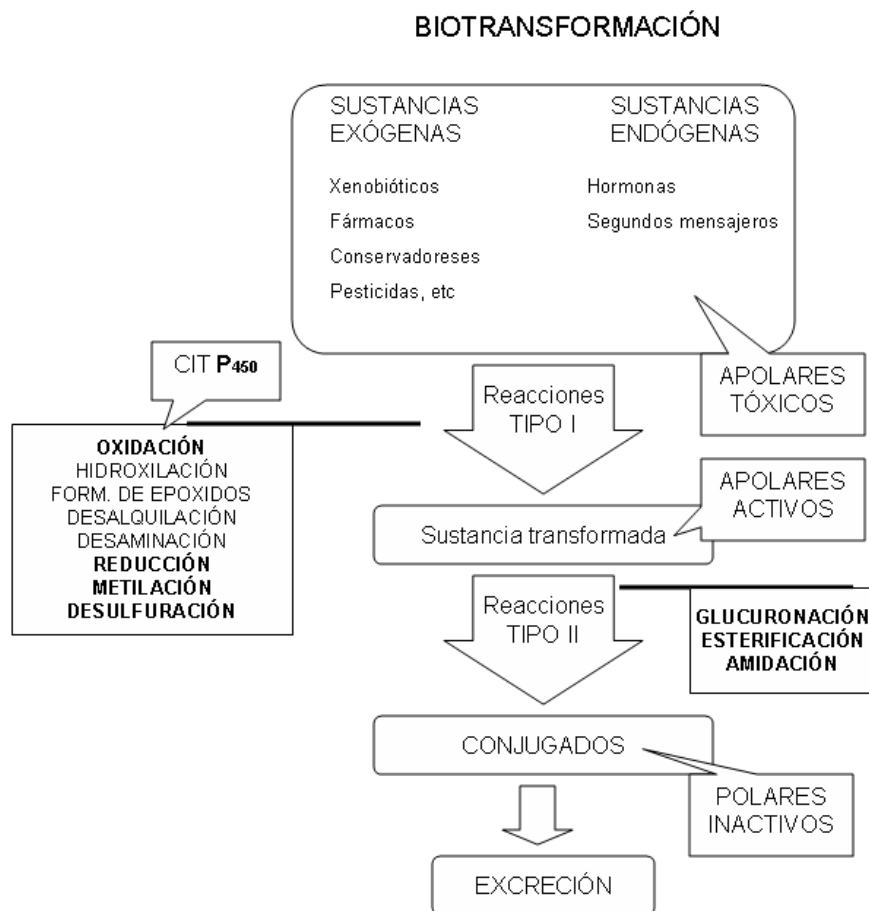


Fig.9. Fases de la biotransformación de xenobióticos (tomado de Maluszynska y Juchimiuk 2005).

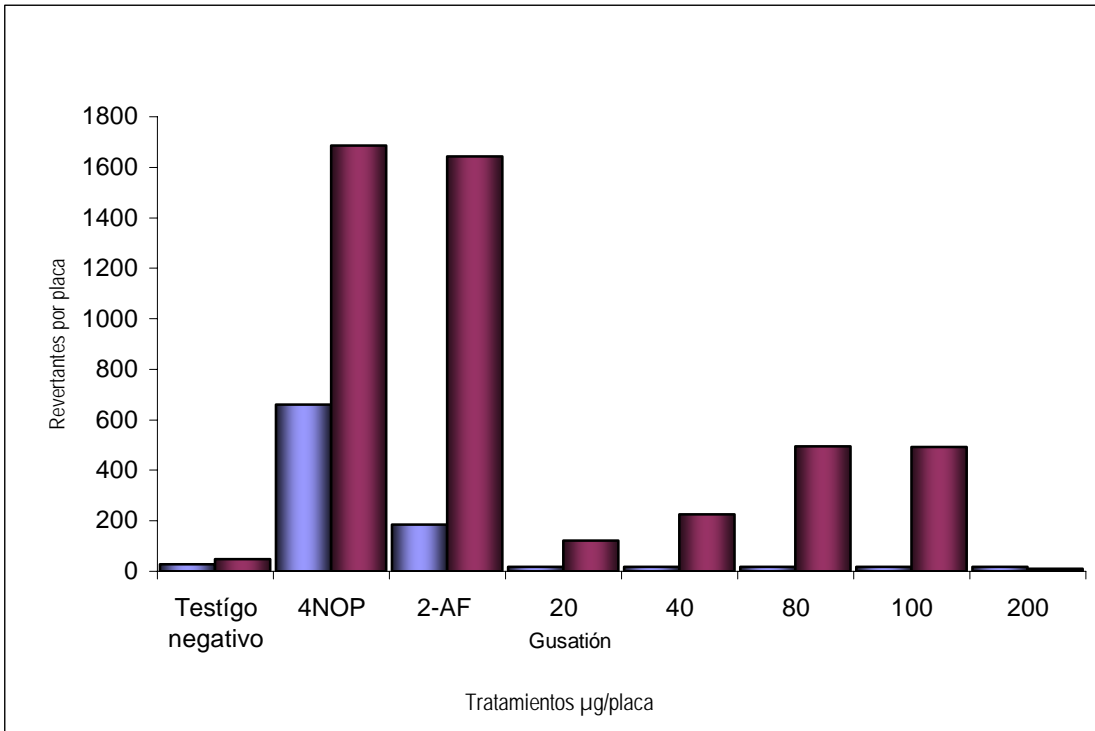


Fig. 10. Mutagenicidad inducida en la cepa TA98 de *S. typhimurium* por el insecticida organofosforado Gusatión con activación metabólica de *Vicia faba*.

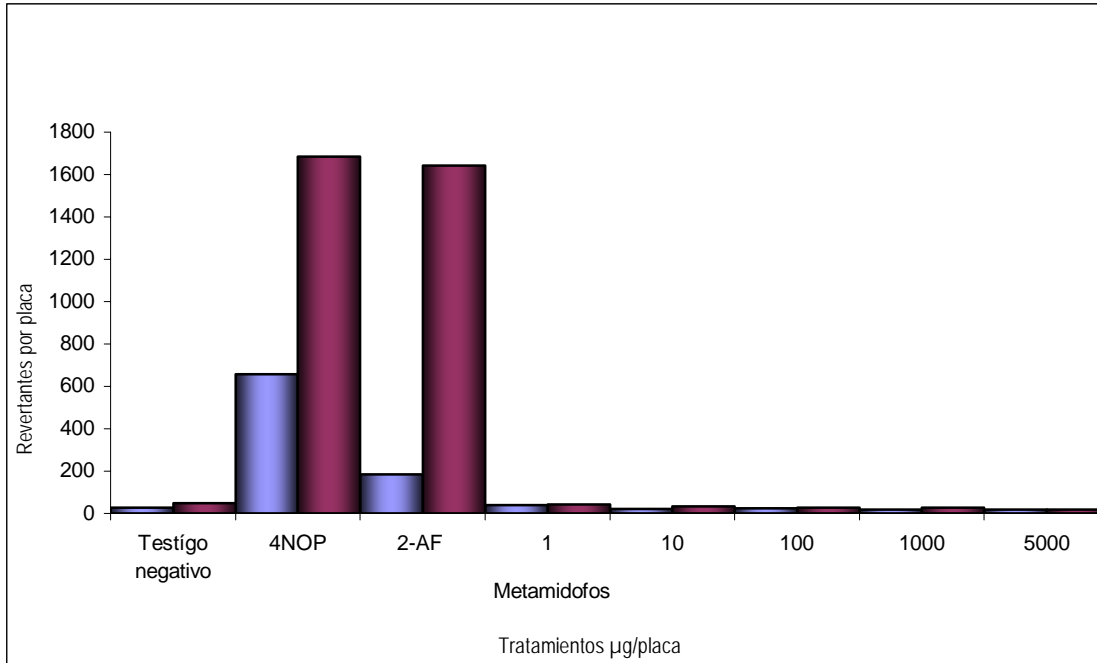


Fig. 11. Mutagenicidad inducida en la cepa TA98 de *S. typhimurium* por el insecticida organofosforado Metamidofos (Tamarón) con activación metabólica de *Vicia faba*.

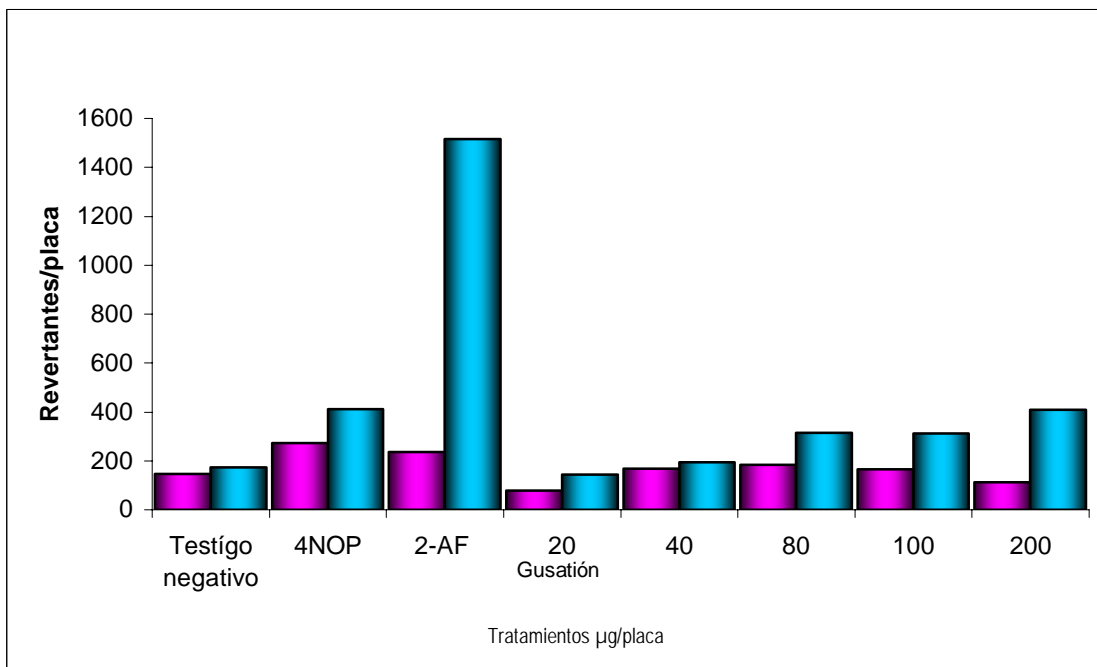


Fig. 12 Mutagenicidad inducida en la cepa TA100 de *S. typhimurium* por el insecticida organofosforado Gusatión con activación metabólica de *Vicia faba*.

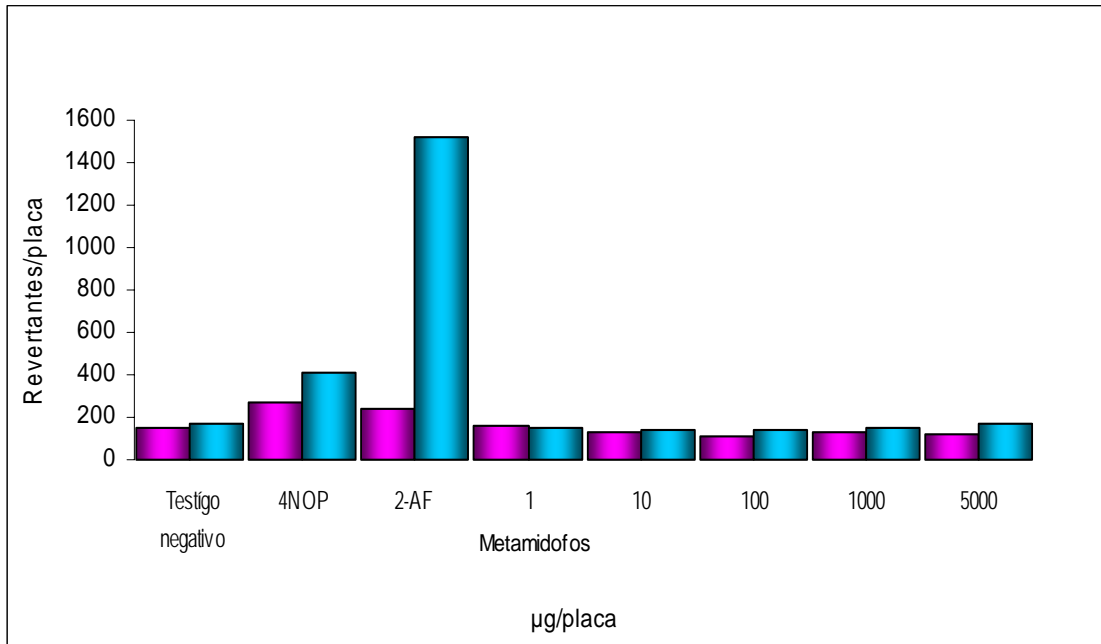


Fig. 13. Mutagenicidad inducida en la cepa TA100 de *S. typhimurium* por el insecticida organofosforado Metamidofos (Tamarón) con activación metabólica de *Vicia faba*.