



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO POR LOS  
AGROQUÍMICOS DIAZINÓN Y FOLICUR EN *Vicia  
faba* POR MEDIO DEL ENSAYO COMETA Y LA  
PRUEBA DE MICRONÚCLEOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**JESÚS ARISBEL BARBA GARCÍA**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**JOSEFINA CORTÉS ESLAVA**

**LICENCIATURA  
2012**





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.

*A mi madre*

*Elvia García*

*Te dedico esta tesis especialmente a ti, por tu gran dedicación como madre, por enseñarme a seguir con los duelos que se me presentaron, por motivarme para emprender mis sueños e impulsarme hasta alcanzarlos, por tu amor y apoyo incondicional, por darme la oportunidad de formarme académicamente.*

*A mi padre*

*Félix Barba*

*Por el esfuerzo y amor que nos has brindado.*

*A mi hija Sarah*

*Porque eres lo que motiva e ilumina mi vida.*

*A Victor Manuel Del Castillo Falconi*

*Por el amor y paciencia que me has ofrecido*

*A mis hermanos*

*María por tu excepcional amistad, por los momentos que compartimos, porque eres una gran compañera.*

*Yeraldin por tu gran ternura.*

*Fernando por transmitirme esa energía y fortaleza que te caracteriza.*

*Areli por tu sinceridad y cariño.*

*A mis Abuelos*

*José Barba y María de Jesús Velasco*

*Emilio García<sup>†</sup> y Alicia García*

*Por ser parte de esa motivación desde niña.*

*A mis Sobrinas:*

*Athena, Brianna y Venus*

*A mis tíos:*

*Emilio, Mayra, Margarita y Olivia*

*Por el apoyo y cariño que me han manifestado.*

## AGRADECIMIENTOS

A la *Universidad Nacional Autónoma de México*, por la oportunidad que me ofreció al formarme académicamente.

Un agradecimiento especial para la *Dra. Josefina Cortés Eslava*, por todo su apoyo académico y su calidez humana.

Quiero Agradecer a mis amigos por el cariño y apoyo moral que he recibido durante todo este tiempo, porque han sido mis ángeles: *Adriana Monroy, Dafne Uscanga, Edna Jiménez, Esther Arce, Fernando Hernández, Georgina González, Guadalupe López, Laura Sevilla, Nancy Cruz, Rosa Elia García, Wendy Quesada.*

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio:  
*Ana Rosa, Helena, Gabriela, Montserrat, Santiago y Victoria.*

Al *Centro de Ciencias de la Atmósfera* por permitirme realizar mis prácticas académicas.

A la *Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo* por permitirme integrarme a su equipo de trabajo.

Agradecimiento al *PAPIIT* por apoyo dentro del proyecto *IN32510*

Quiero agradecer profundamente a aquellas personas que me invitaron a no renunciar a mis sueños.

## INDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Plaguicidas.....	3
1.2 Toxicología.....	4
1.3 Clasificación.....	4
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1 Diazinón.....	7
2.2 Follicur.....	8
2.3 <i>Vicia faba</i> .....	9
2.4 Estrés Oxidante por Presencia de Xenobióticos en Vegetales.....	9
2.5 Actividad de Peroxidasa.....	11
2.6 Electroforesis Unicelular Alcalina ó Ensayo Cometa.....	12
2.7 Micronúcleos como Indicadores de Daño Genotóxico.....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
5. HIPÓTESIS.....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1 Germinación de Semillas de Haba ( <i>Vicia faba</i> ).....	17
6.2 Aislamiento de Núcleos.....	17
6.3 Electroforesis.....	18
6.4 Tinción.....	18
6.5 Registro de los Cometas.....	18
6.6 Obtención de Extractos.....	19
6.7 Cuantificación de Proteínas Totales.....	19
6.8 Determinación de la Actividad de Peroxidasa.....	20
6.9 Análisis de Micronúcleos.....	21
6.9.1 Fijación.....	21
6.9.2 Tinción.....	21
6.9.3 Preparaciones Permanentes.....	21
6.10 Análisis Estadístico.....	22
7. RESULTADOS.....	23
7.1 Ensayo Cometa.....	23
7.2 Cuantificación de Micronúcleos.....	24
7.3 Determinación del Contenido de Proteínas y Actividad de Peroxidasa.....	24
8. DISCUSIÓN.....	25
9. CONCLUSIÓN.....	29
10. FIGURAS Y CUADROS.....	30
11. REFERENCIAS.....	37

## RESUMEN

En este trabajo se evalúa la genotoxicidad de los plaguicidas diazinón y folicur en las raíces de haba (*Vicia faba*) como biomonitor, debido a que en varios estudios se ha observado que dichos plaguicidas son tóxicos en diferentes organismos. Para ello se empleó el ensayo cometa y la frecuencia de micronúcleos, se determinó la actividad de peroxidasa y el contenido de proteínas antes y después de los tratamientos.

Las raíces de *V. faba* se expusieron por 2 horas a 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 y 3 mg/mL de folicur y por otro lado a 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 3 y 4 mg/mL de diazinón 0.5 M; el testigo negativo se introdujo en agua destilada y el positivo en dicromato de potasio, se utilizaron las raíces completas para el ensayo cometa y el meristemo para la técnica de micronúcleos.

Para el ensayo cometa se aislaron los núcleos de las células de la raíz de *V. faba* en amortiguador, se homogeneizó la suspensión de núcleos con agarosa al 1% y se colocaron en un portaobjetos, se sometieron a lisis, se corrió la electroforesis por 20 min, se neutralizaron con Tris y se fijaron con etanol. Finalmente las laminillas se tiñeron con bromuro de etidio, los cometas se observaron en el microscopio de fluorescencia y se midieron utilizando el programa Comet Assay IV y se tomó como criterio de daño el momento de la cola.

En la prueba de micronúcleos se analizaron 1000 células de cada tratamiento, identificando las que presentaban micronúcleos y las que no. Se realizaron al menos dos experimentos de cada tratamiento.

Mediante la técnica de guayacol se determinó la actividad de la peroxidasa en las raíces y el análisis del contenido de proteínas por el método de Bradford.

Los resultados con el ensayo cometa y la aparición de micronúcleos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo negativo, además se observó una relación dosis-respuesta de los plaguicidas y su efecto en la inducción de cometas y de micronúcleos.

La actividad de peroxidasa disminuyó y el contenido de proteínas de las células de la raíz, al incrementar la concentración de los plaguicidas, observándose diferencias significativas en las concentraciones más altas.

Se observó una correlación negativa entre la disminución de la actividad de la peroxidasa y la frecuencia de daño al DNA provocado por los plaguicidas diazinón y folicur.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los agentes genotóxicos son agentes físicos o químicos, capaces de interactuar y producir alteraciones en el material genético de los organismos. Dentro de los agentes genotóxicos se incluyen a los que interaccionan directa o indirectamente con el DNA provocando mutaciones y los que actúan interfiriendo con procesos enzimáticos de reparación, génesis o polimerización del material proteico involucrado en la segregación cromosómica (Rodríguez 2003). Los xenobióticos son compuestos químicos (Porta, *et al.* 2003); la palabra xenobiótico viene del griego "xeno" ("extraño") y "bios" ("vida") (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 1991) estos pueden llegar a ser agentes genotóxicos (Stanley 2007), al estar dentro de la célula pueden ser reactivos por sí mismos o bien, puede ser activados por enzimas metabólicas siendo capaces de interactuar y reaccionar con el DNA (éste proceso es llevado a cabo por los llamados promutágenos) (figura 1)(Rodríguez 2003).

Dentro de la gama de los xenobióticos destacan los metales pesados y las sustancias orgánicas como: plaguicidas, hidrocarburos halogenados y no halogenados, residuos químicos tóxicos, entre otros (Stanley 2007). Para la detección del daño genotóxico, se han utilizado diversos modelos biológicos uno de ellos son las plantas ya que es posible observar un amplio espectro de alteraciones genéticas que incluyen mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas, las plantas constituyen un material biológico con muchas ventajas por su economía, facilidad de manejo y rapidez para obtener resultados (De Serres 1978, Villalobos-Pietrini *et al.*1994).

### **1.1 Plaguicidas**

De acuerdo con la FAO los plaguicidas son compuestos químicos, sustancias o mezcla de sustancias, destinados a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo vectores de enfermedades humanas, especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan un daño interfiriendo en la producción de alimentos o artículos de consumo humano (OMS1992, FAO 2003).

En México, la tierra disponible para la agricultura es de aproximadamente unos 23 millones de hectáreas, o sea, cerca del 12% de la superficie total del país. Históricamente el uso de plaguicidas se ha concentrado en los estados del noreste del país, donde prevalece la agricultura dedicada a los cultivos de exportación. Los cultivos a los que se aplica el mayor volumen de estos productos son: maíz, frijol, sorgo, trigo, cebada, papa y hortalizas (Albert 2005).

Los plaguicidas de mayor uso son los herbicidas, seguidos de insecticidas y fungicidas. Entre los insecticidas más utilizados están los organofosforados. Aunque actualmente no hay datos claros de la cantidad de plaguicidas que se utilizan, es evidente que seguimos estando ampliamente expuestos a los mismos; reportes de 1998 indican que se consumían alrededor de 50,000 toneladas anuales de ingrediente activo (Albert 2005).

## **1.2 Toxicología**

Los plaguicidas, aunque pretenden ser selectivos para las especies que atacan también son nocivos para otros organismos. En humanos son tóxicos tanto por envenenamiento accidental, como por exposiciones crónicas (Rodríguez 2003).

Actualmente se han encontrado residuos de los plaguicidas en agua, aire, suelo, en los alimentos que ingerimos e incluso en muestras de sangre, orina y otros fluidos corporales (García1998, Venegas *et al.* 1998, Gómez-Arroyo *et al.* 2000, Martínez-Valenzuela *et al.* 2009). Según la organización mundial de la salud (OMS), cada año entre 500 000 y un millón de personas se envenenan con plaguicidas y de 5000 a 20000 mueren (OMS 1992).

## **1.3 Clasificación**

Los plaguicidas se clasifican en diversas familias de acuerdo a su estructura química entre los que se encuentran: los organoclorados, los organofosforados, los

carbámicos y los piretroides. Actualmente los insecticidas más aplicados son los organofosforados, los carbamatos y los piretroides (Sogorb 2002).

*Los organoclorados* son insecticidas ampliamente utilizados, su estructura química corresponde a los hidrocarburos clorados, lo que les confiere una alta estabilidad física y química, haciéndolos insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos. Estas propiedades y su lenta biodegradación favorecen su persistencia en el ambiente (Al-Saleh 1994). Estos plaguicidas actúan sobre el sistema nervioso central alterando las propiedades electrofisiológicas y enzimáticas de las membranas neuronales (Narahashi *et al.* 1992), ocasionando intoxicaciones agudas e incluso la muerte por paro respiratorio (Tordoir *et al.* 1994).

*Los organofosforados* son los más utilizados en la agricultura mexicana (Albert 2005), son ésteres, amidas o tioles derivados de los ácidos fosfórico, fosfónico y fosforóico. Se descomponen con mayor facilidad y se degradan por oxidación e hidrólisis, dando origen a productos solubles en agua. Pertenecen a este grupo el paratión, malatión, diazinón, clorpirifos y diclorvos (Al-Saleh 1994). Tienen propiedades alquilantes, es decir que actúan directamente sobre el DNA añadiendo grupos alquilo principalmente metilo y etilo a las bases nitrogenadas que poseen sitios nucleofílicos capaces de reaccionar con electrófilos (Fest *et al.* 1973, Bagchi *et al.* 1995, Stanley 2003), la mayoría son insecticidas y acaricidas, en general su forma de incorporación es por contacto y por ingestión (Jeyaratnman *et al.* 1994).

Se ha observado que causan aneuploidias en espermatozoides humanos y alteran la fertilidad (Padungtod 1999, Sarkar 2000, Giwercman *et al.* 2006), modifican la estructura de la cromatina en células de personas expuestas (Sánchez *et al.* 2004), En células de medula ósea de ratón producen aberraciones cromosómicas y presencia de micronúcleos (Jayashree *et al.* 1994).

*Los carbamatos* tienen ésteres derivados de los ácidos N-metil y dimetil carbámico, se subdividen en tres tipos principales derivados de ésteres carbamatados, comúnmente usados como insecticidas; derivados del ácido tiocarbámico, utilizados como fungicidas y carbamatos que se emplean como herbicidas. Todos ellos son relativamente inestables, con un tiempo corto de persistencia ambiental, su acción es selectiva inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa. Su degradación se realiza por oxidación y sus metabolitos finales son hidrosolubles (Al-Saleh 1994).

*Los piretroides* inicialmente fueron elaborados de manera natural a partir de las flores del crisantemo de compuestos llamados piretrinas, contienen un anillo dimetilciclopropano, con un radical variable que corresponde al ácido crisantémico o pirétrico y otro radical que involucra anillos aromáticos y a veces un grupo ciano, posteriormente se obtuvieron en forma sintética, estos últimos permanecen durante más tiempo en el ambiente, son estables bajo la luz solar y el calor, se hidrolizan por álcalis y son relativamente biodegradables; generalmente son efectivos contra la mayoría de los insectos en dosis muy bajas (Al-Saleh 1994, Ware *et al.* 2004).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Diazinón

El diazinón (Figura 2) es un insecticida que se encuentra en el grupo de los organofosforados. Su modo de acción es transformándose primero en una molécula de diazoxón, este compuesto interfiere en el funcionamiento del sistema nervioso (Journal of Pesticide Reform 2000).

El principal efecto nocivo del insecticida que se ha reportado en animales es inhibiendo la acción de la acetilcolinesterasa (AChE), evitando la degradación de la acetilcolina (ACh), provocando una sobre estimulación nerviosa; además el diazinón y otros insecticidas organofosforados inhiben numerosas enzimas con estructura molecular similar a la acetilcolinesterasa (Ware *et al.* 2000). Investigaciones recientes señalan que el diazinón muestra alta toxicidad en los estados larvarios de *Drosophila melanogaster* (Súkran *et al.* 2004), induce deformaciones e incrementa la mortalidad del pez cebra (Volker 2008), daño al DNA y alteraciones de la cromatina en espermatozoides de ratón (Salazar *et al.* 2008) y en líneas celulares de cáncer de mama de humano induce una elevación de daño cromosómico (Ukpebor *et al.* 2011).

En los tejidos de plantas, el diazinón puede penetrar, ser absorbido y acumulado en grandes cantidades en las raíces, posteriormente se trasloca al tallo y las hojas de la planta en menor concentración donde se ha encontrado una correlación entre el aumento del tiempo de exposición y la concentración de diazinón en los tejidos de las plantas (Kansouh 1968, Kröger *et al.* 2008).

En México, este compuesto es empleado para controlar insectos tanto a nivel doméstico como en las cosechas de frijol, maíz, calabaza, caña de azúcar, papa, plátano, chile, entre una gran variedad de hortalizas (www.terralia.com 2010) y se ha evaluado su efecto en trabajadores del estado de Sinaloa, observándose efectos genotóxicos en células del epitelio bucal (Martínez-Valenzuela *et al.* 2009).

## 2.2 Folicur

Folicur (Figura 3), es un fungicida perteneciente al grupo de los triazoles, cuyo ingrediente activo es el tebuconazol. Este fungicida cuenta con registro en México y está autorizado para aplicarse en los cultivos de trigo, cebada, plátano y vid; se utiliza para combatir la roya negra del tallo (*Puccinia graminis*) (www.bayercropscience.com 2010) roya amarilla (*Puccinia striiformis*), Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*) y cenicilla de la vid (*Uncinula necátor*) (www.helmmexico.com 2011).

Su modo de acción es por vía sistémica y por contacto, penetra la cutícula entrando a la planta una hora después de su aplicación. Los depósitos que quedan en la superficie brindan una prolongada acción residual que dura algunas semanas.

Dentro de la planta se mueve en sentido acropétalo de forma que es absorbido por sus partes vegetativas y traslocado hacia los meristemas terminales. La penetración a través del sistema radicular es muy efectiva, sin embargo es retenido por el suelo y no es móvil, por lo tanto los tratamientos al suelo deben ser realizados en condiciones que aseguren el contacto con la mayor parte del sistema radicular para que pueda ser absorbido sistémicamente (<http://www.helmmexico.com> 2011).

Se ha reportado que es acumulado en los tejidos del pez cebrá (*Danio reiro*) (Andreu *et al.* 2010) y en caracoles, donde se observa una disminución de su crecimiento (Druart *et al.* 2011). En la pulga de agua (*Daphnia magna*) induce reducción en su alimentación, asimilación y reservas energéticas desembocando en efectos crónicos observados en su reproducción, crecimiento o hasta la inducción de su muerte (Ochoa *et al.* 2008, Sancho *et al.* 2009). En las jundiás (*Rhamdia quelen*) genera estrés oxidante y una disminución en la actividad de enzimas que participan en los procesos antioxidantes, como la catalasa (CAT) y la glutatión transferasa (GST) (Ferreira *et al.* 2010). Asimismo se ha observado que es teratógeno en la rana *Xenopus*

*laevis*, en donde se muestran malformaciones a nivel de tejido cartilaginoso en el primero y el segundo arco branquial (Di Renzo *et al.* 2011).

### **2.3 *Vicia faba***

*Vicia Faba* es una planta herbácea perteneciente a la familia Fabaceae, se ha observado que los meristemas de la raíz son los más utilizados en los ensayos de mutagénesis, ya que la respuesta de las raíces como bioensayo para determinar la genotoxicidad de mutágenos ambientales ha presentado buena correlación con las de bacterias y mamíferos (de Kergommeaux *et al.* 1983), además las rutas metabólicas en este tejido son semejantes a las encontradas en otras células de eucariontes y es un tejido embrionario formado por una población de células que se mantienen en continua proliferación; su cariotipo está constituido por seis pares de cromosomas, sus células poseen sensibilidad al efecto de los plaguicidas y es considerada metabólicamente activa debido a que posee enzimas como las oxidasas las cuales son utilizadas en la activación de muchos promutágenos (Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Pimentel *et al.* 2006). Este sistema permite detectar compuestos químicos que ejercen su efecto tóxico vía un metabolito reactivo. Los meristemas radiculares están constituidos por células que carecen de cloroplastos por lo que su metabolismo no es fotodependiente y son permeables a sustancias exógenas, de forma que la penetración y eliminación de solutos es sencilla, además estas células son las primeras que se exponen a los compuestos químicos del agua y suelo (Shelby 1980).

### **2.4 Estrés Oxidante por Presencia de Xenobióticos en Vegetales**

En los organismos existe un equilibrio entre las especies reactivas al oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante. Cuando dicho equilibrio se descompensa a favor de las especies reactivas al oxígeno se produce el denominado estrés oxidante. Las especies reactivas al oxígeno poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras (Halliwell *et al.* 1990).

Las plantas tienen paredes rígidas, además no tienen una circulación bien definida para la distribución de compuestos extraños. El transporte en el xilema mueve un producto químico en la corriente de transpiración y el floema suministra el transporte de nutrientes a puntos de crecimiento como las raíces y brotes. En las plantas no existe un órgano especializado para metabolizar compuestos extraños (Higashi 1988), sin embargo, sus células poseen paquetes enzimáticos que los metabolizan por distintos mecanismos incluyendo la oxidación, la hidrólisis, la conjugación y la reducción.

En el caso de los plaguicidas, las plantas pueden absorberlos y metabolizarlos formando productos aún más agresivos, posteriormente, distintas enzimas como la superóxido dismutasa, actúan en el metabolismo de los xenobióticos; estas enzimas aunque tienen una función protectora para la célula producen especies reactivas al oxígeno y activan reacciones mutagénicas, peroxidación de lípidos ó inactivación de enzimas.

Un ejemplo de cómo el metabolismo de los xenobióticos actúa en el daño celular es la reducción de la quinona a semiquinona por flavoproteínas, posteriormente la autooxidación de la semiquinona dirige la generación del anión superóxido, el cual puede aumentar la concentración de peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo que se unen covalentemente al DNA y a otras moléculas (Figura 4) (Sandermann 1987).

Las células pueden tolerar estados de estrés oxidante leve; sin embargo, situaciones severas de estrés oxidante pueden afectar al metabolismo celular (Vicario 1997). Uno de los modelos que se ha utilizado para conocer el mecanismo por el cual actúan algunas sustancias genotóxicas es la peroxidasa de rábano ya que sufre una activación mutagénica por diversos agentes genotóxicos, dando como resultado mutaciones y fragmentación del DNA (Sandermann 1988). La enzima peroxidasa participa en el metabolismo de pesticidas (Plewa *et al.* 1991, Sanderman 1988, 1992, Gichner *et al.* 1988, 1993).

La reacción peroxidante procede de la siguiente manera:





Aunque cuando la concentración de peróxido es lo bastante elevada se puede llegar a observar daño celular.

## 2.5 Actividad de Peroxidasa

La peroxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de ciertos compuestos donadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas, por medio de peróxidos ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). El substrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peroxidasa: La velocidad de formación del color rojo ladrillo puede ser utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo. La peroxidasa presenta como grupo prostético al Hem, cuyo átomo central de hierro forma complejos con diferentes compuestos, como los cianuros y la hidroxilamina, inhibiéndose su actividad enzimática. La actividad enzimática depende del vegetal, del substrato oxidable que se emplea como reactivo, del pH y de la temperatura a que se trabaja ([www.mazinger.sisib.uchile.cl](http://www.mazinger.sisib.uchile.cl)).

Como la mayoría de las enzimas, la peroxidasa puede ser inactivada por el calor, siendo una de las que precisan mayor temperatura y más tiempo para su inactivación. Posee, además, la propiedad peculiar de la regeneración enzimática. Este fenómeno consiste en que al inactivarla por medio del calor recupera parcialmente su actividad después de un cierto tiempo. Esto ha sido explicado, aduciendo que la fracción proteica de la enzima sufre una desnaturalización parcial, con pérdida de su estructura terciaria, si el calor se aplica un tiempo muy corto, produciéndose luego una reversión de la proteína a su estado normal por recombinación de sus grupos hidrógenos o sulfhidrúlicos ([www.mazinger.sisib.uchile.cl](http://www.mazinger.sisib.uchile.cl) 2011).

## 2.6 Electroforesis Unicelular Alcalina ó Ensayo Cometa

El ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina, es un método sensible y relativamente sencillo para detectar daño en el DNA a nivel de células individuales (Singh *et al.* 1988), asimismo; detecta rupturas de DNA de cadena sencilla y enlaces cruzados, con el enfoque de una sola célula en pruebas citogenéticas.

Fue desarrollada para medir rompimientos en la cadena del DNA en células expuestas a radiación ionizante, utilizando una técnica en la cual embebían las células en un gel de agarosa obteniendo un halo de DNA fragmentado alrededor del núcleo. Posteriormente se optimizó el método efectuando la lisis en una solución neutra y empleando un campo eléctrico débil para atraer a los fragmentos de DNA hacia la carga positiva (Östling 1984). Por último el DNA se tiñó con bromuro de etidio para visualizar los núcleos con los cometas (Tice 2000, Collins 2002).

La electroforesis alcalina ( $\text{pH} \geq 13$ ), desenrolla al DNA y separa las proteínas asociadas, incrementando la movilidad y visualización de los fragmentos de DNA, debido a esto, se pueden observar rupturas de cadena sencilla y doble; lesiones en los sitios sensibles al álcali y en sitios de reparación retardada del DNA; ofreciendo mayor sensibilidad para detectar agentes genotóxicos (Fairbairn *et al.* 1995, Rojas *et al.* 1999). Así, el DNA migra fuera de la célula bajo la influencia de un campo eléctrico, donde el DNA no dañado migra más lento y permanece encerrado dentro del núcleo cuando es aplicada una corriente, mientras que un patrón de migración con la apariencia de un cometa indica que el DNA de la cauda está dañado.

Para evaluar el daño al DNA en estudios de genotoxicidad se ha tomado como criterio de daño el momento de la cola (Anderson *et al.* 2003, Schabath *et al.* 2003), que es el porcentaje de DNA en la cola que es producto de la distancia de migración y de la densidad de DNA (Olive *et al.* 1990, 1992, Muller *et al.* 1994). El momento de la cola incorpora una medida tanto del tamaño más pequeño de DNA que migra fuera del núcleo (longitud de la cola del cometa) y el número de rupturas (representado por la

intensidad de DNA en la cola). Esta medida está basada en el porcentaje de DNA que migra, también se ha hecho popular con el incremento del uso de sistemas de análisis de imagen computarizados, utilizados para almacenar datos de los cometas (Tice *et al.* 2000).

## **2.7 Micronúcleos como Indicadores de Daño Genotóxico**

Los micronúcleos son cuerpos extranucleares compuestos de cromosomas o fragmentos de cromosomas que fallaron en su incorporación dentro de los núcleos de las células hijas durante la división celular (Schmid 1975). Como su nombre lo indica son pequeños núcleos conteniendo masas de cromatina que se encuentran cerca del núcleo principal en las células en interfase, se pueden originar de manera espontánea o como respuesta a agentes clastogénicos y/o aneugénicos, resultando de la pérdida durante la división celular de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros (Fenech y Morley 1985).

Los agentes clastogénicos causan alteraciones cromosómicas de tipo estructural, induciendo lesiones a los cromosomas que provocan fragmentos cromosómicos acéntricos y anillos con centrómero en los que éste se encuentra dañado, alterando el cinetocoro o bien las fibras del huso acromático, provocando retraso en la migración de estos fragmentos hacia los polos del huso mitótico quedando fuera de los núcleos hijos. También se presenta en cromosomas completos, causado por agentes aneugénicos, produciendo aberraciones cromosómicas de tipo numérico causadas por pérdida del centrómero o afectación del mismo, en donde el cromosoma completo no se incorpora a los núcleos de las células hijas. En todos los casos, el material genético no incluido en los núcleos de las células hijas, queda en el citoplasma y una porción de éstos se rodean de membrana nuclear y aparecen en la interfase como pequeños núcleos (Zalacain *et al.* 2005).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Numerosos productos químicos sintéticos como los fertilizantes y plaguicidas, se han utilizado para incrementar la producción agrícola. Los plaguicidas son el arma más violenta y efectiva contra las infestaciones de plagas; su importancia radica en su fácil almacenaje, transporte y aplicación (Restrepo 1992).

Dentro de la amplia gama de agroquímicos, el uso de plaguicidas ha permitido el control de insectos responsables de epidemias severas, como la malaria. Sin embargo, su uso indiscriminado ha provocado grandes desórdenes ecológicos como la resistencia a su acción en especies de insectos, la reducción de poblaciones vegetales y animales, además de la presencia de plaguicidas persistentes en el agua, el suelo y en los organismos (Barbera 1976, Briggs *et al.* 1992).

Dado que es imposible realizar la experimentación en seres humanos se han establecido diversos sistemas biológicos de prueba entre los cuales las plantas presentan innumerables ventajas que las hace una herramienta sumamente útil en estudios de toxicología ambiental.

Las características de *V. faba* como biomonitor se basan en su sensibilidad a pruebas con tratamientos cortos; además, de que es un sistema económico y fácilmente manejable, su ciclo celular es corto, la punta de sus raíces tienen una proporción alta de células en diferentes estados de mitosis, ya que se mantienen en continua proliferación, posee grandes cromosomas y un número bajo ( $n=12$ ); (Gómez-Arroyo *et al.* 1995). El metabolismo vegetal juega un papel importante en la mutagénesis ambiental, dado que los metabolitos resultantes pueden ser más peligrosos que el compuesto original, varios cultivos agrícolas que son tratados con plaguicidas sufren una transformación de esta naturaleza y posteriormente los productos son consumidos por el hombre, esto constituye un importante riesgo para la salud. Por lo que *V. faba* se considera un excelente modelo para detectar la genotoxicidad de agroquímicos como el diazinón y el folicur.

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el daño genotóxico causado por la exposición a los plaguicidas diazinón y folicur de las células de la raíz de haba (*Vicia faba*).

#### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Exponer las células de la raíz de *V. faba* a diferentes concentraciones de los plaguicidas diazinón y folicur.
- Determinar el daño genotóxico por medio del ensayo cometa (electroforesis unicelular alcalina) usando como criterio de evaluación el momento de la cola.
- Cuantificar la actividad de peroxidasa de las células de la raíz.
- Cuantificar la inducción de micronúcleos en el meristemo radicular.

## 5. HIPÓTESIS

Dado que diversos plaguicidas tienen capacidad de ser agentes genotóxicos, entonces al exponer las células de la raíz de *Vicia faba* a diazinón y folicur presentarán daño en el DNA, expresado con el incremento en la frecuencia de cometas y en la longitud de sus caudas, así como la presencia de micronúcleos en las células meristemáticas y modificación de la actividad de peroxidasa.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Germinación de Semillas de Haba (*Vicia faba*)**

Las semillas de haba fueron seleccionadas y lavadas en agua corriente frotándolas intensamente para limpiar de esporas y hongos, posteriormente se colocaron en una solución 0.01 % de hipoclorito de sodio por 30 min y se lavaron perfectamente para quitar los residuos del hipoclorito, sumergiéndolas en agua durante 24h en oscuridad a una temperatura aproximada de 19-20 °C, por último se colocaron entre dos capas de algodón húmedo manteniéndolas en las mismas condiciones hasta que las raíces alcanzaran una longitud de alrededor de 3 cm. Posteriormente las raíces fueron lavadas con cuidado para evitar dañarlas, se retiró la cofia y demás material que pudiera impedir la correcta penetración del agroquímico y se colocaron en tratamiento durante 2 h en oscuridad (Figura 5). Como testigo positivo se empleó dicromato de potasio 0.5 M y como negativo agua destilada.

### **6.2 Aislamiento de Núcleos**

Se cortaron aproximadamente 2 cm de la raíz y se depositaron en 10 mL de amortiguador salino de fosfatos (PBS) frío con pH=7.4. Posteriormente se colocaron las raíces de cada tratamiento en cajas de Petri pequeñas inclinadas sobre hielo para mantener la temperatura baja y protegiéndolas de la luz con la tapa oscurecida y se les adicionó 250 µL de PBS.

Posteriormente se hicieron cortes finos transversales de las raíces omitiendo la punta y la región distal, dejando que los núcleos precipiten por gravedad en el PBS, se tomaron 50 µL de la suspensión de núcleos y se colocó en 50 µL de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) al 1 % a 37 °C se homogeneizó suave y lentamente la suspensión de núcleos, se depositó sobre un cubreobjetos y se le colocó encima un portaobjetos previamente cubierto con agarosa de punto de fusión normal al 1 %, se dejó solidificar y se cubrió con agarosa de punto de fusión bajo (GIBCO-BRL) al 0.5 %

dejando solidificarse sobre una placa fría. Posteriormente se retiró el cubreobjetos y los portaobjetos con el gel con núcleos se colocaron en solución de lisis a pH 10 por al menos 1 h.

### **6.3 Electroforesis**

Se llenó la cámara de electroforesis con amortiguador (NaOH 10N, EDTA 200mM) con  $\text{pH} \geq 13$ , se colocaron las laminillas alineadas con la parte esmerilada orientada hacia el cátodo y se agregó el amortiguador hasta cubrir las. Se incubaron por 18 min en la solución de electroforesis para que se efectuara la desnaturalización de DNA y se corrió la electroforesis a 25 volts y 300 miliamperes por 20 minutos, posteriormente se neutralizaron sumergiéndolas en amortiguador Tris (BIO-RAD) 0.4M,  $\text{pH} = 7.5$  frío por 5 min 3 veces y finalmente se sumergieron las laminillas en etanol para fijarlas y se dejaron secar a temperatura ambiente protegiéndolas del polvo.

### **6.4 Tinción**

Se tiñeron con 50  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio 0.04mg/mL (1X), se les colocó un cubre objetos y se metieron en una cámara húmeda protegida de la luz para evitar la evaporación, así como el decaimiento del fluorocromo mientras se efectuaba el registro al microscopio de fluorescencia. Se registraron 25 núcleos por laminilla y dos laminillas por tratamiento. Se realizaron dos experimentos consecutivos de manera que el mínimo registrado fue de 100 núcleos por concentración.

### **6.5 Registro de los Cometas**

Los cometas fueron observados en el microscopio de fluorescencia a 20X y registrados con el programa Comet Assay IV, tomando en cuenta el valor del momento de la cola.

## 6.6 Obtención de Extractos

Se lavaron y secaron las raíces de haba previamente expuestas a diazinón y folicur, se cortaron 2 cm, se maceraron en un mortero con nitrógeno líquido y se les añadió 500  $\mu$ L de amortiguador de fosfato de potasio 100 mM a pH 7 en relación 1:1 peso/volumen, posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 3 min a 0 °C, se recuperó el sobrenadante manteniéndolo a 4 °C hasta su uso ( $\leq$ 30 minutos).

## 6.7 Cuantificación de Proteínas Totales

El sobrenadante de los extractos se colocó en hielo e inmediatamente se analizó el contenido de proteínas por el método de Bradford (1976); para el reactivo de Bradford se disolvieron 100 mg de azul de Coomasie G-250 85% (Aldrich), en 50 mL de etanol (Sigma) 95% de pureza y se aforó a un litro con ácido fosfórico 85% (Aldrich). Se mezcló durante 12 h en la oscuridad, posteriormente se filtró y se colocó en un frasco ámbar a 4 °C.

En tubos de ensaye se colocaron 5  $\mu$ L del extracto de células de raíz de haba de todos los tratamientos y del testigo negativo ( $H_2O$ ), 1.5 mL de agua destilada y 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford, se agitaron y se realizaron las lecturas de la absorbencia a 595 nm en un espectrofotómetro de UV Jenway 6300 efectuando tres repeticiones y posteriormente promediándolas.

Para el cálculo de la concentración de proteínas, se construyó una curva de referencia con albumina de suero bovino (BSA, Aldrich) pesando 10 mg de BSA y se agregaron 10 mL de agua destilada para tener una concentración final de 1 mg/1 mL. Las concentraciones de la curva fueron 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu$ L y se ajustaron con agua destilada a 100 mL, las determinaciones se hicieron por triplicado.

## 6.8 Determinación de la Actividad de Peroxidasa

La actividad de peroxidasa de las raíces se evaluó utilizando los extractos de la raíz de haba expuestas a los diferentes tratamientos mediante la oxidación del guayacol, monitoreando el cambio de absorbencia a 470 nm. La actividad de peroxidasa se midió cada 30 segundos durante 5 minutos, usando un espectrofotómetro de luz U.V. Se hicieron 3 repeticiones independientes para cada medición por cada experimento como lo describen Gentile *et al.* (1991).

La mezcla de reacción consistió en:

1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3 %

1 mL de guayacol al 1 %

10 μL de extracto de células de raíz de haba

Amortiguador de fosfato de potasio 100 mM a pH=7, en proporción para tener un volumen final de 3 mL.

Los componentes de la mezcla de reacción se combinaron agregando al final el guayacol y se determinó la absorbencia a 470 nm (Chance y Maehly 1995) en un espectrofotómetro de luz UV como una función del tiempo. La tasa de actividad peroxidasa se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{La tasa de reacción de la peroxidasa: } \left[ \frac{\left( \frac{A_{470}}{\epsilon_{470} \times l} \right) \times v/p}{t_{min}} \right]$$

Donde:

$A_{470}$  es la absorbencia a 470 nm

$\epsilon_{470}$  es el coeficiente de extinción para el tetraguayacol (26.6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

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

$v$  es el volumen de reacción en litros  
 $p$  es el contenido de proteína en  $\mu\text{g}$   
 $t_{\text{min}}$  es el tiempo en minutos

## **6.9 Análisis de Micronúcleos**

### **6.9.1 Fijación**

Las raíces de haba previamente tratadas con diazinón y folicur, así como los respectivos testigos (negativo y positivo), se limpiaron cuidadosamente y se cortaron  $\pm$  5 mm, se fijaron en etanol-ácido acético (3:1) (V/V) y se dejaron en el congelador.

### **6.9.2 Tinción**

Se colocaron los meristemas en etanol al 70 % durante 15 min a 28 °C. Se hidrolizaron con HCl 5N a 28 °C alrededor de 30 min agitando continuamente, después se decantó el ácido y se lavaron 3 veces con agua destilada para quitar residuos del HCl. Se tiñeron los meristemas con el reactivo de Schiff colocándolos en portaobjetos excavados dejándolos 20 minutos en la oscuridad, por último se cortaron 2 mm del meristemo y se transfirieron a portaobjetos planos etiquetados, donde se les agregó ácido acético al 45 % y con un cubreobjetos se hizo el aplastamiento en monocapa ("squash"), metiendo al congelador enseguida.

### **6.9.3 Preparaciones Permanentes**

Las preparaciones se congelaron con nitrógeno líquido introduciéndolas 25 segundos cada una y se les desprendió el cubreobjetos con un bisturí, posteriormente se deshidrataron con dos cambios rápidos de butanol absoluto y se montaron con resina sintética Entellan (Merck). Se observaron 1000 células en interfase al azar en el

microscopio óptico con un aumento de 40X, para determinar la incidencia de micronúcleos.

### **6.10 Análisis Estadístico**

Para el análisis de los datos del momento de la cola, cantidad de proteína, actividad peroxidasa y análisis de micronúcleos, se sacaron la media, la desviación estándar, el error estándar y se compararon las diferentes concentraciones de diazinón y folicur con respecto a los testigos (testigo negativo agua destilada y testigo positivo dicromato de potasio) con una prueba ANOVA en el programa SPSS 17.0 considerando las diferencias significativas con una  $p < 0.0001$  en los casos donde hubo diferencia significativa entre el testigo negativo y los tratamientos se aplicó una prueba de comparación múltiple Newman-Keuls.

Se utilizó el análisis de regresión lineal con una  $p \leq 0.05$  para los datos de cantidad de proteína y actividad de peroxidasa.

## 7. RESULTADOS

En los tratamientos aplicados a la raíz de *V. faba* con diazinón y folicur, se observa una relación dosis-respuesta en todos los experimentos realizados (Cuadros 1 y 2).

En las concentraciones aplicadas con diazinón el daño celular fue encontrado a partir de 0.1 mg/mL. El análisis de Tukey muestra que existen diferencias significativas en el ensayo cometa y la prueba de micronúcleos al ser comparados con el testigo negativo (H<sub>2</sub>O), mientras que para la cantidad de proteína y la actividad de peroxidasa se observan diferencias significativas a partir de las concentraciones de 0.2 mg/mL a  $p < 0.001$  (Cuadro 1).

Las concentraciones aplicadas de folicur provocaron daño celular a partir de 0.025 mg/mL. El análisis de Tukey muestra que existen diferencias significativas en el ensayo cometa y en la prueba de micronúcleos al ser comparado con el testigo negativo (H<sub>2</sub>O), mientras que para la cantidad de proteína y la actividad peroxidasa se observan diferencias significativas en los tratamientos de mayores concentraciones: 0.5, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mg/mL a  $p < 0.001$  (Cuadro 2).

### 7.1 Ensayo Cometa

La evaluación del ensayo cometa, muestra que ambos plaguicidas son capaces de inducir daño en el DNA al ser comparados con el testigo negativo. El momento de la cola aumenta proporcionalmente con la concentración de los plaguicidas (Figura 6). A partir de la segunda dosis (promedio  $\pm$  E.E:  $7.28 \pm 3.42$ ), el momento de la cola aumenta significativamente con respecto al testigo negativo (Cuadro 1). Los tratamientos realizados con folicur a partir de 0.025 mg/mL mostraron diferencias significativas con respecto al testigo negativo con el análisis de varianza (Cuadro 2).

## 7.2 Cuantificación de Micronúcleos

En la prueba de micronúcleos de células tratadas con diazinón existen diferencias significativas desde la concentración de 0.2 mg/mL comparado con el testigo negativo (Cuadro 1). Se observa una correlación positiva con un *p de Pearson* de 0.8156 mostrando la relación dosis-respuesta en la cantidad de micronúcleos comparada con las diferentes concentraciones de diazinón (Figura 7).

Para los tratamientos con folicur, la prueba de micronúcleos muestra diferencias significativas en todas las concentraciones (a partir de 0.025 mg/mL) comparado con el testigo negativo (Cuadro 2). Se observa una correlación positiva con una *p de Pearson* de 0.783 mostrando la relación dosis-respuesta en la cantidad de micronúcleos comparada con las diferentes concentraciones de folicur (Figura 8).

## 7.3 Determinación del Contenido de Proteínas y Actividad de Peroxidasa

La cantidad de proteínas y la actividad peroxidasa en células tratadas con folicur y diazinón muestran una correlación negativa en ambos tratamientos.

La actividad peroxidasa en los tratamientos con diazinón y folicur disminuyeron (*p de Pearson* = -0.7047, -0.6996, respectivamente;  $p < 0.05$ ), mientras que la cantidad de proteínas mostró valores de (*p de Pearson* = -0.8352 para diazinón, -0.9612 para folicur  $p < 0.05$ ) conforme se aumentaban las concentraciones de ambos plaguicidas (Figura 9 y 10).

## 8. DISCUSIÓN

Los agroquímicos han aumentado la economía en términos de mejorar la producción agrícola en el mundo al disminuir las plagas y vectores de enfermedades. Asimismo se ha mencionado en distintas ocasiones que los plaguicidas no son tóxicos para el ambiente y la salud; como señalan acerca del insecticida diazinón y el fungicida folicur (Bayer 2011, HELM México S.A. 2011), no obstante este y otros trabajos indican que ambos plaguicidas son capaces de generar alteraciones fisiológicas, daño en las células e incluso en el DNA (Ware *et al.* 2000, SÚkran *et al.* 2004, Salazar *et al.* 2008, Ferreira *et al.* 2010, Di Renzo *et al.* 2011, Druart *et al.* 2011, Ukpebor *et al.* 2011).

En este estudio, los resultados obtenidos en el ensayo cometa indican que los plaguicidas diazinón y folicur aplicados en las raíces de *V. faba* son capaces de inducir daño en el DNA. La relación dosis-respuesta que se observa en el ensayo cometa muestra una degradación del material genético al ser aplicado diazinón (a partir de los 0.1 mg/mL) al igual que lo que se observa para folicur, el cual requiere una dosis más baja para inducir el daño (a partir de 0.05 mg/mL). Esta relación diferencial de ambos plaguicidas puede ser debida a que el fungicida folicur actúa como un inhibidor de la enzima citocromo p450 la cual es esencial para la biosíntesis de ergosterol, y esto provoca una inestabilidad en la integridad de la membrana plasmática y entonces tener acceso a los diferentes organelos celulares (Klix *et al.* 2007, Yin *et al.* 2009). En el estudio realizado por Becher y colaboradores (2011) donde realizan análisis de microarreglos en *Fusarium graminearum*, observan que 1058 genes se expresan diferencialmente después del tratamiento con tebuconazol; señalan que 596 genes involucrados en la biosíntesis de ergosterol incrementan significativamente sus niveles de transcripción, donde señalan que muchos de los genes presentan una respuesta a estrés en lugares inespecíficos, que pueden ser originados por defectos en el suministro de nutrientes como resultado de las perturbaciones en la membrana por los azoles.

El citocromo P450 (CYP) es una superfamilia de genes que participan en el metabolismo de una gran variedad de xenobióticos y sustratos endógenos (Nelson *et al.* 1996, Oyama *et al.* 2003, 2004). Los xenobióticos son metabolizados por las enzimas de la fase I que incluye a la familia de CYP. Los metabolitos son entonces modificados por las enzimas de la fase II (sulfotransferasas, glutatión transferasa, N-acetil transferasa, entre otras). Estas reacciones generalmente dan como resultado la inactivación o desintoxicación. Sin embargo, los CYPs pueden convertir a los xenobióticos en compuestos más activos, tóxicos ó ambos, que pueden formar aductos en el DNA dando como resultado la iniciación y promoción de la tumorigénesis (Gonzalez *et al.* 1994). Asimismo Fenech (2000) señala que los aductos en el DNA dan lugar a rupturas en la hebra o daño en el eje. Si fallan los sistemas de reparación del DNA daría como resultado la conversión de las lesiones de bases a una ruptura de cadena sencilla que se convertiría en una doble hebra en la siguiente síntesis de DNA, que conduciría a la formación de un fragmento acéntrico que se expresaría como un micronúcleo (Fenech *et al.* 1992, 1994, Surrales 1995).

Los resultados obtenidos con la técnica de micronúcleos muestran un comportamiento semejante que los del ensayo cometa ya que revelan diferencias significativas a las mismas concentraciones, Otros estudios realizados en células MCF-6 (línea celular de adenocarcinoma mamario) expuestas con diazinón, muestran daño genotóxico al presentar un incremento en el número de micronúcleos, lo cual concuerda con los resultados encontrados en este estudio (Ukpebor *et al.* 2011), También se ha sugerido que al existir ruptura en el DNA se generan deleciones y translocaciones de los cromosomas que llegan a dañar las proteínas encargadas de la división celular, ocasionando la formación de micronúcleos (Fenech 2000, Faust *et al.* 2004, Gleib *et al.* 2008).

Otros estudios con tebuconazol aplicados en *Rhamdia quelen* muestran una inducción del estrés oxidante en el hígado, al observarse un incremento significativo en peroxidación de lípidos y actividad catalasa (Ferreira *et al.* 2010). También se han observado cambios metabólicos en la carpa europea (*Cyprinus carpio*), ya que la

exposición al tebuconazol disminuye la actividad catalítica por acción de proteasas en respuesta al estrés oxidante, esto fue comprobado al tratar células de hígado, cerebro y musculo blanco donde fueron aumentando los niveles de grupos carboxilo en las proteínas (Toni *et al.* 2011). En el mismo estudio, se observa una disminución significativa en la concentración de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión transferasa y ácido ascórbico. Estos resultados concuerdan con los observados en los resultados de concentración de proteína y actividad peroxidasa ya que ambos disminuyen por la exposición al folicur así como al insecticida diazinón.

Con relación al diazinón señalan que a bajas concentraciones llega a ser letal cuando aumenta el tiempo de exposición, lo que indica que este es un factor que tiene gran influencia sobre la toxicidad de este xenobiótico (Henaó *et al.* 2005), asimismo induce estrés oxidante (Dawood *et al.* 2010) en ratas disminuye significativamente la actividad de la glutatión peroxidasa y de la peróxido dismutasa (Abdou *et al.* 2010), enzimas involucradas en los procesos antioxidantes. Igualmente en la carpa europea (*Cyprinus carpio*) muestra una disminución en la actividad de la glutatión transferasa (Oruc 2010). Dawood *et al.* (2010) señalan que en ratas expuestas disminuyen las enzimas antioxidantes como catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y peroxidación de lípidos (Dawood *et al.* 2010).

La enzima peroxidasa de plantas participa como uno de los intermediarios del metabolismo de los xenobióticos (Sandermann 1988). Esto indica que cuando existe un desequilibrio a favor de los radicales libres generados por diazinón o folicur, la actividad peroxidasa disminuye como mecanismo de protección ante las altas concentraciones del sustrato es utilizado para el propósito, disminuyendo su concentración en el medio intracelular. Los resultados de la actividad peroxidasa nos sugieren que los agroquímicos utilizados en este estudio son activados metabólicamente en el ciclo redox. Los xenobioticos son metabolizados por enzimas de la fase I; sin embargo, muchas veces estos compuestos no son inactivados por estas enzimas y forman intermediarios reactivos (Turrens 2003). Las especies reactivas de oxígeno pueden causar daño celular y esto es rápidamente inactivado en las células por reacciones de

reducción, esto es facilitado por las enzimas peróxido dismutasa, catalasa, citocromo c y glutatión transferasa (Turrens 2003). Si las especies reactivas de oxígeno no son reducidas totalmente, esto puede causar daño en el organismo por que pueden reaccionar con macromoléculas de importancia biológica, como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, en este caso el DNA o simplemente el agroquímico puede estar actuando directamente con el DNA oxidándolo directamente o uniéndose covalentemente. Un experimento que evidencia el estrés oxidante generado por los agroquímicos diazinón y folicur es el ensayo cometa ya que es capaz de detectar sitios apurínicos/apiridinicos (AP) porque una de las bases del DNA con mayor oxidación es la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua). La presencia de 8-oxoGua en el DNA es producida por errores en la incorporación de la adenina (Singh *et al.* 1988, Valverde *et al.* 2009). Los resultados obtenidos en el ensayo cometa muestran rupturas en la doble hélice de DNA, lo que podría dar como resultado un cromosoma roto que se evidencia con los resultados de la técnica de micronúcleos (Savage 1993).

Los resultados revelan que los compuestos químicos utilizados en este estudio provocan rupturas en el DNA, fragmentos cromosómicos, un aumento en la proteólisis y del complejo enzima peroxidasa-ligando; los cuales son eventos característicos de la generación de especies reactivas de oxígeno producida por agentes genotóxicos en la célula.

## 9. CONCLUSIÓN

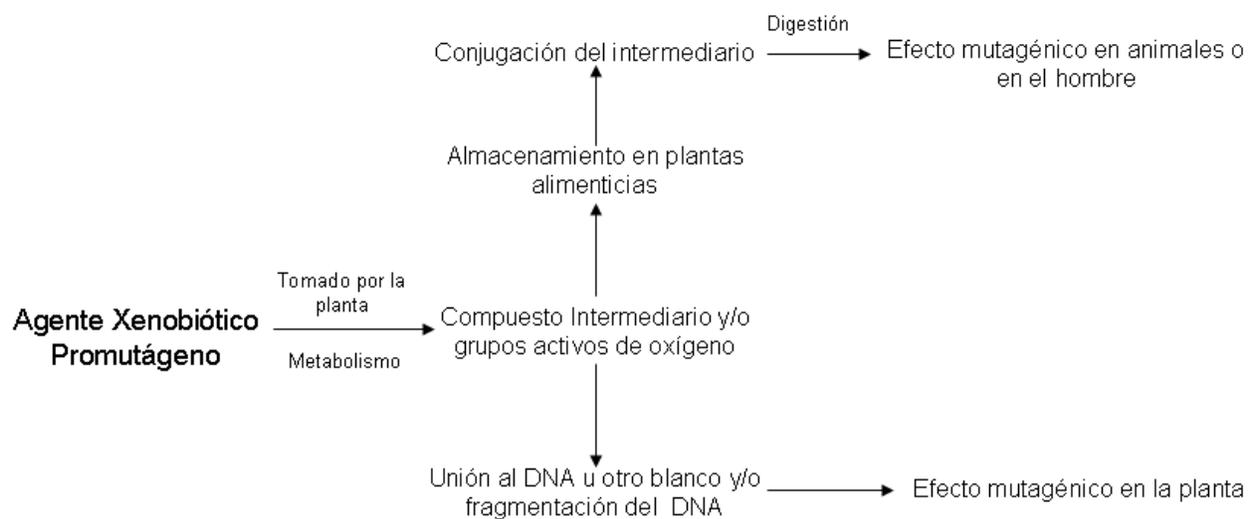
Los resultados obtenidos en el ensayo cometa se observan aumentados de manera dependiente de la concentración de diazinón y folicur; asimismo se observan diferencias significativas con respecto al testigo negativo.

Se observó un aumento en la cantidad de micronúcleos al incrementar la concentración de los agroquímicos probados en este estudio, lo que nos permite concluir que la exposición a diazinón y folicur representa acrecentamiento de daño cromosómico en *V. faba*.

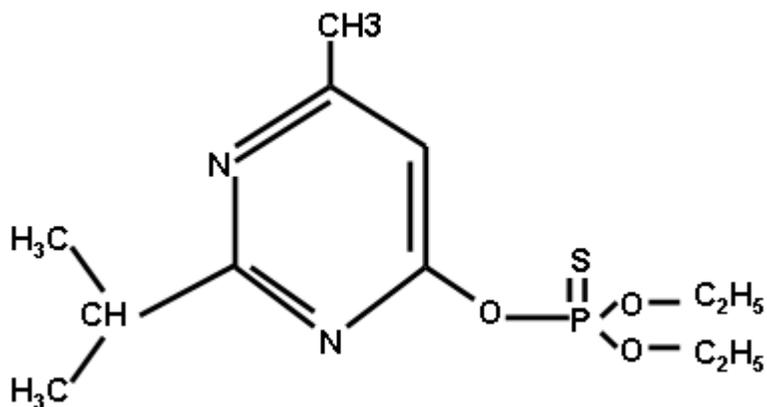
Mediante los experimentos de ensayo cometa y la prueba de micronúcleos, se atribuye daño genotóxico del diazinón y folicur en *Vicia faba*.

En los experimentos realizados la cantidad de proteína y la actividad de la peroxidasa disminuyen en las células de *Vicia faba* cuando son expuestas a diazinón y a folicur.

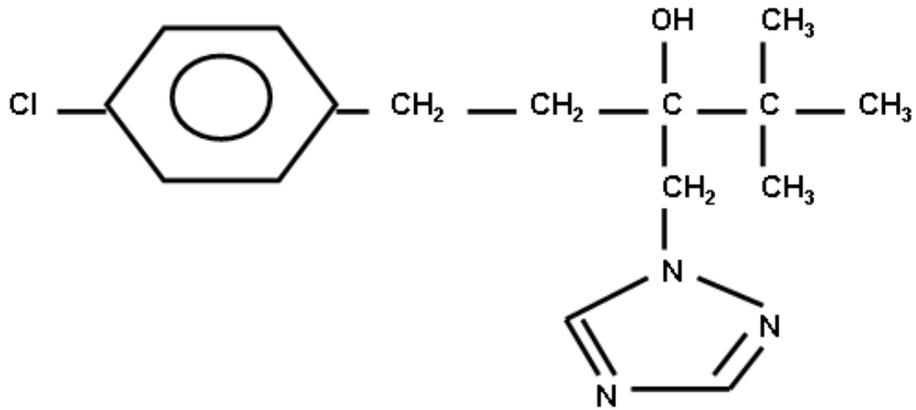
## 10. FIGURAS Y CUADROS.



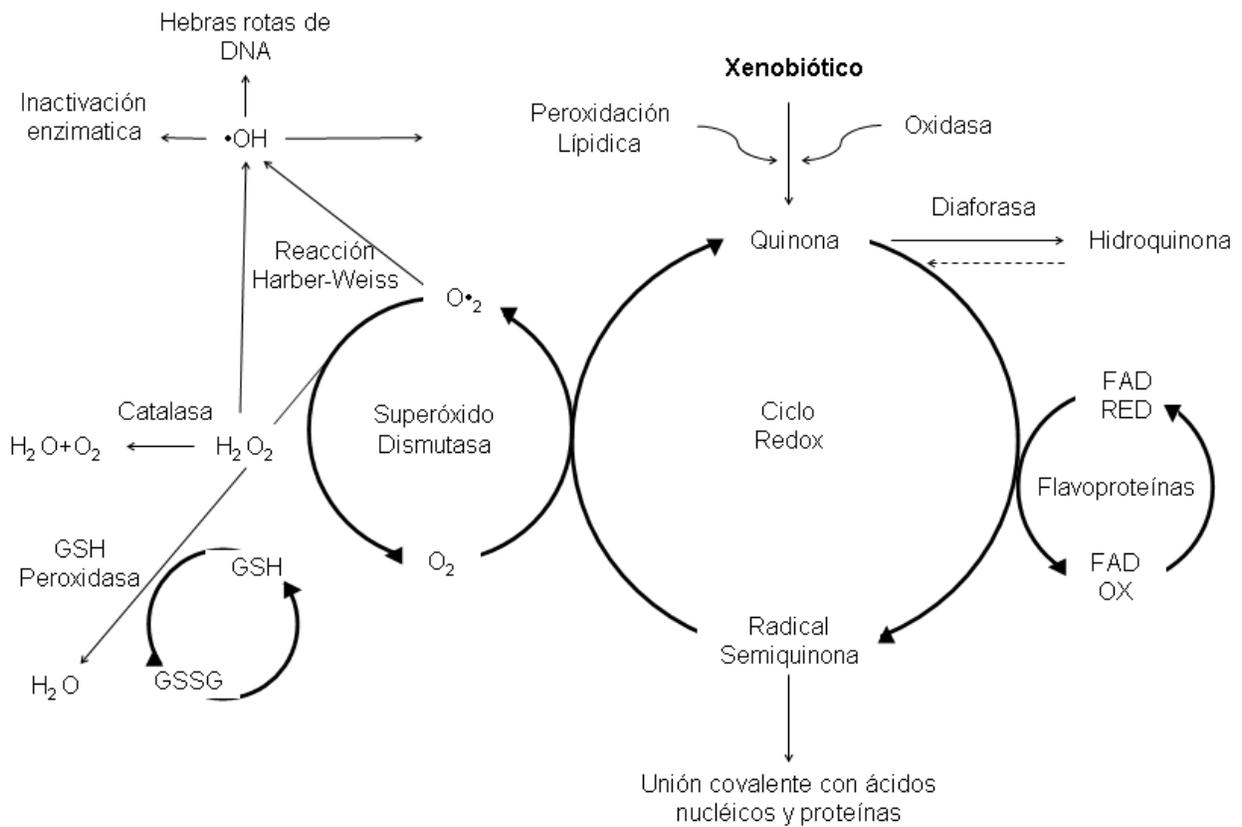
**Figura 1.-** Vías metabólicas de agentes xenobióticos en las plantas, los animales y el hombre (Sandermann 1988)



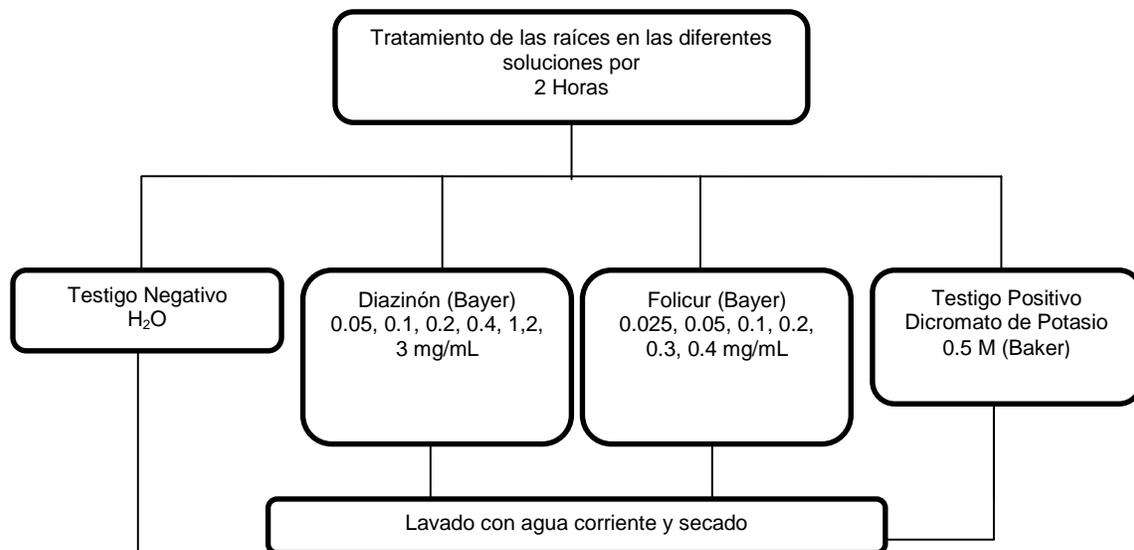
**Figura 2.-** Estructura del insecticida organofosforado: diazinón.



**Figura 3.-** Estructura del fungicida: foli-cur



**Figura 4.** Vía propuesta para el ciclo redox de metabolitos xenobióticos quinoides (Sandermann 1988)



**Figura 5.-** Diseño de los experimentos

**Cuadro 1.-** Efecto de diferentes concentraciones de diazinón en células de la raíz de *V. faba* medido en el ensayo cometa, cuantificación de micronúcleos, cantidad de proteínas y actividad de peroxidasa.

Experimento	Ensayo cometa	Micronúcleos	Cantidad de proteínas		Actividad peroxidasa	
	prom ± E.E.		prom ± E.E.	prom ± E.E.	%	prom ± E.E.
Testigo Negativo	0.53 ± 1.02	16.5 ± 3.13	7.6 ± 0.87	100	0.976±0.0122	100
Testigo Positivo	13.97 ± 2.04*	61.5 ± 6.74	-	-	-	-
Diazinón mg/mL						
0.05	1.65 ± 1.35	24.0 ± 3.74	6.66 ± 0.37	86	0.746 ± 0.0181	77
0.1	7.28 ± 3.42*	36.5 ± 4.62	5.87 ± 0.29	87	0.700 ± 0.0079	88
0.2	8.08 ± 3.12*	57.0 ± 5.80*	4.96 ± 0.70*	55	0.623 ± 0.0325*	75
0.4	11.73 ± 2.59*	65.5 ± 6.15*	3.88 ± 0.58*	58	0.625 ± 0.0091*	52
1.0	14.09 ± 2.88*	72.0 ± 6.45*	3.25 ± 0.09*	62	0.711 ± 0.0106*	60
2.0	19.70 ± 3.06*	76.0 ± 6.63*	2.70 ± 0.10*	43	0.593 ± 0.0134*	46
3.0	34.77 ± 3.59*	89.0 ± 7.16*	1.90 ± 0.40*	27	0.471 ± 0.0041*	22

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos por un análisis de varianza y se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey con una  $p < 0.001$  en todos los experimentos

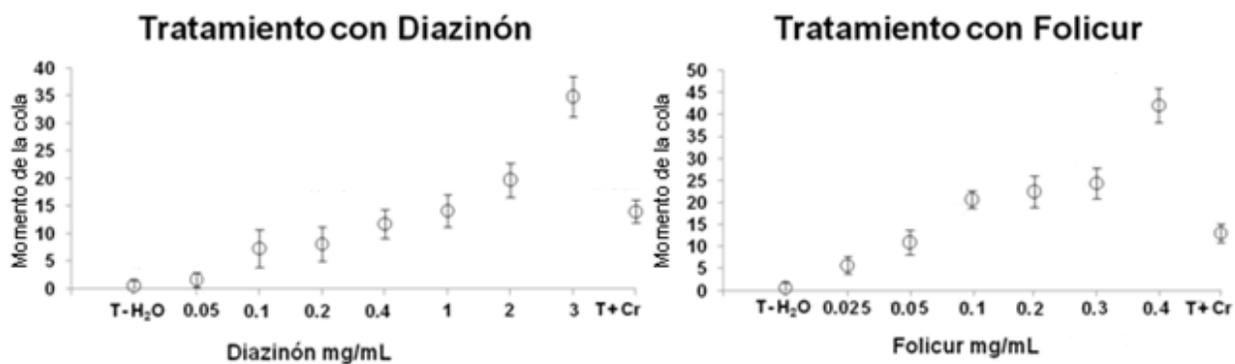
\*Para los experimentos de cantidad de proteína y actividad peroxidasa se utilizó una prueba de comparación múltiple Newman-Keuls,  $P \leq 0.05$ .

**Cuadro 2.-** Efecto de diferentes concentraciones de folicur en células de la raíz de *V. faba* medido en el ensayo cometa, cuantificación de micronúcleos, cantidad de proteínas y actividad de peroxidasa.

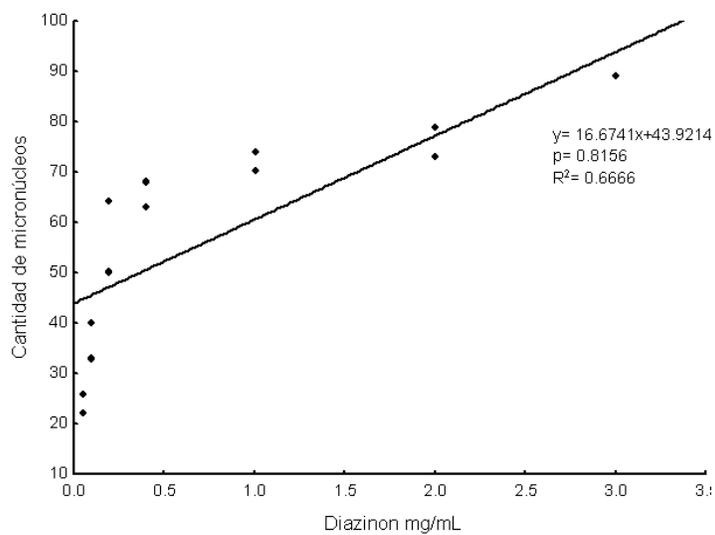
Experimento	Ensayo cometa	Micronúcleos	Cantidad de proteína		Actividad peroxidasa	
	prom ± E.E.		prom ± E.E.	prom ± SD	%	prom ± SD
Testigo Negativo	0.53 ± 1.02	16.5 ± 3.13	7.6 ± 0.873	100	0.976±0.0122	100
Testigo Positivo	13.97 ± 2.04*	61.5 ± 6.74	-	-	-	-
Folicur mg/mL						
0.025	5.72 ± 1.98*	45.5 ± 5.12*	6.300 ± 0.291	99	0.739 ± 0.0199	95
0.05	10.97 ± 2.74*	63.5 ± 6.06*	6.026 ± 0.513	86	0.425 ± 0.0472*	42
0.1	20.69 ± 2.04*	69.0 ± 6.32*	5.436 ± 0.441*	77	0.418 ± 0.0472*	51
0.2	22.45 ± 3.53*	77.5 ± 6.69*	3.973 ± 0.265*	53	0.443 ± 0.0088*	29
0.3	24.36 ± 3.48*	76.0 ± 6.63*	3.393 ± 0.265*	51	0.379 ± 0.0045*	28
0.4	42.06 ± 3.95*	79.0 ± 6.75*	1.796 ± 0.404*	24	0.349 ± 0.130*	25

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos por un análisis de varianza y se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey con una  $p < 0.001$  en todos los experimentos

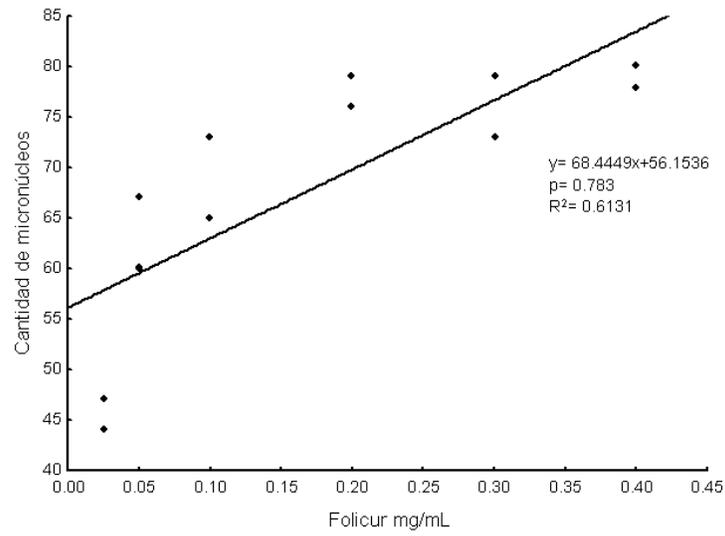
\*Para los experimentos de cantidad de proteína y actividad peroxidasa se hizo la comparación múltiple Newman-Keuls,  $P \leq 0.05$ .



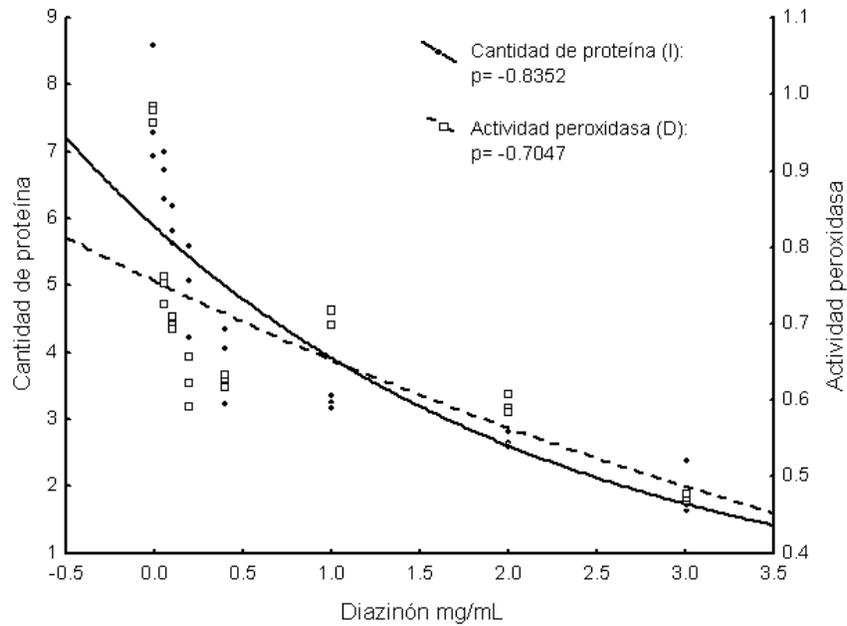
**Figura 6.-** Efecto de los plaguicidas Diazinón y Folicur sobre las células de la raíz de haba (*Vicia faba*), evaluado mediante la prueba de ensayo cometa.



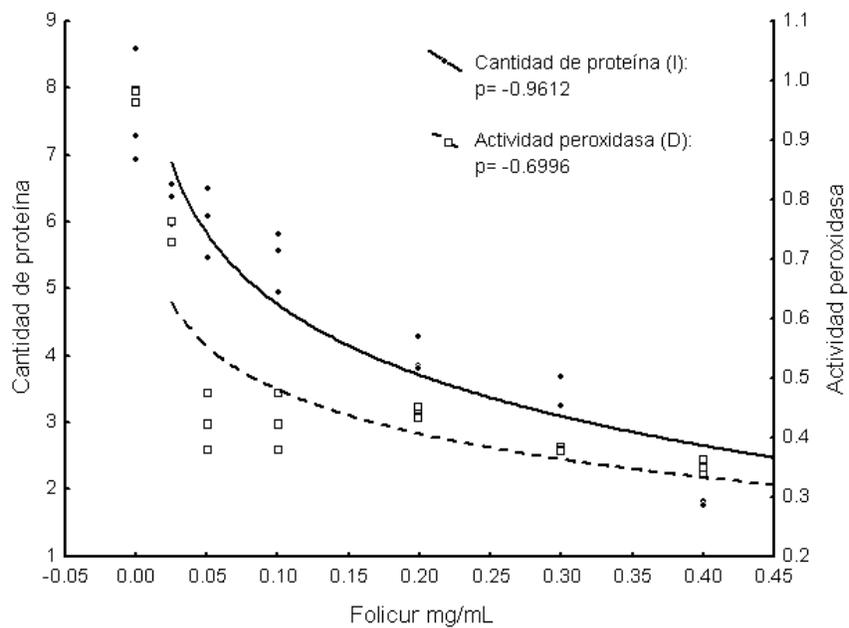
**Figura 7.-** Cantidad de micronúcleos encontrados en diferentes concentraciones de diazinón  $p < 0.05$ .



**Figura 8.-** Cantidad de micronúcleos encontrados en diferentes concentraciones de folicur  $p < 0.05$ .



**Figura 9.-** Cantidad de proteína y actividad peroxidasa en células de la raíz de *V. faba* expuestas a diferentes concentraciones de diazinón  $p < 0.05$ .



**Figura 10.-** Cantidad de proteína y actividad peroxidasa en células de la raíz de *V. faba* expuestas a diferentes concentraciones de folicur  $p < 0.05$ .

## 11. REFERENCIAS

Abdou H.M., El Mazoudy R.H. 2010. Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats. *Journal of Hazardous Materials* 182, 273–278.

Alahyary P., Ilkhani M., Fathy A., Nejati V. 2008. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11, 129-130.

Albert L. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. *Rev. Toxicol. En Línea (retel)* No.8, octubre 2005. <http://www.sertox.com.ar/retell/n0/01.pdf>

Anderson M., Agurell E., Vaghef H. Bolcsfoldi G. and Hellman B. 2003. Extended-term cultures of human T-lymphocytes and the Comet assay: a useful combination when testing for genotoxicity in vitro? *Mutat. Res.* 540, 43–55.

Andreu-Sánchez O., Paraíba L., Jonsson C. y Carrasco J., 2011. Acute toxicity and bioconcentration of fungicide tebuconazol in zebrafish (*Danio reiro*) *Environ. Toxicol.* 21, 000-000

Al-Saleh I A. 1994. Pesticides: a review article. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 13,151-161.

Bagchi D., Bagchi M., Hassoun E. y Stohs S. 1995. *In vivo* and *in vitro* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 104, 29-40.

Banks K. E., Turner P. K., Wood S. H. and Matthews C. 2005. Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 60, 28-36.

Barbera C. (1976). *Pesticidas agrícolas*. Ediciones Omega. Barcelona, 569 pp.

Briggs S.A. and Carson R. 1992. *Basic guide to pesticides. Their characteristics and hazards*. Washington: Taylor & Francis publishers.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 1991. México, 17, 97-102.

Cortés-Genich P., Villegas Arrizón A., Aguilar-Madrid G., Paz-Román M., Maruris-Reducindo M. y Juárez-Pérez C. 2008. Síntomas ocasionados por plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Med. Inst Mex Seguro Soc*, 46, 145-152.

Cox C. 2000. "Diazinon." *J. Pestic. Reform* 20, 15-20.

Dawod S. 2010. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem. Toxicol.* 48, 3345–3353

Dekergommeaux D.J., Grant W.F. and Sandhu S.S. 1983. Clastogenic and physiological Responses of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba* in vivo root tip assay system. *Mutat. Res.* 124,69-84.

De Serres F. 1978, Introduction: Utilization of higher plant systems as monitors of environmental mutagens, *Environ Health Perspect.* 27, 3–6.

Di Renzo F., Baccheta R., Bizzo A., Giavini E. y Menegola E. Is the amphibian *X. laevis* WECa good alternative method to rodent WEC teratogenicity assay? The example of three triazole derivative fungicides Triadimefon, Tebuconazole, Cyproconazole. *Reproduct. Toxicology*, 32,220-226.

Druart C., Millet M., Scheifler R., Delhomme O., Raeppe C., Vaufleury A. 2011. Snails as indicators of pesticide drift, deposit, transfer and effects in vineyard. *Science of the Total Environ*, 40,4280-4288.

FAO (2003). Código Internacional de Conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Organización para la Alimentación y la Agricultura. Adoptado por el 123 período de sesiones del Consejo.

Fairbairn W. Olive P. and O'Neill K. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-45.

Fenech M. y Morley A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat.Res.* 147: 29-36.

Fenech M. and Neville S. 1992, Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes, *Env. Mol. Mutagen*, 19, 27-36.

Fenech M. Rinaldi J. and Surreales J. 1994. The origin of micronuclei induced by cytosine arabinoside and its synergistic interaction with hydroxyurea in human lymphocytes, *Mutagenesis* 9, 273-277.

Fenech M. and Neville S. 1992, Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes, *Env. Mol. Mutagen*, 19, 27-36.

Fenech M. Rinaldi J. and Surreales J. 1994. The origin of micronuclei induced by cytosine arabinoside and its synergistic interaction with hydroxyurea in human lymphocytes, *Mutagenesis* 9, 273-277.

Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res.* 455, 81-95.

Ferreira D., Costa da Molta A., Kreutz L., Candida T., Loro L., Barcellos J. 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrochemicals. Elsevier All rights.

Fest C. y Schmidt K. 1973. The chemistry of organophosphorus pesticides. Springer-Verlag. Nueva York 122-135.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Roma: FAO, 1986, 28.

García J., 1998. Intoxicaciones agudas con plaguicidas. *Rev Panam Salud Pública* 4, 383-387.

Gichner T., Wagner E.D. y Plewa M.J. 1993. Differential responses of N-nitrosamines and aromatic amines in plant cell-microbe coinubation assay. *Biol. Plant.* 35, 401-406.

Gichner T., Vlemínský J. 1984. Inhibition of dimethyl-nitrosamine-induced mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* by diethyldithiocarbamate and carbon monoxide.

Giwerzman A. Rignell-Hydbom A. Rylander L. and Hagmar L. 2006. Reproductive hormone levels in men exposed to persistent organohalogen pollutants: a study of three European cohorts. *Environ Health Perspect*; 114, 1348-53.

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.

Gómez- Arroyo S., Calderón-Segura M.E. y Villalobos-Pietrini R. 1995. Sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 324-330.

Gonzalez F. J. and Gelboin G. H. 1994. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev* 26, 165-183.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidans of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990, 280, 18.

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

Henao B., Palacio J., Camargo M. 2005 Evaluación genotóxica de los plaguicidas cipermetrina y diazinón en tilapia roja (*Oreochromis sp.*). *Actual Bio.l* 27, 43-55.

Jayashree IV, Vijayalaxmi KK and Abdul RM 1994. The genotoxicity of Hinosan, an organophosphorus pesticide in the *in vivo* mouse. *Mutat. Res.* 322, 77-85.

Jeyaratnman J. y Maroni, M. 1994. Organophosphorous compounds. *Toxicology* 91: 15-27. Pesticide Book, 6a. edition. Ohio.

Klix M. Verreet J. and Beyer M: Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. *Crop Prot* 2007, 26, 683-690

Kroger R., Moore M.T., Cooper C.M., Holland M.M. 2009. Diazinon Accumulation and Dissipation in *Oryza sativa* Following Simulated Agricultural Runoff Amendment in Flooded Rice Paddies. *Journal of Water, Air and Soil Pollution* 201, 209-218.

Lehniger Albert L., Nelson David Lee, Cox Michael M. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition*, W.H. Freeman, 1119 pp.

Martínez-Valenzuela C. Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Waliszewski S., Calderón-Segura M., Gastélum R. y Álvarez-Torres A., 2009. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico *Environment International* 35,1155–1159.

Muller,W.U., Bauch, T., Streffer, C., Niedereichholz, F., and Bocker,W. 1994. Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 65,315–319.

Mullins JGL., Parker JE., Cools HJ., Togawa RC., Lucas JA., Fraaije BA., Kelly DE., Kelly SL. 2011. Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE* 6:e20973.

Narahashi T., Frey J., Ginsburg K. and Roy M. 1992. Sodium and GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. *Toxicol. Lett.* 64/65, 420-436.

Nelson D. R., L. Koymans T., Kamataki J. J., Stegeman R., Feyereisen, Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C. and Nebert D. W. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1-42.

Nguyen Van Cong, NguyenThanh Phuong and Mark Bayley, 2008. Effects of repeated exposure of diazinon on cholinesterase activity and growth in snakehead fish(*Channa striata*), *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72,699–703.

Ochoa-Acuña H.G., Walter Bialkowski, Gowri Yale, and Leighanne Hahn, 2009. Toxicity of soybean rust fungicides to freshwater algae and *Daphnia magna*, *Ecotoxicology*.

Olive, P. L., Banath, J. P., and Durand, R. E. 1990. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay. *Radiat. Res.* 122, 86–94.

Olive, P. L., Wlodek, D., Durand, R. E., and Banath, J. P. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell. Res.* 198, 259–267.

OMS 1992. Organización Mundial de la Salud. Empleo inocuo de plaguicidas. Noveno informe del Comité de Expertos en Biología de los Vectores y Lucha Antivectorial. Serie de Informes Técnicos 720. Ginebra.

Oruc E. 2011. Effects of Diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the Liver of *Cyprinus carpio* (L.) *Environ Toxicol* 26, 571–578.

Östling O. and Johanson, KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys.Res. Commun.*, 123, 291-298.

Oyama, T., Kagawa N., Kim Y., Matsumoto A., Isse T. and Kawamoto T. 2003. Lung Cancer and CYP1A1 or GSTM1 Polymorphisms. *Environ. Health. Prev. Med.* 7, 230-234.

Oyama T., Kagawa N., Kunugita N., Kitagawa K., Ogawa M., Yamaguchi T., Suzuki R., Kinaga T., Yashima Y., Ozaki S., Isse T., Kim Y., Kim H. and Kawamoto T. Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer development. 2004. *Frontiers in Bioscience* 9, 1967-1976.

Padungtod, C. 1999. "Sperm aneuploidy among Chinese pesticide factory workers: scoring by the FISH method", *American Journal of Industrial Medicine*, 36,2, August.

Planes S., y Carrero J.M., 1995, *Plagas del campo*, 12ª edición, México, 550 pp.

Pimentel P.E., Ortiz M.A. y Breña V.M. 2006. Tópicos de genética. Universidad Autónoma del Estado de México, Sociedad Mexicana de Genética, pp. 100-101.

Porta Casanellas J., López Acevedo Reguerin M. 2003. *Edafología para la agricultura yel medio ambiente*, Tercera edición, Mundi-Prensa, 929 pp

Restrepo I. 1992. Algunos impactos de los plaguicidas en el ser humano y el ambiente. En los plaguicidas en México. Comisión Nacional de Derechos Humanos, México, D.F., pp 35-74

Rodríguez-Arnaiz R. 2003. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos, 4ta edición. Fondo de cultura económica, México D.F., 17, 56-59 pp.

Rojas E, Lopez MC y Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B.* 722, 225-254.

Salazar-Arredondo E., Solís-Heredia M., Rojas-García E., Hernández-Ochoa I. y Quintanilla-Vega B. 2008. Sperm chromatin alteration and DNA damage by metilparation, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. *Reproductive toxicology*, 25: 455-460.

Savage J.R.K. 1993. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations, *Env. Mol. Mutagen.* 22, 198-207.

Sancho E., Villarreal M.J., Andreu E. y Ferrando M.D.. 2009. Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole, *Chemosphere*, 74,1171–1178.

Sandermann H. 1988. Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes, *Mutat. Res*, 197,183-194.

Sandermann H. 1992. Plant metabolism of xenobiotics, *Trends Biochem. Sci.* 17,82–84.

Sánchez P. L. C., Reyes B. E., López C. L., Recio R., Moran M. J., Cebrián M. E., Quintanilla V. P. 2004. "Organophosphorus pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 108-113.

Sarkar R. 2000. Effects of an organophosphate pesticide, Quinalphos, on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in adult male rats. *J. Reproduc. and Fertil.* 118, 29-38.

Schabath, M. B., Spitz, M. R., Grossman, H. B., Zhang, K., Dinney, C. P., Zheng, P. J., and Wu, X. 2003. Genetic instability in bladder cancer assessed by the Comet assay. *J. Natl. Cancer. Inst.* 95, 540–547.

Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31, 9-15.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.

Stanley E. Manahan. 2003, *Toxicological Chemistry and Biochemistry*, Lewis publishers, 3<sup>rd</sup> Edition, 363, 369-372.

Stanley E. Manahan. 2007. Introducción a la química ambiental. Editorial Reverté México, 725 pp

Súkran Cakir and Rabia Sarikaya, 2004. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in *Drosophila* wing spot test, Food and Chemical Toxicology 43, 443-450.

Surrales J. Xamena N. Creus A. and Morcos R. 1995. The suitability of micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair, Mutat. Res. 341, 43-59.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H.,Muyamae,Y., Rojas, E., Ryu, J. C., and Sasaki, Y. F. 2000. Single cell gel/ Comet assay: Guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35, 206–221.

Toni C., Loro V., Santi A., Cavalheiro de Menezes C., Cattaneo R., Clasen B., Zanella R. 2010. Exposure to tebuconazol in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). Comparative Biochemistry and Physiology, 153, 128–132.

Toni C., Ferreira D. Kreutz L., Loro V., Gil Barcellos L. 2010. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. Chemosphere 83, 579–584.

Tordoir W. y Van Sittert N. 1994. Organochlorines. Toxicology 91, 51-57.

Turrens J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 55, 335-344.

Ukpebor J., Llabjani V., Martin F., Halsall C., 2011. Sublethal genotoxicity and cell alterations by organophosphorus pesticides in MCF-7 cells: Implications for environmentally relevant concentrations. Toxicol Chem., 30, 632-639.

Vaglenov A., Creus A., Laltchev S., Petkova V., Pavlova S. y Marcos R. 2001. Occupational exposure to lead and induction of genetic damage. Environ. Health Perspect. 109, 295-298.

Valverde M. y Rojas E. 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. Mutat. Res. 681, 93–109.

Venegas W., Zapata Y., Carbonell E. y Marcos R. 1998. Micronuclei analysis in lymphocytes of pesticide sprayers from Concepcion (Chile). Teratog. Carcinog. Mutagen. 18, 123-129

Vicario IM. 1997. Peroxidación lipídica, antioxidantes de la dieta y la enfermedad cardiovascular. Nutr. Clin., 16, 19-28.

Villalobos-Pietrini R., Flores-Márquez A.R., Gómez-Arroyo S. 1994. Cytogenetic effects in *Vicia faba* of the polluted water from rivers of the Tlaxcala hydrological system, México. Rev. Int. Contam. Ambient. 10,83-88.

Volker Scheil, Cornelia Kienle, Raphaela Osterauer, Almut Gerhardt, Heinz-R. Köhler, 2009. Effects of 3,4-dichloroaniline and diazinon on different biological organization levels of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. Ecotoxicology, 18,355–363.

Ware G. W. 2000. The pesticide book. Fresno, CA: Thompson Publications. P. 181.

Ware G. and Whitacre D. 2004. An introduction to insecticides. 6th edition. Willoughby, OH Meister-Pro Informational Resources.

Yin Y, Liu X, Li B, Ma Z: Characterization of sterol demethylation inhibitor resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. Phytopathology 2009, 99:487-497.

Zalacain M., Sierrasesúмага L. y Patiño A. 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. An. Sist. Sanit. Navar. 28, 227 –236.

[www.bayercropscience.com](http://www.bayercropscience.com) Diciembre 7 de 2010

[www.terraia.com](http://www.terraia.com) Noviembre 27 de 2010

[www.helmmexico.com](http://www.helmmexico.com) Agosto 10 de 2011

[www.bayercropscience.com](http://www.bayercropscience.com) Diciembre 7 de 2010

[http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/schmidt\\_h02/parte08/02.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidt_h02/parte08/02.html) Agosto 23 de 2011