



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE GEOLOGÍA

**GENOTOXICIDAD DE INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS A TRAVÉS DE LA
DETERMINACIÓN DE ADUCTOS EN EL ADN COMO BIOMARCADORES DE
EXPOSICIÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

LILIANA SÁNCHEZ ESTRADA

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA**

**COMITÉ TUTOR: DR. RAFAEL DE JESÚS VILLALOBOS Y PIETRINI
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA
DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS**

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2013

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de marzo del presente, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **SÁNCHEZ ESTRADA LILIANA** con número de cuenta **98248913** con la tesis titulada **"GENOTOXICIDAD DE INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS A TRAVÉS DE LA DETERMINACIÓN DE ADUCTOS EN EL ADN COMO BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO**:

Presidente: DR. STEFAN MARIAN WALISZEWSKI KUBIAK
Vocal: DR. RAFAEL DE JESÚS VILLALOBOS Y PIETRINI
Secretario: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
Suplente: DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: DR. ADALBERTO EMILIO PIMENTEL PEÑALOZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de febrero de 2013.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas

Agradezco el apoyo financiero brindado por CONACyT

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.

Al comité tutor por dedicar su valioso tiempo y consejo para la revisión de éste trabajo:

Dr. Rafael de Jesús Villalobos y Pietrini

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Mi más sincero agradecimiento a mis sinodales:

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

Dr. Stefan Marian Waliszewski Kubiak

Dr. Adalberto Emilio Pimentel Peñaloza

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Por su disposición en la revisión y evaluación de este trabajo, por su concejo y propuestas para mejorarlo.

Con mucho amor a mis padres **Agustín Sánchez López** y **Sara Estrada Elizondo** por darme su amor, confianza y apoyo incondicionales, a mis hermanas **Sara** y **María de Lourdes**, a mis sobrinos **Lourdes** y **Edgar**, a la **Dra. Sandra Gómez Arroyo** por ser una persona que enriqueció mi vida con su consejo y amistad, al **Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda** investigador en Ciencias Médicas responsable de la Unidad de Proteómica Médica en el INMEGEN por el apoyo valioso durante la experimentación, sin el cual no habría desarrollado el presente trabajo, a **Gabriela Diego** por el increíble apoyo brindado siempre, a mis amigos: **Mariana, Diana, Fabiola, Paulina, Brenda, Ruli, Dany, Toño y Andy** por su entrañable cariño y compañía en todo momento y a **Temí** por su apoyo y amor.

A TU MEMORIA HERMANITA

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

B.B. King

ÍNDICE

| | Página |
|---------------------------------------------------------|---------------|
| RESUMEN | 8 |
| ABSTRACT | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| OBJETIVOS | 12 |
| HIPÓTESIS | 13 |
| ANTECEDENTES | 14 |
| Plaguicida | 14 |
| Historia de los plaguicidas | 14 |
| Plaguicidas organofosforados | 16 |
| Toxicidad de los plaguicidas organofosforados | 17 |
| Gusación | 19 |
| Folimat | 20 |
| Folidol | 21 |
| Metabolismo de los plaguicidas | 22 |
| Metabolismo animal | 23 |
| Metabolismo vegetal | 25 |
| <i>Vicia faba</i> | 26 |
| Mutagenicidad | 27 |
| Biomarcadores de exposición | 28 |
| Ensayo cometa | 29 |
| Aductos como biomarcadores de exposición | 30 |
| Aducto 8-OHdG | 30 |
| Inmunoensayo de ELISA | 32 |
| METODOLOGÍA | 34 |
| Preparación de extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> | 34 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Activación de la mezcla | 34 |
| Cuantificación del contenido de proteínas | 35 |
| Determinación de la actividad de peroxidasa | 35 |
| Extracción de linfocitos (técnica 1×10^6 linfocitos) | 36 |
| Viabilidad celular | 36 |
| Tratamientos | 36 |
| Ensayo cometa | 37 |
| Extracción de ADN | 38 |
| Diálisis de las enzimas | 38 |
| Digestión del ADN | 39 |
| Determinación del aducto 8-OHdG por inmunoensayo de ELISA | 39 |
| Análisis estadístico | 39 |
| RESULTADOS | 40 |
| Cuantificación de proteínas de la fracción enzimática S10 de <i>V. faba</i> incubada con los plaguicidas durante 4 horas | 40 |
| Genotoxicidad de gusatión, folidol y folimat en linfocitos periféricos humanos <i>in vitro</i> con y sin activación metabólica detectada mediante ensayo cometa | 41 |
| Tratamientos directos | 41 |
| Tratamientos indirectos | 43 |
| Frecuencias de células con cometa | 46 |
| Niveles de 8-OHdG en ADN de linfocitos periféricos humanos expuestos <i>in vitro</i> a los insecticidas organofosforados gusatión, folimat y folidol sin activación metabólica vegetal | 47 |
| DISCUSIÓN | 52 |
| CONCLUSIONES | 58 |
| REFERENCIAS | 59 |

RESUMEN

Los plaguicidas provocan efectos desfavorables sobre el ambiente y la salud, los cuales pueden tardar años en manifestarse. Son biológicamente activos y su uso representa un grave problema para la salud humana, especialmente como inductores de cáncer. Tomado esto en cuenta, se realizó un estudio del daño al ADN de linfocitos de sangre periférica humana, ocasionado por la exposición a los plaguicidas organofosforados gusatión, folidol y folimat. Se investigó la influencia del metabolismo vegetal de *Vicia faba* (mezcla S10) para biotransformar estos plaguicidas de promutágenos a mutágenos, utilizando como biomarcadores: la técnica de electroforesis unicelular (ensayo cometa) y la detección de aductos mediante el inmunoensayo de ELISA.

Los linfocitos se obtuvieron de personas no expuestas y sanas. Se utilizaron como testigos negativos el medio RPMI y el dimetilsulfóxido (DMSO) 0.5 M. Como testigo positivo el etanol 0.1 M, cuya actividad mutagénica aumenta significativamente por acción del metabolismo vegetal.

Se evaluó la proporción de células de sangre periférica humana con y sin daño, además de la longitud de la cauda del cometa (μm) de una muestra de 100 células por tratamiento. Se analizaron por registro visual empleando el “software Comet Assay IV”. Los experimentos se llevaron a cabo con y sin activación metabólica adicionando la fracción y cinco concentraciones de cada insecticida. Los resultados mostraron que de manera directa, hay incremento en la cantidad de cometas con intensidades y momentos de la cauda significativamente mayores en las tres primeras concentraciones de los tres insecticidas. De manera indirecta, sólo el folidol presentó elevación del daño. Con los tres insecticidas se observó muerte celular y la presencia de núcleos desintegrados por lo que la razón para no observar diferencias significativas pudo ser una elevada toxicidad, sin embargo la viabilidad celular fue elevada. De lo anterior se concluye que el insecticida folidol es un promutágeno activado por la fracción enzimática S10, mientras que el folimat y el gusatión se comportaron como mutágenos directos en dicho ensayo.

Los resultados de la determinación de aductos, indicaron que existe incremento significativo de daño genotóxico con los tres plaguicidas, con respecto a los testigos y con relación a las concentraciones, incluyendo a los tratamientos con el metabolismo vegetal.

Estos resultados permiten concluir que los insecticidas organofosforados gusatión, folidol y folimat actúan directamente de ADN formando aductos y la exposición a los metabolitos secundarios aumenta significativamente la formación de los mismos lo cual representa un riesgo grave a la salud.

ABSTRACT

Pesticides have adverse effects on the environment and health, which take years to manifest. They could biologically active and their use is a serious problem in human health, especially developing of diseases such as cancer. The pression this is a study of DNA damage in human peripheral blood lymphocytes, caused by exposure to organophosphate pesticides gusation, folidol and folimat. The influence of *Vicia faba*'s plant metabolism (S10 mixture) in the biotransformation of these promutagens to mutagenic pesticides was tested using two biomarkers: the unicellular electrophoresis technique (comet assay) and the detection of adducts by ELISA immuno essay.

Lymphocytes were obtained from healthy unexposed persons to pesticides. The RPMI medium and dimethylsulfoxide (DMSO) 0.5 M were used as negative controls. As a positive control compound ethanol 0.1 M was used, whose mutagenic activity is significantly increased by the action of plant metabolism.

Proportions of human peripheral blood cells with and without damage and the length of the tail of the comet (microns) of a sample of 100 cells per treatment were evaluated. Visual records were analyzed using the software "Comet Assay IV". Experiments were conducted with and without metabolic the activation fraction and adding five concentrations of each insecticide. The results showed that there is a direct increase in the number of comets with intensities and moments of cauda significantly higher for the first three levels. The indirect treatments only folidol presented an elevation of the damage, although for higher concentrations it was not significant, due to the toxicity of the compound that caused cell death and the presence of clouds. From the above results it is concluded that the insecticide folidol is a promutagenic and activated by the enzymatic fraction S10, while gusation and folimat behaved as direct mutagens in this assay.

The determination of adducts indicate a significant increase of genotoxic damage of the three pesticides as compared to controls and related with concentrations. It could suggest that the gusation, folidol and folimat could have a direct effect forming DNA-adducts, and the exposure generated by secondary metabolites increased the formation of aducts, which represents a serious risk to health.

INTRODUCCIÓN

La fuente de alimento más importante para el ser humano son las plantas, éstas participan metabolizando y acumulando una gran cantidad de compuestos en el ambiente. El desarrollo de la agricultura fue fundamental para garantizar la obtención de alimento, permitió el desarrollo de las civilizaciones y actualmente es la principal actividad económica de México (Carrasco 1981, Garrabou *et al.* 1985).

Con el surgimiento de la agricultura fue necesario resolver retos como la prevención de la competencia con las malas hierbas, enfermedades y plagas que atacan a los cultivos. Con esta finalidad se desarrollaron sustancias que, pese a que cumplen con su objetivo, han resultado tóxicas para el ser humano. Entre las más abundantes se encuentran los plaguicidas, compuestos a los que no solo los trabajadores agrícolas están expuestos. La población en general tiene contacto indirecto al alimentarse de las plantas asperjadas y a largo plazo por la contaminación residual de suelos y mantos acuíferos (Ledesma y Delgado 1994).

Con la intención de comprender las consecuencias que tiene dicha exposición en la salud humana, se ha probado el efecto genotóxico de muchos agroquímicos obteniendo resultados en los cuales aparentemente son inofensivos al utilizar el metabolismo animal, sin embargo existen pocos estudios empleando metabolismo vegetal. Hay evidencias experimentales de que algunos compuestos únicamente se activan a través del metabolismo de las plantas, lo que aumenta el riesgo en los seres humanos de ingerir mutágenos activados. Actualmente una de las consecuencias que se asocian a la exposición a dichos compuestos derivados del metabolismo es que surgen radicales libres, que pueden causar daño a la célula alterando la estructura del ADN, fosfolípidos, ácidos grasos y proteínas. Se ha establecido su implicación como genotóxicos en la salud humana, principalmente como promotores de enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Plewa y Gentile 1982, Beckman *et al.* 1990).

OBJETIVOS

Analizar el daño al ADN mediante el ensayo cometa alcalino en linfocitos de sangre periférica humana, expuestos *in vitro* a dichos insecticidas, con y sin activación metabólica vegetal por la fracción S10 de *Vicia faba*.

Evaluar el efecto de los insecticidas organofosforados gusatión, folimat y folidol sobre el ADN en linfocitos humanos *in vitro*, mediante la inducción de aductos por inmunoensayo de ELISA. Asimismo, verificar si dichos insecticidas son mutágenos directos o promutágenos que requieren de la participación del metabolismo vegetal para expresarse.

HIPÓTESIS

- 1) Si un mecanismo de acción, para provocar daño genético, de los insecticidas gusatión, folimat y folidol se espera que al exponer *in vitro* a los linfocitos humanos, mediante el ensayo cometa alcalino se observe un incremento en la citotoxicidad y la inducción de daño al ADN.
- 2) Diversos insecticidas organofósforados han mostrado ser genotóxicos, ya que inducen daño al ADN y son citotóxicos en linfocitos humanos *in vitro*, por lo que se espera que folimat, gusatión y folidol tengan el mismo efecto, el cual se evidencie a través del incremento en la inducción de aductos.
- 3) Las plantas tienen sistemas enzimáticos eficientes que metabolizan a los compuestos xenobióticos, entre los que se encuentran los insecticidas organofosforados, por lo que a través de la fracción microsómica S10 de *Vicia faba* se evidenciará la actividad promutagénica de estos insecticidas.

ANTECEDENTES

Plaguicida

Un plaguicida es una “sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o animales; las especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan daño duradero u otras que interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos; los artículos agrícolas de consumo, la madera y sus productos, el forraje para animales o los productos que pueden administrárseles para el control de insectos, arácnidos u otras plagas corporales.” Se incluyen sustancias desecantes, aquellas que modifican el metabolismo de las plantas regulando el crecimiento, la dehiscencia prematura de los frutos y las que sirven para mantener a las plantas que se almacenan y transportan (FAO 1996, Ortiz-Hernández *et al.* 1997).

Historia de los plaguicidas

El uso de sustancias derivadas de plantas y del petróleo ocurrió a principios del siglo XIX. En 1940 con el descubrimiento del dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) y sus propiedades insecticidas, comienza el uso extenso de los plaguicidas organosintéticos (OMS 1990).

Con su descubrimiento se han fabricado diversidad de sustancias contra las plagas (Fig. 1). La necesidad de encontrar productos cada vez más selectivos y potentes, así como el desarrollo económico en torno a la industrialización de dichos compuestos, incrementó su fabricación y su consumo a nivel mundial. A pesar del beneficio económico que éstos representan, los efectos contaminantes y en la salud humana son cada vez más evidentes (OMS 1990, Estrada 1998).

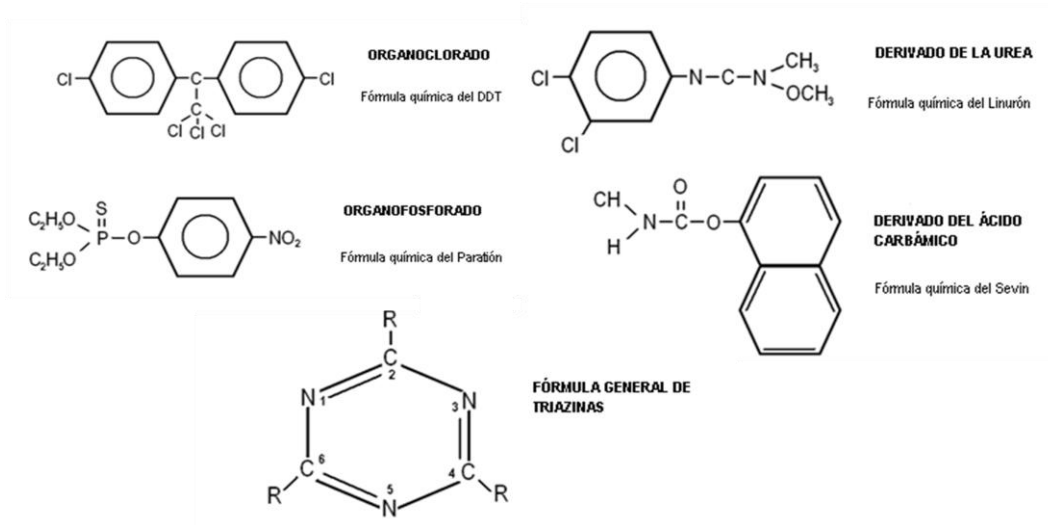


Fig. 1. Estructura química de algunos tipos de plaguicidas.

Entre los plaguicidas que más se comercializan y se usan, en muchos casos indiscriminadamente, se encuentran: los organoclorados y los organofosforados. Los primeros son hidrocarburos que contienen cloro en su molécula, tienen alta persistencia en el ambiente y son solubles en disolventes orgánicos. Los segundos tienen un átomo central de fósforo en la molécula y son los más tóxicos. Se descomponen con mayor facilidad y se degradan por oxidación e hidrólisis, dando origen a productos solubles en agua, que son menos persistentes. Aunque los organofosforados son de baja acumulación en el cuerpo humano, ponen en riesgo su salud, ya que tienen efectos tóxicos y mutagénicos que pueden derivar en efectos teratogénicos y desarrollo de cáncer (Cremlyn 1979, OMS 1993, Al-Saleh 1994).

En 1948 se sintetizaron plaguicidas menos tóxicos como los carbamatos y las piretrinas. Actualmente los organofosforados y los carbamatos son los plaguicidas más usados reemplazando a los organoclorados (Ramírez y Lacasaña 2001).

Según la DGEIE (1995) los plaguicidas que más se utilizan en México son los carbámicos, organoclorados y organofosforados. Los últimos son de especial interés porque tienen alta demanda para el control de plagas en ámbitos muy variados: “doméstico, agrícola y veterinario” (Ortiz-Hernández *et al.* 1997, Pose *et al.* 2000).

De acuerdo a su toxicidad se han clasificado por su peligrosidad, basada en la dosis letal media (DL_{50}). La DL_{50} se refiere a la cantidad de sustancia capaz de matar a 50 de 100 animales de laboratorio y su equivalente es toxicidad aguda (Fukuto 1979, López 1993).

Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados, son ésteres derivados del ácido fosfórico. La mayoría de las formulaciones son muy volátiles, se hidrolizan en medios alcalinos y a temperaturas elevadas, estas propiedades hacen que se disipe con rapidez en el ambiente. Su color varía de cristalino a amarillo parduzco, son solubles en agua y en disolventes orgánicos (muchos son liposolubles). Fueron sintetizados por primera vez durante la Segunda Guerra Mundial aunque no con fines agrícolas. En 1947 cuando el químico Gerhard Schrader comprobó que muchos de los compuestos orgánicos del fósforo son tóxicos para los insectos, comenzó a extenderse su uso, se han preparado y probado en el campo muchos compuestos organofosforados de diversos tipos y se han mejorado las formulaciones para hacerlas más eficientes erradicando las plagas. 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 empleo común en todo el mundo (Córdoba 1986, Bismuth 1987, Pose *et al.* 2000, Ware 2000).

Se estima que alrededor del mundo se utilizan varios miles de toneladas de organofosforados, siendo los más requeridos por su menor persistencia en el ambiente (Fernández 1970, Burger 1995). Sin embargo los efectos adversos de la exposición humana a estos compuestos se han intensificado.

La exposición puede darse por contacto dérmico, inhalación, ingestión de agua, suelo o vegetales contaminados. Su toxicidad depende de su cinética: absorción, distribución, metabolismo y eliminación así como por factores inherentes al individuo como la edad, sexo, dotación genética, estado de salud, condición nutricional, estilos de vida, vía principal de absorción, entre otros. (OMS 1990, 1993, Fait y Colosio 1998).

La mayoría de los insecticidas organofosforados incluyen al malatión, clorpirifos, terbufos, diazinón, metilparatión, forato, metilazinfos y dimetoato como ingredientes activos (Kiely *et al.*, 2004).

Los organofosforados afectan el sistema nervioso central, desde la unión neuromuscular no colinérgica. Los compuestos organofosforados presentan dos características básicas, son más tóxicos para vertebrados por ser inhibidores permanentes de la colinesterasa y no son persistentes en el medio, principal causa que motivó la sustitución de los organoclorados por los organofosforados. 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 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

Dentro del grupo de los organofosforados existe un intervalo muy amplio de toxicidad. La amplitud de dicho intervalo revela la 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 ya que el oxón es un potente inhibidor de la colinesterasa. Otra diferencia bien establecida, es la que presentan los derivados con grupo-metilo, los cuales son menos tóxicos en mamíferos que los grupos 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 en cambio los grupos tioles tienen menor efecto neurotóxico, pero atraviesan con mayor facilidad la membrana celular (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. Por consumir alimentos contaminados). 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 iguales o más tóxicos que el compuesto 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 implicada/s (categoría toxicológica) (Sultatos 1994).

Cuando los plaguicidas ingresan a 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, neuritis, manifestaciones psiquiátricas, trastornos hepatorenales, problemas neurológicos, inmunológicos, metabólicos, endocrinos, conjuntivitis, diarrea, calambres abdominales, dificultad para respirar, entre otros (Ortega et al. 1994). Asimismo, han sido relacionados con el aumento en la incidencia de leucemia y el cáncer de vejiga en agricultores, como consecuencia de los efectos genotóxicos de algunos plaguicidas (Márquez 2003).

Los efectos nocivos de la exposición a plaguicidas no siempre se observan de forma inmediata. Pueden pasar periodos de varios años que derivan en enfermedades agudas y crónicas por lo que es importante el biomonitoreo de este tipo de compuestos (Hagmar *et al.* 2001, Ascarrunz *et al.* 2005). La relevancia de identificar biomarcadores de genotoxicidad radica en poder inferir un estado de prepatogénesis y prevención de

enfermedades. Entre los biomarcadores de genotoxicidad que han sido utilizadas ampliamente, están la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos, aberraciones cromosómicas y el ensayo de electroforesis alcalina, mejor conocido como ensayo cometa (Vigreux 1998, Pastor 2002, Bolognesi 2003). Actualmente se han incorporado técnicas complementarias que permiten abordar el daño al ADN desde el punto de vista molecular y haciendo posible detectar modificaciones desde el nivel de bases nitrogenadas, hasta deformaciones en la doble hélice. Estos cambios a su vez pueden deberse a oxidaciones o a la unión covalente de los mutágenos al ADN y formar aductos. Los cuales son por tanto un biomarcador que permite cuantificar estas interacciones y que tienen relación con el desarrollo de mutaciones puntuales y cromosómicas, que pueden propiciar la transformación celular. Si las alteraciones ocurren en proto-oncogenes o genes supresores de tumores, pueden contribuir al envejecimiento prematuro, producir enfermedades vasculares, autoinmunes o degenerativas, originar problemas reproductivos y aumentar las enfermedades genéticas, tanto monogénicas como poligénicas, así como el desarrollo de cáncer en el órgano blanco (Ascarrunz *et al.* 2005).

Gusatión

Este insecticida organofosforado (Fig. 2), es extremadamente tóxico (Tabla 1), 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).

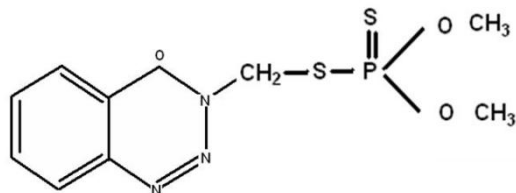


Fig. 2. Fórmula química de Gusatión

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 Salud, 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).

Folimat

Nombre químico (IUPAC): O,O-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforotioato; Meptox; Metafos; Metil fosferno; Metil niran; Metiltiofos; Metron; Nitrox; Oleovofotox; Parataf; Metil paration, entre otros (Fig. 4). Su fórmula molecular es $C_5H_{12}NO_4PS$ Este plaguicida muestra una toxicidad distinta para varios grupos de organismos. Es ligeramente tóxico para plantas acuáticas, aves, nemátodos y gusanos planos. Presenta toxicidad alta en crustáceos y está clasificado por la OMS como extremadamente tóxico (Tabla 1) En suelos tratados favorece la producción de biomasa y la actividad reproductora de los microorganismos (sobre todo de bacterias y actinomicetos), ya que utilizan este compuesto como fuente de alimento; sin embargo, en aguas contaminadas puede reducir el crecimiento de las algas, aunque en algunas especies se ha observado resistencia después de varias semanas de exposición. Los efectos de este plaguicida sobre las poblaciones de animales son poco probables en el campo, sin embargo, las abejas son sensibles incluso a bajas dosis y otros organismos pueden ver comprometida su salud con concentraciones elevadas (NIOSH 1983).

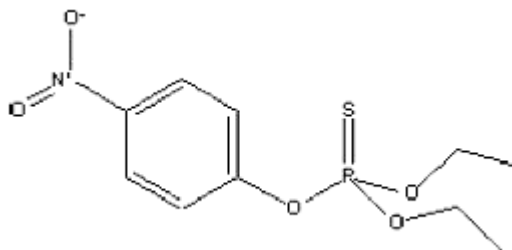


Fig. 4. Fórmula química de Folimat

Folidol

Es un insecticida de amplio espectro y es tóxico por contacto, ingesta o inhalación. El ingrediente activo es el paratión metílico y su nombre químico es O,O-dimetil-O,4-nitrofenil fosforotioato (Fig. 3). Es conocido como: O,O-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforotioato, O,O-dimetil S-[2-(metilamino)-2-oxoetil] fosforotioato; Dimethoate-met; 2-Dimetoxifosfinoiltio-Nmetilacetamida; O,O-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforotioato; O,O-dimetil fosforotioato S-éster con 2- mercapto-Nmetilacetamida. Su fórmula molecular es: $C_8H_{10}NO_5PS$ y se aplica en forma de “spray” (emulsión: 500 g/l; aceite: 10%). Su uso contra los insectos picadores y succionadores está muy difundido en la agricultura y en el cultivo de frutas, verduras y uvas. También se aplica en la lucha contra ácaros, coleópteros y orugas. En las ciudades es utilizado en la jardinería y para el control de plagas domésticas y se asperja en las paredes de las viviendas para evitar el ingreso de insectos (NIOSH 1983). Está clasificado por la OMS como muy tóxico (Cuadro 1), sin embargo su venta en México no está debidamente regulada y es un compuesto al que se tiene fácil acceso.

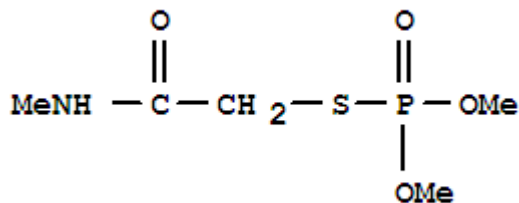


Fig. 3. Fórmula química de Folidol

Cuadro 1. CLASIFICACIÓN DE PELIGROSIDAD DE ACUERDO CON SU TOXICIDAD SEGÚN LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS 1990).

| Plaguicida organofosforado | Clasificación |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Gusatión | Muy peligroso |
| Folimat | Extremadamente peligroso |
| Folidol | Muy peligroso |

Metabolismo de los plaguicidas organofosforados

Se trata de compuestos generalmente apolares que tienden a disolverse en grasas. Esto es de interés biológico ya que hace que la piel, sea una de las más comunes vías de absorción. La mayoría de los organofosforados son insecticidas de contacto, fumigantes y de acción estomacal, pero también pueden ingresar sistémicamente ya que las plantas los absorben e integran en su savia y tejidos intoxicando a los insectos que se alimentan de ellas. Esto permite que dichos compuestos ingresen a las vías metabólicas tanto de las plantas asperjadas como de los animales que las consumen (Cremllyn 1990).

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas realizadas por los seres vivos para la obtención de energía y para la construcción de biomoléculas. Cuando un agente xenobiótico se absorbe, es biotransformado (Fig. 5). Las enzimas que se encargan de la biotransformación de los compuestos son muy variadas. Se encuentran en el citoesqueleto, en el retículo endoplásmico, en las mitocondrias y en el caso de los mamíferos, en las células hepáticas. Además de la catálisis, las reacciones metabólicas también se encargan de la eliminación de aquellas sustancias y sus metabolitos que resultan tóxicas, sin embargo, la capacidad de eliminación está limitada por la concentración del agente tóxico (Grover y Cessna 1991).

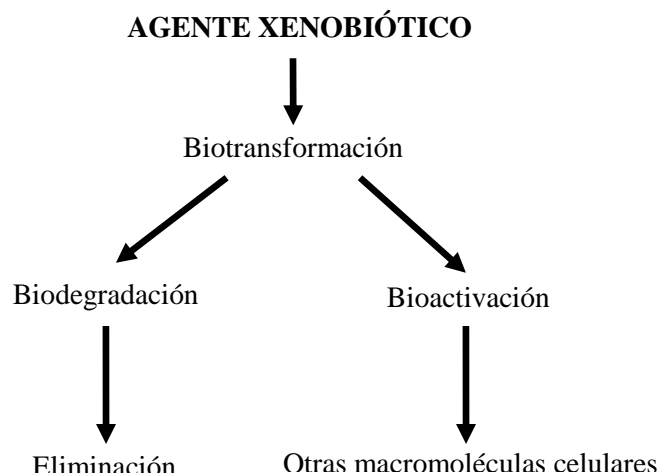


Fig. 5. Esquema de la biotransformación metabólica (tomado de Albert 1988).

Generalmente, los productos de su biotransformación son más solubles en agua, lo que facilita su eliminación y disminuye su toxicidad. En otras ocasiones se obtiene un compuesto intermedio que resulta más reactivo que el original y puede interactuar con otras macromoléculas celulares (Albert 1988, Cremllyn 1990).

Las reacciones que comprenden el metabolismo son principalmente hidrólisis, oxidaciones y reducciones. Cuando el compuesto tiene un grupo funcional, 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

La descomposición de los compuestos organofosforados una vez absorbidos ocurre, en parte, por la hidrólisis mediada por esterasas “A”, lo cual actúa de manera desintoxicadora. Las esterasas “B” por el contrario, son las moléculas diana sobre las que los organofosforados actúan tóxicamente en el organismo, como es el caso de la

acetilcolinesterasa cuya actividad bioquímica resulta inhibida, dependiendo de la naturaleza del propio compuesto y de su concentración (Maluszynska y Juchimiuk 2005).

En general, el catabolismo de compuestos xenobióticos es aplicable al de los organofosforados. Sigue dos fases de desintoxicación: La fase I, en la que ocurren reacciones de activación y fase II, de conjugación. En ocasiones, el organofosforado requiere que se metabolice antes de convertirse en un compuesto biológicamente activo y por tanto nocivo en el organismo (Sanderman 1988, Sultatos 1994). En el hígado de mamíferos se originan los grupos radicales característicos de cada organofosforado por acción de citocromos P-450. Se producen hasta 8 alquilfosfatos diferentes (por acción de las esterasas A), que son comunes para estas sustancias. Todos los compuestos resultantes son solubles en agua y se eliminan por la orina y las heces (Albert 1988, Maluszynska y Juchimiuk 2005). Las reacciones de las fases mencionadas se resumen en la figura 6.

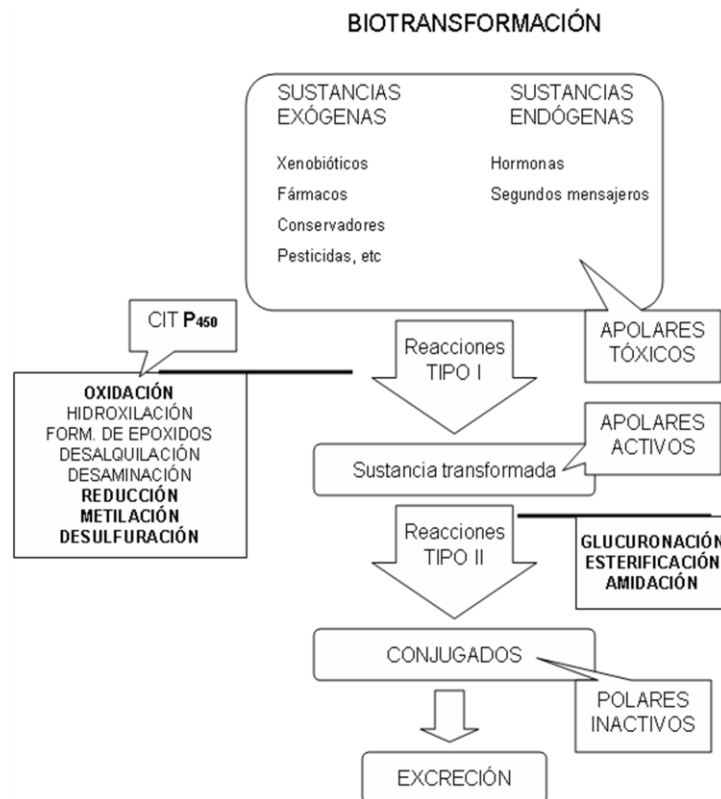
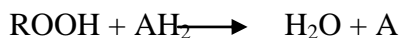


Fig.6. Fases de la biotransformación de xenobióticos (tomado y modificado de Maluszynska y Juchimiuk 2005).

Metabolismo vegetal

El sistema vegetal es capaz de biotransformar agentes xenobióticos por oxidación, transformación química y conjugación e incorporarlos en sus tejidos (Maluszynska y Juchimiuk 2005). Los sistemas vegetales adquieren grupos reactivos tipo -OH, -SH, -COOH ó -NH₂ que participarán en la conjugación. En general se conocen 3 fases en el metabolismo vegetal. Las reacciones de la fase I (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, Coleman *et al.* 1997).

Las principales enzimas involucradas en el mecanismo de activación de compuestos en sistemas vegetales son las peroxidasas. Éstas median reacciones de oxidación con oxígeno molecular y peroxidación, catalizando la siguiente reacción:



La peroxidasa con sus diferentes formas isoenzimáticas, parece estar relacionada con la oxidación de numerosos compuestos. Se han identificado tres tipos de reacciones en las que pueden intervenir: peroxidantes, oxidantes e hidroxilantes.

En las plantas el tipo de enzima peroxidasa es ferriprotoporfirina peroxidasa (que contiene el grupo heme y puede reducir el peróxido, mientras un electrón donador es oxidado). Este 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, Plewa y Gentile 1982, Sandermann *et al.* 1990).

El término activación metabólica vegetal connota el proceso por el cual un promutágeno o mutágeno indirecto es transformado por la acción metabólica de una planta en un mutágeno (Plewa 1978, Gentile *et al.* 1982, 1986, Plewa y Gentile 1982, Plewa *et al.* 1988, Gómez-Arroyo *et al.* 1995). En plantas superiores, se conoce poco acerca del destino metabólico de los compuestos organofosforados y en los animales de los productos y residuos. 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 organismo o tejido 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. Se analiza la inducción de mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas, ensayo cometa, aductos, etc. 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, 2000).

Vicia faba

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

Actualmente, los bioensayos con plantas superiores son recomendados para su empleo en monitoreo de posibles efectos genotóxicos de compuestos como los plaguicidas y *V. faba* es muy sensible a dichos compuestos (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 *et al.* 1995, 2000, Flores-Maya *et al.* 2005).

Mutagenicidad

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 se asocia a distintos efectos (Wulff y Andrioli 2006).

La mutagenicidad es una forma de evidenciar 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, además de ser capaces de inducir cáncer cuando (Wulff y Andrioli 2006).

Los compuestos que actúan directa o indirectamente sobre el ADN o por evento clastogénico se denominan genotóxicos. Su potencial es un factor de riesgo primario para efectos crónicos o a largo plazo, tales como efecto carcinogénico y toxicidad reproductora.

Actualmente los estudios citogenéticos y moleculares atienden a la demanda de conocer las evidencia toxicológicas de la acción mutagénica y carcinogénica de los plaguicidas. Esto surge como resultado de su uso extenso por grandes poblaciones que se exponen de manera ocupacional y accidental. La mayoría de los carcinógenos genotóxicos forman aductos covalentes o afectan indirectamente a través de la inducción de especies reactivas de oxígeno. Algunos carcinógenos no son genotóxicos pero estimulan la proliferación celular incrementando la probabilidad de producción de errores espontáneos durante la replicación del ADN. Butterworth y Bogdanffy (1990), señalan que existe gran cantidad de referencias bibliográficas que apoyan que la estimulación mitogénica del crecimiento y eventos asociados con la muerte celular, tales como inflamación, liberación

de nucleasas y estimulación de la proliferación celular regenerativa pueden jugar un papel crítico en el proceso de carcinogénesis inducida por agentes químicos.

Existen diferentes enzimas como las catalasas y las peroxidasas que actúan como mecanismos naturales que eliminan estas especies reactivas de oxígeno. Si las enzimas fallan y se produce daño en el ADN, la tendencia es a repararlos. Si las alteraciones no son reparadas, pueden inducir proliferación celular si se han producido en genes críticos (proto-oncogenes o genes supresores de tumores) (Jones y Baylin 2002). Además se pueden producir alteraciones reversibles llamadas modificaciones epigenéticas que alteran la estructura de la cromatina y la expresión de genes (Jones y Baylin 2002). La metilación del ADN y la acetilación de histonas constituyen los mecanismos epigenéticos más importantes.

En general, las pruebas de micronúcleos y el ensayo cometa son de gran utilidad en la evaluación de daño en el ADN, por la rapidez con que se realizan y por su uso potencial para estudiar cualquier población celular eucarionte (Albertini 2000). Algunos de los estudios que se han realizado establecen asociación entre exposición a plaguicidas y la presencia de aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas y/o micronúcleos (Au *et al.* 1999, Antonicci *et al.* 2000, Bolognesi 2003).

Biomarcadores de exposición

El monitoreo biológico consiste en medir en una muestra biológica la capacidad de un agente tóxico potencial, un metabolito o una reacción química que sea dañina para el organismo, evaluando el daño inducido.

El resultado de la exposición a un agente tóxico puede medirse mediante biomarcadores, detectando los cambios químicos, físicos o morfológicos que un sistema biológico determinado pueda presentar. La importancia de identificar biomarcadores de genotoxicidad radica en que permiten inferir un estado de prepatogénesis y prevención de enfermedades. Entre los biomarcadores de genotoxicidad que han sido utilizadas ampliamente, están la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos, aberraciones cromosómicas y el ensayo de electroforesis alcalina, mejor conocido como ensayo cometa (Pastor 2002, Bolognesi 2003).

Se han desarrollado técnicas para detectar gran cantidad de mutágenos con potencial carcinogénico. Los aductos, al estar constituidos por el agente en el lugar dónde actúa y ocurre el daño, pueden ser usados eficientemente como biomarcadores de exposición (Lauwerys y Hoet 1993, WHO 1996).

Los efectos nocivos de la exposición a plaguicidas no siempre se observan de forma inmediata. Pueden pasar periodos hasta de años que derivan en enfermedades agudas y crónicas por lo que es importante el biomonitorio de este tipo de compuestos (Hagmar 2001).

Ensayo cometa

El ensayo cometa o electroforesis alcalina, es una de las técnicas más utilizadas para detectar daño en el ADN por exposición a sustancias genotóxicas. Es una técnica que permite encontrar roturas de cadena simple y de cadena doble en células especializadas, lo que hace posible evaluar la respuesta en poblaciones celulares. Es rápido, sensible y sencillo. Combina la simplicidad de las técnicas bioquímicas para detectar las roturas en los sitios susceptibles al alkali con el simple procedimiento de una prueba citogenética típica. Fue desarrollado por Ostling y Johanson en 1984. Fue un ensayo en donde la lisis y electroforesis fueron realizadas bajo condiciones neutras y el marcaje se realizó con naranja de acridina. La imagen obtenida fue como la de un cometa con una cabeza compuesta de ADN intacto y una cauda constituida de piezas rotas de ADN dañado por lo que se le nombró “Ensayo Cometa”. Las ventajas de este incluyen la colección de datos a nivel de células individuales permitiendo un análisis estadístico más robusto, no es necesario un número grande de células en la muestra (<10000 células), tiene gran sensibilidad para detectar el daño al ADN y se usa en cualquier tipo de célula eucariota, proveniente de diversas poblaciones, *in vitro* e *in vivo*, eso incluye desde células de poblaciones humanas hasta células de organismos acuáticos, se ha empleado para estudios eco-genotoxicológicos y monitoreo ambiental. La técnica está basada en la capacidad de los fragmentos de ADN para ser embebidos en un gel de agarosa y responder a un campo eléctrico. El corrimiento del extendido de ADN depende directamente del daño presente en las células. Es importante mencionar que las lesiones al ADN consisten en la ruptura de las cadenas

después del tratamiento alcalino o sin éste e incluso de la combinación con ciertas enzimas, lo que incrementa la migración de ADN (Tice *et al.* 2000).

Aductos como biomarcadores de exposición

Los aductos son el resultado de una unión covalente entre dos moléculas. Éstos incluyen la unión de un agente tóxico o algún metabolito a macromoléculas como el ADN, proteínas o lípidos. Cuando modifican al ADN puede resultar una alteración mutagénica que puede preceder a un proceso carcinogénico. Actualmente se sabe que algunos carcinógenos bien conocidos y presentes en el humo del tabaco, como el benzo(a)pireno, actúan formando aductos sobre determinadas bases nitrogenadas del ADN e induciendo la aparición de mutaciones (Fig. 8). Sin embargo en el caso de compuestos como los organofosforados hay poca información en cuanto a su relación con la inducción de aductos y menor aún del destino de sus metabolitos.

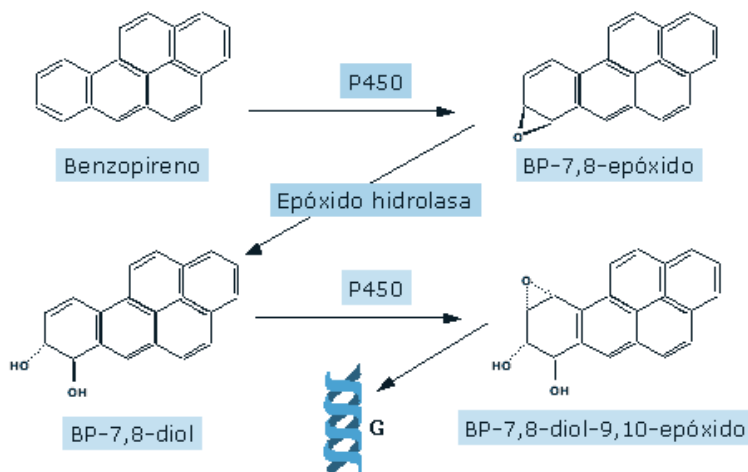


Fig. 8. El benzo(a)pireno presente en el humo del tabaco constituye un epóxido reactivo electrófilo que forma aductos en el ADN. Estos aductos pueden introducir mutaciones que podrían iniciar un proceso neoplásico.

Aducto 8-OHdG

El aducto 8-OHdG fue descubierto en 1984 por Kasai y colaboradores en una serie de experimentos con los que detectaron mutágenos que reaccionaron con el ADN. Usando principalmente cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se demostraron estas interacciones de sustancias tóxicas o mutagénicas con el ADN y que los radicales libres participan en la oxidación del carbono 8 de la guanina, así como que el aducto 8-OHdG se forma como resultado del estrés oxidante (Takagi *et al.* 1991)

El estrés oxidante es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir el balance entre pro-oxidantes y antioxidantes. Este desbalance es causado por una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño celular. El estado de óxido-reducción de la célula está determinado por el equilibrio entre las oxidaciones y las reducciones de los distintos compuestos biológicos presentes en ella, principalmente de aquellos que se encuentran en mayor proporción (Floyd *et al.* 1989). Las células de manera cotidiana sufren daños por el estrés oxidante, sin embargo la exposición a agentes físicos ó químicos pueden modificar la eficiencia de los sistemas de reparación que originalmente remediarían el daño. Estos sistemas consisten (en cuanto al daño oxidante) en la reparación por escisión de bases y de nucleótidos. Esto resulta eficiente cuando la mutación o el aducto no excede las 32 pares de bases de longitud (Patel *et al.* 2007, Shen *et al.* 2007). Cuando los niveles de aductos son muy elevados, la célula recurre a la detención de la división celular y si el daño supera esta medida, en algunos casos se provoca muerte celular.

Desde los estudios realizados, por Kasai y colaboradores (1984), la detección de este aducto ha servido para el biomonitorio de muchas sustancias cancerígenas. Un ejemplo importante son los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las especies reactivas del oxígeno, de los cuales hay amplia información en cuanto a su acción directa aparentemente inocua en diferentes sistemas biológicos y evidencias de que sus metabolitos causan daño oxidante al ADN y producen aductos, lo cual puede derivar en mutación y fragmentación del ADN (Park *et al.* 2006).

El radical OH^\cdot es una de las principales especies reactivas del oxígeno que se unen al ADN, puede interactuar con adenina, timina, citocina y guanina, sin embargo tiene mayor incidencia en el C8 de la guanina. Esto ocurre por la afinidad electrónica y menor potencial de ionización de esta base nitrogenada, cuando se une al C8 de 2'-desoxiguanosina se genera una oxipurina, elimina un electrón y forma el aducto 8-OHdG (Fig. 9) (Kasai, 1997). Las mutaciones que se ocasionan al generarse este aducto son principalmente transversiones TA-GC, ya que disminuyen la especificidad en el apareamiento de las bases. Cuando hay gran cantidad de aductos, se desestabiliza la integridad de la macromolécula

con lo cual se propicia la ruptura del ADN, dando como resultado el desarrollo de enfermedades degenerativas.

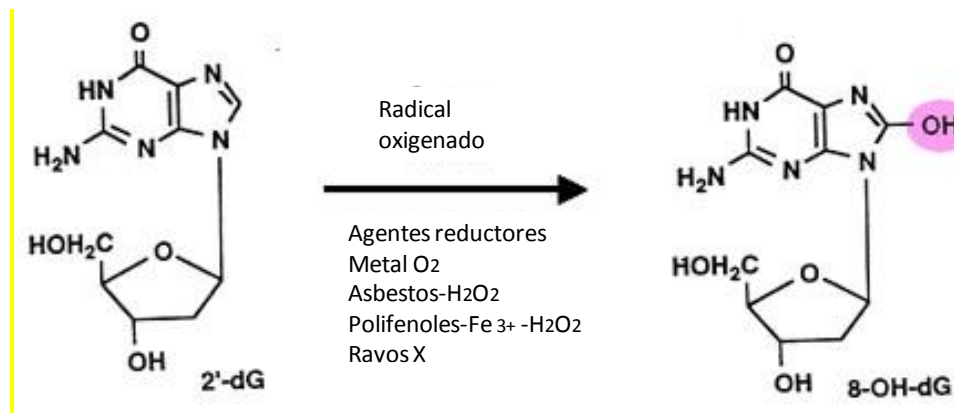


Fig. 9 Formación de 8-OHdG por radicales de oxígeno, tomado y modificado de Kasai (1988).

Para detectar este aducto se han desarrollado varias técnicas, las más comunes involucran inmunoensayos como el ELISA, cromatografía líquida de alta resolución, espectrofotometría de masas MALDI y espectrometría de fluorescencia, entre las principales (Kasai 1997).

Los niveles de aductos de 8-OHdG, son un indicador de estrés oxidante (Floyd *et al.* 1986, Kasai 1997, Shen *et al.* 2007). Esto permite suponer que los derivados del metabolismo de insecticidas organofosforados, principalmente grupos OH^- , PO_4^- y alquilo, entre otros, pueden formar aductos y detectar específicamente los de 8-OHdG lo cual evidenciaría su implicación en procesos mutagénicos y muy probablemente carcinogénicos.

Inmunoensayo ELISA

ELISA o enzimo-inmunoensayo, es una aplicación del inmunoensayo heterogéneo de fase sólida con un reactivo marcado (enzima-anticuerpo) combinado con un anticuerpo unido a una fase sólida.

Los lectores ELISA son espectrofotómetros que permiten detectar todas las longitudes de onda del ultravioleta y del espectro visible continuamente, lo que hace posible realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de una placa (Lequin 2005, Van Weemen 2005).

El ensayo ELISA tiene 4 fases: la primera es la de conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima. Donde ocurre la unión anticuerpo-enzima o antígeno-enzima en un determinado periodo de tiempo produciendo una solución coloreada que se valora visualmente o cuantifica mediante el espectrofotómetro y dónde el tiempo juega un papel crucial. Posteriormente, la segunda fase corresponde a la unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos que generalmente tienen gran afinidad por proteínas. La tercera fase consiste en la formación de una o más capas de inmunocomplejos, en esta etapa el antígeno unido a la placa se detecta con un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto) y por último la lectura de la reacción enzimática, eliminando las moléculas marcadas que no formaron inmunocomplejos que por lo tanto no quedaron asociadas, entonces se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría (Lequin 2005).

Este ensayo es eficiente para la detección de aductos de diversa índole, entre los que se encuentran los que afectan a los ácidos nucleicos. Existen “kits” específicos para la detección como es el caso de los aductos 8 OHdG, lo que resulta una técnica eficiente para evidenciar el daño oxidante al ADN ya que es posible cuantificar la cantidad de aductos presentes por ng de muestra de ADN, obteniendo los resultados en corto tiempo (Wang *et al.* 2011).

METODOLOGÍA

Preparación de extractos de raíces de *Vicia faba*

Se sumergieron las semillas en agua durante 24 horas, se colocaron entre dos capas de algodón húmedo (agua de la llave) y se mantuvieron en oscuridad a 20 °C para que germinaran. Aproximadamente a los 5 días cuando la plántula alcanzó de 4 a 6 cm se cortaron 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 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, Gómez-Arroyo *et al.* 1995).

El homogeneizado fue centrifugado por 30 minutos a 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 tomó una parte de la fracción en relación 1:9 (volumen/volumen) con una mezcla de amortiguador de fosfatos (pH 7.4) con MgCl₂ 8 X 10⁻³ M (Baker), KCl 3.3 X 10⁻² M (Baker), Glucosa 6-fosfato 5 X 10⁻³ M (Sigma) y NAD 4 X 10⁻³ M (Sigma) (Calderón-Segura *et al.* 1999, Gómez-Arroyo *et al.* 2000).

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 4 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 absorbencia 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 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 absorbencia a 470 nm.

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

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

t 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

Extracción de linfocitos (técnica 1 x 10⁶ linfocitos)

Se colocaron 20 mL de sangre heparinizada en 2 tubos estériles (10mL) y se centrifugaron a 10000 xg, 20 min a 37 °C. Se aisló la capa de linfocitos con pipeta punta estéril. Se colocó en una capa de ficoll histopaque frío (sin mezclarlos), se diluyó 1:1 con solución de Hanks (37 °C) y se centrifugó a 8000 xg, 10 min a 37 °C. Se separaron los linfocitos (capa blanca) y se transfirieron 1:1 al tubo con RPMI 1640. Se hicieron 2 lavados para eliminar el ficoll histopaque centrifugando a 8000 xg durante 10 min. Se cuantificaron en la cámara de Neubauer (10 µL) y se mantuvieron en 3 mL de RPMI 1640 (37 °C) con 1% de penicilina/estreptomicina.

Viabilidad celular

Técnica de azul tripano: se colocaron en una cámara de Neubauer 10 µL de la muestra y 10 µL de azul tripano (0.4 %) durante 3 minutos y se observaron y contaron 100 células consecutivas antes y después del tratamiento en cada muestra. Los linfocitos que se tiñeron corresponden a los que estaban muertos.

Tratamientos

Se prepararon alícuotas de 200 µL a partir de las de 3 mL de los linfocitos extraídos previamente.

Para los tratamientos directos se incubaron durante 4 horas a 37 °C llevando a 1 mL con los testigos negativos: RPMI y DMSO 0.5 M. Para el testigo negativo se utilizó etanol a una concentración de 0.1 M.

A los tratamientos se adicionaron los plaguicidas gusatión, folimat y folidol para obtener concentraciones de 10, 20, 40 y 60 µg/100 µL.

Los tratamientos indirectos se prepararon igual que los directos adicionando 500 µL de la fracción S10 de *V. faba*.

Ensayo cometa

El ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo de Tice *et al.* (2000) que se describe a continuación. Las laminillas se prepararon con una suspensión del botón con 150 μL de agarosa LMP (bajo punto de fusión) y se colocaron en la laminilla 25 μL de una mezcla del tratamiento con 75 μL de agarosa NMP (punto de fusión normal) al 1 %, se cubrió inmediatamente. Se prepararon 2 placas por cada tubo de siembra. Después de preparar todas las laminillas se llevaron a refrigeración durante 5 min para fijar la agarosa. Luego se removió el cubreobjetos de la laminilla. Posterior a ello se colocaron las laminillas en solución de lisis (10 % de DMSO y 1 % de tritón X-100 2.5 M NaCl, 100 mM, EDTA, 10 mM Tris aun pH 10), por un tiempo mínimo de 1 hora y máximo de 15 días.

Antes de realizar la corrida electroforética se dejaron reposar las placas en el amortiguador de electroforesis pH 10 que contiene: 1 mM EDTA (Invitrogen) e hidróxido de sodio 300 mM (Merck) hasta cubrirlas completamente.

Terminado este tiempo se realizó la corrida electroforética en forma horizontal, las condiciones usadas fueron: 25 V, 300 mA y 20 min (Tice *et al.* 2000).

Posterior a la electroforesis, las placas se sometieron al amortiguador de neutralización pH 7.5 (Tris 0.4 M). Las laminillas se hidrataron en agua desionizada fría y fueron teñidas con 60 μL / de bromuro de etidio 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cubriéndolas con un cubreobjetos.

La migración del ADN se evaluó con la frecuencia de daño en el núcleo (cometas), longitud y el momento de la cauda en 50 células por cada laminilla. Para esto se utilizó un microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Carl Zeiss) con filtro de excitación de 515 a 560 nm y filtro de barrido de 590 nm, objetivo 40x. Se analizaron las lecturas con el programa Comet Assay IV.

Extracción de ADN

Se aisló el ADN mediante la técnica de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (1x10⁶ linfocitos). Los linfocitos de cada alícuota de los tratamientos se lisaron con 300 µL de amortiguador de lisis frío (0.1 M EDTA, 0.15 M Na Cl pH=8). A lo anterior se le adicionó proteinasa K (0.1 mg/mL), ARNasa A (20 µg/ml) y SDS (0.5 %) incubando a 37°C por 12 horas en agitación constante. Se adicionó fenol 1:1, precalentado a 50 °C y se centrifugó a 8 000 xg durante 10 min a 4 °C. Se recolectó la fase acuosa en 1:1 fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 para extraer el ADN, se mezcló con el vortex y centrifugó a 8000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se recogió la fase acuosa y se adicionó 1:1 cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) mismas condiciones de centrifugado y se aplicó éter etílico centrifugando a 8000 xg por 3 minutos a 4 °C (extracción del ADN). La precipitación del ADN se llevó a cabo añadiendo 750 µL de etanol absoluto frío y 30 µL de acetato de sodio (3M), mezclando suavemente hasta observar el ADN. Se dejó precipitar -20°C, 12 horas y se centrifugó a 10000 xg, 20 min a 4 °C. Se lavó con etanol al 80 %, se dejó secar y se resuspendió en 50 µL de amortiguador TE (10 Mm Tris-HCl, 1 mM EDTA pH=8).

La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro (Nano Drop ND-1000) a 280 nm (dilución 1:50) con agua desionizada estéril. Se conservó a -80 °C para su posterior uso en la detección de los niveles de 8-OHdG por inmunoensayo de ELISA (Yin et al. 1995).

Diálisis de enzimas

Las enzimas requeridas para la digestión del ADN (nucleasa micrococcal y fosfodiesterasa) se dializaron utilizando el “kit” con amortiguador de diálisis (agua mili-Q), centrifugando 3 veces en los microtubos las enzimas en alícuotas de 1 mL a 4 °C, se mezclaron suavemente las enzimas ya separadas y se determinó su concentración en un espectrofotómetro Nano Drop ND-1000) a 280 nm y se usaron inmediatamente para la digestión del ADN.

Digestión del ADN

De cada tratamiento, se secaron 100 µg de ADN en un evaporador Speed Vac (Concentrator 5301 Eppendorf) y se agregó la mezcla enzimática nucleasa micrococcal/fosfodiesterasa (30 mU/µL y 10 mU/µL, respectivamente) en amortiguador de digestión (Succinato de sodio 100 mM, pH 6.0 y cloruro de calcio 50 mM), agitando en vortex y centrifugándolo unos segundos a 8 000 xg para mezclar completamente, se incubó a 37 °C por 12 horas. Se agregó la enzima NP1(Sigma) (1.25 mg/mL), en amortiguador de AcNa a pH 5 (250 mM) más cloruro de zinc (2 mM) y se incubó por 1 hora a 37 °C. Se adicionó tris base (0.5 M) para detener la reacción, se centrifugó a 8000 xg durante 5 minutos y se usó el sobrenadante que contenía el ADN de los linfocitos.

Determinación del aducto 8-OHdG por inmunoensayo ELISA

A partir del ADN aislado de los linfocitos humanos tratados y no tratados con los insecticidas organofosforados con y sin activación metabólica vegetal *in vitro* (S10 de la raíz de *Vicia faba*), se tomaron 100 µL por cada muestra de ADN y se utilizó el “kit 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine” (Cayman Chemical) preparando los diferentes componentes como se indica en el protocolo de dicho producto. Posteriormente se tomaron alícuotas de 50 µg de ADN y se midieron los aductos de 8-hidroxi-2-desoxi guanosina por el inmunoensayo ELISA. Las lecturas se tomaron por triplicado a 450 nm en un lector de ELISA (ELx800 BioTec). Gen 5 ELISA, utilizando la hoja de cálculo (Cayman Chemical), convirtiendo los resultados a ng/µg de ADN mediante la curva estándar para 8-OHdG (10.3-3000 pg/mL). Se realizaron tres ensayos para cada plaguicida, cada uno con muestras por duplicado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la frecuencia de cometas, longitud de la cauda, niveles de 8-OHdG y viabilidad celular se evaluaron aplicando un análisis de varianza, la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls y un análisis de regresión lineal. Se realizaron tomando los datos del promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes por cada plaguicida, con y sin activación metabólica vegetal, con muestras por duplicado.

RESULTADOS

Cuantificación de proteínas de la fracción enzimática S10 de *V. faba* incubada con los plaguicidas durante 4 horas

El contenido de proteínas totales en los extractos de la fracción S10 de *V. faba* incubados durante 48 horas con 5, 10, 20, 40 y 60 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, de gusatión, folimat y folidol variaron significativamente con respecto al valor testigo, después de la incubación se observó su disminución (Cuadro 2). La actividad de la peroxidasa mostró aumento significativo que concordó con la disminución en el contenido de proteínas.

Cuadro 2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y ACTIVIDAD PEROXIDASA DE LA FRACCIÓN S10 DE *Vicia faba* INCUBADA DURANTE 48 HORAS CON LOS PLAGUICIDAS FOLIDOL, GUSATIÓN Y FOLIMAT.

| Fracción S10 de <i>Vicia faba</i> $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ | Antes de la incubación | | Después de la incubación (48 h) | |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Contenido total de proteínas ^a $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ | Actividad peroxidasa ^a nM de tetraguaiacol/min/ μg de proteína | Contenido total de proteínas ^a $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ | Actividad peroxidasa ^a nM de tetraguaiacol/min/ μg de protein |
| Sin tratamiento S10 | 3.28 \pm 0.11 | 0.045 \pm 0.09 | 3.39 \pm 0.15 | 0.044 \pm 0.06 |
| Folidol | | | | |
| 5 | 3.33 \pm 0.12 | 0.042 \pm 0.07 | 1.36 \pm 0.03* | 0.139 \pm 0.03* |
| 10 | 3.32 \pm 0.16 | 0.035 \pm 0.02 | 1.34 \pm 0.15* | 0.142 \pm 0.07* |
| 20 | 3.18 \pm 0.10 | 0.037 \pm 0.09 | 1.41 \pm 0.17* | 0.133 \pm 0.08* |
| 40 | 3.23 \pm 0.02 | 0.041 \pm 0.11 | 1.37 \pm 0.09* | 0.127 \pm 0.05* |
| 60 | 3.29 \pm 0.07 | 0.038 \pm 0.09 | 1.41 \pm 0.17* | 0.131 \pm 0.03* |
| Gusatión | | | | |
| 5 | 3.52 \pm 0.13 | 0.039 \pm 0.08 | 1.48 \pm 0.15* | 0.136 \pm 0.08* |
| 10 | 3.46 \pm 0.03 | 0.054 \pm 0.17 | 1.49 \pm 0.14* | 0.152 \pm 0.06* |
| 20 | 3.34 \pm 0.19 | 0.045 \pm 0.04 | 1.54 \pm 0.24* | 0.149 \pm 0.11* |
| 40 | 3.37 \pm 0.09 | 0.047 \pm 0.12 | 1.37 \pm 0.11* | 0.137 \pm 0.09* |
| 60 | 3.41 \pm 0.08 | 0.043 \pm 0.11 | 1.41 \pm 0.10* | 0.141 \pm 0.04* |
| Folimat | | | | |
| 5 | 3.24 \pm 0.23 | 0.041 \pm 0.08 | 1.51 \pm 0.22* | 0.130 \pm 0.04* |
| 10 | 2.89 \pm 0.09 | 0.034 \pm 0.22 | 1.53 \pm 0.03* | 0.148 \pm 0.07* |
| 20 | 3.34 \pm 0.11 | 0.051 \pm 0.14 | 1.48 \pm 0.24* | 0.149 \pm 0.02* |
| 40 | 3.19 \pm 0.12 | 0.048 \pm 0.06 | 1.49 \pm 0.13* | 0.137 \pm 0.02* |
| 60 | 3.25 \pm 0.03 | 0.034 \pm 0.12 | 1.45 \pm 0.07* | 0.141 \pm 0.05* |

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

^a Media de tres experimentos \pm error estándar.

Genotoxicidad de gusatión, folidol y folimat en linfocitos periféricos humanos *in vitro* con y sin activación metabólica detectada mediante ensayo cometa

Los resultados de los tratamientos de linfocitos periféricos humanos que fueron expuestos *in vitro* durante 4 horas a los tres plaguicidas organofosforados de manera directa e indirecta, mediante el ensayo cometa, se muestran en la tabla 3 y son los siguientes:

Tratamientos directos

El testigo positivo (etanol) tuvo diferencias significativas de la longitud de la cauda $29.66 \pm 3.59 \mu\text{m}$, con respecto a los testigos negativos (RPMI Y DMSO), en los que se observaron longitudes promedio de 7.19 ± 1.26 y $6.83 \pm 2.66 \mu\text{m}$, respectivamente.

Con el insecticida gusatión no se presentaron diferencias significativas comparado con los testigos negativos para la concentración más baja ($5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), mientras que a partir de 10 y $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ se mostró incremento significativo de la frecuencia de cometas y longitudes de la cauda significativamente mayores (Tukey, $p > 0.05$), con las concentraciones más elevadas (40 y $60 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) no se observaron caudas ya que había una gran cantidad de células desintegradas (Fig. 10).

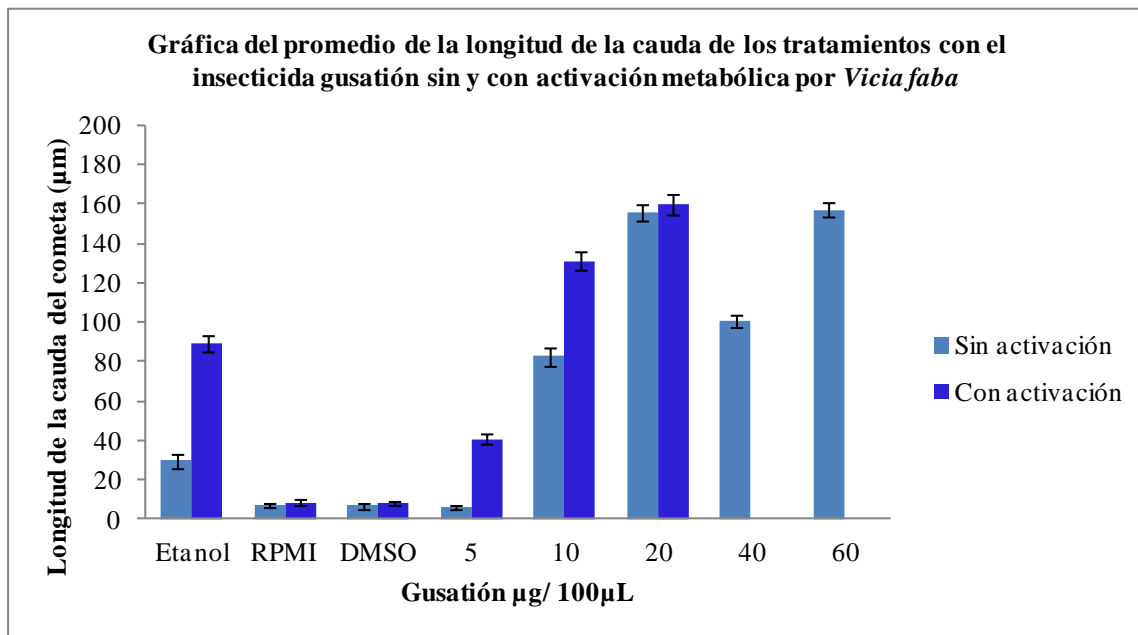


Figura 10. Promedio de la longitud de la cauda de los tratamientos *in vitro* con el insecticida gusatión con y sin activación metabólica con S10 de *V. faba*

Con el insecticida folimat no se presentó incremento significativo en la longitud de la cauda en la concentración de 5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, en tanto que con 10, 20, 40 y 60 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ se mostró aumento significativo (Fig. 11). Al comparar entre tratamientos se observó una disminución en la longitud de la cauda en la concentración de 40 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$, mientras que en las concentraciones de 20 40 y 60 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ no variaron significativamente entre sí.

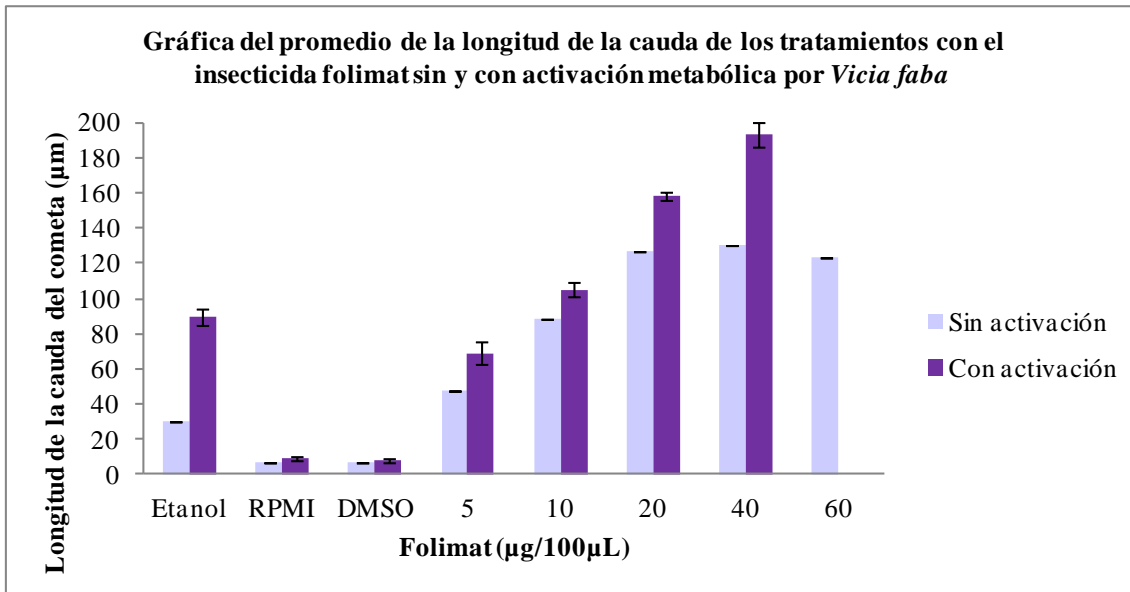


Figura 11. Promedio de la longitud de la cauda de los tratamientos *in vitro* con el insecticida folimat con y sin activación metabólica con S10 de *V. faba*

En el caso del insecticida folidol aplicado directamente (Fig. 12), las concentraciones más elevadas incrementaron la cauda pero no significativamente entre sí en las concentraciones de 20 a 60 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$. Se notó incremento significativo de la longitud de la cauda, para todas las concentraciones, con respecto al testigo positivo (Tukey, $p > 0.05$), con un efecto dosis-respuesta.

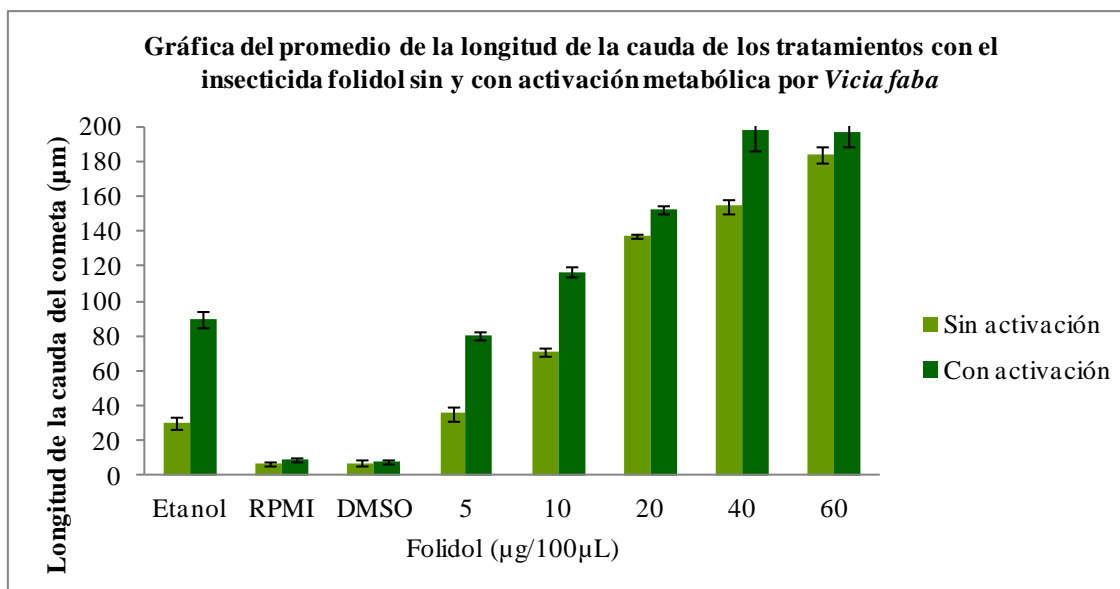


Figura 12. Promedio de la longitud de la cauda de los tratamientos *in vitro* con el insecticida folidol con y sin activación metabólica con S10 de *V. faba*

Tratamientos indirectos

Los resultados de la determinación de genotoxicidad inducida *in vitro* en linfocitos periféricos humanos, mediante el ensayo cometa, al adicionar la fracción S10 de *V. faba* (metabolismo vegetal) se muestran en el cuadro 3 y son los siguientes:

El testigo positivo (etanol) presentó diferencias significativas de la longitud de la cauda $89.40 \pm 4.26 \mu\text{m}$, con respecto a los testigos negativos (RPMI Y DMSO), en los que se observaron longitudes promedio de 8.56 ± 1.25 y $7.68 \pm 0.99 \mu\text{m}$, respectivamente. También mostró incremento significativo con relación al tratamiento directo ($29.66 \pm 3.59 \mu\text{m}$).

Los insecticidas gusatión y folimat presentaron diferencias significativas con respecto al testigo positivo, pero no entre las concentraciones. En las concentraciones de 20, 40 y 60 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ nuevamente se observaron cantidades muy elevadas de nubes (núcleos desintegrados) (Figs. 10 y 11). En el caso del insecticida gusatión en 40 y 60 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ no se tomaron lecturas de las caudas y sus momentos porque las placas

presentaron solo nubes y no se podían reconocer cometas y lo mismo para el folimat en la concentración de 60 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$.

El insecticida folidol provocó elevación significativa del daño a partir de 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, aunque entre las concentraciones de 40 y 60 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ no fué significativo y presentó gran cantidad de núcleos desintegrados (Fig.12).

Los resultados del porcentaje de viabilidad obtenido se muestran en la figura 13.

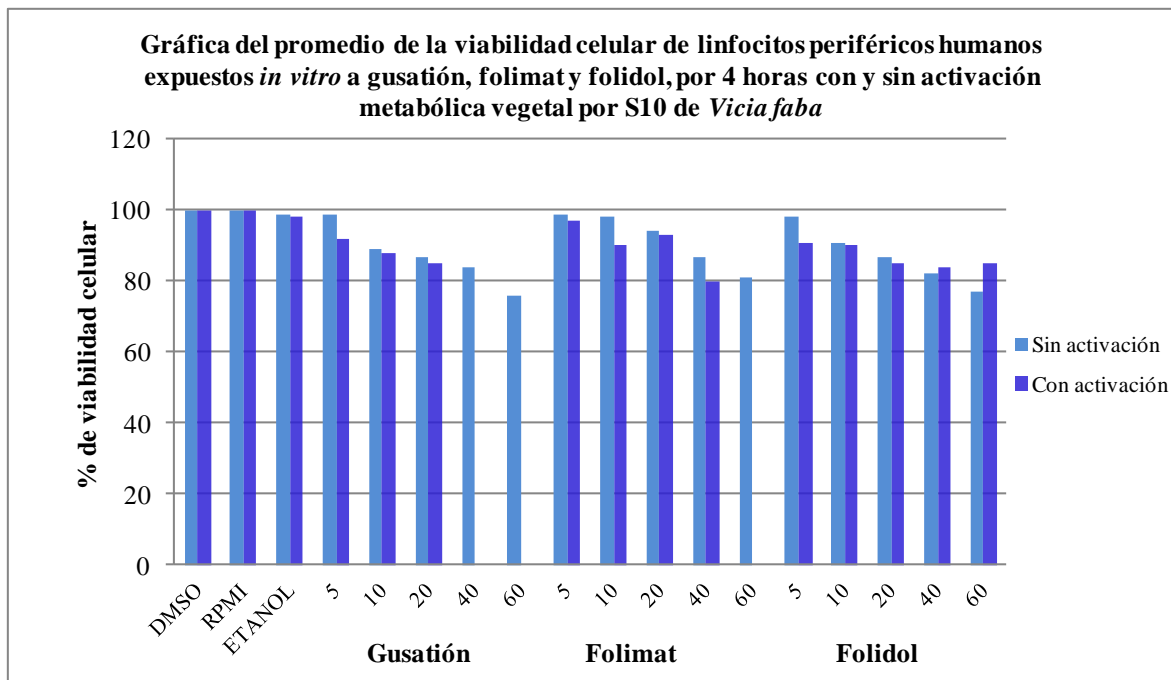


Figura 13. Promedio del porcentaje de viabilidad de linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a las insecticidas gusatión, folimat y folidol durante 4 horas con y sin activación metabólica vegetal

Cuadro 3. ENSAYO COMETA EN LINFOCITOS INCUBADOS DURANTE 4 HORAS CON LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS GUSATIÓN, FOLIMAT Y FOLIDOL CON Y SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA POR *Vicia faba*.

| Tratamientos directos $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ | Longitud de la cauda $\bar{X} \pm \text{EE}$ nm | Momento de la cauda $\bar{X} \pm \text{EE}$ | Frecuencia de cometas (%) | Tratamientos indirectos (Fracción <i>S10</i> de <i>V. faba</i>) $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ | Longitud de la cauda $\bar{X} \pm \text{EE}$ nm | Momento de la cauda $\bar{X} \pm \text{EE}$ | Frecuencia de cometas (%) |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------|
| Testigos | | | | | | | |
| ETANOL | 29.66 \pm 3.59 | 40.89 \pm 2.59 | 48.32 \pm 2.3 | ETANOL | 89.40 \pm 4.26 | 64.16 \pm 3.28 | 100 \pm 0.0 |
| RPMI | 7.192 \pm 1.26 | 0.97 \pm 0.06 | 3.17 \pm 0.1 | RPMI | 8.56 \pm 1.25 | 1.49 \pm 0.06 | 3.3 \pm 0.2 |
| DMSO | 6.838 \pm 2.66 | 0.48 \pm 0.04 | 4.11 \pm 1.3 | DMSO | 7.68 \pm 0.99 | 1.05 \pm 0.05 | 3.6 \pm 1.3 |
| Gusati3n | | | | | | | |
| 5 | 5.91 \pm 3.59 | 5.99 \pm 1.30 | 5.2 \pm 0.0 | 5 | 40.76 \pm 2.64* | 17.21 \pm 1.37 | 13.2 \pm 2.7 |
| 10 | 82.72 \pm 4.84* | 12.76 \pm 1.01 | 7.5 \pm 0.0 | 10 | 130.9 \pm 4.78* | 09.18 \pm 1.83 | 24.3 \pm 2.3 |
| 20 | 155.78 \pm 4.19* | 17.22 \pm 1.37 | 18.9 \pm 0.0 | 20 | 159.9 \pm 5.01* | 16.93 \pm 1.27 | 77.9 \pm 0.1 |
| 40 | 100.25 \pm 2.94* | 17.62 \pm 1.35 [†] | 31.8 \pm 0.0 | 40 | † | † | †† |
| 60 | 157.70 \pm 3.91* | 38.38 \pm 3.10 [†] | 36.9 \pm 0.0 | 60 | † | † | †† |
| Folimat | | | | | | | |
| 5 | 47.29 \pm 3.37* | 10.53 \pm 1.07 | 54.8 \pm 0.1 | 5 | 69.04 \pm 6.91* | 22.58 \pm 1.88 | 9.3 \pm 2.4 |
| 10 | 88.43 \pm 4.60* | 16.59 \pm 1.48 | 9.1 \pm 0.6 | 10 | 105.2 \pm 4.35* | 32.90 \pm 1.54 | 23.7 \pm 1.8 |
| 20 | 127.02 \pm 2.26* | 37.32 \pm 1.39 | 28.5 \pm 0.1 | 20 | 158.3 \pm 1.86* | 38.28 \pm 1.27 | 63.7 \pm 1.1 |
| 40 | 135.95 \pm 2.86* | 47.71 \pm 1.74 | 61.9 \pm 0.4 | 40 | 193.2 \pm 6.72* | 75.98 \pm 3 ^{††} | 98.3 \pm 0.9 |
| 60 | 123.35 \pm 4.03 [†] | 65.49 \pm 0.8 | 93.4 \pm 0.3 | 60 | † | † | †† |
| Folidol | | | | | | | |
| 5 | 35.34 \pm 3.61* | 9.46 \pm 0.91 | 5.8 \pm 0.7 | 5 | 80.08 \pm 2.54 | 25.4 \pm 1.79 | 16.1 \pm 1.4 |
| 10 | 70.60 \pm 2.22 * | 26.32 \pm 1.28 | 17.7 \pm 1.1 | 10 | 116.9 \pm 2.61* | 35.2 \pm 1.56 | 38.2 \pm 2.4 |
| 20 | 137.7 \pm 1.21* | 41.81 \pm 1.66 | 46.9 \pm 2.9 | 20 | 152.2 \pm 2.29* | 51.4 \pm 1.50 | 75.6 \pm 1.7 |
| 40 | 154.5 \pm 4.33* | 76.46 \pm 1.76 | 68.1 \pm 1.1 | 40 | 198.2 \pm 11.4 ^{†*} | 84.1 \pm 2.41 | 100 \pm 0.1 |
| 60 | 183.7 \pm 4.40* | 83.97 \pm 0.74 | 87.9 \pm 4.1 [†] | 60 | 196.4 \pm 7.59 [†] | 93.9 \pm 1.6 [†] | 100 \pm 0.3 |

* Diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos, obtenido por an3lisis de varianza, para $F^L = 391.17$ $F^M = 699.38$

, posteriormente, se aplic3 el an3lisis de comparaci3n m3ltiple Student-Newman-Keuls, $p < 0.0001$

^a Media de la longitud de la cauda, momento de la cauda y % de viabilidad celular obtenida de tres experimentos independientes \pm error est3ndar

^b RPMI 1640

^c DMSO Dimetilsulf3xido

† Muerte celular

†† N3cleos desintegrados

Frecuencias de células con cometa

Los resultados de la frecuencia de células con cometa se muestran en el cuadro 3 y en la figura 14. El gusatión no presentó diferencias significativas con el testigo positivo de manera directa y al incluir el metabolismo la frecuencia de cometas disminuyó a partir de los 40 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ por la presencia de núcleos desintegrados. El folimat incrementó la frecuencia de cometas, tanto directa como indirectamente, excepto en la concentración de 60 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ donde sólo se observó la presencia de nubes.

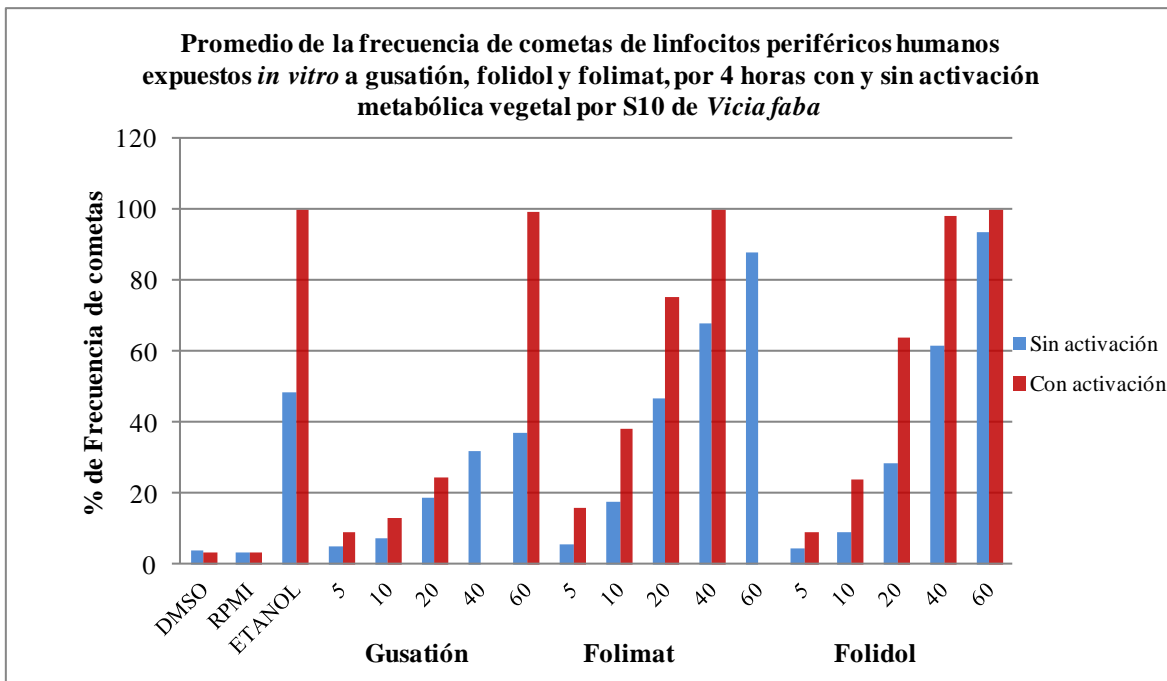


Figura 14. Gráfica del promedio de la frecuencia de cometas de linfocitos periféricos humanos tratados con los insecticidas organofosforados gusatión, folimat y folidol.

Niveles de 8-OHdG en ADN de linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* a los insecticidas organofosforados gusatión, folimat y folidol sin activación metabólica vegetal

El cuadro 4, muestra los resultados obtenidos de la determinación de aductos 8-OHdG en el ADN de linfocitos periféricos expuestos *in vitro* a los insecticidas organofosforados gusatión, folimat y folidol.

Con los 3 insecticidas a concentraciones de 10, 20, 40, 60 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$, comparados con el testigo ($P < 0.001$), aumentaron los niveles de 8-OHdG en el ADN. En el caso de gusatión y folimat las concentraciones de 5 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ no presentaron diferencias significativas con respecto a los niveles de 8-OHdG (Figuras 15, 16 y 17).

Entre los distintos plaguicidas se observó que a las mismas concentraciones el gusatión es con el que se muestra menos cantidad de aductos con relación al folimat, el cual se encuentra en medio con relación al folidol que es el insecticida que causó el mayor incremento en los niveles de aductos (Cuadro 4).

En todos los casos se notó un comportamiento de concentración-efecto.

| CUADRO 4. NIVELES DEL ADUCTO 8-OHdG EN LINFOCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS EXPUESTOS <i>IN VITRO</i> DURANTE 4 HORAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS GUSATIÓN, FOLIMAT Y FOLIDOL | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tratamientos directos µg/100µL | ng/µg ADN X ± EE | Tratamientos indirectos (Fracción S10 de <i>Vicia faba</i>)µg/100µL | ng/µg ADN X ± EE |
| ETANOL RPMI DMSO GUSATIÓN 5 10 20 40 60 | 1.313 ± 0.121 0.357 ± 0.051 0.445 ± 0.007 0.524 ± 0.02 0.741 ± 0.01* 1.117 ± 0.02* 1.471 ± 0.07* 2.196 ± 0.03* | ETANOL RPMI DMSO GUSATIÓN 5 10 20 40 60 | 2.947 ± 0.02* 0.518 ± 0.014 0.427 ± 0.013 1.161 ± 0.103 1.724 ± 0.05** 2.178 ± 0.04** 2.983 ± 0.01** 3.755 ± 0.09** |
| ETANOL RPMI DMSO FOLIMAT 5 10 20 40 60 | 1.289 ± 0.051 0.327 ± 0.006 0.338 ± 0.037 0.421 ± 0.005 0.644 ± 0.01* 1.167 ± 0.05* 1.762 ± 0.28* 2.141 ± 0.11* | ETANOL RPMI DMSO GUSATIÓN 5 10 20 40 60 | 3.294 ± 0.06* 0.416 ± 0.004 0.347 ± 0.014 0.658 ± 0.05 0.961 ± 0.01** 1.329 ± 0.10** 2.360 ± 0.04** 2.927 ± 0.03** |
| ETANOL RPMI DMSO FOLIDOL 5 10 20 40 60 | 1.450 ± 0.033 0.414 ± 0.004 0.452 ± 0.068 0.766 ± 0.01* 0.913 ± 0.04* 1.744 ± 0.05* 2.615 ± 0.01* 3.169 ± 0.02* | ETANOL RPMI DMSO GUSATIÓN 5 10 20 40 60 | 2.905 ± 0.05* 0.435 ± 0.027 0.418 ± 0.004 1.678 ± 0.03** 2.311 ± 0.01** 2.965 ± 0.01** 3.697 ± 0.10** 4.920 ± 0.04** |

^aPromedio de 3 experimentos

*Diferencias significativas para F= 110.67 p<0.001 prueba estadística Newman Keuls

**Diferencias significativas para F= 295.21 p<0.001 prueba estadística Newman Keuls

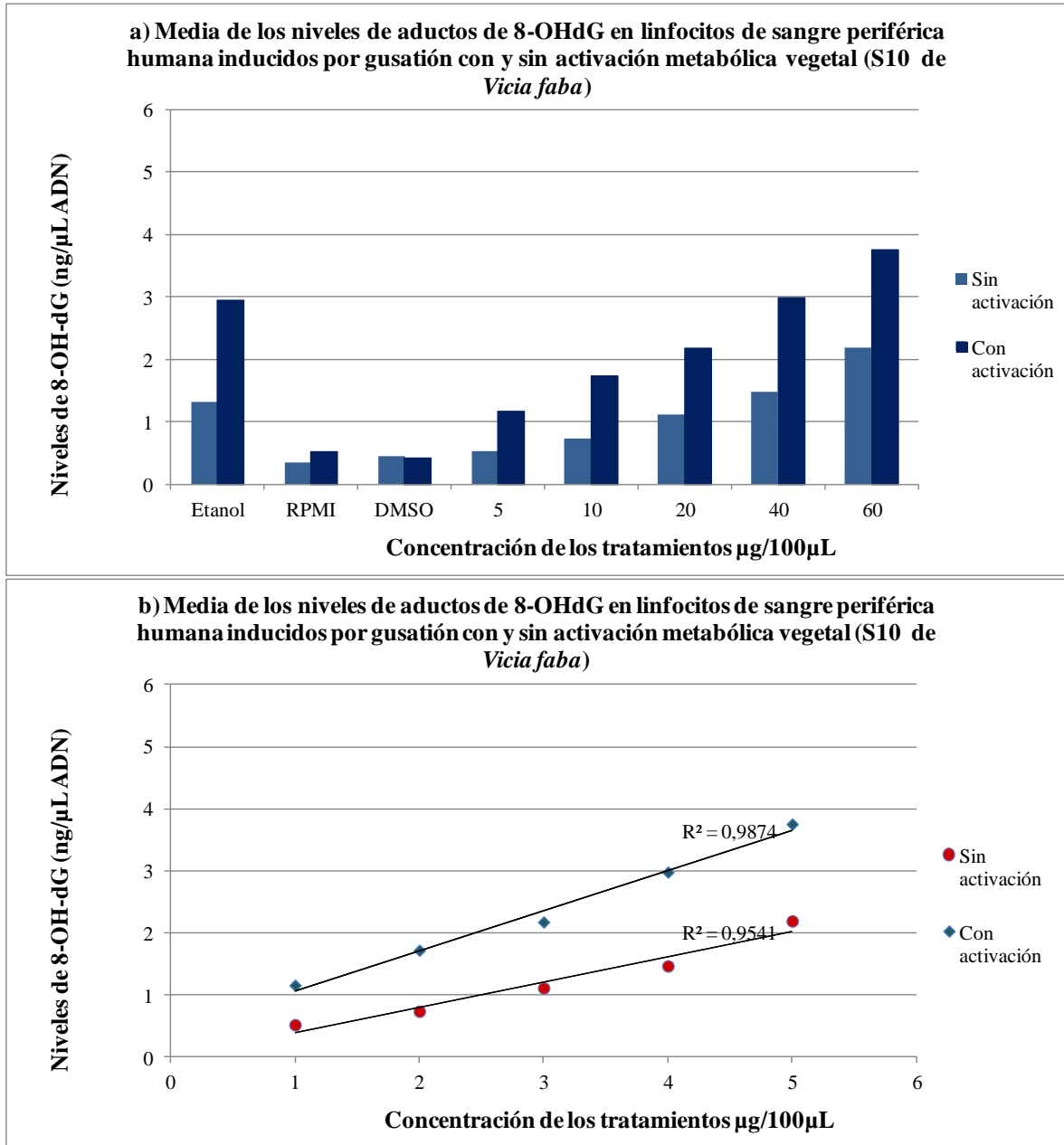


Figura 15. a) niveles del aducto 8-OHdG en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* durante 4 horas a diferentes concentraciones del insecticida organofosforado gusatión y b) análisis de regresión lineal de los promedios de los niveles del aductos de 8-OH-dG con y sin activación metabólica por la fracción S10 de *V. faba*.

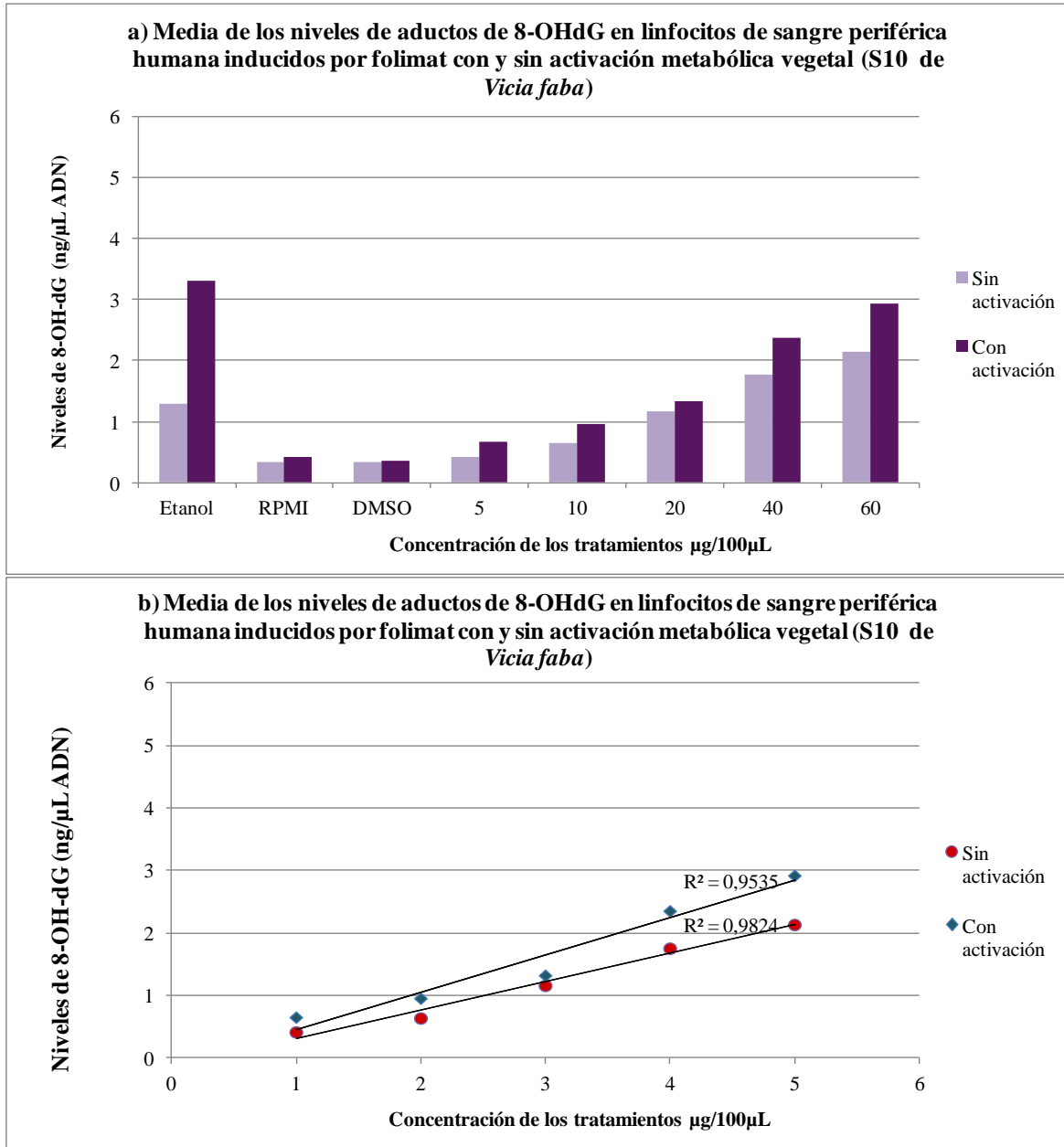


Figura 16. a) niveles del aducto 8-OHdG en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* durante 4 horas a diferentes concentraciones del insecticida organofosforado folimat y b) análisis de regresión lineal de los promedios de los niveles del aductos de 8-OH-dG, con y sin activación metabólica por la fracción S10 de *V. faba*.

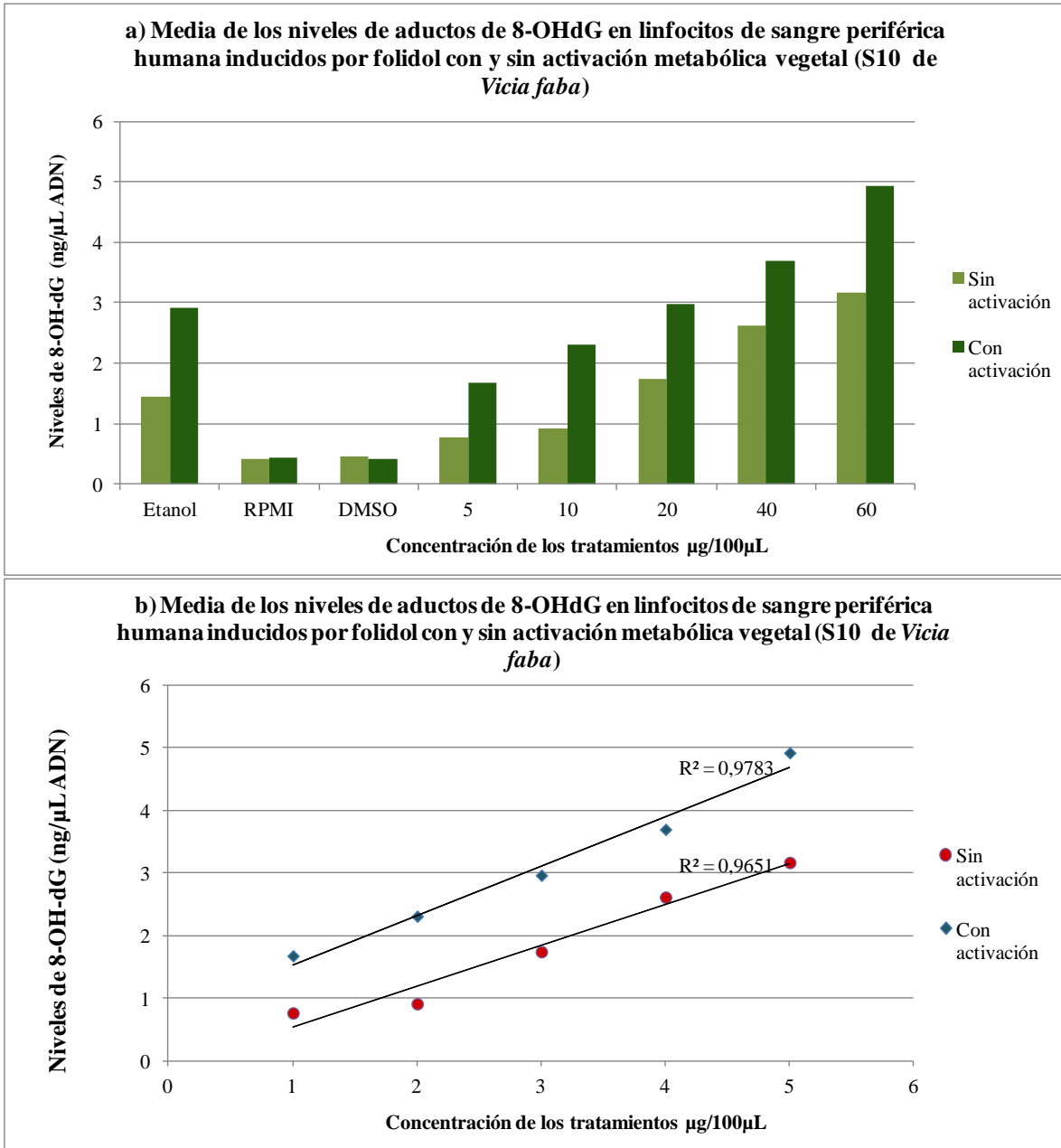


Figura 17. a) niveles del aducto 8-OHdG en linfocitos periféricos humanos expuestos *in vitro* durante 4 horas a diferentes concentraciones del insecticida organofosforado folidol y b) análisis de regresión lineal de los promedios de los niveles del aductos de 8-OH-dG, con y sin activación metabólica por la fracción S10 de *V. faba*.

DISCUSIÓN

La vía más común de exposición a sustancias tóxicas es el uso de insecticidas. Los estudios realizados en las últimas décadas y relacionados con estos compuestos, demostraron que hay riesgo y daño genotóxico por su exposición. La gran mayoría de estas investigaciones son de carácter ocupacional y ambiental, ya que en muchas de las comunidades se usan mezclas de insecticidas (Gómez-Arroyo *et al.* 2000, Martínez-Valenzuela *et al.* 2009). Sin embargo el daño que de manera individualizada pueden ejercer, es diferente y como consecuencia el resultado en distintos organismos y órganos blanco también.

La biotransformación es un parámetro importante cuando se quiere dar seguimiento al efecto que tienen dentro de la cadena trófica. Los destinos moleculares de los metabolitos de muchos insecticidas organofosforados y otros compuestos son aún desconocidos. Su efecto acumulativo a través de su interacción con moléculas como el ADN, proteínas y lípidos puede ser un indicador importante del desarrollo de enfermedades.

Diversos estudios muestran que los insecticidas organofosforados pueden dañar directa o indirectamente diferentes sistemas celulares. En algunas investigaciones de biomonitorio en personas expuestas a plaguicidas, los resultados indicaron inducción de aberraciones cromosómicas (Rupa *et al.* 1988, Kaioumova y Khabutdinova 1998, Sailaja *et al.* 2006), *in vitro* Gómez-Arroyo *et al.* (1988), han detectado que al aplicar el insecticida directamente a sistemas de linfocitos humanos en cultivo, no se inducen intercambios de cromátidas hermanas (ICH), mientras que al probar este mismo compuesto en *Vicia faba* se obtiene un aumento significativo en la frecuencia de ICH, lo que sugiere la existencia de algún mecanismo que durante el metabolismo vegetal que activa al insecticida. Esto coincide con resultados obtenidos en las cepas SIAE D3 y D7 de *Saccharomyces cerevisiae* que demostraron mutagenicidad con activación metabólica (Riccio *et al.* 1981).

La probable carcinogenicidad y mutagenicidad causada por la exposición prolongada a plaguicidas es uno de los argumentos que impulsan a realizar investigaciones

en el área de la citogenética con la finalidad de reconocer factores carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos en individuos que se exponen a los agentes genotóxicos, pero también detectar todas las posibilidades de exposición como las indirectas (Nehéz *et al.* 1988).

En este estudio se probó la capacidad genotóxica y la de inducir la formación de aductos con tres plaguicidas organofosforados: gusatió. folimat y folidol.

La detección de aberraciones cromosómicas es una de las formas más eficientes para identificar mutágenos, cancerígenos y teratógenos en grupos humanos expuestos. Es un biomarcador muy recomendado para la predicción de problemas de salud como cáncer y abortos en poblaciones expuestas a mutágenos y cancerígenos (Preston 1999, Bonassi y Au 2002. Citados por Cuenca y Ramírez, 2004).

Se sabe que la exposición de los linfocitos a una amplia variedad de plaguicidas ocasiona reducción y alteración de su actividad, disminución de la respuesta proliferativa y alteraciones en los niveles de anticuerpos en la circulación (Paz-yMiño *et al.* 2002, Schafer *et al.* 2004, Terán, 2006). Estos efectos pueden tener como consecuencias: un aumento en el riesgo de enfermedades infecciosas y cánceres asociados con la inmunosupresión. La leucemia es uno de los tipos de cáncer que se asocia con la presencia de aductos en estas células sanguíneas y por tanto, conocer el efecto en su formación permitirá la prevención y tratamiento oportuno de dichos casos (Alavanja *et al.* 2005).

Por otro lado, se utilizó etanol como testigo positivo por estar clasificado como cancerígeno (grupo 1) según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los resultados mostraron una capacidad mutagénica detectable y además, como se había demostrado previamente, esta capacidad se eleva mediante la activación metabólica vegetal con la fracción S10 de *V. faba* (Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999, Flores-Maya *et al.* 2005).

El empleo del ensayo cometa fue una metodología relevante en este trabajo, para observar la acción de los plaguicidas de manera directa e indirecta (metabolismo vegetal) con la finalidad de establecer las concentraciones y una medida del daño (ruptura del ADN)

que permitiera correlacionar con la formación del aducto 8-OHdG. En cuanto a los parámetros de la prueba del cometa que mide el daño individual y exposición reciente, los casos presentaron valores significativamente elevados.

El insecticida gusatión incrementó significativamente la frecuencia de cometas a partir de 10 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, con longitudes de la cauda significativamente mayores que el testigo negativo, sin embargo con las concentraciones de 40 y 60 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no se obtuvieron datos significativos. Se observó toxicidad elevada, notándose gran cantidad de núcleos desintegrados (nubes). Al incluir el metabolismo vegetal, se notó un incremento significativo como se esperaba. Nuevamente hubo un alto índice de toxicidad expresada por la cantidad de nubes observadas (Figuras 13 y 14) y al compararlos con los tratamientos directos se incrementó significativamente la longitud de las caudas con la concentración de 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Estos resultados coinciden con los análisis realizados en cultivo de linfocitos humanos (CLH), que muestran 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 (Andrade-Morales 2001). En estudios realizados por Sánchez-Estrada (2008), mediante el ensayo de Ames, fue un mutágeno y promutágeno en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, activado por la fracción S10 de *V. faba*.

El insecticida folimat aplicado directamente incrementó la cantidad de cometas significativamente con el que igualmente se encontraron muchas nubes. Cuando se incluyó el metabolismo vegetal los resultados fueron similares a los del gusatión. Se observaron diferencias significativas con respecto al testigo y las concentraciones de 20 a 60 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ presentaron una cantidad de nubes muy elevada. Se han llevado a cabo muchos estudios sobre la genotoxicidad de plaguicidas utilizando métodos citogenéticos, los resultados obtenidos en estudios *in vitro* demostraron que diferentes insecticidas, como el folimat y algunas mezclas donde se incluye, fueron capaces de incrementar el número de MN en linfocitos de sangre periférica y de cometas (Blasiak 1999, Tice y Vasquez 1999, Rahman *et al.* 2002).

El insecticida folidol provocó incremento significativo con las concentraciones de 5 a 20 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$, con respecto al testigo negativo, pero en las concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ no variaron entre sí. Al incluir la fracción enzimática S10 de *V. faba* una elevación del daño a partir de 10 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$, aunque con las concentraciones más elevadas no fue significativo y presentó núcleos desintegrados con las concentraciones de 40 y 60 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ (Fig.15). Este insecticida es muy tóxico y las nubes registradas excedieron la cantidad de núcleos con cometas que podían registrarse. El folidol se ha descrito como muy tóxico en los análisis realizados por Gómez-Arroyo *et al.* (1995) y sus resultados mostraron que el folimat, en ensayos de mutagenicidad inducida en cepas TA100 de *Salmonella typhimurium*, ha tenido un comportamiento promutagénico que requiere del metabolismo (S9) para provocar daño al ADN.

En contraste con las mismas concentraciones la cantidad de aductos de 8-OHdG fue significativamente elevada con un comportamiento de concentración-respuesta. Al activarlos metabólicamente. Los resultados en estudios *in vitro* y en personas expuestas a plaguicidas, entre los que se encuentra el gusatión, han indicado 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).

Asimismo, la actividad metabólica de *V. faba* tanto *in vivo* como *in vitro* fue evidente por el incremento en la genotoxicidad del etanol producida al exponer los linfocitos. Tanto la inducción de cometas, la longitud y el momento de la cauda, como la producción de aductos en el ADN, el comportamiento coincide con estudios previos en la inducción de ICH (Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999, Flores-Maya *et al.* 2005). Esto es importante dado que el etanol es reconocido como un cancerígeno (IARC 1987).

Los resultados observados en este trabajo confirmaron que el gusatión es genotóxico y citotóxico, además de ser un promutágeno activado por *V. faba*. (Andrade 2001, Sánchez-Estrada 2008) también Gómez-Arroyo *et al.* (1988) reportaron el daño que este plaguicida produce en los meristemas de la raíz en *V. faba* y el decremento en el índice mitótico.

En cuanto al folimat, Moreno-Zenteno (2007) realizó un análisis del daño genotóxico a través de la reversión en *Salmonella typhimurium*, con la presencia y ausencia de la fracción enzimática (S9), empleando las cepas TA98 y TA100 en las que el insecticida folimat no presentó comportamiento mutagénico ó citotóxico de forma directa e indirecta con ninguna de las concentraciones examinadas en la cepa TA98, sin embargo, indicó efecto mutagénico en la cepa TA100, a partir de 1000 microgramos por placa con y sin activación metabólica detectando diferencias significativas entre los tratamientos directos e indirectos aumentando su efecto al ser activados, resultados que coinciden con este estudio en el que se observa mayor efecto al ser metabolizados por la fracción S10 de *V. faba*.

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 transformados en productos fenólicos y radicales libres (principalmente grupos alquilo). Estos grupos están relacionados con la degradación de las desoxirribosas en el ADN, la abstracción de hidrógeno del ADN provoca rompimientos o enlaces cruzados de las cadenas y la producción de agentes desaminantes. Estos compuestos 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. Esto aumenta la posibilidad de alteraciones en el mecanismo de apareamiento de bases y favorece la alquilación.

Lo anterior da lugar a nuevas mutaciones que pueden ser reparadas directamente o intervienen en el sistema de reparación de las mutaciones, aumentan los radicales libres, con lo cual también se genera estrés oxidante y por tanto se incrementa la posibilidad de formar aductos (Starr *et al.* 2004). Esto sugiere que un mecanismo similar pudo haber ocurrido en el caso de los insecticidas organofosforados probados en este trabajo.

El daño al ADN revelado por la versión alcalina del ensayo cometa, fue probablemente originado por rompimientos de hebra sencilla, sitios lábiles al álcali, enlaces cruzados ADN-ADN, DNA-proteínas y rompimientos de hebra sencilla asociados a sitios de reparación por escisión incompletos como ha sido sugerido por Tice *et al.* (2000), estos

mismos mecanismos probablemente estuvieron involucrados en la inducción de cometas por los insecticidas organofosforados estudiados en este trabajo, así como también por otros mecanismos tales como el estrés oxidante que ha sido mencionado por Muñoz *et al.* (2008) y Kisby *et al.* (2009) en trabajadores agrícolas expuestos al insecticida organofosforado azinfos metílico. Posiblemente éste último sea el principal mecanismo de inducción de cometas por los insecticidas ya que la producción del aducto 8OHdG, denota su efecto oxidante y el comportamiento en ambos casos es similar con cada uno de los compuestos evaluados.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran que el ensayo cometa es una prueba sensible para evaluar los rompimientos en el ADN causados por contaminantes ambientales tales como los insecticidas organofosforados.

1.- La actividad metabólica de *V. faba* fue evidente por el incremento en la mutagenicidad producida por el testigo negativo (etanol) al exponer a los linfocitos.

2.- Los tratamientos en los cuales se adicionó la fracción S10 de *Vicia faba*, mostraron que la activación metabólica de los insecticidas organofosforados evaluados, aumenta la producción de metabolitos reactivos que se unen covalentemente al ADN, induciendo su fragmentación que se observa en el incremento de la frecuencia de cometas y en la longitud y momento de la cauda. Este mismo comportamiento se observó en la elevación de los niveles del aducto 8OHdG.

3.- La cantidad de aductos de 8-OHdG fue significativamente elevada con un efecto de concentración-respuesta con los tres plaguicidas. La detección de los niveles de aductos 8-OHdG, como biomarcadores del daño por estrés oxidante, es una técnica eficiente para evidenciar de manera rápida el efecto provocado por diversos compuestos tóxicos.

4.- El método de ELISA demostró ser un ensayo adecuado para detectar los niveles de 8OHdG, los cuales son un buen biomarcador molecular del daño por estrés oxidante causado por los insecticidas organofosforados en linfocitos humanos *in vitro*.

CONCLUSIÓN GENERAL

Estos resultados evidenciaron que los tres insecticidas son genotóxicos y citotóxicos, además de ser promutágenos activados por la fracción S10 de *V. faba*.

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.
- Alavanja, M., Sandler D., Lynch C., Knott C., Lubin J., Tarone R., Thomas K., Dosemeci M., Barker J., Hoppin J. y Blair A. (2005). Cancer Incidence in the Agricultural Health Study Scand J Work Environ Health, 31 (S1): 39–45
- Albert L. A. (1988). Curso básico de toxicología ambiental. Editorial Limusa, México, pp.311-314.
- Albertini R. J., Nickolas J. A. y O'Neill J. P. (1996) Future research directions for evaluating human genetic and cáncer risk from environmental exposures. Environ. Health Perspect. 104: 503-510.
- Al-Saleh I. A. (1994). Pesticides: a review article. J Environ Pathol Toxicol Oncol; 13:151-161.
- 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.
- Antonucci G. A. y de Syllos Colus I. M. (2000) Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides. Teratogenesis, Carcinogenesis & Mutagenesis. 20: 265-272
- Ascarrunz M. E., Tirado N., Gonzales A. R., Cuti M., Cervantes R., Huici O. y Hors E. (2005) Evaluacion de riesgo genotoxico: biomonitorizacion de trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Palca, y Mecapaca, expuestos a plaguicidas; Cuadernos del Hospital de Clinicas vol. 50 N°2, 29 - 31.

- Au W.W., Sierra-Torrez C. H, Cajas-Salazar N, Shipp B. K. y Lagator M. S. (1999) Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environ Health Perspec*; 107: 501-505.
- Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A., y Freeman B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 1620-1624.
- 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.
- Blasiak J., Jaloszynski P., Trzeciak A. y Szyfter K. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat. Res.* 1999; (445) 275-283
- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mut Res.* 543:251-272.
- 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.
- Butterworth B. E. y Bogdanffy M. S. (1990). A comprehensive approach for integration of toxicity and cancer risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 29:23-6.
- 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.

- Carrasco P. (1981) La sociedad mexicana antes de la conquista, Daniel Cosío Villegas y otros. Historia General de México, 3° ed. México, COLMEX. v. I, pp. 165-268.
- Coleman J.O.D., Mechteld M. A., Kalff 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.
- Cremllyn R. (1990). Plaguicidas Modernos y su Acción Bioquímica. Limusa, México, 356 p.
- Cremllyn R. (1979). Pesticides, Preparation and Mode of Action. John Wiley, Nueva York, 360 p.
- Cuenca P. y Ramírez V. (2004). Aberraciones cromosómicas en trabajadoras expuestas a plaguicidas. Rev. Biol. Trop. 52: 219-224.
- 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: 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.
- Fait A. y Colosio C. (1998). Recent advances and current concepts in pesticide hazards. En: Emmett EA, Frank AL, Gochfeld M, Hez SM, editores. The year book of occupational and environmental medicine. St. Louis: Mosby, 15- 29.

- 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. y 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.
- Floyd R. A., Watson J. J., Wong P. K., Altmiller D. H., Rickard R. C. (1986). Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine. Sensitive detection and mechanism of formation. Free Radic. Res. Commun. 1: 163-172.
- Forgash A. J. (1984). History, evolution and consequences of insecticide resistance. Pestic. Biochem. Physiol. 22: 178-186.
- 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.
- Fukuto T. R. (1971). Relationship between the structure of organophosphorus compounds and their activity as acetylcholinesterase inhibitors. Bull WHO 44: 31.
- 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. y Plewa M.J. (1986). *In vitro* activation of chemicals by plants: a comparison of techniques. Mutat. Res. 164: 53-58.

- 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.
- 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 and the mutagenesis mechanism of diethylditiocarbamate and ammonium metavanadate. *Mutat. Res.* 316: 164-172.
- 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. 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. (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., 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., Castillo-Ruiz P., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini, R. (1988). *Vicia faba*-Sister chromatid exchanges of the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, oxydemeton methyl, azinphos methyl and phoxim. *Cytologia* 53: 627-634.

- 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.
- Hagmar L., Stromberg U., Tinnerberd H. y Mikoczy Z. (2001). The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *Int J Hyg Environ Health*, 2204 (1): 43-47.
- Jones, P. A. y S. B. Baylin. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415-428.
- Kaioumova, D. y Khabutdinova, L. (1998). Cytogenetics characteristics of herbicide production workers in Ufa. *Chemosphere* 37 (9-12): 1755-1759, ISSN: 0045-6535.
- Kasai H. (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy.2'-deoxyguanosine, as marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.* 387: 147-163.
- Kasai H., Hayami H., Yamaizumi Z., Saito H. y Nishimura S. (1984). Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucleic Acids Res.* 12: 2127-2136.
- Kiely T., Donaldson D. y Grube A. (2004). *Pesticides Industry Sales and Usage. 2000 and 2001 Market Estimates.* Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA-733-R-99-001

- Kisby G. E., Muniz J.F., Scherer J., Lasarev M. R., Koshy M., Kow Y. W. y McCauley L. 2009. Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers. *J Agromed* 14:206-214.
- Lauwerys R. y Hoet P. (1993). Industrial chemical exposure-guidelines for biological monitoring. 2nd Ed. London: Lewis. 21:134-154.
- Ledesma M. J. y Delgado P. (1994). Predicción de la exposición a productos fitosanitarios. *Salud y Trabajo* 103: 12-19.
- Lequin R. M. (2005) Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzime-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 51: 12 2415-2418.
- López C. L. (1993). Exposición a plaguicidas organofosforados. *Perspectivas en Salud Pública* N° 18. México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Maluszynska J. y Juchimiuk J. (2005). Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *J. Plant Genotox.* 56: 177-184.
- Márquez M. E., López J. B. y Londoño M. (2003). Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos. *IATREIA*. 16 (4): 275 – 282.
- 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.
- 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-Valenzuela, C., Gómez Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Félix-Gastélum R. y Álvarez-Torres, A. (2009). Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa state, Mexico. *Environ. Int.* 35: 1155-1159.
- Moreno Zenteno M.C. (2007). Evaluación de daño genotóxico a través del sistema de Salmonella typhimurium producido por cuatro insecticidas organofosforados. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas (Biología Experimental), UNAM.
- Muñiz J. F., McCauley L., Scherer J., Lasarev M., Kaoshy M., Kow Y. W., Nazar-Stewart V. y Kisby G. E. (2008). Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227: 97-107.
- Nehéz, M., Boros P., Ferke, A., Mohos, J., Palotás, M., Vetró, G., Zimányi, M. & Desi, I. (1988). Cytogenetic examination of people working with agrochemicals in the southern region of Hungary. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 8 (1): 37-44, ISSN: 0273-2300.
- NIOSH. (Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional) (1983). Registry of Toxic Effects of Chemical Substances. Vol.3, p.127.
- OMS. Organización Mundial de la Salud) (1990). Organización Panamericana de la Salud (OPS), Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Serie Vigilancia, 9. Plaguicidas organoclorados. México: OMS/OPS.
- OMS. Organización Mundial de la Salud, (1993). Organización Panamericana de la Salud (OPS), División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas, Washington: OMS/OPS.
- 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.
- Ostling O., Johanson K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 123: 291-98.
- Park J. H., Mangal D., Frey A. J., Harvey R. G., Blair I. A. y Penning T. M. (2009). Aryl-hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the aldo-keto reductase product benzo(a)pyrene-7,8-DIONE. *J.Biol. Chem.* 284: 29725-29734.
- Pastor B. S. (2002). Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos Universidad Autónoma de Barcelona. Fac. de Ciencias. Depto. de Genética y Microbiología. Grupo Mutagénesis. Tesis Doctoral/ Disponible en: <http://www.tdx.cesca>.
- Patel P., Bevan R., Mistry N. y Lunec J. (2007). Evidence of oligonucleotides containing 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. *Free Radic. Biol.Med.* 42: 552-558.
- Paz-y-Miño, C., Creus A., Cabré O. y P. Leone (2002). Genética toxicológica y carcinogénesis. Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) y Fundación para la Ciencia y Tecnología (Fundacyt). Quito. 297 p.
- Plewa M.J. y Wagner E. D. (1993). Activation of promutagens by green plants. *Annu. Rev. Genet.* 27: 93-113.
- 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 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 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. (1978). Activation of chemical into mutagen by green plants. A preliminary discussion. Environ. Health Perspect. 27: 45-50.
- Pose D., De Benz S., Delfino N. y Burger M. (2000). Intoxicación aguda por organofosforados. Rev Med Uruguay ; 16: 5- 13.
- Rahman M.F., Mahboob M., Danadevi K., Saleha Banu B. y Paramjit G. Assessment of genotoxic effects of chloropyriphos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. Mutat. Res. 2002: (516)139-147.
- Ramírez J. A. y Lacasaña, M. (2001) Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Arch Prev Riesgos Labor. 4(2): 67-7523.
- 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.
- Riccio E., Shepherd C., Pomemy A., Mortelmans K. and Waters M. D. (1981). Comparative studies between the S. cereviciae D3 and D7 assays of eleven pesticides. 12th Ann. Meeting Environ. Mutagen Soc. p. 82.
- 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.
- Sailaja N., Chandrasekhar M., Rekhadevi P., Mahboob M., Rahman M., Saleha B., Vuyyuri B., Danadevi K., Hussain S. y Grover P. (2006). Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. Mutation Research 609 (1): 74–80, ISSN: 1383-5718.

- Sánchez-Estrada L. (2008). Mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* por los insecticidas organofosforados gusación y metamidofos activados por la fracción S10 de Vicia faba. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sandermann H. Jr. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.* 197: 183-194.
- Schafer K., Reeves M., Spitzer S. y Kegley S. (2004). Los invasores químicos. Pesticidas en nuestros cuerpos y la responsabilidad empresarial. Pesticide Action 51Network North America (PANNA). San Francisco. 60 p. <http://www.panna.org/sites/default/files/ChemTres2004Span.pdf>
- 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.
- Shen J., Deininger P., Hunt J. y Zhao H. (2007). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86: 9697-9701.
- 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.

- Takagi A. Sai K., Unemura T., Hasegawa R. y Kurokawa Y. (1991). Short-term exposure to the peroxisome proliferators, perfluorooctanoic acid and perfluorodecanoic acid, causes significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats. *Cancer Lett.* 57: 55-60.
- 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.
- 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.
- Terán G. (2006). Epidemiología de intoxicaciones agudas por plaguicidas en Ecuador. Red de Acción en Plaguicidas y Alternativas de América Latina, RAP-AL. *Diálogo Andino Estado y Sociedad Civil. Revista Enlace* 75:34-35
- Tice R., Arguell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C. y Sasaki Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221.
- Tice R. R., Vasquez M. (1999). Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. *Research Triangle Park.* 1998: 1-8.
- 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.
- Van Weemen B. K. (2005). The rise of EIA/ELISA. *Clinical Chemistry.* 51:12
- Vigreux C., Poul J., Deslandes E., Lebailly P., Godard T., Sichel F., Henry-Amar M. y Gauduchon P. (1998). DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay-comet assay/and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutation Research.* 419: 79 – 90.

- Wang L., Du D., Lu D., Lin C. T., Smith JN, Timchalk C., Liu F., Wang J. y Lin Y. (2011) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of organophosphorylated butyrylcholinesterase: a biomarker of exposure to organophosphate agents. *Anal. Chim. Acta* 693:1-6.
- Ware G. W. (2000). *The pesticide book*. 5a edición, Thomson Publications. Nueva York, pp. 1-415.
- WHO, World Health Organization. *Biological monitoring of chemical exposure in the workplace*. (1996) Geneva: World Health Organization; 3. Christiani D. C. Utilization of biomarker data for clinical and environmental intervention. *Environ Health Perspect.* 104: 921-5.
- 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.
- Yin B., Whyatt R. M., Perera F. P., Randall M. C., Cooper T. B. y Santella M. (1995). Determination of hydroxydeoxiguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 1023-1032.