



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO  
POR EXPOSICIÓN *in vivo* A LOS PESTICIDAS  
METAMIDOFOS Y AZINFOS METÁLICO EN  
*Solanum lycopersicum* Y *Coriandrum sativum*.

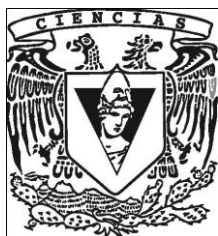
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA LILIA MARROQUÍN PÉREZ



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

1. Datos del alumno  
Marroquín  
Pérez  
Ana Lilia  
55 90 71 62  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
306073566
2. Datos del tutor  
Dra.  
Sandra Luz  
Gómez  
Arroyo
3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
Luis Felipe  
Jiménez  
García
4. Datos del sinodal 2  
Dr.  
Pedro Rafael  
Valencia  
Quintana
5. Datos del sinodal 3  
Dra.  
Josefina  
Cortés  
Eslava
6. Datos del sinodal 4  
Dra.  
María Isabel  
Rodríguez  
Romero
7. Datos del trabajo escrito  
Determinación de daño genotóxico por exposición *in vivo* a los pesticidas metamidofos y azinfos metílico en *Solanum lycopersicum* y *Coriandrum sativum*.  
69 p.  
Año 2015 .

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi directora de tesis por ser parte fundamental de mi formación científica, por la orientación que me brindo y por su calidad humana:

**Dra. Sandra Gómez Arroyo**

A cada uno de los integrantes de mi jurado por dedicar su valioso tiempo para la revisión de este trabajo:

Dr. Luis Felipe Jiménez por ser un gran ejemplo

Dr. Rafael Valencia por sus brillantes observaciones

Dra. Josefina Cortés Eslava, por su infinita paciencia y su apoyo durante la realización de este trabajo.

Dra. Isabel Rodríguez por sus valiosas aportaciones y consejos.

A mis compañeros del Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera quienes me dieron su apoyo, amistad, consejo e hicieron que el trabajo fuera más ameno.

A la M. en C. Ana Rosa Flores y a Victoria Carrillo por todo el apoyo que me ha brindado tanto académico como personal.

A todas las personas que participaron directa o indirectamente para que la culminación de este trabajo fuera posible.

Agradezco el apoyo financiero brindado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM proyecto No. IN-222112 por la beca de Licenciatura/Conclusión de estudios.

*A life in research can be a most enjoyable life  
with many frontiers to explore.*

*~ Earl W. Sutherland ~*

## DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mi familia las palabras no son suficientes cuando hay tanto que decir, Papá me enseñaste la fortaleza, la perseverancia y el amor, eres mi modelo a seguir, Mamá siempre has sido mi pilar tú me enseñaste a leer, escribir y a no rendirme. Les agradezco por ser los autores de esta vida, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

A Ulises e Irene, con sus juegos me enseñaron a crecer gracias hermanitos, y Saíd por ser mi niño que me enseña el mundo.

A mis tíos y primos que siempre están presentes y apoyándome, también son mis padres y hermanos

A mis amigos (Gaby, Mitzui, Danií, Lyz, Talex y Jan) porque aunque a veces estén lejos sabemos que siempre estamos juntos.

A Miguel, porque nos encontramos cuando estábamos perdidos, gracias por ser mi cómplice.

*Después de todo, cuando estás enamorado, quieres contarlo a todo el mundo.  
Por eso, la idea de que los científicos no hablen al público de la ciencia me parece aberrante.*

*~Carl Sagan~*

*Espero que algún día la locura me lleve al camino de la iluminación.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
I.I Impacto de la exposición a plaguicidas .....	4
I.II Plaguicidas.....	5
I.III Historia de los plaguicidas.....	5
I.IV Clasificación.....	6
I.IV.I Organofosforados .....	8
I.IV.I.I Metamidofos.....	9
I.IV.I.II Azinfos metílico .....	10
I.V Metabolismo de los plaguicidas en plantas.....	11
I.V.I Fase I o de oxidación .....	12
I.V.II Fase II o de conjugación .....	13
I.V.III Fase III o reacciones terciarias.....	14
I.VI Activación metabólica en plantas.....	16
I.VII Biomarcadores utilizados en el monitoreo de genotoxicidad .....	17
I.VII.I Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa .....	18
I.VII.II Prueba de micronúcleos.....	21
I.VII.II.I Criterio de selección de micronúcleos.....	23
I.VIII Cultivo de linfocitos humanos .....	23
I.IX Características de los vegetales utilizados .....	24
I.IX.I <i>Solanum lycopersicum</i> .....	24
I.IX.II <i>Coriandrum sativum</i> .....	26
II. JUSTIFICACIÓN .....	27
III. OBJETIVOS .....	28
III.I Objetivo general .....	28
III.II Objetivos particulares.....	28
IV. HIPÓTESIS.....	29
IV.I Hipótesis general .....	29
IV.II Hipótesis particulares .....	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
V.I Germinación de semillas.....	30
V.II Tratamientos.....	30
V.III Ensayo cometa .....	30
V.IV Extracción de fracción enzimática .....	32
V.V Cultivo de linfocitos .....	32
V.VI Análisis estadístico.....	33
VI. RESULTADOS.....	35
VII. DISCUSIÓN .....	45
VIII. CONCLUSIONES .....	51
IX. LITERATURA CITADA.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de plaguicidas según su categoría toxicológica.....	7
Tabla 2. Clasificación de plaguicidas según su vida media.....	8
Tabla 3. Efecto de los plaguicidas metamidofos y azinfos metílico en <i>S. lycopersicum</i> y <i>C. sativum</i> .....	35
Tabla 4. Índice de división nuclear en <i>S. lycopersicum</i> y <i>C. sativum</i> .....	39
Tabla 5. Análisis estadístico de células polinucleadas en <i>S. lycopersicum</i> y <i>C. sativum</i> .....	42
Tabla 6. Frecuencia de MN en cultivo de linfocitos.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del metamidofos.....	9
Figura 2. Estructura química del azinfos metílico.....	11
Figura 3. Esquema general del metabolismo de xenobióticos en plantas.....	15
Figura 4. Componentes de una célula sometida a la técnica de ensayo cometa pH >13.....	20
Figura 5. Los diferentes destinos posibles de un cultivo de células expuestas a agentes genotóxicos/clastogénicos después del bloqueo de citocinesis.....	22
Figura 6. Áreas de producción de <i>S. lycopersicum</i> .....	25
Figura 7. Célula sometida a ensayo cometa.....	37
Figura 8. Histograma de promedio de momentos de cauda.....	38
Figura 9. Histograma de índice de división nuclear.....	40
Figura 10. Microfotografías de células polinucleadas de cultivo de linfocitos..	41
Figura 11. Histograma de promedios de MN en cultivo de linfocitos humanos con extractos vegetales.....	42

## RESUMEN

Usualmente los vegetales son considerados como alimentos frescos, sanos e inocuos, pero hay que considerar que les son aplicados una gran cantidad de agroquímicos para evitar pérdidas económicas por plagas. Entre estos compuestos se encuentran el metamidofos y el azinfos metílico, ambos plaguicidas organofosforados, ampliamente utilizados en los campos agrícolas para el control de plagas, sobre todo en cosechas para consumo humano por lo que representan un riesgo importante. Diferentes estudios demuestran que son capaces de entrar en las vías metabólicas de las plantas, siendo transformados donde puede potenciarse, disminuir o inhibirse su actividad genotóxica.

En el presente trabajo se evaluó la genotoxicidad de los plaguicidas metamidofos y azinfos metílico en *Solanum lycopersicum* (jitomate) y *Coriandrum sativum* (cilantro), hortalizas básicas en la dieta de los mexicanos. Las plantas fueron tratadas en condiciones que asemejan los campos agrícolas, asperjándolas cada 15 días en tres ocasiones con metamidofos 14 mM y de azinfos metílico 4 mM, utilizando como testigo negativo H<sub>2</sub>O y como testigo positivo etil metanosulfonato 6 mM.

Posterior a cada aplicación se realizó el ensayo cometa en las células de las hojas para evaluar el daño genotóxico generado por los plaguicidas analizando el momento de la cauda en 100 células por tratamiento, empleando el programa "Comet Assay IV". Esta prueba indicó que los plaguicidas metamidofos y azinfos metílico causan daño al ADN en las hojas de cilantro y jitomate, pero en la tercer aplicación se observa una notable disminución del daño, siendo el cilantro más efectivo para reducirlo; al parecer dichas plantas activan mecanismos tales como el metabolismo vegetal, con los cuales disminuyen la genotoxicidad de dichos compuestos.

Por otro lado, se obtuvieron extractos de las mismas plantas y con estos fueron tratados linfocitos humanos en cultivo; los resultados obtenidos indicaron que el índice de división nuclear no se vio afectado por la aplicación de los extractos, así



como tampoco el número de células polinucleadas, de igual manera, en la prueba de micronúcleos no se obtuvieron diferencias significativas respecto al testigo negativo.

## I. INTRODUCCIÓN

En el tema de salud alimenticia usualmente se escucha la frase: “come frutas y verduras”, pero ¿actualmente qué tan sano resulta esto? Sin duda todos los consumimos, si no diario, al menos un par de veces a la semana, y esto puede dar una idea de la importante fuente de alimento que son las plantas para el hombre.

Sin embargo, los vegetales también metabolizan y acumulan gran variedad de los compuestos presentes en el ambiente, tales como metales pesados y plaguicidas, que al incorporarse en sus tejidos se vuelven parte de la cadena trófica.

En 1950 se inició en México la modernización de la agricultura y con ello el desarrollo de sustancias que previnieran y combatieran las enfermedades y plagas, entre estos, agroquímicos, los fertilizantes y los plaguicidas. Al constatar la efectividad de dichos compuestos tuvo auge la aplicación de plaguicidas, en un principio organoclorados, es decir aquellos que en su composición química tienen un alto contenido de cloro. Posteriormente, comenzaron a ser sustituidos por otros con alto contenido de fósforo, conocidos como organofosforados; más de la mitad de estas sustancias fueron destinadas para cultivos de algodón y hortalizas (Cortez, 2001).

A pesar de que, desde entonces, se ha tenido una mayor producción en menor tiempo, ésta ha sido a costa de la contaminación del agua, del suelo y del aire, así como de la acumulación de sus residuos en los alimentos, y de riesgos potenciales a la salud ya que pueden causar efectos genotóxicos, es decir, daños en su material genético, de los organismos expuestos, entre muchos otros efectos.

Con esto surge la pregunta ¿qué tan grave es el daño generado por los plaguicidas a nivel genético? Existen diferentes niveles de daño, que van desde rupturas en el ADN, hasta cambios en el número de cromosomas o bien en su estructura. Dichas modificaciones a su vez pueden ser capaces de incorporarse en generaciones celulares posteriores (Clayson y Grant, 1992).

Se ha intentado comprender las consecuencias de la exposición a los plaguicidas y es por eso que desde 1984 el Programa Internacional de Seguridad Química (con siglas en inglés IPCS) realiza estudios colaborativos en plantas superiores para monitorear

contaminantes ambientales, cooperando con el Programa Ambiental de las Naciones Unidas y la Organización Mundial de la Salud (FAO), con el propósito de desarrollar metodologías para mejorar la evaluación del riesgo de exposición a sustancias químicas (Grant y Salamone, 1994).

## **I.I Impacto de la exposición a plaguicidas**

Diversos estudios han demostrado que los plaguicidas son un riesgo para la población en general, ya sea por estar ocupacionalmente expuestos, por el consumo de alimentos contaminados con residuos y por la persistencia de éstos en el ambiente (suelo, aire y agua).

En 2004 el proyecto PLAGSALUD registró más de 7000 episodios de envenenamiento por plaguicidas en América Central, de los cuales el 40% se relacionan con trabajadores expuestos a dichos compuestos y el resto son consecuencias de accidentes o intentos de suicidio. Hay que tener en mente que las cifras mencionadas únicamente son de casos registrados, ya que muchos otros no tiene registro, por lo tanto el número real puede ser más alto.

Se ha calculado que a nivel mundial, cada año el 3 % de los trabajadores ocupacionalmente expuestos a plaguicidas sufren episodios de intoxicación aguda (Chelala, 2004) y esta cifra aumenta en países en vías de desarrollo como es el caso de México.

Según la Organización Internacional de las Uniones de Consumidores, cada 4 horas muere un trabajador agrícola en los países en vías de desarrollo por envenenamiento por plaguicidas, lo que equivale a más de 10,000 defunciones al año, y otros 375,000 se intoxican con estos productos (FAO, 1986).

En México, en 2005 el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) reportó 3902 casos de intoxicación aguda en trabajadores agrícolas expuestos (Hernández *et al.*, 2007). En 2009 el INEGI calculó 4 millones cien mil trabajadores campesinos dedicados a la agricultura, la ganadería y la producción maderable, con estos datos es posible observar la enorme cantidad de personas que se encuentran potencialmente expuestas a plaguicidas.

Se calcula que el 35 % de los plaguicidas usados en América Central están restringidos en los países productores de éstos. En América Central por lo menos cuatro millones de personas, entre ellas niños, en contacto con actividades agrícolas están potencialmente expuestos a plaguicidas. Aun cuando los trabajadores en la agricultura pueden evitar la exposición directa a estas sustancias siguiendo métodos de aplicación adecuados y el uso de ropas protectoras, los encargados de las explotaciones agrícolas frecuentemente no las proveen o las condiciones en el terreno y las temperaturas elevadas hacen su utilización muy difícil (Chelala, 2004).

Es por esto que los plaguicidas han sido objeto de amplia investigación y es necesario evaluar el daño que provocan para mejorar el control de su uso.

## **I.II Plaguicidas**

La Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) los define como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causen perjuicios o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y sus derivados, así como alimentos para animales o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos” (CICOPLAFEST, 1998).

## **I.III Historia de los plaguicidas**

La historia de su aplicación se remonta aún antes de nuestra Era, cuando se empleaban derivados naturales con acción plaguicida; Plinio el Viejo fue un procurador militar romano que vivió entre los años 23 y 79 a. C. Él registró muchos de los primeros insecticidas naturales utilizados, dentro de los que se encuentran: extractos de pimienta, agua jabonosa, vinagre, aceite de pescado, salmuera y lejía, entre otros (Ware y Whitacre, 2004). Posterior a esto comenzaron a manejarse aceites derivados de petróleo hasta 1940, cuando el uso de plaguicidas sintéticos fue un parteaguas al descubrir las

propiedades insecticidas del dicloro-difenil-tricloroetano mejor conocido como DDT, compuesto organoclorado mayormente empleado durante los siguientes 30 años. Sin embargo, la aplicación masiva de este compuesto originó un nuevo problema ya que la población comenzó a presentar daños y se evidenció un marcado aumento de la contaminación ambiental (Estrada, 1998).

Más adelante se inicia el desarrollo de plaguicidas organofosforados con propiedades sistémicas, es decir, que aunque eliminan la plaga al contacto, el compuesto se transloca dentro de la misma planta, siendo el primero de ellos el di-etil para-nitro fenil mono-tio-fosfato conocido comúnmente como paratión. A pesar de que estos plaguicidas son muy efectivos para el control de las plagas y de bajo costo, resultan altamente tóxicos para los animales y entre ellos los mamíferos ya que pueden ser absorbidos por la piel y las vías respiratorias. El gran uso de dichos compuestos está relacionado con el auge de productos exportables no tradicionales, los que fueron promovidos en la década de los 80 como la solución para la crisis agraria en los países centroamericanos (Estrada, 1998).

Con esto como base, ha continuado la elaboración de sustancias más potentes que combaten las plagas. Frecuentemente aparecen nuevos plaguicidas ya sea para uso doméstico o para emplear en la agricultura, ganadería o campañas de salud pública, siendo la mayoría organoclorados que tienen átomos de carbono, cloro, hidrógeno y en ocasiones oxígeno y son muy estables en el ambiente y organofosforados (derivados del ácido fosfórico) que poseen un átomo central de fósforo en la molécula y son más tóxicos y menos estables en el ambiente en relación con los organoclorados (Cremllyn, 1979). Así ha ocurrido durante los últimos 70 años con la aplicación y acumulación continua de agroquímicos en las tierras de cultivo, lo cual provoca que las plantas almacenen cada vez más agentes tóxicos en sus tejidos y como consecuencia también los seres humanos y muchos animales, pues finalmente los vegetales son el inicio de la cadena alimenticia.

#### **I.IV Clasificación**

Dentro de la naturaleza del hombre está hacer clasificaciones con base en diversas características, los plaguicidas no podían ser la excepción, a continuación se mencionan algunos de los criterios en los que se han categorizado.

Toxicológico: fue propuesto por la OMS en función del nivel de daño a la salud que provocan, expresada en DL<sub>50</sub> que indica la dosis letal al 50 % administrada por vía oral o dérmica en ratas (OMS, 1990). Esta clasificación ordena los plaguicidas en cuatro tipos: extremadamente tóxicos, muy tóxicos, moderadamente tóxicos, y ligeramente tóxicos (CICOPLAFEST, 2004) como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de plaguicidas según su categoría toxicológica.

Clasificación de la OMS según los riesgos	Formulación Líquida DL <sub>50</sub> Aguda *		Formulación Sólida DL <sub>50</sub> Aguda *	
	Oral	Dermal	Oral	Dermal
<b>I a</b> Sumamente peligrosos	<20	<40	<5	<10
<b>I b</b> Muy peligrosos	20 a 200	40 a 400	5 a 50	10 a 100
<b>II</b> Moderadamente peligrosos	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	100 a 1000
<b>III</b> Poco peligrosos	2000 a 3000	> a 4000	500 a 2000	> a 1000
<b>IV</b> Normalmente no ofrecen peligro.	> a 3000		> a 2000	
* En ratas				

Por su vida media: se considera el tiempo de efectividad, clasificándolos en: permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes como se muestra en la tabla 2 (Briggs y Council, 1992).

Tabla 2. Clasificación de plaguicidas según su vida media.

<b>Clasificación</b>	<b>Vida Media</b>
Permanentes	Más de 20 años
Persistentes	Menos de 20 años
Moderadamente persistentes	De 1 a 8 meses
No persistentes	12 semanas o menos

Químico: como su nombre lo indica, está en función de su composición química, es decir, considera los elementos que los constituyen, ya que los efectos sobre la salud son característicos y diferentes para cada uno de los grupos definidos. Dentro de éstos se encuentran principalmente los organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretoides y triazínicos (Morell, 1998). Dado que este trabajo se enfoca en los plaguicidas organofosforados se profundizará al respecto.

#### **I.IV.I Organofosforados**

Son liposolubles y volátiles, características que facilitan su absorción; su toxicidad es variable y los efectos farmacológicos también cambian de acuerdo al grado de toxicidad y a la vía de entrada en el organismo (Fernández *et al.*, 2010).

Este tipo de plaguicidas es de los más utilizados en México para cultivos de consumo como maíz, alfalfa, canola, cebolla, algodón, nuez, jitomate, papa, manzana, frijol, chícharos, entre muchos más. Al ser plaguicidas de tipo sistémico no sólo quedan en la cáscara de los vegetales o frutas, también son capaces de penetrar hasta la pulpa. Diversos procesos como pelar, hervir, cambiar la temperatura o humedad pueden reducir los niveles de residuos en los productos, pero esto no siempre asegura queden completamente libres de ellos.

Actúan principalmente en el sistema nervioso central (SNC) fosforilando la enzima acetilcolinesterasa (AChE), e inhibiéndola irreversiblemente. Moretto (1998) señala que en las terminaciones nerviosas esto provoca una acumulación de la acetil colina ACh en la unión sináptica y la alteración de la transmisión normal de los impulsos nerviosos ocasionando tensión, ansiedad, insomnio, inestabilidad emocional, neurosis, apatía, confusión, jaquecas, convulsiones depresión de los centros respiratorios y circulatorios y puede llegar a causar coma o incluso la muerte. Los síntomas por esta intoxicación pueden aparecer desde las primeras dos horas o hasta horas más tarde, dependiendo de si los plaguicidas requieren activación metabólica o de la capacidad de ser solubles en grasa.

#### I.IV.I.I Metamidofos

El plaguicida metamidofos, cuya nomenclatura IUPAC es O,S-dimetil fosforoamidotioato fue introducido en el mercado en 1969 por Chevron Chemical Company bajo el nombre de tamarón. También es conocido con nombres como: monitor, filitox, famanox, Ttm, patrole, methedrin 60, morithion, red star alloran, entre otros. Este insecticida organofosforado tiene actividad por vía sistémica, ingestión y de contacto. Se considera muy peligroso (Tabla 1) con  $DL_{50}$  de 15.6 mg/kg por vía oral, 0.213 mg/L por inhalación y 122 mg/kg por vía dérmica; y por su vida media se clasifica como no persistente (Tabla 2). En cuanto a su estructura química, tiene un peso molecular de 124.97 g/mol y su fórmula general es  $C_2H_8O_3NP$ , su estructura química se muestra en la figura 1.

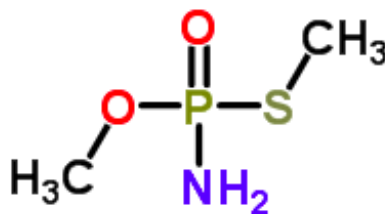


Fig. 1. Estructura química de metamidofos.



A partir de 1996 la CICLOPAFEST restringe su uso en México, a pesar de ésto es utilizado en cultivos de maíz, arroz, papa, soya, lechuga, caña de azúcar, árboles frutales, algodón, tabaco y jitomate (Prieto *et al.*, 2002) sin importar la restricción, esto es debido principalmente a que su precio en el mercado es muy bajo en comparación con otros compuestos. La dosis recomendada para hortalizas es de 1 a 1.5 L/Ha disuelta en 40 L de agua y el distribuidor Bayer recomienda la última aplicación 7 días antes de la cosecha en jitomate.

Este plaguicida es muy eficiente eliminando insectos como chicharrita del jitomate (*Eutettix tenellus*), chinche del jitomate (*Cyrtopeltis notata*, *Dhycipus minimus*), diabrótica (*Diabrotica variegata*), gusano del cuerno de jitomate (*Manduca quinquemaculata*), minador de hojas (*Lyriomisa munda*) y trips (*Frankiniella tritisi*), entre muchas otras plagas no sólo de esta hortaliza.

Antonius y Snyder (1994) realizaron estudios en jitomate a través de cromatografía de gases hallando que la vida media del metamidofos en el fruto es de 4.8 a 5.1 días, mientras que en las hojas es de 5.5 a 5.9 días. Por otro lado, Egea González *et al.* (1998) utilizaron la misma técnica cuantificando los niveles de metamidofos después de haber sido aplicado en haba y jitomate cultivados en invernadero, obteniendo que la vida media de los residuos de metamidofos en haba es de 6.8 a 7.7 días y jitomate en 5.1 a 5.7 días. También encontraron que los niveles de metamidofos en el invernadero descienden dramáticamente la primer hora posterior a la aplicación, pero en las siguientes horas la disminución es muy lenta ya que 52 horas después aún permanecen residuos en el aire. Recientemente, Panagiotis *et al.* (2005) estudiaron la degradación de dicho pesticida con la misma técnica en uvas, mostrando que la vida media de degradación del metamidofos fue de 16 días en campo abierto, 22 días en condiciones de invernadero y 267 días en uvas almacenadas en refrigerador.

#### **I.IV.I.II Azinfos metílico**

Este plaguicida organofosforado fue desarrollado en 1953 por Casa Bayer, se le considera sumamente tóxico (Tabla 1) teniendo una  $DL_{50}$  de 15 mg/kg por vía oral y 16 mg/kg por vía dérmica. Su vida media es de 21 a 68 días, esto indica que es moderadamente persistente (Tabla 2). Es uno de los plaguicidas de más alto riesgo según

el registro de intoxicaciones agudas de la Secretaria de Salubridad y Asistencia. Su nombre IUPAC es O,O-dimetil S-[(4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)il)metil]fosforoditioato, es un compuesto derivado de N-clorometil benzasimida. Algunos otros nombres con los que es conocido son: crystión, gusatión, gotnión, metiltriazotión, entre otros.

Su fórmula química general es  $C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$  posee un peso molecular de 317.33 g/mol en la figura 2 se muestra su estructura química.

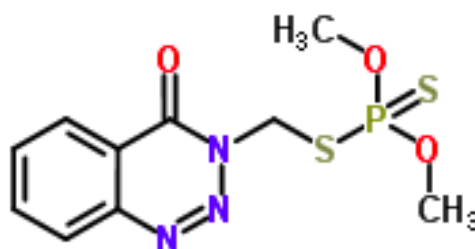


Fig. 2. Estructura química de azinfos metílico.

En 2006 fue eliminado de la Unión Europea, mientras que en Nueva Zelanda se suspendió su uso durante 5 años a partir del 2009. En México la CICOPLAFEST autoriza su uso en cultivos de jitomate, algodón, chile, manzano, nogal, papa, peral y vid. Algunas de las plagas que elimina en jitomate son: pulgones (*Aphis gossypii*, *Aphis solani*), cochinilla prieta (*Blapstinus spp*), diabrotica (*Diabrotica variegata*), entre otras.

#### **I.V Metabolismo de los plaguicidas en plantas**

El metabolismo es un conjunto de reacciones químicas coordinadas que actúan a través de las enzimas dentro de las células con el fin de obtener energía y construir biomoléculas. Cuando agentes externos como los plaguicidas son absorbidos por la piel, o en el caso de las plantas por las raíces, hojas o tallos, pueden ocurrir dos eventos, la

biotransformación a través del metabolismo vegetal y/o el almacenamiento en los tejidos. Para el primer caso existen tres fases importantes en el metabolismo vegetal de los plaguicidas, las enzimas que realizan las reacciones químicas relacionadas con la biotransformación se encuentran en el citoesqueleto, en el retículo endoplásmico, en las mitocondrias y en el caso de los mamíferos, se lleva a cabo principalmente en las células hepáticas (Cremllyn, 1979; Albert, 1988).

### **I.V.I Fase I o de oxidación**

En dicha fase se puede reducir o modificar la fitotoxicidad de los plaguicidas, prepara las moléculas para la fase II incrementando su polaridad. En esta etapa también es posible bioactivar los xenobióticos puesto que se introduce un grupo sustituyente no presente, ya sea funcional o reactivo, tal como: amida, amino, ácido carboxílico, ciano, halogeno, hidroxilo, metoxil, metilo o sulfhidrilo. Las principales reacciones de conversión en la fase I son oxidación, reducción e hidrólisis (Lamoureux y Frear, 1979).

Las reacciones de oxidación son las más comunes en xenobióticos y resultan en desintoxicación o activación del compuesto, catalizadas por el citocromo P-450 como oxidasa de funciones mixtas (OFM) usualmente se encuentra unido a la membrana celular (Sandermann, 1988), pero las reacciones se llevan a cabo en el retículo endoplasmático (Menn, 1978), donde uno de los dos átomos de oxígeno molecular se incorpora en el sustrato y el otro se reduce a agua por un donador de electrones como la nicotinamina adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) o nicotinamina adenina dinucleótido reducido (NADH). El citocromo P-450 en plantas se caracteriza por un alto grado de especificidad de sustrato (Higashi *et al.*, 1981; Higashi, 1985, 1988). Existen dos tipos de peroxidasas involucradas en la reacción, la clásica que utiliza  $H_2O_2$  y la otra que emplea oxígeno molecular y origina radicales libres intermediarios que interactúan con el ADN y aumentan la mutagenicidad de algunos agentes químicos (Yamasaki, 1974; Lamoureux y Frear, 1979; Dohn y Krieger, 1981; Plewa *et al.*, 1991).

Las reacciones de reducción como técnica para metabolizar xenobióticos en plantas son menos comunes que las de oxidación. Dentro de éstas, la más frecuente es la nitroreducción arilo donde un grupo nitro en un anillo fenilo es reducido a un grupo amino

catalizada por una arilo. Otra reacción de reducción es la desaminación en la cual es removido un grupo amino (Frear *et al.*, 1969; Higashi *et al.* 1981).

Finalmente, la hidrólisis es una reacción común en la fase I debido a que algunos plaguicidas poseen grupos éster amida o nitrilo. Las desesterificaciones durante la fase I son catalizadas por estererasas, aunque este proceso puede ocurrir sin enzimas a un pH 6.0. Muchas de las estererasas que actúan no son específicas respecto al xenobiótico y están presentes en la cutícula y las paredes celulares. Los plaguicidas compuestos por ésteres son altamente lipofílicos, lo que facilita su movilidad por la cutícula; sin embargo, se requiere desesterificación antes de su entrada en el floema. La desesterificación se puede ver como una manera de bioactivación porque el plaguicida no se transloca tan fácilmente como éster. En algunos casos, la forma desesterificada es más tóxica (Menn, 1978; Shimabukuro *et al.*, 1982).

#### **I.V.II Fase II o de conjugación**

En esta fase ocurren reacciones de conjugación que son procesos anabólicos que generalmente forman moléculas de mayor peso molecular cuya actividad biológica, solubilidad en agua y movilidad se reduce en gran medida (Shimabukuro *et al.*, 1982). Las reacciones de conjugación que se llevan a cabo en plaguicidas pueden ser con glucosidos simples o complejos, con glutatión y con aminoácidos. En sistemas animales dichos conjugados son excretados, pero debido a que las plantas carecen de sistema excretor, éstos permanecen en el organismo vegetal y pueden llegar a incorporarse en polímeros insolubles en las reacciones de la fase III. Cualquier toxicidad que queda en la fase I generalmente se reduce aún más por las reacciones de la fase II (Higashi, 1988) aunque en otras ocasiones esta vía también activa promutágenos (Shimabukuro *et al.*, 1982).

La conjugación de glutatión implica la unión de dicho tripéptido a la molécula de plaguicidas que contienen grupos halógenos, fenolato o alquilo sulfóxido. Estas reacciones son catalizadas por la glutatión-S-transferasa (Shimabukuro *et al.*, 1982; Lamoureux y Rusness, 1987).

Los conjugados de azúcar más comunes en plaguicidas son glucósidos y ésteres de azúcar. La glucosa se une a grupos fenoles (O-glicosilación) o grupos N-arilamina (N-glicosilación) a través de un enlace  $\beta$ -glucósido, mediado por la glucosiltransferasa. La difosfoglucosa uridina (UDPG) es el donador de azúcar más común. La enzima encargada de catalizar esta reacción es la glucosiltransferasa, que es muy específica para el UDPG. Por otro lado, los ésteres de glucosa se forman en plaguicidas que poseen ácido carboxílico; estos productos de conjugación no cuentan con una desintoxicación estable ya que pueden activarse nuevamente por esterasas citoplasmáticas (Pflugmacher y Sandermann, 1998).

La conjugación de aminoácidos se presenta en compuestos que contienen ácido fenoxiacético. Se forma un enlace peptídico entre el resto de ácido carboxílico del herbicida y el grupo amino del aminoácido. Esta reacción es catalizada por la enzima N-acetil transferasa. Los aminoácidos más comunes en esta reacción son aspartato y glutamato, aunque se ha identificado que también ocurre con menor frecuencia en valina, leucina, fenilalanina y triptófano. Estos compuestos conjugados pueden ser activos aún, pero con muy baja movilidad. Existen algunas pruebas de que estos metabolitos se incorporan a través de la pared celular (Schröder y Collins, 2002).

### **I.V.III Fase III o reacciones terciarias**

Esta fase es única en plantas debido a que éstas no excretan xenobióticos como lo hacen los animales, por tanto necesitan alguna forma para eliminarlos dentro de su propio sistema, y esto lo hacen mediante:

- 1) los productos de conjugación de la fase II,
- 2) el movimiento de metabolitos a vacuolas de almacenamiento,
- 3) y la incorporación de los metabolitos en regiones de la pared celular (Shimabukuro *et al.*, 1981).

En algunos casos hay una conjugación secundaria en la que se realiza una adición de ácido malónico al conjugado de azúcar mediante un enlace éster, siendo catalizada por la malonil-CoA-transferasa. Esta reacción facilita el secuestro vacuolar del producto. Los metabolitos de plaguicidas también pueden incorporarse al material de la pared celular,

son conocidos como residuos insolubles (Sandermann, 1988) y generalmente contienen anillos aromáticos o heterocíclicos (Schröder y Collins, 2002). Hasta la fecha, se ha demostrado que sólo algunos pocos conjugados de glutatión se acumulan en vacuolas de plantas (Li *et al.*, 1995)

Resulta importante mencionar esto, ya que el hombre al consumir plantas no sólo ingiere los plaguicidas que fueron directamente aplicados sobre éstas, sino también los metabolitos producidos por su biotransformación, en la figura 3 se muestra un resumen de las fases metabólicas en vegetales.

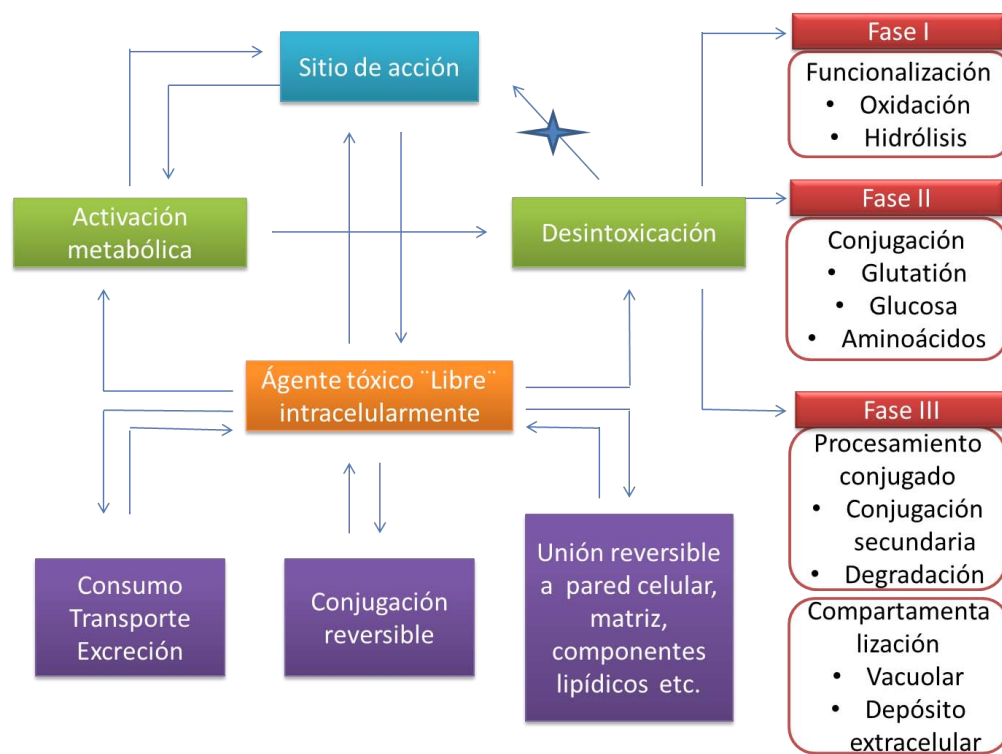


Fig. 3. Esquema general del metabolismo de xenobióticos en plantas (Modificado de Hock y Elstner, 2005).

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

Con lo mencionado anteriormente se comprende la relevancia de investigar a profundidad el metabolismo de estos plaguicidas, así como el destino que tienen los metabolitos que se originan, pues finalmente son aplicados en las cosechas para tener una mayor producción que será consumida en gran parte por el hombre.

## **I.VI Activación metabólica en plantas**

Se ha demostrado que las plantas tienen la capacidad de biotransformar sustancias inocuas en mutágenos a través de diversos procesos metabólicos (Plewa y Gentile, 1986; Maluszynska y Juchimiuk, 2005).

Plewa (1978) desarrolló un método para evaluar la respuesta mutagénica de varios plaguicidas en presencia de sistemas enzimáticos de plantas, también propuso el término “activación vegetal” para definir el proceso por el cual un promutágeno es activado a su forma mutagénica por acción biológica de un sistema vegetal.

Hay dos procesos generales para el estudio de activación metabólica vegetal de promutágenos, *in vivo* e *in vitro*. En los estudios efectuados *in vivo* 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.

Por otro lado, en los estudios *in vitro* el agente es incubado con un homogeneizado de tejido de la planta o con homogeneizados de cultivos celulares vegetales, pueden ser añadidos cofactores y finalmente se realiza un análisis de los metabolitos de los tejidos de la planta o los cultivos celulares (Plewa y Gentile, 1982; Plewa *et al.*, 1984, 1988).

En ambos métodos la acción del metabolismo vegetal sobre un mutágeno potencial se prueba en un microorganismo indicador como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Aspergillus nidulans*, etc. o en células en cultivo de mamífero, con el fin de evaluar su actividad genética y sus propiedades genotóxicas (Scott *et al.*, 1978; Loprieno y Adler, 1980; Takehisa *et al.*, 1982; Takehisa y Kanaya, 1983; Plewa *et al.*, 1988; Gómez-Arroyo *et al.*, 1995; Cortés-Eslava *et al.*, 2001).

## **I.VII Biomarcadores utilizados en el monitoreo de genotoxicidad**

Como ya se mencionó, la genotoxicidad es el resultado nocivo de la interacción de agentes químicos o físicos (en este caso los plaguicidas) con el material hereditario de la célula, y se manifiesta como alteraciones genéticas y/o cambios en el número o estructura de los cromosomas, mismos que pueden incorporarse en generaciones celulares subsecuentes (Clayson y Grant, 1992). La determinación genotóxica es una herramienta útil para la identificación de riesgos ambientales y de salud humana importante para desarrollar medidas de prevención y control.

Un biomarcador o marcador biológico se define como una alteración inducida por un xenobiótico, es decir, un agente externo, en componentes celulares, bioquímicos, procesos, estructuras o funciones que se pueden medir en un sistema biológico o una muestra (Silbergeld y Davis, 1994).

Los biomarcadores se agrupan en tres tipos: de exposición, de efecto y de susceptibilidad. Los de exposición valoran la dosis interna determinando el agente o subproductos de biotransformación permitiendo su cuantificación en el organismo (Christiani, 1996). Los de efecto son parámetros biológicos que reflejan la interacción del agente con los receptores biológicos, es decir, son indicadores de cambios bioquímicos dentro de un organismo como resultado de la exposición a un xenobiótico, tales como modificaciones en la composición sanguínea, alteraciones de actividades enzimáticas, aductos en el ADN, etc. Finalmente los biomarcadores de susceptibilidad son aquellos que indican una sensibilidad particular individual al efecto, por ejemplo los polimorfismos del citocromo P450 (Gil y Pla, 2001).

El ensayo cometa forma parte de los biomarcadores de efecto al evaluar el daño al ADN, así como la prueba de micronúcleos al evidenciar daño en los cromosomas.

Existen diversas pruebas citogenéticas (que se enfocan a la estructura, función y comportamiento de los cromosomas) que permiten analizar la frecuencia y tipo de daño que sufre el material hereditario, algunas de éstas pueden ser aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas o micronúcleos (Maluszynska y Juchimiuk, 2005).



Asimismo, existen distintas pruebas que detectan los rompimientos de ADN que permiten estimar la genotoxicidad de diferentes agentes, tales como la prueba de TUNEL que identifica apoptosis, funcionando con la polimerización de nucleótidos marcados a rupturas de la cadena de ADN *in situ* catalizada por la terminal transferasa nucleotidil (Havel y Durzan, 1996), la prueba de FISH que es una técnica fluorescente de hibridación *in situ* utilizada para detectar aberraciones cromosómicas, además de mostrar detalladamente el reordenamiento cromosómico, tanto en mitosis como en núcleos en interfase (Kolano *et al.*, 2003); o bien, el ensayo cometa del cual se hablará más adelante.

Se han establecido diferentes bioensayos en plantas superiores para la detección y seguimiento de mutágenos en el ambiente, así como distintos modelos para el tipo de contaminación monitoreada (Grant, 1982). Por otra parte, también es importante seleccionar la planta adecuada para evaluar según el ambiente a estudiar, ya que no sólo interviene el tipo de mutágeno, sino otras características como la especie de la planta, el genotipo y el estadio en el que se desarrolla. La respuesta de éste ante los mutágenos puede ser considerada en diferentes niveles de organización, tales como el ADN, cromosomas o el genoma (Kihlman, 1956).

Algunas ventajas del uso de vegetales para este tipo de monitoreo son su fácil manejo, el daño no es expansivo y en algunos casos son más sensibles que otros sistemas. Aunque por otro lado, hay algunas limitaciones como las diferencias bioquímicas entre plantas y mamíferos, que en ciertos casos impiden extrapolar los efectos a los seres humanos (Grant y Salamone, 1994).

En poblaciones humanas los biomarcadores suelen utilizarse como indicadores del estado de salud o del riesgo a enfermedades. Al igual que en plantas se realizan estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. A nivel individual pueden emplearse para apoyar o rechazar el diagnóstico de un determinado tipo de intoxicación o de otro efecto adverso inducido por productos químicos (Páldy *et al.*, 1987).

### **I.VII.I Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa**

Es un método sensible y relativamente sencillo para detectar daño en el ADN a nivel de células individuales (Singh *et al.*, 1988). Se fundamenta en la sensibilidad que tienen los sitios dañados de ADN al ser sometidos a un pH mayor a 13 y su comportamiento al ser

expuestos a un campo eléctrico (electroforesis), dando como resultado que los fragmentos de ADN migren a una velocidad diferente que el resto del material nuclear, originando la formación de la cola de un “cometa”, entre más larga sea esta porción, mayor es el daño presente en el material genético.

La electroforesis unicelular alcalina detecta rupturas de ADN de cadena sencilla y enlaces cruzados, con el enfoque de una sola célula en pruebas de genotoxicidad, proporciona resultados a corto plazo en células blancas en estudios *in vivo* e *in vitro*, y ha demostrado utilidad en la evaluación de daño y reparación de ADN inducidos por agentes físicos y químicos en diversos sistemas celulares (Buschini *et al.*, 2004; Jamil *et al.*, 2004; Van Kooij *et al.*, 2004), así como para monitorear poblaciones expuestas a agentes químicos genotóxicos. Una importante contribución del ensayo cometa a la toxicología genética es su aplicación en estudios *in vivo* ya que no requiere gran número de células para el análisis, virtualmente cualquier órgano o tejido es adecuado para la aplicación de esta prueba (Collins, 2004).

Este ensayo fue desarrollado por Östling y Johanson (1984) para cuantificar rompimientos en la cadena de ADN en células individuales expuestas a radiación ionizante, para lo que embebían las células en un gel de agarosa sobre portaobjetos de microscopio para ser sometidas a una electroforesis neutra tras la lisis en presencia de sales y detergentes obteniendo un halo de ADN fragmentado alrededor del núcleo. Más adelante Singh *et al.* (1988) optimizaron el ensayo al realizar la electroforesis alcalina ( $\text{pH} \geq 13$ ). En estas condiciones de pH, la migración incrementada del ADN es asociada con elevados niveles de rupturas de cadena simple, con sitios de reparación por escisión incompletos y sitios lábiles al álcali. Como la mayoría de los agentes genotóxicos inducen en mayor magnitud ruptura de cadenas sencillas y/o sitios lábiles al álcali, esta versión del ensayo tiene mayor importancia en la identificación de éstos. Finalmente el ADN se tiñó con bromuro de etidio para visualizar los núcleos con cometas (Tice *et al.*, 2000).

En general el principio básico del ensayo, es el medio alcalino ( $\text{pH} < 13$ ) que permite el desenrollamiento del ADN y la separación de proteínas asociadas incrementando la movilidad y visualización de los fragmentos de ADN así como la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis. Luego, al ser observada la célula al microscopio (por fluorescencia o por tinción con plata del material nuclear), presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear) y una cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo), por lo que

este ensayo es también conocido como ensayo cometa, debido al patrón de migración del ADN que se produce en las células dañadas.

Con el desarrollo de estas técnicas han surgido distintas formas de cuantificar el daño al ADN, en las que se incluye el examen visual como el análisis fotográfico y oculométrico, así como el uso de programas especializados que facilitan la documentación de los datos (Kumaravel *et al.*, 2009), una ventaja de éste último es que reduce la subjetividad del observador (Sunjog *et al.*, 2013).

Respecto a las medidas utilizadas para el análisis del ensayo se pueden mencionar las cantidades total o relativa de ADN en la cabeza o la cauda, longitud total, longitud de cauda, radio de la cabeza y medidas respectivas de los “centros de gravedad” tal como el “momento de la cauda” (Dhawan y Anderson, 2009) que se muestran en la figura 4.

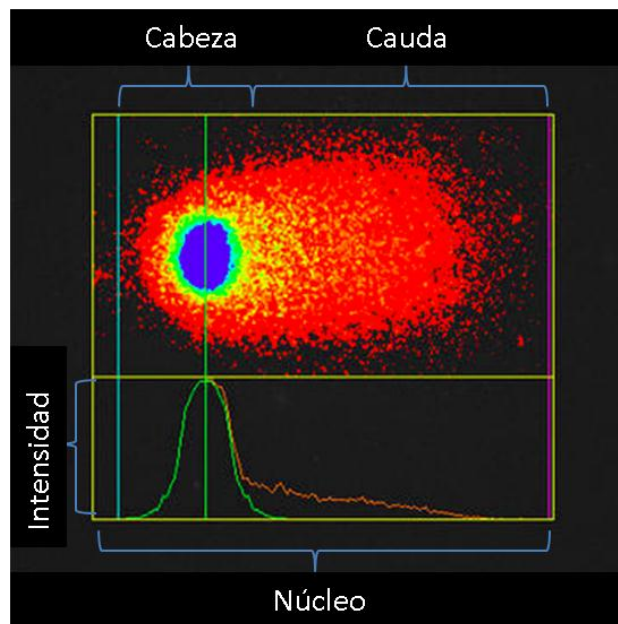


Fig. 4. Elementos de una célula sometida a la técnica de ensayo cometa pH  $\geq 13$

Para evaluar el daño al ADN en estudios de genotoxicidad se ha tomado como criterio de daño el momento de la cauda (Anderson *et al.*, 2003; Schabath *et al.*, 2003), que corresponde al porcentaje de ADN en la cola que es producto de la distancia de migración

y de la densidad de ADN (Olive *et al.*, 1990; Muller *et al.*, 1994). El momento de la cauda incorpora una medida tanto del tamaño más pequeño de ADN que migra fuera del núcleo (longitud de la cola del cometa) y el número de rupturas (representado por la intensidad de ADN en la cola). Esta medida está basada en el porcentaje de ADN que migra, también se ha hecho popular con el incremento del uso de sistemas de análisis de imagen computarizados, utilizados para almacenar datos de los cometas (Tice *et al.*, 2000).

### **I.VII.II Prueba de micronúcleos**

Heddle (1973) y Schmid (1975) fueron los primeros investigadores que de manera independiente propusieron que: un ensayo alternativo y simple para determinar el daño cromosómico *in vivo* era el registro de micronúcleos (MN) en poblaciones celulares en división. Este ensayo es uno de los más utilizados en mamíferos para evaluar la exposición a contaminantes ambientales, ya sea en linfocitos de sangre periférica o epitelio bucal.

Es fundamental realizar pruebas de genotoxicidad no sólo en hortalizas también en seres humanos, ya que los consumidores no sólo ingieren los plaguicidas que fueron directamente aplicados sobre éstas, sino también los metabolitos producidos por su biotransformación, y para determinar el daño que éstos causan en células humanas se han desarrollado ensayos tales como el de micronúcleos que es ampliamente utilizado para medir anormalidades cromosómicas.

En el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis (MNBC) las células que han completado una división nuclear son bloqueadas durante la citocinesis usando la citocalacina-B (cit-B) y son identificadas por ser binucleadas. La cit-B es un inhibidor de la polimerización de la actina, proteína requerida para la formación del anillo de microfilamentos que constriñe el citoplasma entre los núcleos hermanos durante la citocinesis (Carstairs, 1962). El uso de la cit-B permite la acumulación de la mayoría de las células en división en la fase binucleada dentro de la población celular en división, a pesar de su grado de sincronía y la proporción de células. A través de esta metodología también es posible evaluar los puentes nucleoplásmicos (cromosomas dicéntricos que forman puentes en anafase) y yemas nucleares, además de ser útil para determinar el índice de división nuclear (Fenech, 2000, 2006).

Como su nombre lo indica, los micronúcleos son pequeños núcleos contenidos en masas de cromatina que se encuentran cerca del núcleo principal en las células en interfase, se forman a partir de material cromosómico que se ha quedado rezagado durante la fase mitótica de disyunción, en la cual se separan las dos cromátidas hermanas hacia cada uno de los dos polos, para, posteriormente, dar lugar a dos células hijas genéticamente iguales, como resultado de la división celular. Ese material genético que no llega a ninguno de los dos polos anafásicos debido a alguna alteración cromosómica (como ruptura) o a un mal funcionamiento del aparato mitótico, no queda incluido en ninguno de los dos núcleos que van a constituir las células hijas y puede formar por si solo un núcleo de tamaño muy pequeño, es decir, un “micronúcleo” perfectamente visible en el microscopio óptico; en la figura 5 se muestra el proceso de formación tanto de micronúcleos como de otras anomalías celulares. Esta técnica es utilizada para evaluar alteraciones citogenéticas que permiten diagnosticar la capacidad de un compuesto para inducir alteraciones cromosómicas (Schmid, 1975; Fenech y Morley, 1985; Bello y López de Cerain, 2001).

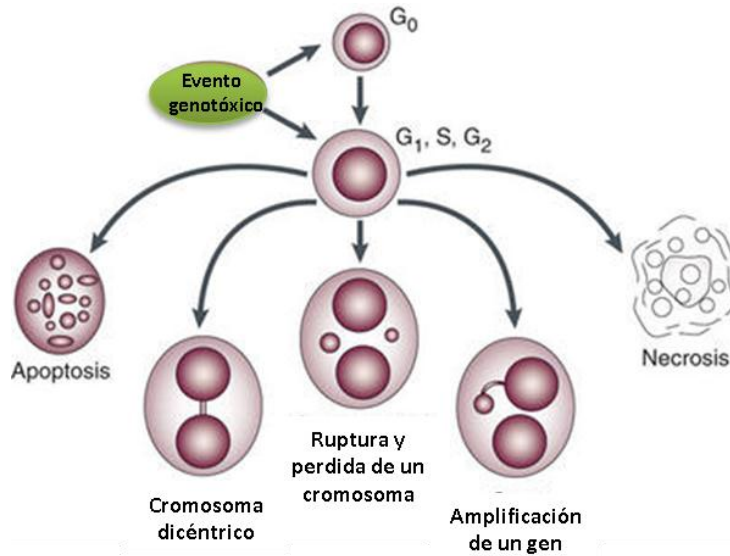


Fig. 5. Los diferentes destinos posibles de un cultivo de células expuestas a agentes genotóxicos/citotóxicos después del bloqueo de citocinesis (Modificado de Fenech, 2007).

### **I.VII.II.I Criterio de selección de micronúcleos**

Siguiendo los criterios utilizados en “HUMN project” (Fenech *et al.*, 2003) los micronúcleos cumplen las siguientes características:

1. El diámetro de MN varía entre 1/16 y 1/3 del diámetro de los núcleos principales.
2. Los MN son redondos u ovalados.
3. No son refractantes y pueden ser distinguidos fácilmente de las partículas de tinción.
4. No están ligados o conectados a los núcleos principales.
5. Pueden tocar pero no solapar los núcleos principales y el límite micronuclear debe ser distinguible del límite nuclear.
6. La tinción tiene la misma intensidad en MN que en los núcleos principales.

### **I.VIII Cultivo de linfocitos humanos**

Los linfocitos humanos periféricos representan una población celular en la cual el ADN está predominantemente en la etapa pre-sintética del ciclo celular, es decir, la etapa  $G_0$ , y sólo el 0.2% o menos se encuentran en etapa auto-sintética, poseen un núcleo denso y citoplasma escaso, tienen un diámetro de 6  $\mu\text{m}$  y un volumen estimado de 110  $\mu\text{m}^3$ . El sistema de linfocitos de sangre periférica es un indicador extremadamente sensible tanto *in vivo* como *in vitro* para el análisis citogenético del efecto de diversos agentes químicos. Este sistema cuenta con diversas ventajas, dentro de ellas es posible obtener gran cantidad de células ya que 1 mL puede contener de 1 a 3 millones de linfocitos, estas células permanecen generalmente en estado  $G_0/G_1$  en circulación periférica y normalmente no se dividen *in vivo*. Es fácil estimular el crecimiento del cultivo en presencia de fitohemaglutinina (lectina que estimula la división celular), con ésta las células presentan las primeras mitosis a las 36 horas de haber iniciado el cultivo y a las 48 horas ya se observan metafases (Sandberg, 1982).

Nowell (1960) fue el primero en demostrar que los linfocitos humanos periféricos pueden ser estimulados por la fitohemaglutinina (FH) *in vitro*. Ésta es una proteína derivada de la planta de frijol *Phaseolus vulgaris*, que estimula un amplio espectro de células T.

La mitomicina C (MMC) es un agente alquilante utilizado como testigo positivo en cultivo de linfocitos en ensayos como el de MN, no requiere activación metabólica para manifestar su efecto (Shiraishi y Sandberg, 1982; Katzung, 1994). Su acción consiste en formar enlaces cruzados con el ADN actuando principalmente en la guanina y en menor grado en la citocina y adenina, este fenómeno ocurre de manera importante durante el ciclo celular en las fases S y G<sub>2</sub>, a dosis altas inhibe la formación de ARN y de proteínas.

## **I.IX Características de los vegetales utilizados**

### **I.IX.I *Solanum lycopersicum***

Conocida comúnmente como jitomate, su gran demanda y rendimiento hacen que sea una hortaliza altamente cultivada en todo el mundo y de mucha importancia en el sistema alimenticio, además de ser un producto base en la dieta mexicana. Esta hortaliza es originaria de la región que va del norte de Chile al sur de Colombia, pero fue en México donde comenzó su domesticación; es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva anualmente, o todo el año en invernadero (Nuño, 2007). Cuenta con un genoma de aproximadamente 900 Mb y 24 cromosomas que consisten en heterocromatina y eucromatina pericéntrica distal (Michaelson *et al.*, 1991). En cuanto a clasificación taxonómica pertenece al reino: Plantae, división: Magnoliophyta, clase: Magnoliopsida, subclase: Asteridae, orden: Solanales, familia: Solanaceae.

La FAO (2007) comenta que un alto porcentaje de los costos de producción está relacionado con la compra y aplicación de insumos, entre ellos los agroquímicos, utilizados por los tomateros de una manera excesiva y que, además de encarecer los costos, causan serios disturbios al ambiente y a la salud de los consumidores y de los mismos agricultores. Datos proporcionados por la FAO afirman que la elaboración mundial se ha mantenido estable, con un nivel promedio anual de 123.79 millones de toneladas, de las cuales Centro América representa el 0.15% de la producción mundial.

En 1985, México contaba con una superficie de cosecha de 55, 470 Ha, y un rendimiento de 1,453,623 toneladas por año. La región más importante es la del noroeste (véase figura 6) en la cual el estado de Sinaloa aporta el 75% de la producción total. La superficie abierta al cultivo en este estado comprende un 85% de tierras de riego con rendimientos promedio de 26 ton/Ha y el resto abarca terrenos de temporal.

Según la Secretaria de Desarrollo Agropecuario de México, el jitomate es la especie hortícola más cultivada tanto a cielo abierto como en la agricultura protegida, asimismo, es el cultivo más rentable, ya que tiene un potencial de rendimiento de 4 a 25 kg por m<sup>2</sup> y es altamente consumido aumentando constantemente; para el 2010 presentaba un consumo *per cápita* de 25 kg utilizado principalmente como condimento en sopa, arroz, salsas y guisados en general y en menor medida en ensaladas.

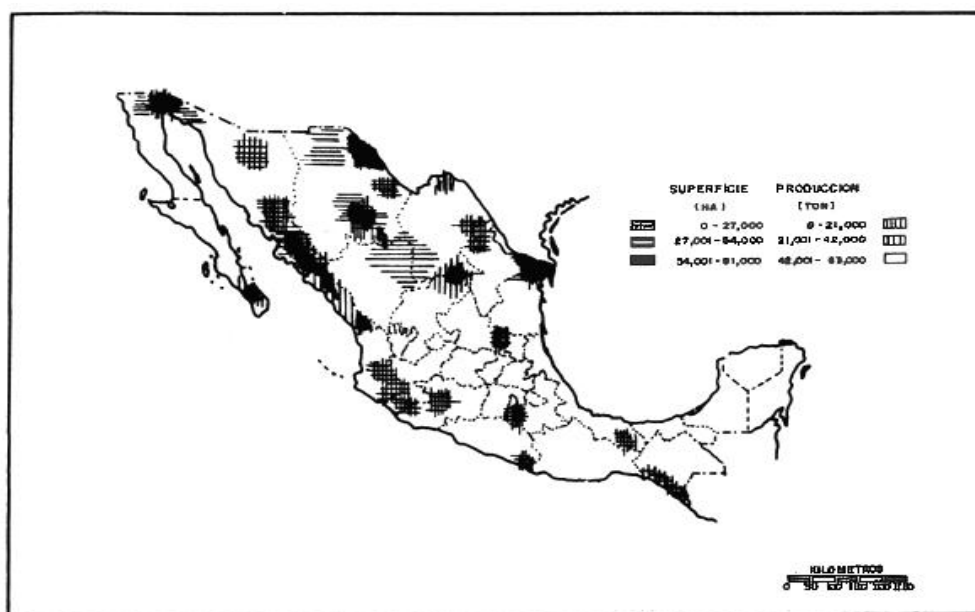


Fig. 6. Áreas de producción de *S. lycopersicum* en México (Fuente: Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1987).



## **I.IX.II *Coriandrum sativum***

Usualmente llamado cilantro, pertenece al reino: Plantae, división: Magnoliophyta, clase: Magnoliopsida, subclase: Rosidae, orden: Apialeses, familia: Apiaceae. Es una planta anual que tiene origen en el continente asiático en el centro y norte de la India. Al continente americano fue llevado por los portugueses y españoles en los viajes de conquista y colonización (Harten, 1974).

Según Diederichsen (1996) el cilantro cuenta con 22 cromosomas a diferencia de la mayoría de las especies de la familia. El sistema de raíz consta de una principal de la cual derivan raíces secundarias finas y superficiales. El sistema caulinar muestra un tallo comprimido de 60 a 90 cm aproximadamente, en el cual se disponen las hojas pinnatisectas (Cabrera y Salazar, 2004).

En Jalisco, Michoacán, Tlaxcala y Veracruz, es importante su uso en padecimientos relacionados con el aparato digestivo como: cólicos, dolor de estómago, hígado, vesícula, gases y bilis. Por otro lado, para bajar la fiebre y en casos de debilidad, fatiga, contra la gripa y fortalecer los pulmones. Se ha demostrado que el aceite esencial obtenido de los frutos y semillas posee una actividad antibiótica contra un gran número de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia Coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*; y el hongo *Candida albicans*. En los frutos y semillas se han identificado las cumarinas: bergaterpeno, umbeliferana y

umbeliferina, los flavonoides: glicosido de quercetinae isoquercetina, los componentes fenilicosácidos: cafeico y paracumarico, el sesquiterpeno ácido absisico y el esteroide gamma citoesterol. En las hojas se han detectado los flavonoides glucósido de camferol, el 3-4 dimeto i y el 3 meto i-quercitin y quercitin (Cabrera y Salazar, 2004).

En 2010 CONAGUA registró una superficie de producción de cilantro en México de 94 Ha, con una producción de 3 294 toneladas por año. En cuanto a los precios diarios de hortalizas reportados en diversas Centrales de Abasto a nivel nacional, se encuentra al cilantro en diferentes precios Toluca \$7.00 kilo, Torreón \$4.40 manojo, Chiapas \$1.00 manojo, Jalisco \$11.00 manojo, Nuevo León \$16.00 a 20.00 kilo, DF \$8. 00 manojo, Sonora \$3.00 manojo, Yucatán \$20.00 rollo, Sinaloa \$15.00 manojo, Guanajuato \$12.00 manojo y Querétaro \$20.00 manojo (SAGARPA, 2012).

## II. JUSTIFICACIÓN

Alrededor del mundo numerosos productos agroquímicos como plaguicidas son aplicados con alarmante frecuencia en diversos tipos de cultivos con la finalidad de eliminar plagas que, de lo contrario, provocarían pérdidas en las cosechas y consecuentemente bajas económicas. Al ser tan común su aplicación, estas sustancias se acumulan en los suelos y se dispersan por el aire y el agua, además algunos de ellos poseen altos niveles de persistencia en el ambiente, representando un fuerte problema de contaminación ambiental. Por otro lado, no sólo resultan ser agresivos para las plagas que combaten, también para otros animales y poblaciones humanas ya sea por contacto directo como es el caso de trabajadores agrícolas o indirectamente como consumidores de los productos de cosecha.

Es importante realizar estudios sobre los efectos que ocasionan, ya que también pueden ser introducidos por sistemas vivos, tales como los vegetales cuyo metabolismo puede transformarlos, produciendo metabolitos más peligrosos que el compuesto original y ser almacenados en estructuras como frutos o partes comestibles de la planta, donde finalmente formarán parte de la cadena trófica. Resulta fundamental la investigación sobre los efectos que tienen y el nivel de daño que pueden ocasionar en poblaciones humanas y en los mismos vegetales; para esto, pruebas como el ensayo cometa y el estudio de micronúcleos en el cultivo de linfocitos resultan herramientas muy útiles que arrojan datos certeros.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.I Objetivo general**

Evaluar el daño genotóxico causado por la exposición directa a los plaguicidas organofosforados metamidofos y azinfos metílico en *Solanum lycopersicum* y *Coriandrum sativum* simulando las condiciones de cultivo en campo como frecuencia de aplicación y concentración.

#### **III.II Objetivos particulares**

- Evaluar el daño en el material genético de *S. lycopersicum* y *C. sativum* provocado por los plaguicidas organofosforados metamidofos y azinfos metílico, a través del ensayo cometa.
- Detectar daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica humana provocado por los metabolitos contenidos en extractos vegetales de *S. lycopersicum* y *C. sativum*, tratados con estos plaguicidas a través del análisis de micronúcleos en células binucleadas.

## **IV. HIPÓTESIS**

### **IV.I Hipótesis general**

Los insecticidas metamidofos y azinfos metílico tienen potencial genotóxico, por tanto se espera que las plantas de *Solanum lycopersicum* y *Coriandrum sativum* expuestas a dichos compuestos presenten daño en el ADN significativamente mayor que aquellas que no lo estuvieron.

### **IV.II Hipótesis particulares**

- Si los insecticidas metamidofos y azinfos metílico causan daño en el material genético, se espera que en el ensayo cometa las plantas de *S. lycopersicum* y *C. sativum* expuestas a dichos plaguicidas presenten momentos de cauda mayores que aquellas no expuestas.
- Si las plantas son capaces de transformar metabólicamente a los insecticidas, entonces aquellas tratadas con metamidofos y azinfos metílico contendrán en sus extractos metabolitos que al incubarse con linfocitos humanos causarán daño genotóxico expresado en micronúcleos.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **V.I Germinación de semillas**

Las semillas de *Solanum lycopersicum* y *Coriandrum sativum* fueron seleccionadas (las de aspecto más sano y de mejor color) para ser lavadas con agua corriente y enseguida se enjuagadas con etanol al 70 % durante 2 minutos para eliminar esporas de hongos. Posteriormente, son germinadas en un almacigo (previamente desinfectado con hipoclorito de sodio y agua) en sustrato *peat moss* esterilizado, dentro de un invernadero, sin ningún tipo de contaminante. La semillas tardan aproximadamente 10 días en germinar, una vez que les salen las primeras hojas verdaderas, es decir, fotosintéticas son trasplantadas a bolsas negras para vivero de 30x30 cm con una capa de tezontle y otra de tierra, ambas esterilizadas en un autoclave. Son regadas diariamente.

### **V.II Tratamientos**

Pasados cuatro meses se aplicó cada tratamiento en tres plantas de jitomate y tres de cilantro. Se asperjaron cada 10 días en tres ocasiones con el fin de imitar las prácticas agrícolas siguiendo las indicaciones del proveedor Bayer de 1 L/Ha equivalente a 14 mM en metamidofos y 4 mM en azinfos metílico, el testigo positivo fue tratado con etil metanosulfonato (EMS) 6 mM (Gichner *et al.*, 2008), mientras que al testigo negativo únicamente se le administro agua. Transcurridos 10 días posteriores a cada aplicación, con una navaja nueva se colectaron tres hojas de cada planta con las cuales se realizó el ensayo cometa y diez hojas para obtener la fracción enzimática. Se realizó una repetición bajo las mismas condiciones

### **V.III Ensayo cometa**

#### Extracción de núcleos

Las hojas fueron colocadas en cajas Petri que se mantuvieron en hielo, se adicionaron 300  $\mu$ L de amortiguador PBS estéril y frío con un pH de 7.5. Utilizando una navaja nueva se cortaron suavemente las porciones en fracciones finas lo más pequeñas posible. Una vez aislados los núcleos mecánicamente, se tomaron 50  $\mu$ L de la suspensión y se mezclaron con 50  $\mu$ L de agarosa punto de fusión bajo (Sigma) 1% a 40 °C en un tubo

ependorff. Posteriormente, se toman 80  $\mu$ L de esta suspensión y se montaron sobre un cubreobjetos que fue colocado sobre un portaobjetos previamente cubierto con agarosa punto de fusión normal (Gibco) 0.5%. Se enfrió durante 5 minutos sobre una placa metálica colocada sobre una capa de hielo y el cubreobjetos fue removido. Cada muestra se hizo por triplicado.

### Lisis

A continuación las laminillas fueron colocadas en una caja Koplín vertical y se adicionó una solución de lisis pH 10 (NaCl, EDTA, Tris, NaOH, DMSO, Tritón X-100, H<sub>2</sub>O desionizada) fría, durante una hora.

### Electroforesis

Transcurrido el tiempo las laminillas se retiraron suavemente de la solución de lisis para ser colocadas en la cámara de electroforesis con amortiguador frío pH  $\geq$  13 (NaOH 10N, EDTA 200 mM pH10, H<sub>2</sub>O desionizada) orientadas con la parte esmerilada dirigida al cátodo. Se incubaron durante 5 minutos para efectuar el desenrollamiento y a continuación se realizó la electroforesis a 25 V, 300 mA durante 10 minutos a 4 °C. Al finalizar el tiempo se retiraron de la cámara y fueron neutralizadas con amortiguador Tris (BIO-RAD) 0.4 M, pH 7.5 dando 3 enjuagues de 5 minutos cada uno.

### Fijación y Tinción

Se fijaron con etanol 100 % durante 15 minutos y se dejaron secar al aire.

Para observarlas se distribuyeron 50  $\mu$ L de bromuro de etidio 0.04 mg/mL 1x en un cubreobjetos que fue colocado sobre la cara de la laminilla que contenía los geles de agarosa y se metió en una cámara húmeda protegida de la luz para evitar la evaporación, así como el decaimiento del fluorocromo, mientras se efectuaba el registro al microscopio de fluorescencia. Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo luz amarilla.

### Lectura de laminillas

De cada laminilla se analizaron 30 células al azar con el microscopio de fluorescencia a 400 aumentos con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm. Fueron evaluadas tres laminillas por cada muestra.

Se empleó el sistema computarizado de análisis de imágenes Comet Assay IV para medir el daño al ADN expresado por el valor del momento de la cauda.

#### **V.IV Extracción de fracción enzimática**

Para obtener los extractos vegetales, las hojas se enjuagaron perfectamente, se secaron y fueron pesadas en una caja Petri (previamente pesada). Posteriormente, se colocaron en un mortero frío y se agregó nitrógeno líquido para comenzar con el macerado del material adicionando amortiguador de fosfatos de sodio pH 7.4 conteniendo manitol 0.6 M (Baker), EDTA 1 mM (Baker) y dithiothreitol 1 mM (Sigma), la relación de volumen de la solución amortiguadora en mL es 1:1 respecto al peso en g de las hojas. Se añadió directamente polivinyl pirrolidona (Sigma) en relación 10 % del peso de las hojas, una vez homogeneizado se tomó la masa resultante y se colocó en tubos ependorff para ser centrifugada a 11,500 rpm durante 15 minutos, se extrajo el sobrenadante con una jeringa fría y se filtró con membranas milliporo 0.22  $\mu\text{m}$  (Takehisa *et al.*, 1988; Gómez-Arroyo *et al.*, 1995). Finalmente, se congeló hasta realizar el cultivo de linfocitos. Todo el material fue previamente esterilizado en autoclave.

#### **V.V Cultivo de linfocitos**

##### Siembra

A partir de donadores jóvenes de entre 20 y 30 años, no fumadores y clínicamente sanos, se extrajeron por punción venosa 5 mL de sangre periférica con una jeringa previamente heparinizada (PiSA). La siembra se realizó en tubos cónicos para centrifuga, cada uno con 4.5 mL de medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 0.2 mL de fitoehemaglutinina (Sigma), se agregaron 8 gotas de sangre a cada tubo y fueron incubados a 37 °C. El experimento se hizo por triplicado.

##### Tratamiento

Veinticuatro horas después se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de extractos vegetales de *S. lycopersicum* y *C. sativum* tratados con metamidfos, azinfos metílico, etil metanosulfonato (EMS) y agua, respectivamente, mientras que el testigo positivo de los

cultivos se trató con 125  $\mu$ L de mitomicina C, y el testigo negativo es únicamente el medio RPMI 1640 con fitohemaglutinina.

#### Bloqueo de citocinesis

A las 48 horas se agregaron 375  $\mu$ L de citocalacina-B (Gibco) a cada tubo para bloquear la citocinesis. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

#### Cosecha y fijación

Una vez transcurridas 72 horas desde la siembra se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y el botón se fijó agregando 5 mL de metanol-ácido acético (Sigma) en proporción 3:1 frío, se mezcló y nuevamente se centrifugó a 1,500 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células, esto se repitió hasta que el paquete celular tomara un tono blanquecino. Posteriormente, los tubos fueron refrigerados al menos dos horas.

#### Preparación de laminillas y tinción

Para montar las laminillas, las células fueron resuspendidas y se deslizaron 3 gotas en portaobjetos limpios dejando secar al aire libre. Para la tinción se sumerfieron durante 3 minutos en colorante Giemsa al 10 % diluido en agua destilada, se enjugaron, se dejaron secar para proceder a la observación.

#### Análisis de laminillas

Para identificar el índice de división nuclear (IDN) se analizaron 1000 células viables por tratamiento registrando el número de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas, pentanucleadas y hexanucleadas. Para evaluar la genotoxicidad se contaron 500 células binucleadas (BN) al azar observando la cantidad de micronúcleos (MN), puentes citoplasmáticos (PC) y brotes o yemas nucleares (YN). Las observaciones se realizaron microscopio óptico a 400 aumentos.

### **V.VI Análisis estadístico**

Se llevó a cabo utilizando el programa SPSS 20, las tablas y los gráficos fueron generados en Microsoft Excel y PowerPoint 2010. Para el ensayo cometa se tomó como



medida cuantitativa el momento de la cauda, expresándola en promedios y error estándar, a estos datos se aplicó la prueba de ANOVA de un factor y para el post-hoc la prueba Tukey-Kramer de comparación múltiple con un intervalo de confianza de 99%, es decir  $p < 0.005$ .

Para el cultivo de linfocitos se cuantificó el índice de división nuclear (IDN) de acuerdo al método de Eastmond y Tucker (1989) para evaluar la actividad citostática de los extractos vegetales. Respecto a las células polinucleadas, se realizó la prueba no paramétrica de  $\chi^2$  con una  $p < 0.05$  con el ajuste de Bonferroni para ver si existían diferencias significativas entre los tratamientos respecto a los testigos positivo y negativo. Finalmente, para MN se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con una  $p < 0.05$  y la post-hoc U de Mann-Whitney, para evaluar diferencias significativas entre el testigo negativo y los tratamientos.

## VI. RESULTADOS

### Ensayo cometa

Los resultados de la evaluación de los plaguicidas metamidofos y azinfos metílico aplicados *in vivo* a *S. lycopersicum* y *C. sativum* muestran que efectivamente ambos plaguicidas son agentes genotóxicos (Tabla 3, figuras 8 y 9).

Tabla 3. Efecto de los plaguicidas metamidofos y azinfos metílico en tres aplicaciones en *S. lycopersicum* y *C. sativum*, cuantificado a través del momento de la cauda en el ensayo cometa.

Sistema vegetal	<i>S. lycopersicum</i>			<i>C. sativum</i>		
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
Número de aplicación	$\bar{X} \pm E.E.$	$\bar{X} \pm E.E.$	$\bar{X} \pm E.E.$	$\bar{X} \pm E.E.$	$\bar{X} \pm E.E.$	$\bar{X} \pm E.E.$
Testigo Negativo (H <sub>2</sub> O)	0.74 ± 0.05	0.81 ± 0.09	1.26 ± 0.07	0.57 ± 0.04	0.50 ± 0.04	0.50 ± 0.04
Testigo Positivo (EMS)	14.97 ± 0.96 *	7.89 ± 0.50 *	8.28 ± 0.58 *	14.35 ± 0.90 *	11.70 ± 0.68 *	17.10 ± 0.86 *
Metamidofos	8.08 ± 0.55 *	8.71 ± 0.57 *	8.17 ± 0.51 *	7.87 ± 0.56 *	5.33 ± 0.59 *	2.82 ± 0.34
Azinfos metílico	10.68 ± 0.59 *	8.47 ± 0.60 *	7.52 ± 0.46 *	9.67 ± 0.52 *	9.83 ± 0.63 *	3.58 ± 0.31 *

\*Diferencias significativas entre el testigo negativo y los tratamientos obtenidas por el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple Tuckey-Kramer con una p<0.005.

En *S. lycopersicum* tanto el testigo positivo como los plaguicidas mostraron tener diferencias significativas respecto al testigo negativo. En las plantas tratadas con el testigo positivo EMS efectivamente tuvieron altos niveles de daño en la primer aplicación, sin embargo, en las siguientes dos aplicaciones se observó reducción del mismo. Respecto a los plaguicidas, en metamidofos se mantiene constante el promedio del momento de la cauda siendo este alrededor de 8 en las tres aplicaciones. Por otro lado azinfos metílico también generó daño en la primer aplicación, pero del mismo modo que el EMS dicho efecto decrece en las siguientes dos aplicaciones (Fig. 8).

Por otro lado en *C. sativum* el daño ejercido por la primera aplicación de EMS fue alto y a pesar de que disminuyó en la segunda, nuevamente aumentó notablemente en la tercera aplicación. Por su parte metamidofos muestra una clara disminución gradual de daño conforme transcurrieron las aplicaciones, en la tercera aplicación las diferencias no son significativas respecto al testigo negativo. Finalmente con azinfos metílico las primeras dos aplicaciones tienen promedios muy semejantes, mientras que en la última se reduce drásticamente.

Estos resultados muestran el potencial de dichos plaguicidas para inducir daño al ADN de estos vegetales, asimismo se observa la capacidad que estas plantas poseen para contrarrestar estos agentes y evitar el daño en sus células. En la figura 7 se presentan imágenes de núcleos sometidos al ensayo cometa captadas con el programa Comet Assay IV.

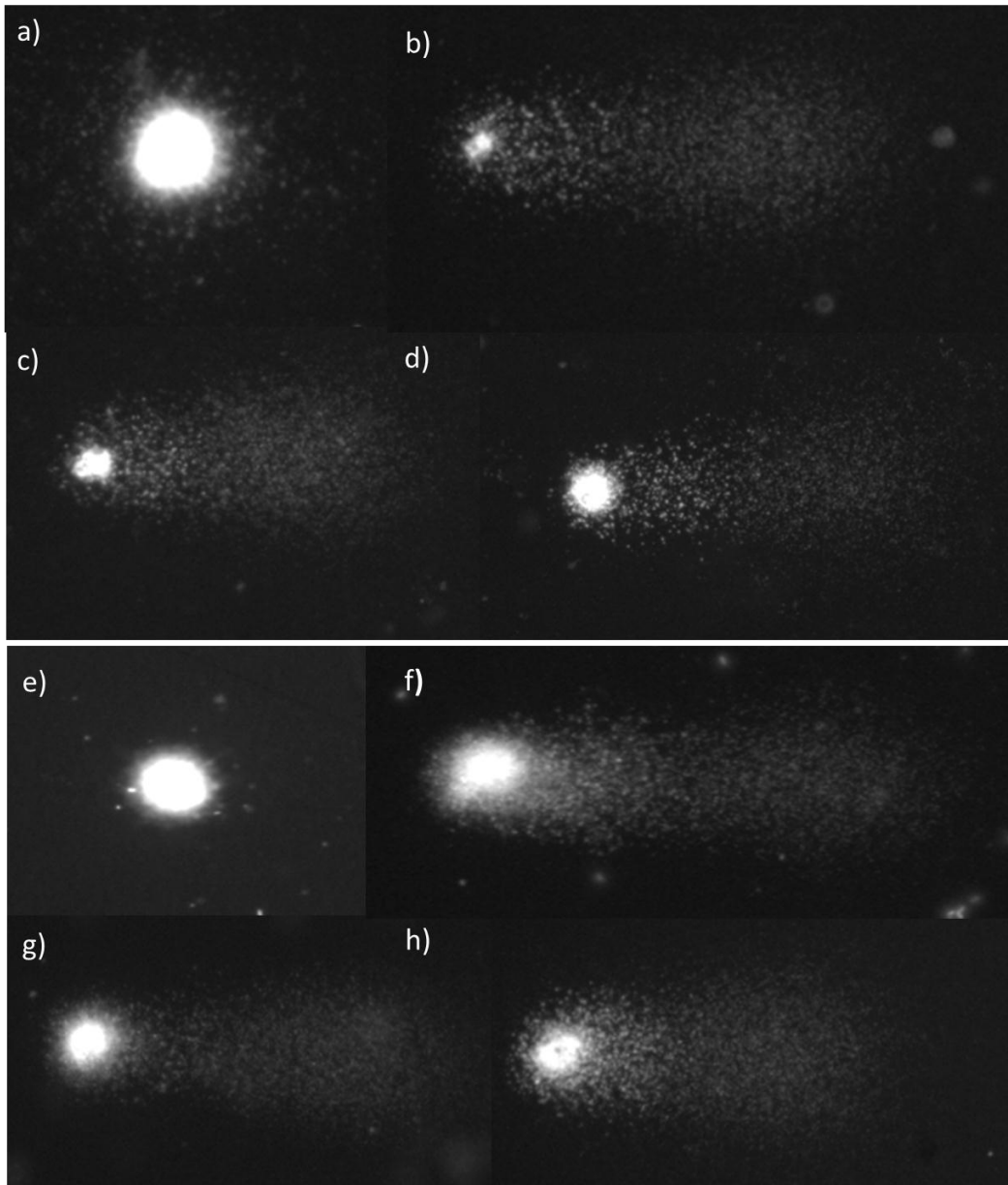


Fig. 7. Cometas en *S. lycopersicum* a) núcleo intacto de testigo negativo, b) núcleo dañado por EMS, c) cometa originado por metamidofos, d) cometa originado por azinfos metílico. Cometas en *C. sativum*, e) núcleo intacto de testigo negativo, f) núcleo dañado por EMS, g) cometa originado por metamidofos, h) originado azinfos metílico. Visto en microscopio óptico a 400 aumentos.

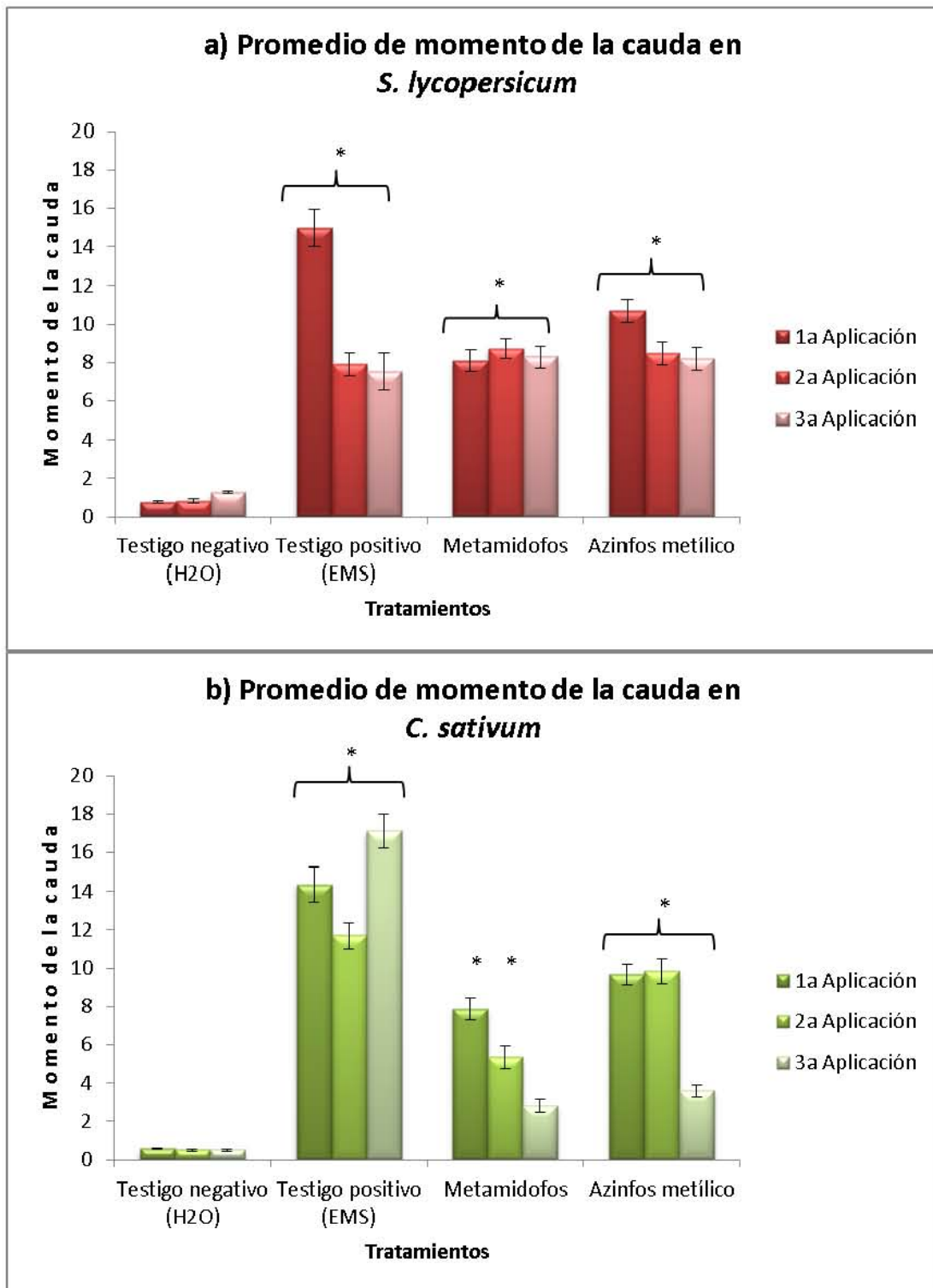


Fig. 8. Promedio del momento de la cauda en el ensayo cometa de las tres aplicaciones en a) *S. lycopersicum* y b) *C. sativum*.

\*Diferencias significativas respecto al testigo negativo.

## Cultivo de linfocitos

### Índice de división nuclear (IDN)

En la prueba de cultivo de linfocitos se observó el IDN que describe el número de veces que en promedio una célula se divide. Éste parámetro evalúa la actividad citostática de los extractos vegetales. Como se observa en la tabla 4 y en la figura 9 los valores de IDN se encuentran entre 1.55 y 1.89, es decir que ocurrió al menos una división nuclear, por lo tanto la mayoría de las células son binucleadas y se encuentran en el rango óptimo según la HUMN project que va de 1.3 a 2.0 (Fenech 2007).

Tabla 4. Índice de división nuclear (IDN) en *S. lycopersicum* y *C. sativum* con los distintos tratamientos.

	<i>S. lycopersicum</i>	<i>C. sativum</i>
Testigo negativo (RPMI 1640)	1.69	1.73
Testigo positivo (MMC)	1.86	1.89
Extractos de plantas tratadas con:		
H <sub>2</sub> O	1.59	1.71
EMS	1.72	1.65
Metamidofos	1.71	1.67
Azinfos metílico	1.74	1.55

Un valor de IDN = 1 indica que ocurrió una división nuclear.

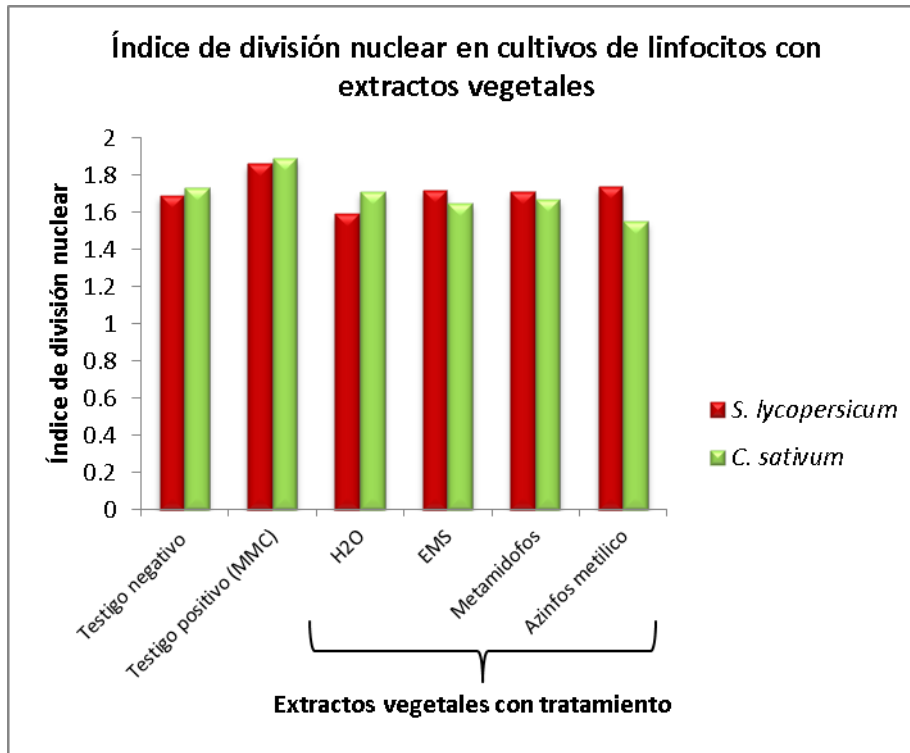


Fig . 9. Histograma del índice de división nuclear en cultivo de linfocitos de sangre periférica incubado con extractos de *S. lycopersicum* y *C. sativum*.

### Células polinucleadas

Para analizar la frecuencia de células polinucleadas en los cultivos, se realizó una prueba de  $\chi^2$  (con  $p < 0.05$  y ajuste de Bonferroni), que muestra si existen diferencias significativas entre los tratamientos y los testigos negativo y positivo (MMC). En los resultados de los cultivos con extracto de *S. lycopersicum* (Tabla 5) se observa que el testigo negativo únicamente tiene diferencia con el testigo positivo como era de esperarse, mientras que el testigo positivo muestra diferencias significativas respecto a todos los tratamientos; por otro lado los extractos de las plantas tratadas con H<sub>2</sub>O muestran diferencias significativas respecto a aquellas tratadas con EMS, metamidofos y azinfos metílico, por su parte EMS no arroja diferencias significativas respecto a metamidofos ni a azinfos metílico, así como estos dos últimos tampoco las muestran entre sí.

En cuanto a *C. sativum* existen diferencias significativas del testigo negativo comparado con MMC, H<sub>2</sub>O, metamidofos y azinfos metílico, pero no con EMS; el testigo positivo (MMC) indica diferencias significativas en relación a todos los tratamientos; los extractos tratados con H<sub>2</sub>O muestran diferencias significativas respecto a los tratados con EMS, mientras que en este se observan diferencias en relación a ambos plaguicidas; metamidofos y azinfos metílico no muestran diferencias entre sí (Tabla 5). En la figura 10 se muestran las fotomicrografías de las células polinucleadas.

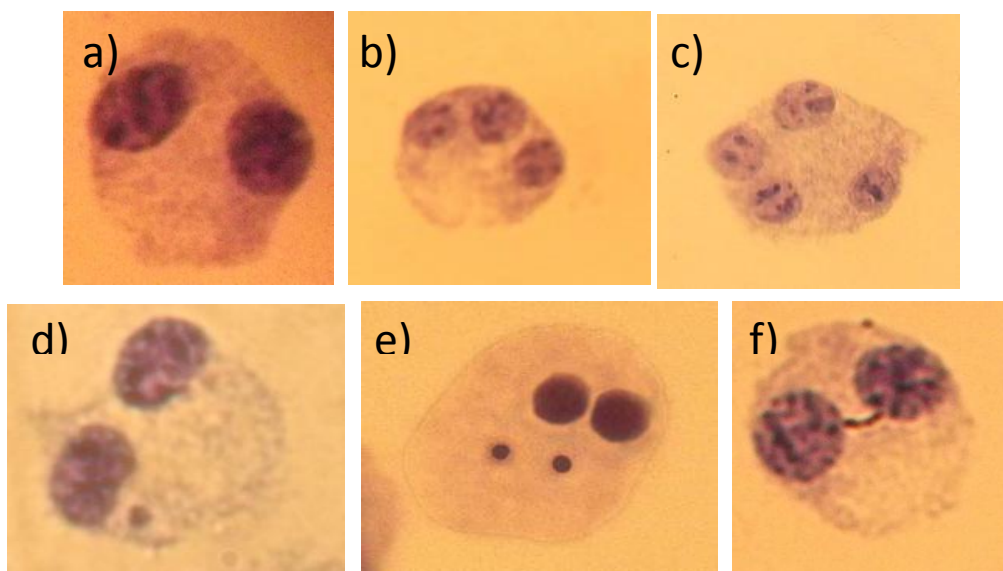


Fig 10. Microfotografía de células polinucleadas en cultivo de linfocitos vistas en microscopio óptico a 400 aumentos. a) célula binucleada b) célula trinucleada d) célula tetranucleada d) célula binucleada con 1 MN e) célula binucleada con 2 MN y f) células binucleadas con puente nucleoplasmático.



Tabla 5. Análisis estadístico de células polinucleadas en A) *S. lycopersicum* y B) *C. sativum* con la prueba de  $\chi^2$  ( $p < 0.005$ ) con ajuste de Bonferroni.

A)		Testigos		Extractos de plantas tratadas con:		
<i>S. lycopersicum</i>		Testigo negativo (RPMI 1640)	Testigo positivo (MMC)	H <sub>2</sub> O	EMS	Metamidofos
Testigos	Testigo positivo (MMC)	1.3x10 <sup>-12</sup> *				
Extractos de plantas tratadas con:	H <sub>2</sub> O	0.64	2.6x10 <sup>-18</sup> *			
	EMS	0.11	4.8x10 <sup>-11</sup> *	6x10 <sup>-4</sup> *		
	Metamidofos	0.31	2x10 <sup>-15</sup> *	2x10 <sup>-3</sup> *	0.61	
	Azinfos metílico	0.11	8.5x10 <sup>-15</sup> *	1x10 <sup>-4</sup> *	0.71	0.89

B)		Testigos		Extractos de plantas tratadas con:		
<i>C. sativum</i>		Testigo negativo (RPMI 1640)	Testigo positivo (MMC)	H <sub>2</sub> O	EMS	Metamidofos
Testigos	Testigo positivo (MMC)	2.2x10 <sup>-12</sup> *				
Extractos de plantas tratadas con:	H <sub>2</sub> O	9x10 <sup>-3</sup> *	4.4x10 <sup>-21</sup> *			
	EMS	0.20	5.5x10 <sup>-14</sup> *	0.05 *		
	Metamidofos	8.8x10 <sup>-5</sup> *	6.6x10 <sup>-17</sup> *	0.40	0.01 *	
	Azinfos metílico	1.26x10 <sup>-6</sup> *	2.4x10 <sup>-18</sup> *	0.23	4.2x10 <sup>-4</sup> *	0.81

\*Diferencias significativas obtenidas entre los tratamientos.

Micronúcleos (MN)

Respecto al promedio de MN se observa que el testigo positivo (MMC) presenta mayor promedio de micronúcleos que el testigo negativo tanto en *S. lycopersicum* como en *C. sativum* (Tabla 6, figura 10 y 11).

Se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ) para ver si existen diferencias significativas entre los tratamientos, el resultado fue positivo y se aplicó el post-hoc U de Mann-Whitney para averiguar que tratamientos presentaban diferencias significativas respecto al testigo negativo hallando que éstas solo se encuentran en el testigo positivo

Tabla 6. Frecuencia de micronúcleos en cultivo de linfocitos incubado con extractos de *S. lycopersicum* y *C. sativum*.

	<i>S. lycopersicum</i>	<i>C. sativum</i>
	$\bar{X} \pm E.E.$	$\bar{X} \pm E.E.$
Testigo negativo (RPMI 1640)	0.001 $\pm$ 0.001	0.002 $\pm$ 0.001
Testigo positivo (MMC)	0.024 $\pm$ 0.006 *	0.022 $\pm$ 0.007 *
Extractos de plantas tratadas con:		
H <sub>2</sub> O	0.001 $\pm$ 0.002	0.002 $\pm$ 0.001
EMS	0.0005 $\pm$ 0.005	0.002 $\pm$ 0.001
Metamidofos	0.003 $\pm$ 0.001	0.005 $\pm$ 0.002
Azinfos metílico	0.004 $\pm$ 0.001	0.004 $\pm$ 0.001

Promedio de 2000 células por tratamiento

\*Diferencias significativas entre el testigo negativo y los tratamientos obtenidas por el estadístico Kruskal-Wallis con una  $p < 0.005$  y la prueba U de Mann-Whitney.

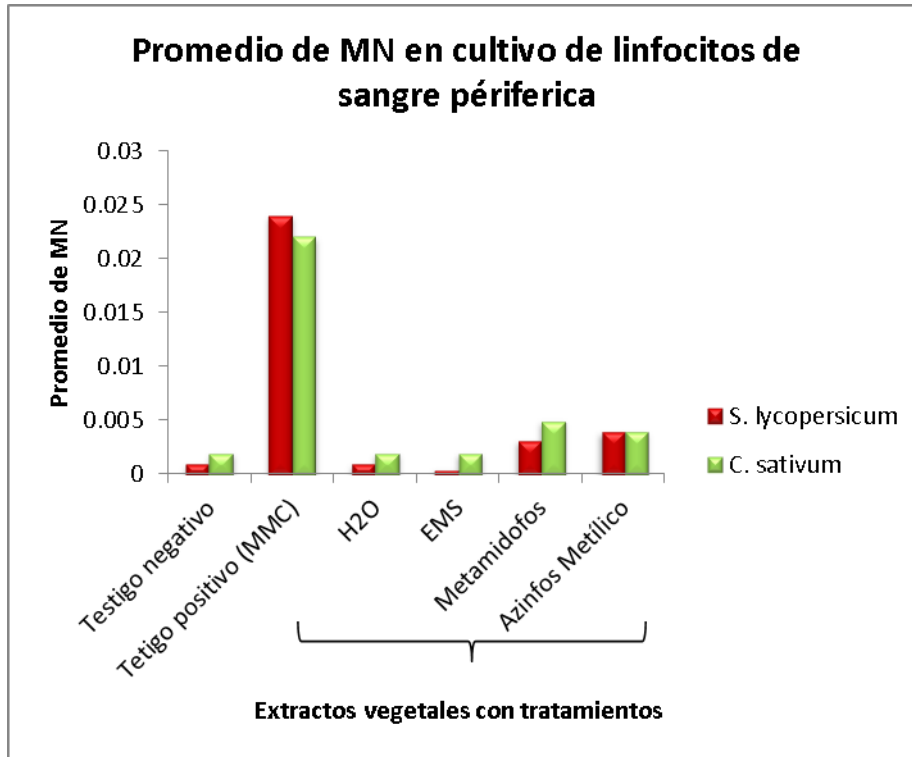


Fig. 11. Promedio de micronúcleos en cultivos de linfocitos con extractos vegetales de *S. lycopersicum* y *C. sativum*.

## VII. DISCUSIÓN

Las hortalizas, al ser el blanco de los agroquímicos para mejorar la producción y disminuir plagas y enfermedades, se encuentran mayormente expuestas a los efectos que éstos pueden causar; sin embargo no implica que sólo éstas sean afectadas, pues se ha documentado que dichos productos son capaces de incorporarse a los tejidos vegetales representando un riesgo para la salud pública, ya que son cultivadas principalmente para consumo humano y existe evidencia de que las plantas a través del metabolismo son capaces de activar algunos compuestos, es decir, pueden contener mutágenos activados con potencial para producir modificaciones al ADN (Sánchez-Estrada, 2013). Por ello es fundamental realizar investigaciones sobre los efectos genotóxicos que estos compuestos producen tanto al ser aplicados directamente en plantas, como los que causan al ser consumidas por animales y seres humanos.

Este trabajo está enfocado particularmente en el daño al ADN que los plaguicidas organofosforados metamidofos y azinfos metílico ocasionan a las hortalizas *S. lycopersicum* y *C. sativum*, así como los metabolitos genotóxicos, derivados de la transformación de dichos compuestos que los extractos de estas plantas puedan contener, pues estos alimentos se incluyen en gran proporción en la alimentación del ser humano, sobre todo el jitomate y cilantro que forman parte de la dieta de consumo frecuente de los mexicanos.

Los plaguicidas organofosforados metamidofos y azinfos metílico al ser derivados del ácido fosfórico presentan dos radicales que usualmente son grupos alquilo, sobre todo etilo o metilo, y tienden a atacar al átomo de carbono del ADN mediante la alquilación (Moutschen-Dahmen *et al.*, 1984). El ensayo cometa demostró que las aplicaciones de estos compuestos en *S. lycopersicum* y *C. sativum* inducen daño en el ADN de dichas plantas, pero al transcurrir la secuencia de aplicaciones el efecto va decreciendo, esto puede deberse a que se están aplicando *in vivo* en plantas completas que activan mecanismos de defensa contra los xenobióticos, tales como las fases del metabolismo vegetal donde ocurre la biotransformación, que si bien es cierto puede activar a los agentes genotóxicos, también puede tener acción antígenotóxica.

Al aplicar estos plaguicidas en *C. sativum* se observa una notable disminución del daño al ADN, lo que sugiere que el cilantro posee algunos factores que le confieren efectos antígenotóxicos contra estos plaguicidas, dichos resultados coinciden con los descritos

por Cortés-Eslava *et al.* (2013) quienes observan que azinfos metílico reduce la viabilidad de células HaCat y produce daño significativo, mientras que metamidofos es menos tóxico; al co-incubar estas células humanas con células de *C. sativum* no solo decrece la toxicidad de los plaguicidas, también promueve la proliferación celular. Asimismo, realizaron cultivos de *S. typhimurium*, en los cuales al aplicar directamente metamidofos y azinfos metílico se observaron efectos citotóxicos, pero en presencia del metabolismo del cilantro esta toxicidad disminuyó, lo que concuerda con lo citado por Díaz-Hernández (2004). Del mismo modo, se han efectuado estudios con los insecticidas organofosforados dimetoato y paratión metílico hallando que al aplicarlos directamente en *S. typhimurium* son tóxicos, pero no presentan efectos mutagénicos, sin embargo, al ser co-incubada con células de *C. sativum* disminuye la toxicidad de ambos pesticidas y se activa la mutagenicidad de éstos (Cortés-Eslava *et al.*, 2001).

De igual manera, se observa que al aplicar los pesticidas organofosforados en *S. lycopersicum*, el daño al ADN se reduce conforme transcurren las aplicaciones, no obstante esta disminución no es tan notoria como en el cilantro. Hasta el momento no se han realizado estudios acerca del potencial antigenotóxico de esta hortaliza. Lubkowitz *et al.* (1975) examinaron el metabolismo de metamidofos aplicado en hojas y frutos de jitomate, hallando que el 75% del pesticida se había metabolizado a los 14 días, pese a que no pudieron encontrar los metabolitos formados, sugieren que la ruta más probable es la desaminación a través de la vía O,S-dimetil fosforotioato.

El ensayo cometa ha sido frecuentemente utilizado para medir daño genotóxico ocasionado por diversos agentes, tanto *in vitro* como *in vivo*. En *Nicotiana tabacum* y *Solanum tuberosum* se ha empleado para cuantificar el daño en el ADN de dichas plantas cultivadas en suelos contaminados con metales pesados tales como cadmio, cobre, plomo y zinc (Gichner, 2006), también se ha utilizado en raíces de *Allium cepa* expuestas al herbicida imaztapir (Liman *et al.* 2015), en *Petunia x hybrida* se utilizó para medir el daño por diferentes dosis de irradiación gamma (Dona *et al.*, 2013).

Los insecticidas metamidofos y azinfos metílico son capaces de generar daño al ADN, al ser asperjadas en *Solanum lycopersicum* y *Coriandrum sativum*, pero al parecer éstas son capaces de activar mecanismos que disminuyen la genotoxicidad de estos agentes, por ejemplo el metabolismo vegetal, a través del cual son conjugados en la tercer fase. Estos conjugados usualmente persisten en la planta por tiempo prolongado y son compartimentalizados en la misma hasta su liberación, donde una posibilidad es

convertirse en activos tras su consumo ya sea por animales o por el hombre (Sandermann, 1988). *C. sativum* muestra un metabolismo más eficaz para biotransformar estos pesticidas y disminuir el daño ocasionado en el ADN puesto que en la tercer aplicación del plaguicidas metamidofos la diferencia deja de ser significativa respecto al testigo negativo (Tabla 3).

Respecto al testigo positivo EMS, en cilantro no se presenta disminución de los niveles de daño genotóxico ocasionado por el compuesto, sin embargo, en jitomate se aprecia una notable reducción. Gichner (2003) realizó estudios para establecer las diferencias a nivel genotóxico entre etil metanosulfonato (EMS), N-etil-N-nitrosoreea (ENU) e hidrazida maleica aplicados en *Nicotiana tabacum* y encontró que dichos compuestos actúan dañando el ADN de las células somáticas de las hojas, quedando detenidas en la etapa G<sub>0</sub> del ciclo celular y que tanto EMS como ENU inducen eventos recombinantes causando mutaciones y aberraciones cromosómicas.

Este tipo de investigaciones son impulsadas sobre todo, por la capacidad que tienen los plaguicidas para inducir mutaciones y con ello ciertas enfermedades, ya sea por acción de estos compuestos directamente o por su transformación mediada por el metabolismo de las plantas.

Azinfos metílico es un agroquímico que ha sido altamente estudiado por su nivel de toxicidad y su potencial mutagénico, el metabolismo de este pesticida en plantas no sucede de forma rápida ya que 28 días después de la aplicación el 73% del compuesto continúa en la superficie de la planta, los metabolitos solubles son translocados. Por el método de cromatografía 2D TLC se encontraron 16 metabolitos de los cuales el principal es la benzacimida (Steffens y Wieneke, 1976).

Diversos estudios demuestran que el pesticida azinfos metílico tiene potencial para dañar o producir resultados adversos en las células de diferentes sistemas. En algunas investigaciones se encontró que es capaz de provocar efectos c-mitóticos en plantas (Grant, 1973), al aplicarlo directamente en cultivos de linfocitos humanos se obtienen resultados negativos en la inducción de ICH, mientras que en meristemos de *Vicia faba* se observaron resultados positivos (Gómez-Arroyo *et al.*, 1988), con activación metabólica de *Nicotiana tabacum* y de *Vicia faba* induce mutaciones reversas en cultivos de *Salmonella typhimurium* (Gómez-Arroyo *et al.*, 2007; Sánchez-Estrada, 2008; Gómez-Arroyo *et al.*,

2015). Estos resultados muestran que dicho pesticida requiere de mecanismos presentes en las plantas durante el metabolismo vegetal, para efectuar una transformación que activa su mutagenicidad.

Bajo las condiciones de este trabajo el índice de división nuclear se encuentra en el rango óptimo en los cultivos de linfocitos tratados con extractos de las plantas, lo cual concuerda con el conteo de células polinucleadas, esto sugiere que no hay efecto citotóxico por los extractos *per se* así como tampoco por los metabolitos contenidos en dichos extractos. Por otro lado, se observa que los extractos de *C. sativum* tratados con los plaguicidas organofosforados inducen un nivel muy bajo de micronúcleos (tabla 6); esto corresponde con los estudios realizados por Díaz-Hernández (2004) que estudió la acción mutagénica de ambos insecticidas por medio del metabolismo vegetal de *C. sativum* en cepas de *S. typhimurium*, concluyendo que aun con el metabolismo vegetal no se activa el efecto mutagénico con ninguno de los dos plaguicidas. Cortés-Eslava *et al.* (2004) mediante el mismo ensayo probó la actividad antimutagénica del cilantro en contra de la actividad mutagénica de las aminas aromáticas.

Actualmente, el ensayo de MN es una prueba muy valiosa a la cual se recurre para identificar el daño en el ADN, su uso como importante biomarcador para el biomonitoreo de agentes genotóxicos en el ambiente detecta los efectos clastogénicos que afectan cromosomas y aneuploidógenos que alteran el huso acromático (Norppa y Falck, 2003).

Los cultivos de linfocitos incubados con extractos de *Solanum lycopersicum* y *Coriandrum sativum* no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo negativo en cuanto a formación de MN, es decir, que no hubo acción genotóxica por parte de los metabolitos secundarios. Una de las razones puede ser que las concentraciones de metabolitos contenidos en los extractos no fueran las suficientes para ejercer daño, sin embargo, es más probable que por las reacciones de conjugación que transforman a los metabolitos en compuestos insolubles en agua, al ser agregados en los cultivos de linfocitos, no pudieran ser liberados para ejercer el efecto genotóxico esperado.

Por otro lado, Karabay y Oguz (2005) reportaron que metamidofos tiene acción mutagénica en *S. typhimurium* tanto por sí solo, como en presencia de la fracción S9, así como la inducción de aberraciones cromosómicas y la formación de MN en médula ósea de ratas, esto concuerda con las investigaciones realizadas por Noriega *et al.* (2005) quienes aplicaron metamidofos en ratones por vía subcutánea, y cuyos resultados indican

que la frecuencia de MN en eritrocitos aumenta proporcionalmente al incremento de la concentración y a la prolongación de la exposición al insecticida. Otros estudios han reportado la formación de MN en células hematopoyéticas de ratón *in vivo* e *in vitro* por acción del pesticida metamidofos así como ICH en células de médula ósea en ratón *in vivo* y cultivos de células del bazo *in vitro* (Amer y Sayed, 1987).

Respecto a azinfos metílico, se ha documentado que al aplicarlo directamente en cultivo de linfocitos tiene efectos citotóxicos, mientras que al incubarlo con fracción S9 (de hígado de rata) o S10 (de *Vicia faba*) disminuye la toxicidad permitiendo la proliferación, sin embargo, es transformado en un compuesto mutagénico, lo que sugiere que el metabolismo tanto animal como vegetal están involucrados en reacciones que inactivan la citotoxicidad de este pesticida, pero activan su mutagenicidad (Herbold, 1986; Cortés-Eslava *et al.*, 2014; Gómez-Arroyo *et al.*, 2015), por otro lado, no se obtienen resultados significativos para la prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) al aplicar este compuestos en cultivos de linfocitos humanos, con una concentración máxima de 30 ppm, pero al mezclarlo con la fracción S10 de *Vicia faba* hay una relación dosis-respuesta para la aparición de ICH (Gómez-Arroyo *et al.*, 1987; Gómez-Arroyo *et al.*, 2015). Bianchi *et al.* (1994) reportaron que no es mutagénico para *Sacharomyces cerevisiae*, pero forma aductos en presencia de S9 (Saha *et al.*, 1997).

Los trabajos sobre activación de genotóxicos y mutágenos por acción del metabolismo vegetal abundan, pero los resultados de estos estudios dependen del tipo de pesticida y de la planta cuyo metabolismo lo modificará.

Sánchez- Estrada (2008) realizó estudios sobre la activación metabólica tanto vegetal como animal de los plaguicidas azinfos metílico y metamidofos en *S. typhimurium* encontrando que el primero tiene efecto mutagénico al ser coincubado con las fracciones metabólicas de *V. faba*, no obstante, en el segundo observó que la actividad mutagénica era baja aun con el metabolismo vegetal. Por otro lado, Flores-Maya *et al.* (2005) llevaron a cabo la activación promutagénica de los herbicidas metribuzina y ametrina también con el metabolismo de *V. faba*, induciendo intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos humanos, y hallando que en el sistema de activación de la planta *in vivo* hay mayor frecuencia de ICH en comparación del sistema *in vitro*.

Los trabajos citados anteriormente corroboran que ambos plaguicidas tienen efecto genotóxico al ser aplicados directamente en los vegetales y en cultivos de linfocitos



humanos, sin embargo, en presencia extractos de ciertas plantas, como en el caso del cilantro y jitomate, la toxicidad disminuye significativamente al estar presente el metabolismo de dichas plantas.

La acción antígenotóxica tanto en cilantro como en jitomate puede deberse al alto contenido de clorofila presente en las hojas de estas plantas. Los pigmentos vegetales como la clorofila se han relacionado directamente con la actividad antimutagénica y antígenotóxica. Nageishi *et al.* (1997) estudiaron el efecto de la clorofila (extraída de espinacas y de clorela) sobre la genotoxicidad de 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) en *Drosophila melanogaster* expresada por manchas en la alas, los resultados mostraron que la genotoxicidad que se inducía al administrar vía oral 4NQO fue suprimida por la administración simultáneamente clorofila. Otros pigmentos vegetales como la purpurina y la alizarina también son capaces de suprimir la actividad genotóxica de compuestos tales como aminas heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos probados en *D. melanogaster* y *S. typhimurium*, inhibiendo la actividad del citocromo P450 (CYP) que participa en el metabolismo de xenobióticos en las plantas y es responsable de la activación de los mutágenos (Tekahashi *et al.*, 2002). Del mismo modo, los compuestos fenólicos constituyen la mayor clase de metabolitos secundarios con potencial bioactivo al cual se le atribuyen propiedades antioxidantes y antibacteriales, siendo los flavonoides el grupo más grande de compuestos fenólicos, se han identificado altas concentraciones de este compuesto en cilantro, y es por esto que se le atribuyen propiedades de oxidoreducción actuando como agente reductor, donador de hidrógenos, extintor de oxígenos libres y quelador de metales (Wong, 2006).

El estudio de los efectos genotóxicos y mutagénicos de los plaguicidas, así como los metabolitos generados y su destino; tanto en plantas como en seres humanos, son de fundamental interés, ya que un gran porcentaje de cultivos agrícolas son tratados con dichos compuestos para evitar pérdidas económicas en el sector agrícola por plagas, para posteriormente ser consumidos por animales y por el hombre. Esto se ha relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades por inducción de daño en el material genético a causa de exposición a estos compuestos o sus metabolitos. Al conocer estos efectos se podría prevenir y tratar los problemas mencionados que afectan la salud pública y disminuyen la calidad de vida.

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados confirman que el ensayo comenta es una prueba muy útil y sumamente sensible para evaluar rompimiento en la cadena de ADN por acción de compuestos genotóxicos como los plaguicidas organofosforados. Asimismo, las plantas de *Solanum lycopersicum* y *Coriandrum sativum* son excelentes sistemas vegetales, útiles para el biomonitoreo *in vivo* de agentes genotóxicos.

Los plaguicidas organofosforados metamidofos y azinfos metílico son genotóxicos al asperjarse de forma directa en *Solanum lycopersicum* y *Coriandrum sativum*, pero al actuar el metabolismo de éstas, disminuye la toxicidad de ambos por las transformaciones ocurridas, se sugiere que los compuestos generados son almacenados en los órganos de la planta hasta ser liberados durante el consumo de ésta. Se cree que el mecanismo a través del cual se realizan estas modificaciones es la conjugación durante la tercera fase, que genera compuestos insolubles en agua, y por ello los metabolitos contenidos en los extractos no pudieron ser liberados para ejercer daño en forma de micronúcleos, pero es necesario continuar con este tipo de investigaciones para comprender las vías que actúan en esta clase de procesos, pues existe evidencia de que estos compuestos son altamente dañinos para los seres vivos.

## IX. LITERATURA CITADA

Albert L.A. (1988) Curso básico de toxicología ambiental. Editorial Limusa, México. pp.311-314.

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

Antonius G.F. y Snyder J.C. (1994) Residues and half-lives of acephate, methamidophos, and pirimiphos-methyl in leaves and fruit of greenhouse grown tomatoes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52:141-148.

Amer S.M. y Sayed M.A. (1987). Cytogenetic effects of the insecticide methamidophos in mouse bone marrow and cultured mouse spleen cells. *Z. Naturforsch. C.* 42:21–30.

Bello G.J. y López de Cerain S.A. (2001) Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Ediciones Díaz de Santos. España.

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

Briggs S.A. y Council C.R. (1992) Basic guide to pesticides. Their characteristics and hazards. Washington: Taylor y Francis publishers.

Buschini A., Carboni P., Furlini M., Poli P. y Rossi C. (2004) Sodium hypochlorite dioxide- and peracetic acid-induced genotoxicity detected by comet assay and *Saccharomyces cerevisiae* d7 test. *Mutagenesis.* 19:157-62.

Cabrera A.V. y Salazar I.E. (2004) Producción de hortalizas de clima cálido. Universidad Nacional de Colombia. Pp. 291-292.

Carstairs K. (1962) The human small lymphocyte – Its possible pluripotential quality. *Lance.* 21:829-832.

Chelala C. (2004) Un reto constante: los plaguicidas y su efecto sobre la salud y el medio ambiente. Organización Panamericana de la Salud OPS Washington, D.C.

Christiani D.C. (1996) Utilization of biomarker data for clinical and environmental intervention. *Environ. Health Perspect.* 104: 921-925.

CICOPLAFEST (1998) Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. SEMARNAP, SECOFI, SAGAR y SSA, México D.F.

CICOPLAFEST (2004) Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. SEMARNAP, SECOFI, SAGAR y SSA, México D.F.

Clayson D.B. y Grant D.L. (1992) The assessment of mutagenicity. Health protection branch mutagenicity guidelines. *Environ. Mol. Mutagen.* 21:15-37.

Collins A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. Principles, application, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26:249-61.

CONAGUA (2010) Estadística agrícola de los distritos de riego. Año agrícola 2008-2009. México D.F

Cortez N.C. (2001) Situación en México de las existencias de plaguicidas sujetos al convenio de Estocolmo. México D.F.

Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini, R. y Espinosa- Aguirre J.J. (2001) Metabolic activation of three arylamines and two organophosphorus insecticides by coriander (*Coriandrum sativum*) a common edible vegetable. *Toxicol. Lett.* 125:39-49.

Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa- Aguirre J.J. (2004) Antimutagenicity of coriander (*Coriandrum sativum*) juice on the mutagenesis produced by plant metabolites of aromatic amines. *Toxicol. Lett.* 153, 283-292.

Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Arenas-Huertero F., Flores-Maya S., Díaz-Hernández M.E., Calderón-Segura M.E., Valencia-Quintana R.J., Espinosa-Aguirre J.J. y Villalobos-Pietrini R. (2013) The role of plant metabolism in the mutagenic and cytotoxic effects of four organophosphorus insecticides in *Salmonella typhimurium* and in human cell lines. *Chemosphere* 92:1117-1125.

Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Teloxa Meneses H.S., Gómez Ramirez B.M. y Villalobos-Pietrini R. (2014) Efecto del insecticida gusación en *Salmonella typhimurium*

cepas TA98 y TA100 transformado por el metabolismo vegetal y animal. Rev. Int. Contam. Ambie. 30:37-44.

Cremllyn R. (1979) Plaguicidas Modernos y su Acción Bioquímica. Limusa, México 356 p.

Dhawan A. y Anderson D. (2009) *The comet assay in toxicology*. Royal Society of Chemistry. Reino Unido. 478 p.

Díaz-Hernández M.E. (2004) Evaluación de la capacidad metabólica del cilantro en la mutagenicidad de los insecticidas organofosforados. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Diederichsen A. (1996) Die biologische Vielfalt des Korianders (*Coriandrum sativum* L.) - Sammlung, Charakterisierung und Evaluierung. PhD thesis.

Dohn D.R. y Krieger R.I. (1981) Oxidative metabolism of foreign compounds by higher plants. Drug Metab. Rev. 12:119-157.

Donà M., Ventura L., Macovei A., Confalonieri M., Savio M., Giovannini A., Carbonera D. y Balestrazzi A. (2013) Gamma irradiation with different dose rates induces different DNA damage responses in *Petunia x hybrida* cells. J Plant Physiol. 15:780-787.

Eastmond D.A. y Tucker I.D. (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. Environ. Mol. Mutagen. 13:34-43.

Egea González F.J., Martínez Vidal J.L., Castro Cano M.L. y Marínez Galera M. (1998) Levels of metamidophos in air and vegetables after greenhouse applications by gas chromatography. J. Chromatogr. 829:251-258.

Estrada M. (1998) Uso moderno de plaguicidas en México. Memorias, Ciclo de Conferencias "Hacia una renovación ambiental en México" Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.

FAO (1986) La alimentación y el medio ambiente. Desarrollo Coop. Alemania Federal 1:18-20

FAO (2007) Producción de tomate bajo condiciones protegidas. Roma. pp 584-587.

Frear D.S., Swanson H.R. y Tanaka F.S. (1969) N-demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas: isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochemistry* 8:2157-2169.

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

Fenech M. (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat. Res.* 600; 81-95.

Fenech M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2:1084-1104.

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

Fenech M., Cahng W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S. y Zeiger E. (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. *Mutat. Res.* 534:65-75.

Fernández A., Mancipe G. y Fernández A. (2010) Intoxicación por organofosforados. *Rev. Fac. Med* 18:84-92.

Flores-Maya S., Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M.E., Villalobos-Pietrini R., Waliszewski S.M. y Gómez de la Cruz L. (2005). Promutagen activation of triazine herbicides metribuzin and ametryn through *Vicia faba* metabolism inducing sister chromatid exchanges in human lymphocytes *in vitro* and in *V. faba* root tip meristems. *Toxicol. In Vitro* 19:243-251.

Gichner T. (2003) Differential genotoxicity of ethyl methanesulphonate, N-ethyl-N-nitrosourea and melaic hydrazide in tobacco seedlings based on data of the comet assay and two recombination assays. *Mutat. Res.* 538:171-179.

Gichner T. (2006) Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65: 420-426.

Gichner T., Lovecka P. y Vrchotova B. (2008) Genomic damage induced in tobacco plants by chlorobenzoic acid-metabolic products of polychlorinated biphenyls. *Mutat. Res.* 657:140-145.

Gil G. y Pla A. (2001) Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 21:245-255.

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., Noriega-Aldana N., Juárez-Rodríguez D. y Villalobos-Pietrini R. (1987) Sister chromatid exchanges induced by the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, phoxim and methyl azinphos in cultured human lymphocytes. *Contam. Ambient.* 3:63-70.

Gómez-Arroyo S., Castillo-Ruiz P., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini, R. (1988) *Vicia faba* sister chromatid exchanges of the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, oxydemeton methyl, azinphos methyl and phoxim. *Cytologia* 53:627-634.

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

Gómez-Arroyo S., Sánchez-Estrada L., Andrade-Morales S., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini R. (2015) Genotoxic effect of azinphos methyl in bacterial and in human lymphocyte cultures after plant activation. *Rev. Int. Contam. Ambient.* (En prensa).

Guerra-Chamon J.C. (1972) Inducción de mutaciones de color de semilla con metanosulfonato de etilo en el frijol. Tesis de Maestría Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Costa Rica.

Grant W.F. (1973) Cytological effects of environmental mutagen-pesticides. *Mutat. Res.* 21:221-222.

Grant W.F. (1982) Cytogenetic Studies of Agricultural Chemicals in Plants. Plenum Press. New York. pp 353-378.

Grant W.F. y Salamone M.F. (1994) Comparative mutagenicity of chemical selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plants system for the detection of environmental mutagens. Mutat. Res. 310:187-209.

Harten A.M (1974) Coriander: The history of an old crop, Landbouwk. Tijdschr. 86:58-64.

Havel L. y Durzan D.J. (1996) Apoptosis in plants. Biot. Acta 109:1-10.

Heddle J.A. (1973) A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutat.Res.18:187-190.

Herbold B. (1986) Azinphos-methyl; cytogenetic study with human lymphocyte culture in vitro to evaluate for harmful effect to on chromosomes. Reporte No. 94575. Bayer. A.G.

Hernández G.M., Jiménez G.C., Jimenez A.F. y Arceo G.M. (2007) Caracterización de las intoxicaciones agudas por plaguicidas: perfil ocupacional y conductas de uso de agroquímicos en una zona agrícola del Estado de México, México. Rev. Int. Contam. Ambient. 23:159-167.

Higashi K. (1985) Microsomal cytochrome P-450 in higher plants. In: P-450 and Chemical Carcinogenesis. Grann Monographs on Cancer Res. 30:49-66.

Higashi K. (1988) Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. Mutat. Res. 197:273-288.

Higashi K., Nakashima K., Karasaki Y., Fukunaga M. y Mizugachi Y. (1981) Activation of benzo(a)pyrene by microsomes of higher plants tissues and their mutagenicity. Biochem. Int. 2:373-380.

Hock E. y Elstner E. (2005) Plant toxicology. Cuarta edición. Editorial Taylor y Francis Group. pp. 471.

Jamil K., Shaik A.P., Mahboob M. y Krishna D. (2004) Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chlorpyriphos, dimethoate, and endosulfan) on human lymphocytes *in vitro*. Drug Chem. Toxicol. 27:133-44.



Karabay N.U. y Oguz M.G. (2005) Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and metamidophos. *Genet. Mol. Res.* 4: 653:662.

Katzung B.G. (1994) *Farmacología básica y clínica. El manual moderno.* México D.F. 1260 p.

Kihlman B.A. (1956) Factors affecting the production of chromosome aberrations by chemicals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 25:543-555.

Kolano B., Wolny E. y Maluszynska J. (2003) Fluorescent *in situ* hybridisation in plant. *Mutagenesis* 19:269-276.

Kumaravel T., Vilhar B., Faux S. y Jha A. (2009) Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol. Toxicol.* 25: 53-64.

l'Agglomération de la Région de Compiègne (2010) <http://www.agglo-compiegne.fr/> Fecha de consulta 6 de Marzo 2015.

Lamoureux G.L. y Frear D. S. (1979) Pesticide metabolism in higher plants: *in vitro* enzyme studies. En: *Xenobiotic Metabolism: In Vitro Methods.* Amer. Chem. Soc. 97:77-128.

Lamoureux G.L. y Rusness D.G. (1987) EPTC metabolism corn, cotton and soybean: identification of a novel metabolic derived from metabolism of a glutathione conjugate. *J. Agric. Food Chem.* 35:1-7.

Li Z.S., Zhen R.G, y Rea P.A. (1995) I-Choro-2,4-dinitroenzene-elicited increase in vacuolar glutathione-S-conjugate transport activity. *Plant Physiol.* 109:177-185.

Liman R., Ciğerci İ.H. y Öztürk N.S. (2015) Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. *Pestic Biochem Physiol.* 118:38.42

Loprieno N. y Adler I.D. (1980) Cooperative programme of the EEC on shorth term assay for mutagenicity. En: *Molecular and Cellular Aspects of Carcinogen Screening Test.* Montesano R., Bartsch H. y Tomatis L. (Eds.) IARC Publ. No 27 Lyon, pp. 331-341.

Maluszynska J. y Juchimiuk J. (2005) Plant genotoxicity: A molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Arh Hig. Rada Toksikol.* 56:177-184.

Menn J.J. (1978) Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. *Environ. Health Perspect.* 27:113-124.

Michaelson M.J., Price H.J., Ellison J.R. y Johnston J.S. (1991) Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. *Amer. J. Bot.* 78:83–188.

Morell E.I. (1998) *Plaguicidas: Aspectos Ambientales, Analíticos y Toxicológicos.* Universitat Jaume I. Universitat Jaume I. Castelló D'Impressió. S.L. p. 275.

Moretto A. (1998) Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agents. *Toxicol. Lett.* 28:509-513.

Moutschen–Dahmen J., Moutschen–Dahmen H. y Degraeve N. (1984) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of insecticides. En: *Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of industrial pollutants* (Kirsch–Volders M., Ed.). Plenum Press. Nueva York. pp. 127–203.

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

Nageishi T., Rai H. y Hayatsu H. (1997) Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutation Res.* 376:97–100.

Noriega O.B., Aldana E.A., Chávez F.M., Cervantes M.E., Ojeda F.L. y Quevedo L.I. (2005) Valoración de genotoxicidad con determinación de MN en ratones expuestos a metamidofos. *Boletín Medico. Fac. Med. Universidad Autónoma de Sinaloa.* 1:13-17.

Norppa H. y Falck G.C. (2003) What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18: 221-233.

Nowell P.C. (1960) Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20:462-466.

Nuño R.M. (2007) *Manual de producción de tomate rojo bajo condiciones de invernadero para el valle de Mexicali.* Baja California. pp. 18-23.

OMS (1990) Plaguicidas. Informe técnico No. 12 Organización Mundial de la Salud. Ginebra. Suiza.

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

Östling O. y Johanson K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123:291-298.

Panagiotis E.A., Christos P., Nikolaos V.K. y Thanos A. (2005) Degradation of methamidophos on soultanina grapes on the vines and during refrigerated storage. *Food Chem.* 91:235-240.

Páldy A., Puskás N., Vincze K. y Hadházi M. (1987) Cytogenetic studies on rural population exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 187:127-132.

Pflugmacher S. y Sandermann H. (1998) Taxonomic distribution of plants glucosyltransferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 49:507-511.

Plewa M.J. (1978) Activation of chemical into mutagen by green plants. A preliminary discussion. *Environ. Health Perspect.* 27:45-50.

Plewa M.J. y Gentile J.M. (1982) The activación of chemicals into mutagens by green plants. En: De Serres F.J. y Hollaender A. (Eds.). *Chemical Mutagens.Principles and Methods for their Detection.* Plenum Press. Nueva York. Vol 7, pp. 401-423.

Plewa M.J. y Gentile J.M. (1986) Mutagenicity of atrazine: a maize microbe bioassay. *Mutat Res.* 38:287-292

Plewa M.J. y Wagner E.D. (1993) Activation of promutagens by green plants. *Annu. Rev. Genet.* 27:93-113.

Plewa M.J., Wagner E.D., Gentile G.J. y Gentile J.M. (1984) An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutat. Res.*136:233-245.

Plewa M.J, Wagner E.D y Gentile J.M. (1988). The plant cell/microbe coincubation assay for the analysis of plant-activated promutagens. *Mutat. Res.*197: 207-219.

Plewa M.J., Smith S.R. y Gentile J.M. (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagen by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutat. Res.* 247:57-64.

Prieto A., Molero D., Gonzáles G., Buscema L., Eltiene G. y Medina D., (2002) Persistent of methamidophos, diazinon and malathion in tomatoes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69:479-485.

SAGARPA. (2012) SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasica.gob.mx/?id=1051> Fecha de consulta 21 de octubre de 2014.

Saha R.G., Lagueux J., Kapur S., Levallois P., Ayotte P., Tremblau M., Zee J. y Poirier G.G. (1997) Determination of genotoxicity of the metabolites of the pesticide guthion, sencor, Iorox, reglone, dactanol, and admire by 32P-postlabeling. *Mol. Cell. Biochem.* 169:177-184.

Sánchez-Estrada L. (2008) Mutagenicidad inducida en *Salmonella typhimurium* por los insecticidas organofosforados gusatión y metamidofos activados por la fracción S10 de *Vicia faba*. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Sánchez-Estrada L. (2013) Genotoxicidad de insecticidas organofosforados a través de la determinación de aductos en el ADN como biomarcadores de exposición. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F.

Sandberg A.A. Ed. (1982) Sister chromatid exchange. Alan R. Liss Inc. Nueva York. 706 p.

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

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

Schmid W. (1975) The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31:9-15.

Schröder P. y Collins C. (2002) Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *Inter. J. Phytorem.* 4:247-265.

Scott B.R., Sparrow A.H., Schwemmer S.S y Schairer L.A. (1978) Plant metabolic activation of 1,2-dibromoethane (DBE) to a mutagen of greater potency. *Mutat. Res.* 49:203-212.

Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos (1987) Estimación de Rendimientos de jitomate, Pags. 40.

Shimabukuro R.H., Lamoureux G.L. y Frear D.S. (1981) Pesticides metabolism in plants: principles and mechanisms. En: *Biological Degradation of Pesticides.* (Eds) Matsumura F. Plenum Press. Nueva York. pp. 123-145.

Shimabukuro R.H., Lamoureux G.L. y Frear D.S. (1982) Pesticides metabolism in plants: principles and mechanisms. En: *Biodegradation of Pesticides.* Eds.: Matsumura F. y Murti C.R.K. Plenum Press. Nueva York. pp. 21-66.

Shiraishi Y. y Sandrbeg A.A. (1982) Effect of cell fusion on mitomicyn C induced SCE levels. *Cytobios* 33:197-202.

Silbergeld E.K. y Davis D.L. (1994) Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clin. Chem.* 40:1363–1367.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. y Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184- 191.

Sunjog K., Kolarević S., Héberger, K., Gačić Z., Knežević-Vukčević J., Vuković-Gačić B. y Lenhardt M. (2013) Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking differences. *Anal. Bioanal. Chem.* 14:4879-4885.

Takehisa S. y Kanaya N. (1983) A comparison of *Vicia faba*-roots S10 and rat liver S9 activation of ethanol, maleic hydrazide and cyclophosphamide as measured by sister chromatid exchange induction in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 124:145-151

Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. (1982) Induction of SCEs in CHO cells by extracts from *Vicia faba* roots exposed to ethanol. *Mutat. Res.* 105:169-174.

Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. (1988) Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on the induction of sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 197:195-205.

Tekahashi E., Fujitab K., Kamataki T., Arimoto-Kobayashi S., Okamoto K. y Negishi T. (2002) Inhibition of human cytochrome P450 1B1, 1A1 and 1A2 by antigenotoxic compounds, purpurin and alizarin. *Mutat Res.* 508: 147-156.

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

Van Kooij R.J, De Boer .P, De Vreeden-Elbertse J.M., Ganga N.A., Singh N. y Te Velde E.R. (2004) The neutral comet assay detects strand DNA damage in selected and unselected human spermatozoa of normospermic donors. *Int. J. Androl.* 27:140-6.

Ware G. y Whitacre D. (2004) *The pesticide Book*. 6<sup>a</sup> ed. Ohio MeisterPro Information Resources pp. 128.138.

Wong P.Y.Y. (2006) Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chem.* 97:505-515.

Yamasaki I. (1974) Peroxidase. En: *Molecular Mechanism of Oxygen Activation*. Ed.: Hayaish O. Academic Press. Nueva York. Pp. 5335-5558.