

00381 5  
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION DEL EFECTO GENOTOXICO  
PROVOCADO POR LOS HERBICIDAS  
TIOCARBAMICOS MOLINATE Y BUTILATE EN DOS  
SISTEMAS DE PRUEBA CON LA PARTICIPACION  
DEL METABOLISMO VEGETAL

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

P R E S E N T A :

**M. EN C. MARIA ELENA CALDERON SEGURA**



DIRECTORA DE TESIS: DRA. SANDRA GOMEZ ARROYO  
LABORATORIO DE CITOGENETICA AMBIENTAL,  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMOSFERA, UNAM

1999

269709

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

# INDICE

	Pág
<b>ABSTRACT</b>	1
<b>RESUMEN</b>	4
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	7
1. Toxicidad de los herbicidas tiocarbámicos	9
1.1. En plantas	10
1.2. En animales	10
2. Estudios sobre efectos mutagénicos y/o carcinogénicos de los herbicidas tiocarbámicos	11
3. Metabolismo de los tiocarbámicos	12
3.1. En plantas	12
3.1.1. Reacciones de oxidación o de Fase I	13
3.1.2. N-desalquilación	14
3.1.3. Formación de sulfonas	14
3.1.4. Reacciones de conjugación o de Fase II	14
3.1.5. Reacciones terciarias o de Fase III	15
3.2. En animales	16
4. Sistemas de prueba	17
4.1. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)	18
4.2. Cinética de proliferación celular e índice mitótico	19
5. Mutágenos directos e indirectos o promutágenos	22
<b>II. OBJETIVOS</b>	25
<b>III. HIPÓTESIS</b>	26
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	27
1. Propiedades fisicoquímicas del butilate y molinate	27
2. Tratamientos directos con butilate, molinate y etanol a los cultivos de linfocitos humanos	27
2.1. Cosecha de linfocitos humanos	28
2.2. Tinción diferencial de las cromátidas hermanas	28
3. Activación metabólica <i>in vivo</i>	29
3.1. Preparación de los extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con butilate, molinate y etanol y su aplicación a los cultivos de linfocitos humanos	29
4. Activación metabólica <i>in vitro</i>	30
4.1. Obtención de la fracción enzimática S10 de la raíz de <i>Vicia faba</i>	30
4.2. Mezcla enzimática S10	31
4.2.1. Coincubación de las diferentes concentraciones de butilate, molinate y de etanol con los cultivos de linfocitos humanos	31
4.2.2. Coincubación de las diferentes concentraciones de butilate, molinate y de etanol con los cultivos de linfocitos humanos y la mezcla S10	31
5. Evaluación de la cinética de proliferación celular y del índice mitótico	32

6	Análisis citogenético de los dos herbicidas sobre el DNA de las células meristemáticas de <i>Vicia faba</i>	33
6.1.	Tratamientos directos con butilate y molinate en las raíces de <i>Vicia faba</i>	33
7	Análisis estadístico	34
8	Determinación de proteínas totales por el método de Biorad	35
8.1.	Extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con butilate, molinate y etanol aplicados a los cultivos de linfocitos humanos	35
8.2	Mezcla S10, sistema de activación metabólica <i>in vitro</i>	35
8.3.	Determinación del pH a los cultivos de linfocitos humanos en los sistemas de activación metabólica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	36
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b>	37
1.	Tratamientos directos con butilate, molinate y etanol a los cultivos de linfocitos humanos	37
2.	Activación metabólica <i>in vivo</i>	37
2.1.	Aplicación de los extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con las diferentes concentraciones de butilate, molinate y etanol a los cultivos de linfocitos humanos	37
3.	Activación metabólica <i>in vitro</i>	38
3.1	Coincubación de las diferentes concentraciones de butilate, molinate y de etanol con los cultivos de linfocitos humanos	38
3.2	Coincubación de la mezcla microsómica S10 de las raíces de <i>Vicia faba</i> con las diferentes concentraciones de butilate, molinate y de etanol y los cultivos de linfocitos humanos	38
4.	Evaluación de la cinética de proliferación celular y del índice mitótico	38
5.	Análisis citogenético del butilate y molinate sobre el DNA de las células meristemáticas de <i>Vicia faba</i>	40
6.	Análisis estadístico	40
7.	Determinación de proteínas totales por el método de Biorad	40
7.1	Activación metabólica <i>in vivo</i>	41
7.1.1.	Extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con butilate, molinate y etanol aplicados a los cultivos de linfocitos humanos	41
7.2	Activación metabólica <i>in vitro</i>	41
8	Determinación del pH a los cultivos de linfocitos humanos	41
8.1.	Activación metabólica <i>in vivo</i>	41
8.2.	Activación metabólica <i>in vitro</i>	42
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	43
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	53
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	55
<b>IX.</b>	<b>TABLAS</b>	69
<b>X.</b>	<b>FIGURAS</b>	85

*DEDICO ESTE TRABAJO A*

*MI HIJA **ITZEL**  
POR SER TODO EN MI VIDA*

*A MIS PADRES*

*Hermila Segura de Calderón y Miguel Calderón Méndez con todo mi amor y por ser lo más valioso de mi vida, por su gran apoyo para lograr esta meta.*

*Con gran cariño a mis hermanos y sobrinos*

*Con mucho cariño para mi amigo Marco Antonio*

*A Pietro Villalobos Peñalosa por su ayuda invaluable en la elaboración de la tesis*

*A la M. en C. Martha Patricia Cerón por su participación y asesoría técnica en las determinaciones de proteínas*

*A Emma Gutiérrez Mendoza y Catalina Silva por su ayuda incondicional*

*A la Dra. Bettina Sommer-Cervantes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias S. S. A. por la revisión del resumen en inglés de la tesis doctoral.*

## *Agradecimientos:*

*Con profundo cariño y respeto a la Dra. Sandra Gómez Arroyo, por brindarme su apoyo, formarme en esta área de investigación y por la dirección de esta tesis.*

*Asimismo, al Dr. Rafael Villalobos Pietrini por contribuir en mi formación y superación académica en el área de citogenética.*

*Al Centro de Ciencias de la Atmósfera por permitirme realizar mis estudios de posgrado y por el apoyo para la obtención de las becas.*

*Especialmente a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por las becas otorgadas durante mis estudios de maestría y doctorado.*

*Al Programa-PADEP(003353)-Tesis Doctorales por el soporte económico para la realización del proyecto de tesis doctoral*

*Gracias a los integrantes del Jurado:*

*Dra. Judith Guzmán Rincón  
Dra. Patricia Ostrosky Shejet  
Dra. Rosario Rodríguez Arnáiz  
Dr. Luis Felipe Jiménez García  
Dr. Emilio Rojas Del Castillo  
Dr. Rafael Villalobos Pietrini*

*Por su valiosa revisión al trabajo de tesis*



## ABSTRACT

Several chemicals are not mutagens by themselves but they need plant or animal metabolism to induce damage to DNA, meaning a promutagen is transformed in mutagen through metabolic activation. Butylate and molinate are thiocarbamic herbicides widely used in Mexican agriculture, however there are few evaluation of their genotoxic potencial

Taken in account that human and animal health risk to pesticides could be direct or indirect, in this work it was analyzed the influence of *Vicia faba* metabolism to biotransform the thiocarbamic herbicides molinate and butylate through the damage produced to the same plant using SCE analysis and *in vivo* activation. The roots were exposed to the herbicides and its extracts were applied to human lymphocyte culture. The activation systems containing the enzymatic S10 fraction of the plant roots *in vitro* were also added to human lymphocyte cultures in several concentrations of both herbicides in order to evaluate the cytogenetic effects by scoring the SCE.

In this work the results obtained with molinate and butylate treatments in *Vicia faba* root tip meristems, showed that both herbicides produced significant increase of SCE from the control employing the Newman-Keuls multiple comparisons test ( $p < 0.001$ ) and a concentration-response relationship was observed. Metaphase cells were not found in 100 ppm of molinate and 300 ppm of butylate. This herbicide produced SCE and was less toxic than molinate.

The direct treatments with both herbicides showed that they are not direct mutagens in cultured human lymphocytes. However both were cytotoxic since 300 ppm produced cell death. When the extracts of the roots treated for 4 h with molinate and butylate were applied to lymphocyte cultures a positive response was obtained. The SCE frequencies increased significantly from 100 to 300 ppm of molinate, but with 400 ppm decreased to control values. Meanwhile butylate increased SCE in a concentration-response relationship, it was not phytotoxic for the roots but the extracts were cytotoxic for lymphocytes producing cell death at 500 ppm.

The *in vitro* assays with and without S10 *Vicia* metabolic fraction in which molinate and butylate was added at 48 h lymphocyte cultures for 4 h treatment alone or in combination with the S10 mixture, showed negative response when both herbicides were applied directly, cellular death was produced by 300 ppm molinate and 200 ppm butylate. However in the treatments where the

S10 metabolic fraction was added the frequencies of SCE obtained were significantly higher than those the control in the Newman-Keuls multiple comparison test ( $p < 0.001$ ) and a concentration-response relationship were not observed with molinate. At 50 ppm significant differences of SCE appeared, it was asymptotic up to 200 ppm and decreased to control values when 300 ppm were applied. The herbicide did not affected the lymphocytes because no mitotic inhibition occurred with direct treatments, 300 ppm induced cell death, meanwhile when S10 mix was added cell death did not appear. With butylate the SCE frequencies also increased with 50 ppm and a concentration-response-relationship was noted. The same detoxification behaviour was observed, when the herbicide was applied without S10 mix cellular death was provoked at 200 ppm, meanwhile with S10 mix this phenomenon was induced at 300 ppm.

Comparing both plant activation systems, *in vivo* SCE frequencies were higher than *in vitro*.

This show that both herbicides need the *Vicia faba* metabolism to produce damage to the DNA, meaning that the enzymatic system of the broad bean root can biotransforme both herbicides to mutagenic metabolites or produce highly reactives to DNA. Possibly molinate and butylate sulfoxide are involved in the genetic damage to the lymphocytes in culture, due to these metabolites that are the active forms of these herbicides behave as alkylant agents, thus are the potential candidates to interact with DNA.

To be certain about the metabolic capacity of the *Vicia faba* roots *in vivo* as well as *in vitro*, ethanol was used as positive control. It showed to be a promutagen activated by the broad bean in both systems doubling the SCE values in the lymphocytes obtained by direct treatments.

The protein concentration used in the S10 mix was constant (*in vitro* activation) besides when the extracts obtained of roots treated with both herbicides and the positive control were applied to lymphocyte culture the protein concentrations were not different from the negative control with the exception of the highest concentration of molinate that produced a decrease in protein synthesis.

The mitotic (M1) and replication (R1) indexes of human lymphocyte cultures (HLC) were determined through the evaluation of the effects of the tiocarbamic herbicides butylate and molinate with and without metabolic activation by *Vicia faba in vivo* and *in vitro*. Direct treatment with butylate and molinate on HLC for 48 hours delayed cell cycle and increased the frequency of M1 cells, higher concentrations produced cell death. M1 decreased to control values

in concentration related manner. When the roots extracts (*in vivo* activation) treated with butylate were added to HLC for 48 h cell cycle was stimulated, and RI was not modified, while MI decreased to control values. Molinate showed an opposite effect of on cell cycle, MI and RI decreased and 400 ppm had no affect on the these parameters.

Both herbicides applied directly to HLC for 4 hours stimulated cell cycle, increased the frequency of M3 cells and produced cell death at higher concentrations. RI were not affected by any of the pesticides, but MI was diminished to control values by molinate. The butylate with *in vitro* activation showed similar effects for MI, RI, except for molinate had not action on the MI and RI.

On the other hand, RI and MI were not affected by ethanol with and without metabolic activation *in vivo* and *in vitro*, but had a positive response *in vitro* assays, stimulating cell cycle and increasing M3 cells frequency. The *Vicia faba* extracts alone and S10 mixture had not affected RI and MI.

The tiocarbamic herbicides butylate and molinate with and without plant activation *in vivo* by *Vicia faba* roots showed altered MI and RI. The results suggested that RI and MI measurements are useful to screen potential toxic activity of pesticides.

## RESUMEN

Algunos agentes químicos actúan directamente sobre el DNA, mientras tanto que otros requieren del metabolismo animal o vegetal para producir daño, los cuales son denominados promutagénos.

El butilate y molinate son herbicidas tiocarbámicos ampliamente utilizados en la agricultura mexicana, sin embargo, son pocos los estudios realizados a nivel genotóxico.

Tomando en cuenta el riesgo que representan los pesticidas para la salud animal y humana ya sea directa o indirectamente, en este trabajo se investigó el papel del metabolismo de *Vicia faba* para biotransformar al butilate y al molinate y el daño producido en la planta misma a través del análisis de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), utilizando como sistema de activación *in vivo* a las raíces, las cuales se expusieron a los dos herbicidas y sus extractos fueron aplicados a cultivos de linfocitos humanos. El sistema de activación *in vitro* consistió en la fracción microsómica S10 de las raíces, coincubando las diferentes concentraciones con los mismos pesticidas para determinar su efecto mediante la misma prueba citogenética.

En este trabajo se evidencia que los tratamientos con el butilate y el molinate en los meristemas apicales de la raíz de *Vicia faba*, con ambos herbicidas incrementan significativamente el ICH, al aplicar la prueba de comparación múltiple Neuman-Keuls con respecto al testigo y se observó una relación concentración-respuesta. Con 100 ppm de molinate y 300 ppm de butilate no se encontraron metafases, por lo tanto este último es menos tóxico que el molinate.

Los resultados obtenidos con los tratamientos directos con ambos herbicidas en los cultivos de linfocitos humanos demostraron que no son mutágenos directos. Sin embargo a 300 ppm, ambos fueron citotóxicos ya que inhibieron la mitosis y produjeron muerte celular. Cuando se aplicaron los extractos de las raíces tratadas con el molinate y el butilate a los cultivos de linfocitos humanos (CLH) por 48 h se obtuvo respuesta positiva. Las frecuencias de ICH aumentaron significativamente en relación directa a la concentración, de 100 ppm a 300 ppm de molinate, pero con 400 ppm disminuyó al valor testigo y fueron fitotóxicos para las raíces del haba, mientras que con el butilate se notó una relación concentración-respuesta, con 500 ppm se provocaron efectos tóxicos para los linfocitos ya que inhibieron la mitosis hasta producir muerte celular y no hubo fitotoxicidad.

Cuando fueron adicionados el molinate y el butilate por 4 h a los cultivos de linfocitos humanos de 48 h (sistema de activación *in vitro*, sin la fracción metabólica S10 de *Vicia faba*) mostraron respuesta negativa. Con 300 ppm de molinate y 200 ppm de butilate se indujo la muerte celular. Sin embargo, cuando se agregó la fracción S10, ambos herbicidas aumentaron significativamente el ICH con relación al testigo, lo que se evidenció al aplicar la prueba de Neuman-Keuls ( $P < 0.001$ ). A partir de 50 ppm de butilate se notó un claro comportamiento de concentración-respuesta y con 200 ppm produjo muerte celular, mientras que con el molinate esta respuesta fue asintótica con 100 y 200 ppm, con 300 ppm de molinate disminuyó al valor testigo y no afectó a los linfocitos ya que no ocurrió inhibición de la mitosis, mientras que en forma directa causó la muerte celular.

Al comparar ambos sistemas de activación vegetal, la frecuencia de ICH fue mayor *in vivo*, que en *in vitro*.

Esto demuestra que ambos herbicidas requieren del metabolismo de *Vicia faba* para producir daño en el DNA, lo que significa que el sistema enzimático de la raíz del haba puede transformar a los dos herbicidas a productos metabólicos altamente reactivos al DNA. Posiblemente los sulfóxidos de molinate y de butilate estén implicados en el daño genético provocado en los linfocitos humanos en cultivo ya que estos tienen acción alquilante y son las formas activas de estos herbicidas, por lo tanto, son candidatos para interactuar potencialmente con el DNA.

Para tener la certeza de la capacidad metabólica de *Vicia faba* tanto *in vivo* como *in vitro*, se empleó al etanol como testigo positivo que mostró ser un promutágeno del haba en ambos sistemas, al duplicar el valor del ICH de los linfocitos

El contenido de proteínas en los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con molinate, butilate y etanol fueron semejantes al del testigo ( $4.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), excepto con el molinate ya que a concentraciones elevadas disminuyeron la síntesis de proteínas. En el sistema de activación *in vitro* la concentración de proteínas usada fue constante de  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$

Los índices mitótico (IM) y de replicación (IR) en linfocitos humanos en cultivo (LHC) fueron determinados para evaluar los efectos de los herbicidas tiocarbámicos, butilate y molinate, con y sin activación metabólica por la raíz de *Vicia faba in vivo e in vitro*. En los tratamientos directos por 48 h a los CLH, el butilate y el molinate retrasaron el ciclo celular e incrementaron la

frecuencia de M1 y a concentraciones elevadas causaron la muerte celular. El IM disminuyó conforme aumentó la concentración. Cuando se agregaron los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con el butilate (sistema de activación *in vivo*) a los CLH por 48 h, al comparar con el testigo se notó que el ciclo celular fue estimulado y el IR no fue alterado, pero el IM descendió en relación a la concentración. El efecto fue inverso sobre el ciclo celular con los extractos del molinate, el IM e IR se redujeron y a partir de 400 ppm no se mostró efecto sobre éstos parámetros.

Ambos herbicidas aplicados directamente por 4 h a los CLH estimularon el ciclo celular, incrementaron la frecuencia de células M3 y ocasionaron muerte celular a concentraciones elevadas. El IR no fue modificado por los dos plaguicidas, excepto que con el molinate bajó el IM. En presencia del sistema de activación metabólica *in vitro*, el butilate tuvo el mismo efecto sobre el ciclo celular, el IM y el IR. Con el molinate no se afectaron éstos parámetros y no tuvo acción sobre el ciclo celular.

Por otra parte, el etanol aplicado sin y con activación metabólica *in vivo* e *in vitro* no tuvo efecto sobre los tres criterios de evaluación, excepto que estimuló la cinética de proliferación celular (CPC) y aumentó la frecuencia de células M3 en el ensayo *in vitro*.

La fracción enzimática y la mezcla S10 utilizadas en los sistemas de activación metabólica *in vivo* e *in vitro* no mostraron efecto sobre la CPC, el IM y el IR.

Los resultados de los herbicidas tiocarbámicos butilate y molinate sin y con la activación metabólica por las raíces de *Vicia faba in vivo* evidenciaron su acción tóxica sobre la proliferación y el índice mitótico de los linfocitos humanos en cultivo.

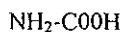
## I. INTRODUCCIÓN

La economía agrícola depende de la intensa aplicación de compuestos químicos sintéticos *con propiedades plaguicidas*, sin embargo, su uso ha traído graves consecuencias en la contaminación de algunos lagos, ríos, suelos, los alimentos agrícolas y ha provocado alteraciones de distintos ecosistemas (Fuhremann *et al.* 1978, Cooper 1991, Peterle 1991). Diversas investigaciones han mostrado su presencia en ciertos mantos acuíferos o en los canales del agua potable e incluso en el agua para la elaboración de la leche u otros alimentos enlatados (Hayes 1991, Peterle 1991). Varios estudios han indicado efectos deletereos en la calidad, la cantidad y el contenido nutricional de los cultivos agrícolas, como ejemplos se pueden citar la composición de lípidos y de proteínas en los tejidos de hortalizas, en la calidad del aceite en las semillas del maíz, de la soya, del algodón, etc. (Wilkinson *et al.* 1979, Yamaguchi *et al.* 1991). Además estos productos pueden acumularse en diferentes tejidos de distintos organismos incluyendo al ser humano y posiblemente ocasionarle la manifestación temprana de alteraciones en el funcionamiento de diversos órganos como en el sistema cardiovascular y el reproductor o conducir a la formación precoz de tumores, cáncer, daño al material genético o incluso la muerte por intoxicación (Yamaguchi *et al.* 1991).

En México, los plaguicidas de mayor importancia están representados por los organofosforados, los carbámicos y los tiocarbámicos. Estos últimos se utilizan principalmente como herbicidas pero también tienen actividad de insecticida y fungicida (DGEIE 1995)

Los herbicidas representan las dos terceras partes del total de los pesticidas, son aplicados para el control de semillas, en los monocultivos agrícolas y de plántulas preemergentes de pastos perennes o anuales (WHO 1988 ). Su aspersión en los campos forestales y silvestres ha provocado disminución en la tasa de sobrevivencia de algunos animales por el deterioro en la disponibilidad del alimento e incluso se ha detectado su acumulación en ciertos tejidos y han causado muerte por intoxicación (Hutson y Roberts 1988, Cooper 1991, Julli y Krassoí 1995).

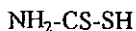
Los herbicidas tiocarbámicos son derivados del ácido carbámico:



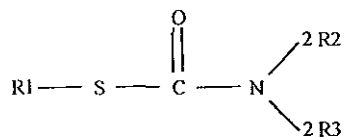
La sustitución de un átomo de azufre en un oxígeno del ácido da origen a los tiocarbámicos



mientras que dos azufres en el ácido carbámico, forma los ditiocarbámicos



Estos compuestos están divididos en dos clases, los derivados S-alquilo ó S-benzilo, incluyen al vernolate, cicloate, eptam o EPTC, pebulate, tiobencarb, molinate y butilate y los derivados S-cloroalil, el dialate, el trialate y el sulfalate, son compuestos con amplio rango de empleo en los suelos agrícolas, forestales y silvestres en diversas zonas geográficas, específicamente en los cultivos de cereales, tabaco, papa, remolacha y diversas hortalizas. Actúan inhibiendo el desarrollo de plántulas preemergentes de hierbas, de pastos anuales y perennes (Wilkinson *et al.* 1979, Fuerts 1987, WHO 1988). La fórmula general es:



donde R1= es un grupo alquilo unido al azufre, originando a los S-tiocarbamatos ó en el oxígeno a los O-tiocarbámicos.

R2 y R3= dos grupos alquilo ó un alquilo y un grupo cíclico ó un hexametileno (WHO 1988)

Estos herbicidas son líquidos ó sólidos con bajo punto de fusión, volátiles, solubles en agua y algunos de ellos estables en medios ácidos acuosos. Su oxidación secuencial a sulfóxidos y sulfonas de tiocarbamatos disminuye su estabilidad hidrolítica (WHO 1988).



## 1. Toxicidad de los herbicidas tiocarbámicos

### 1.1. *En plantas*

La mayoría de los herbicidas tiocarbámicos a bajas concentraciones alteran varios procesos bioquímicos tales como fotosíntesis, respiración, biosíntesis de lípidos (suberina y cutina), de ácidos grasos (Fig 1.), de isoprenoides (específicamente del caureno, un precursor de las giberelinas) y de flavonoides (antocianinas) en la raíz, en el tallo y en la hoja (Mann *et al.* 1965, Still *et al.* 1970, Kolatokudy y Brown 1974, Karuren y Wilkinson 1975, Wilkinson y Smith 1975 a, b, 1976, Bolton y Harwood 1976, Ashton *et al.* 1977, Wilkinson *et al.* 1979, Fuerts 1987, Weisshaar y Boger 1987, Wilkinson 1987, Gronwald 1991). Inhiben la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos *in vitro* e *in vivo* en diferentes especies vegetales (Mann *et al.* 1965, Moreland *et al.* 1969, Duke *et al.* 1975, Deal *et al.* 1980, Ebert 1980). Los sitios anatómicos más afectados por los herbicidas en la planta son los meristemos apicales e intercalares cercanos al nódulo del coleóptilo que impide el desarrollo de las hojas primarias y de la raíz, siendo menos sensible que las hojas; este proceso es debido al bloqueo de la división y de la elongación celulares (Dawson 1963, Parker 1963, Nalewaja 1964, Nalewaja *et al.* 1968, Banting 1970, Ashton *et al.* 1977, Chen y Casida 1978, Ebert 1980, Ashton y Grafts 1981).

Existen pocas evidencias de los efectos directos de los tiocarbámicos sobre el DNA de los vegetales (Banting 1970, Hess 1987, Vaughn y Vaughn 1989, Vaughn y Lehen 1991). Se ha descrito que los herbicidas dialate y trialate inducen anomalías cromosómicas, alteraciones en la morfología del núcleo, agrupamiento del material cromosómico, micronúcleos, puentes anafásicos y detención de la división celular en células meristemáticas de hoja y tallo del trigo (Banting 1970, Hepler y Yackson 1989).

Gómez-Arroyo *et al.* (1992) mostraron que el herbicida molinate provoca aberraciones cromosómicas en células de la punta de la raíz de *Vicia faba*, observando en metafase fragmentos y anillos cromatídicos y en anafase, fragmentos, puentes sencillos cromosomas con el centrómero inactivado, isocromosomas y alteraciones en el huso mitótico

## 1. 2. *En animales*

Los herbicidas tiocarbámicos son muy tóxicos a bajas concentraciones en artrópodos, peces, anfibios, aves, mientras que los mamíferos son menos sensibles. La  $LD_{50}$  oral en ratas está entre 50 a y 1000 mg/kg (Fry 1979, WHO 1988, Cashman y Olsen 1989, Heath *et al.* 1993).

En ratas tratadas con concentraciones altas de estos herbicidas se aparecieron síntomas de toxicidad como anorexia, lagrimeo, ataxia, sudoración, escalofrío, hipersalivación, hipotermia, pérdida de coordinación, depresión, fibrilación muscular, convulsiones seguidas de la muerte (Akulov *et al.* 1972, IARC 1976). En ratas y cobayos expuestos a dosis letales del herbicida dialate dos horas después de su aplicación causó ausencia de coordinación y la muerte por parálisis respiratoria, , la autopsia reveló dilatación del cerebro, del cerebelo y de las vísceras abdominales, hemorragias en las meninges y aumento en el tamaño de las glándulas adrenales (Doloshitsky 1969).

Se ha reportado un 20 % de mortandad en ratas inyectadas con 232 mg/kg de cicloato por cuatro meses, así como, manifestación de hiperemia y edema en la piel de conejos con aplicación dérmica de 115 mg/kg/día con el mismo compuesto (Rebrin y Aleksandrova 1971). En personas ocupacionalmente expuestas al EPTC se evidenciaron náuseas e irritación en la piel (Medved e Ivanova 1971).

La administración de 36 mg/Kg/día de molinate durante dos meses a ratas machos jóvenes no afectó su fertilidad, sin embargo, causó alteraciones en los espermatozoides, cuando se aparearon con hembras normales se produjo reabsorción embrionaria lo que sugirió un efecto letal dominante, además ocasionó un incremento en la mortalidad posnatal (Voytenko y Medved 1973, Anina *et al.* 1975).

En los seres humanos, se ha mencionado un solo caso de intoxicación en personas adultas y en infantes que bebieron agua potable contaminada con molinate proveniente de campos agrícolas, los que manifestaron síntomas como diarrea, náuseas, debilidad, escalofrío, dolor abdominal y conjuntivitis; estos signos desaparecieron cuando dejaron de ingerir el agua. El análisis químico del agua 15 días después reveló la concentración de 0.006 ppm del herbicida (Minakawa *et al.* 1978)

El empleo de grandes cantidades de los herbicidas tiocarbámicos molinate y tiobencard en los cultivos arroceros de California en 1985, tuvo como consecuencias la contaminación de los

rios aladaños (en el delta San Joaquín-Sacramento) y en los canales de agua potable, lo que ocasionó daño en algunos órganos y alta mortalidad en varias especies de peces incluyendo la carpa común (*Cyprinus carpio*), el róbalo (*Morone saxatilis*), el esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) y otros organismos acuáticos (California Department of Food and Agriculture 1981, 1985). El molinate es muy tóxico en la carpa común (*Cyprinus carpio*) ( $LD_{50}=0.21 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) en contraste con su baja toxicidad en ratas ( $LD_{50}=720 \text{ mg/Kg}$ ) (California Department of Fish and Game 1982, 1983, California State Water Resources Control Board 1984, Finlayson and Faggella 1986)

En Australia (1993) se detectaron niveles de  $42 \mu\text{g/L}$  de molinate en canales de agua potable posiblemente proveniente de campos arroceros lo que provocó un efecto letal en algunas especies de crustáceos y alteraciones en ciertos ecosistemas (Bailey 1993, Julli y Krassoi 1995).

## 2. Estudios sobre efectos mutagénicos y/o carcinogénicos de los herbicidas tiocarbámicos

Con respecto a su actividad mutagénica y/o carcinogénica la información es muy escasa, los herbicidas más ensayados son los derivados S-cloroalil: el dialate, el sulfalate y el trialate, los que indujeron mutaciones puntuales en *Salmonella thyphimurium* cepas TA98, TA100 y TA1535 (mutantes por corrimiento de lectura y por sustitución de pares de bases) solo en presencia de la fracción microsómica S9 de hígado rata (Bignami *et al.* 1974, IARC 1976, Carere *et al.* 1978, Sikka y Florezyk 1978, Douglas *et al.* 1981, Woo 1983, Sandhu *et al.* 1984) El dialate y el trialate son mutagénos en *Streptomyces coelicolor* y en *Pellargonium* y producen aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en células de ovario de criceto dorado *in vitro* y dieron resultados positivos en el ensayo de linfoma en ratones con activación metabólica animal (S9) (Carere *et al.* 1978, Douglas 1981, Sandhu *et al.* 1984).

Innes *et al.* (1969) mostraron que el dialate es carcinogénico en ratas y ratones expuestos a  $100 \text{ mg/kg}$  con formación de tumores en hígado y pulmón. El sulfalate causó tumores en glándulas mamarias de ratones, de ratas hembras y en pulmón y estómago en ratones y ratas machos (WHO 1988).

Murnik (1976) reportó que el vernolate y el butilate produjeron mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster* Pintér *et al.* (1990) no encontraron efectos en médula ósea de ratones tratados con 1000 mg/kg de vernolate, pero con 1500 mg/kg se provocaron efectos mielotóxicos en ambos sexos, con marcada toxicidad en los machos y a 2000 mg/kg notó alta incidencia de micronúcleos en médula ósea en ambos sexos 48 h después del tratamiento. También describieron que el molinate a 250 mg/kg fue clastogénico y causó incremento significativo de micronúcleos en eritrocitos policromáticos 48 h después de la administración en ambos sexos, con 350 mg/kg se ocasionó daño cromosómico muy severo y toxicidad moderada en los mielocitos y a 700 mg/kg es tóxico. Con el butilate no se observó efecto sobre la médula ósea.

Plewa *et al* (1988) no detectaron efecto mutagénico del dialate, trialate y butilate con el ensayo de Ames sin la activación metabólica de mamíferos.

### 3. Metabolismo de los tiocarbámicos

#### 3. 1. *En plantas*

Existe poca información concerniente al destino metabólico de los tiocarbámicos en las plantas superiores y en los animales, más aun sobre la naturaleza y la toxicidad de los residuos y/o de los productos así como acerca de la identidad y la caracterización de los sistemas enzimáticos y/o de las enzimas específicas que modifican la estructura de estos compuestos (Fang 1976, Grover 1989, Sterling 1994). Los herbicidas son metabolizados rápidamente, absorbidos y transportados por las raíces y las hojas, transportados a diferentes partes de la planta y acumulados en las hojas (Grover y Cessna 1991). La absorción de los herbicidas está en función de numerosos factores como las propiedades fisico-químicas del compuesto, del suelo y los ambientales (temperatura, luz, humedad) y la especie vegetal, entre otros (Devine 1989, Devine y Vanden-Born 1991, Sterling 1994).

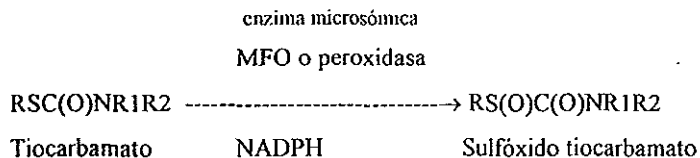
El metabolismo involucra tres fases, las reacciones primarias o de Fase I incluyen sulfoxidación y N-desalquilación, las secundarias o de Fase II, la conjugación con glutatión,

azúcares o aminoácidos y las terciarias o de Fase III, incorporación en productos naturales de la planta (Shimabukuro *et al.* 1981, 1982, Grover y Cessna 1991).

### 3. 1. 1. Reacciones de oxidación o de Fase I

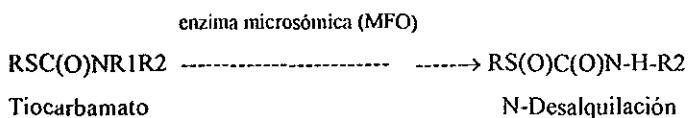
Las transformaciones oxidantes ocurren en la fase primaria del metabolismo, son procesos no sintéticos y pueden activar o desactivar al compuesto original. Estas reacciones dependen del sistema enzimático de los citocromos P450, enzimas conocidas como oxidasas de función mixta (MFO), las cuales intervienen en la desintoxicación de los xenobióticos, estas enzimas se localizan principalmente en el retículo endoplásmico y en la pared celular, requieren de oxígeno molecular y como sustratos secundarios o cofactores, nicotinamina adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) o nicotinamina adenina dinucleótido reducido (NADH) que son altamente específicas e inducibles por sus sustratos (Higashi *et al.* 1981, Higashi 1988). Las peroxidasas y otras oxigenasas también intervienen en el metabolismo oxidante. La oxidación en el átomo del azufre forma sulfóxidos de tiocarbámicos, son más solubles en agua, reactivos y tóxicos que la molécula original. Los sulfóxidos son capaces de reaccionar con los sulfhidrilos y son potentes agentes carbamilantes de los grupos tioles del glutatión (GSH), de la coenzima A (CoASH) y de otros componentes tisulares incluyendo proteínas, además son fuente de ácidos sulfónicos (Fig. 2) (Casida *et al.* 1974, 1975a,b, Hubell y Casida 1975a, b, 1977, Lay y Casida 1976, Carringer *et al.* 1978, Chen y Casida 1978, Gray 1991, Hatzios 1991).

La reacción general de oxidación de los carbamatoatos o tiocarbamatos en las plantas es .



### 3. 1. 2. *N*-desalquilación

La *N*-desalquilación es una reacción oxidante muy común, considerada de desactivación, sin embargo con otros herbicidas se producen derivados bioactivados muy tóxicos, involucra la eliminación de un grupo metilo o alquilo cercano al átomo de nitrógeno, la oxidación es catalizada por el sistema MFO, procede a la formación de un producto inestable el *N*-hidroximetil (Fig. 2) (Casida *et al.* 1974, Hubell y Casida 1977)



### 3. 1. 3. *Formación de sulfonas*

Los sulfóxidos tiocarbamatos sufren transformaciones que originan los derivados sulfonas, los cuales son más inestables, de vida muy corta y con menor efectividad como herbicidas (Fig. 2) (Casida *et al.* 1974, 1975a, b, Hubell y Casida 1977, Stephenson *et al.* 1979).

### 3. 1. 4 *Reacciones de conjugación o de Fase de II*

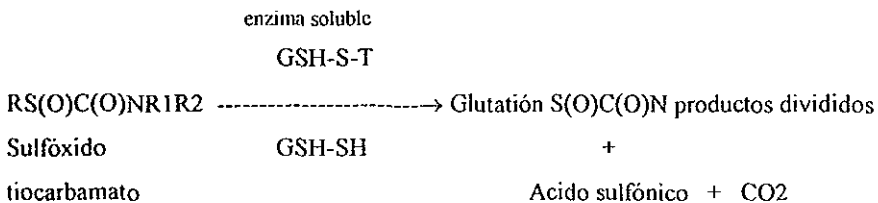
En general, la conjugación es considerada como una reacción de desactivación y de desintoxicación, involucra la interacción de los metabolitos provenientes de la Fase I y con un sustrato endógeno que puede ser el glutatión, los azúcares, aminoácidos y, en menor frecuencia, las proteínas. El sustrato principal es el glutatión (GSH) (o hemoglutatión de ciertas leguminosas) que está presente en todas las células vegetales y en las animales en su forma reducida abreviado comúnmente como GSH, el grupo estructural sulfhidrilo (SH) de la cisteína es el más importante en su interacción con los sulfóxidos tiocarbámicos y los xenobióticos (Chen y Casida 1978, Fuhremann *et al.* 1978, Stephenson *et al.* 1979, Horvath y Pulay 1980, Breaux 1986, 1987, 1987).

La biodegradación de los sulfóxidos tiocarbámicos es una reacción muy rápida con glutatión (GSH) y/o cisteína y glicina, asistida por el sistema enzimático glutatión-S-transferasas (GSH-S-T) que son enzimas citosólicas solubles, con especificidad limitada a herbicidas y cuya función es estrictamente catalizar el ataque del glutatión, romper el enlace carbonilo y transferir el grupo carbamoilo de los sulfóxidos al GSH, esta división enzimática requiere de NADPH. Los productos de las reacciones secundarias son conjugados, malonilcisteína y ácidos malonil-3-tioláctico de alto peso molecular, más polares y solubles en agua (Lamoureux y Frear 1979, Lamoureux y Rusness 1987), difíciles de extraer, aislar, purificar y caracterizar de los extractos vegetales (Huckle y Milburn 1982). La conjugación con GSH puede o no puede ser una reacción enzimática que probablemente se realiza en pocas horas o menos, lo cual sugiere que los herbicidas poco tiempo son activos y sólo a bajas concentraciones dentro de la planta (Lay *et al* 1975, Lay y Casida 1976, Carringer *et al.* 1978, Leavit y Penner 1979, Breaux 1987)

Varios estudios indican que las reacciones de carbamitación son importantes en el metabolismo y posiblemente en el modo de acción de los herbicidas tiocarbámicos (Fuerts 1987).

El significado biológico de los metabolitos es desconocido, son considerados como un mecanismo de regulación y control de los niveles de los derivados tóxicos que resultan de las reacciones de Fase I. Aparentemente pueden ser metabolizados y convertidos a productos biológicamente activos (Grover y Cessna 1991).

La reacción de conjugación de los sulfóxidos tiocarbámicos en plantas es la siguiente:



### 3. 1. 5. Reacciones terciarias o de Fase III

En animales, los pesticidas o xenobióticos son metabolizados en dos fases, las reacciones primarias originan sulfóxidos tiocarbamatos los cuales son conjugados en productos secundarios solubles y fácilmente excretados por la orina, sin embargo, en las plantas no existe este fenómeno. Shimabukuro *et al.* (1981, 1982) incluyeron al metabolismo de los pesticidas las

reacciones terciarias o de Fase III, exclusivas de los vegetales superiores, las cuales limitan la biodisponibilidad de los herbicidas por incorporación a residuos insolubles.

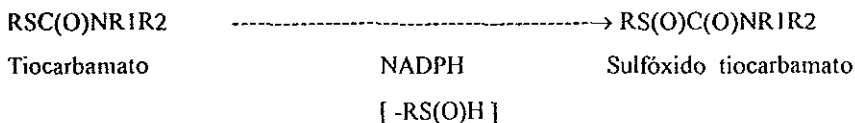
Los productos primarios y/o secundarios pueden ser compartimentalizados en vacuolas transferidos al espacio extracelular o a la pared celular por mecanismos enzimáticos desconocidos, parece ser que se unen a moléculas específicas, como ligninas, taninas, pectinas, polisacáridos (celulosa, almidón) y algunos polipéptidos (globulinas) u otros componentes vegetales, su incorporación depende del herbicida, de su ruta metabólica, de las especies vegetales y de sus estructuras (tejidos, órganos, etc.) (Fig. 2) (Sandermann *et al* 1990, 1992, Sandermann 1992,).

### 3. 2. *En animales*

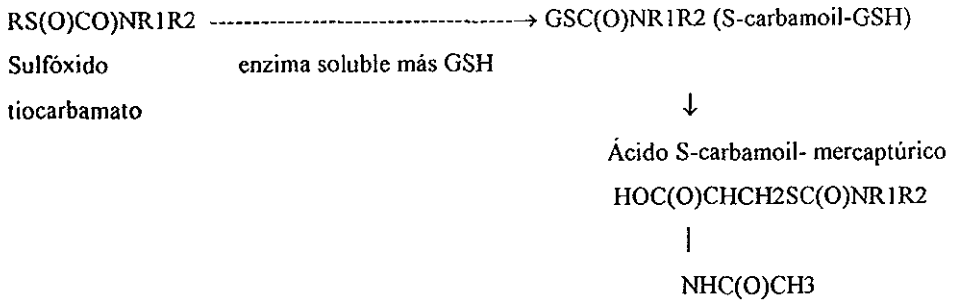
Los tiocarbamatos en forma de aerosoles ingresan al cuerpo de los animales vía el tracto respiratorio, la absorción es a través de la piel, de las membranas mucosas y del tracto digestivo siendo rápidamente metabolizados en dos fases. En las reacciones de la Fase I, la sulfoxidación es catalizada por el sistema MFO para la conversión a sulfóxidos tiocarbámicos seguido de su conjugación con GSH, asistidas por el sistema GSH-S-T, el conjugado de GSH es transformado al derivado de cisteína, el cual es acetilado y excretado como ácido S-carbamoil-mercaptúrico (Hubell y Casida 1977, Chen y Casida 1978) La sulfoxidación de los tiocarbamatos representa un mecanismo de desintoxicación en los mamíferos, la baja toxicidad de los sulfóxidos se atribuye a la alta tasa de rompimiento y eliminación de los conjugados con GSH, divididos y acetilados para formar ácidos mercaptúricos antes de ser excretados, estos son detectados e identificados en orina de ratas tratadas con molinate, butilate, EPTC y vernolate (Casida *et al* 1974, Lay y Casida 1976, Hubell y Casida 1977, Carringer *et al.* 1978, Chen y Casida 1978, Debaun *et al.* 1978a, b, Lay y Menn 1979).

Siendo la reacción de conjugación la siguiente:

oxidasa microsómica de hígado de rata







#### 4. Sistemas de prueba

Se han descrito pocos trabajos sobre la inducción de efectos mutagénicos causados por los herbicidas en sistemas vegetales superiores comparados con los bioensayos que usan células de mamíferos en cultivo, estos estudios emplean diversas pruebas genéticas como son *aberraciones cromosómicas*, *micronúcleos*, *mutaciones puntuales* e *intercambios de cromátidas hermanas (ICH)* (Schvartzman 1987).

Son varias las especies vegetales que se emplean como monitores de mutágenos químicos, como son *Tradescantia paludosa*, *Allium cepa*, *Secule cereale*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Crepis capillaris*, *Lycopersicon sculentum*, las más frecuentemente utilizadas son: *Allium cepa* y *Vicia faba* (Grant 1994) Las células somáticas de la punta de raíz de *Vicia faba* son comúnmente empleadas para detectar daño cromosómico por mutágenos ambientales ya que ofrece amplias ventajas:

- sus cromosomas son de gran tamaño y fácilmente observables
- su cariotipo normal es  $2n=12$ , presentando 5 pares de cromosomas subacrocéntricos y un par de metacéntricos
- el promedio de duración del ciclo celular de la raíz principal es de 19.3 horas a 19 °C, sus fases. presintética (G<sub>1</sub>) 4.9 h, sintética (S) 7.5 h, postsintética (G<sub>2</sub>) 4.9 h y mitosis 2 h (Evans y Scott 1964).
- es una técnica muy barata comparada con los ensayos que utilizan células de mamíferos (Kihlman 1971).

#### 4. 1. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)

El estudio de ICH es una prueba citogenética rápida y sensible, puesto que son producidos a concentraciones hasta diez veces menores que las requeridas para provocar aberraciones cromosómicas y ofrece un método adecuado para detectar mutágenos y/o carcinógenos ambientales (Kato 1974, 1977, Latt 1974, Perry y Evans 1975). El ICH desde el punto de vista molecular es un fenómeno que implica transposiciones simétricas de DNA de doble cadena equivalentes entre las dos cromátidas de un mismo cromosoma. Algunos estudios han evidenciado que el proceso de ICH requiere que la célula pase por la etapa de síntesis (S) del DNA (Wolff 1974) y se ha sugerido que es durante o inmediatamente después de que se ha formado la horquilla de replicación cuando se lleva a cabo el intercambio de doble banda entre las cadenas de DNA (Kato 1974, Painter 1982).

Este fenómeno fue descubierto por McClintock (1938) y visualizado en el microscopio de luz por Taylor *et al.* (1957) en *Vicia faba*. Kihlman y Kronborg (1975) fueron los primeros en realizar un trabajo sobre los ICH en vegetales superiores, con el método de incorporación de la 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU) un análogo de la timina, sin embargo, esta técnica fue inicialmente utilizada y perfeccionada para las células de mamíferos en cultivo (Perry y Evans 1975). Consiste en la sustitución de 5-BrdU en el DNA por la timina endógena (dThd) en las células que crecen por dos generaciones consecutivas en presencia de este análogo de base o durante la primera división, obteniéndose diferenciación entre las cromátidas hermanas en los cromosomas metafásicos, de tal manera que los cromosomas de la segunda mitosis poseen una cromátida sustituida por la 5-BrdU en cada cadena de DNA, mientras que su cromátida hermana es sustituida en sus dos cadenas y los ICH observados son la suma de todos los intercambios ocurridos en las dos divisiones celulares (Fig. 3). Las cromátidas hermanas sustituidas tiñen diferencialmente por combinación del fluorocromo Hoechst 33258 y Giemsa (Perry y Wolff 1974). El fluorocromo actúa como fotosensibilizador (Scheid 1976) y la irradiación de las preparaciones celulares con luz ultravioleta (UV-luz de onda larga) de las preparaciones celulares ocasiona desbrominación y eventualmente rompimientos de una sola hebra en las cadenas reemplazadas con la 5-BrdU (Lyon 1970). La incubación de las laminillas con un amortiguador a temperatura alta guía a la extracción preferencial de las nucleoproteínas de las cromátidas que

fueron sustituidas, finalmente son teñidas con el colorante resultando la tinción diferencial de la cromátida menos desorganizada que es la que contiene más timina (dThd) (Fig. 3 ) (Schvartzman 1987).

Tempelaar *et al.* (1982), desarrollaron un procedimiento con tinción de Feulgen para obtener el contraste diferencial de las cromátidas sustituidas por la 5-BrdU para visualizar el ICH en los cromosomas vegetales, que consiste en fijar los meristemos de las raíces e inmediatamente hidrolizarlos con HCl 5N a 28 °C. El principio básico de la reacción de Feulgen-Schiff consiste en la transformación ácida del DNA catalizada por la hidrólisis con ácido polialdehído apurínico (APA) seguida de la tinción de los aldehídos con el reactivo de Schiff. El DNA sustituido por la BrdU tiene fuerte afinidad por las proteínas comparado con el DNA que contiene dThd y con la hidrólisis (que evita la irradiación con luz UV), la que contiene más dThd y menor BrdU son degradados y la cromátida que contiene más 5-BrdU sustituida es preferencialmente teñida (Gordon *et al.* 1976). La adición de la 5-fluorodesoxiuridina (5-FdU), un inhibidor específico de la enzima timidilato sintasa que cataliza la síntesis endógena del ácido timidílico, permite que la incorporación de la BrdU sea mayor (Cohen *et al.* 1958) y la uridina (Urd) contrarresta el efecto adverso de la FdU sobre la síntesis de RNA, facilitando la sustitución de la 5-BrdU por la dThd en el DNA de las células vegetales (Kihlman y Kronborg 1975).

#### 4.2 *Cinética de proliferación celular e índice mitótico*

Adicionalmente a los estudios mutagénicos, la cinética de proliferación linfocitaria y el índice mitótico, estimulados por un mitógeno como la fitohemaglutinina, permiten establecer criterios biológicos que se consideran importantes en la genética toxicológica. Este tipo de análisis es particularmente usado para determinar los efectos inmediatos de las drogas citotóxicas o de los tratamientos con las citocinas en poblaciones de células tumorales.

El proceso de activación celular es iniciado como respuesta a un estímulo externo que modifica las actividades funcional y bioquímica de las células eucariontes con la transición de las fases G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub> de su ciclo. Normalmente este proceso es asociado con la inducción rápida de la

expresión de nuevos genes, incluyendo aquellos que codifican a los factores de transcripción, a los oncogenes, a las citocinas, a las moléculas de superficie celular (antígenos CD), a las moléculas de adhesión y a otros genes de funciones desconocidas. El estímulo activa a las células a controlar una función específica, usualmente la unión de un ligando a su receptor (por ejemplo, la citocina) y/o la formación del complejo antígeno-receptor. La constitución de este complejo induce cambios conformacionales, los cuales sirven para transmitir una señal intracelular. Este proceso involucra a varios segundos mensajeros y a una complicada cascada de reacciones bioquímicas que guían eventualmente a la modulación de la actividad de los genes en el núcleo. La fosforilación de proteínas intracelulares mediada por las cinasas pueden ser uno de los pasos iniciales en la activación celular. La redistribución rápida y temporal del  $Ca^{++}$  de los compartimientos intracelulares (almacenes), también es otro evento clave en la activación de la célula. Los factores que activan a la células pueden ser funcionalmente distinguidos como competentes y de progresión. Los primeros preactivan a la célula, muchos de estos factores son codificados por los genes denominados de respuesta temprana e inmediata (ERG), los cuales juegan un papel relevante en la transición de la fase  $G_0$  a  $G_1$ , pero son incapaces de promover la entrada a la fase S (síntesis) del ciclo celular. La actividad simultánea y sucesiva de los factores de progresión suministra una señal blanco requerida para iniciar la fase S. La expresión o la represión de estos genes puede posteriormente comenzar la proliferación y/o la diferenciación de numerosas células (Pagano *et al.* 1992a, b, 1993).

Las proteínas reguladoras del ciclo celular incluyen a una familia especial conocida como ciclinas (se hallan cinco en las células humanas, A-E) y a sus proteínas asociadas, las cinasas y las fosfatasas. Las concentraciones de las ciclinas difieren en las distintas fases del ciclo, por ejemplo A y B se acumulan en la interfase y disparan la transición entre  $G_2$  y M, estas concentraciones son relativa y rápidamente degradadas con la inducción de la entrada de las células a la mitosis. La inhibición de su síntesis detiene el ciclo celular en interfase. Algunas de estas proteínas también muestran diversos grados de fosforilación en las fases del ciclo celular. Otras proteínas conocidas como cinasas, dependientes de las ciclinas (CDKs), se unen a estas proteínas para activar a otras que fosforilan a otras proteínas intracelulares, la *cdc2*, que ha mostrado ser el mejor regulador del ciclo celular. En todos los eucariontes la entrada a la fase M depende críticamente de la activación del complejo *cdc2/ciclina B*. La destrucción rápida de las ciclinas (via ubiquitina) conduce a la pérdida de actividad de los componentes de la cinasa,

diversas proteínas reguladas por un mitógeno (MRP) son de función desconocida y sintetizadas después de la estimulación de las células por factores de crecimiento mitogénicos. Los cambios transcripcionales y el incremento temporal en los RNAm corresponden a varios factores de transcripción y citocinas que son observadas durante todas las fases del ciclo celular. Las células que regularmente no se dividen (quiescentes) son usualmente denominadas células  $G_0$ . Las cuales normalmente son detenidas en la fase  $G_1$  antes de iniciar S. Algunos factores de crecimiento mitogénicos, como las citocinas actúan sobre las células  $G_0$  para el reinicio del ciclo celular, con la transición de la fase  $G_0$  a  $G_1$ , el cual es un proceso muy complejo e involucra la inducción selecta y coordinada de la expresión de cientos de genes diferentes y probablemente la represión de otros. Después de la estimulación celular, las células expresan un limitado número de receptores para los factores de crecimiento y otros ligandos, estos últimos se unen a sus respectivos receptores (fase de iniciación) y las células llegan a ser “competentes” y responden a otros factores, la unión de nuevos ligandos a sus receptores median la señal para el transcurso del ciclo celular (fase de progresión), los cuales son conocidos como factores de progresión (Pagano *et al.* 1992a, b, 1993).

Estudios recientes concernientes al control molecular del ciclo celular han conducido al desarrollo de nuevos métodos para inducir la proliferación celular que son usados como terapia de lesiones en órganos y tejidos incluyendo la reparación de neuronas maduras que no pueden dividirse. Por otra parte, estos hallazgos podrían ayudar a reducir la reproducción desenfrenada de las células cancerígenas. La regulación de su actividad y/o la alteración de ciertas proteínas involucradas en el ciclo o en la proliferación celular, como el factor que promueve a la maduración (PMF) y la *cdc2*, ayudarían a impedir que se altere la fisiología de algún órgano o que las células entren a mitosis, con la consecuente prevención de la producción de la metástasis y del cáncer.

El conocimiento del proceso de regulación y/o control del ciclo celular ha llevado al empleo de un tipo de terapia tumoral conocida como terapia del ciclo celular que se basa esencialmente en el tratamiento de las células  $G_0$  con citocinas para inducir las a entrar a la fase S, haciéndolas vulnerables a la acción de las drogas específicas de la fase S. Además ha servido para diseñar tratamientos de protección a las células tronco-no cíclicas.

Son pocas las investigaciones que han evidenciado alteraciones sobre la cinética de proliferación celular por pesticidas en su mayoría los organofosforados como metil paratión,

malatión, metilazinfos y en menor grado los carbámicos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Sobti *et al.* 1982).

## 5. Mutágenos directos e indirectos o promutágenos

Plewa (1978) desarrolló un método para evaluar respuestas mutagénicas de algunos plaguicidas en presencia del sistema enzimático vegetal e introdujo el término de "activación vegetal" que denota el proceso mediante el cual un agente químico no mutagénico es transformado por la acción biológica de una planta en mutágeno (Plewa y Gentile 1982). Aquellos agentes químicos que por sí mismos no son mutagénicos, sino que requieren de activación metabólica previa (animal o vegetal) para ejercer dicho efecto son denominados **promutágenos o mutágenos indirectos**.

La formación de productos metabólicos tóxicos en las plantas depende del tipo de compuesto, de sus propiedades fisicoquímicas, de la concentración, de la tasa y de las rutas de conversión o del rompimiento metabólico con o sin el sistema enzimático. La toxicidad puede ser incrementada, disminuida o nulificada (Zilkah y Gressel 1977, Hess 1985, 1987, Sterling 1994).

Existen dos procedimientos generales usados en los estudios sobre activación de promutágenos vegetales, que son métodos *in vivo* e *in vitro*, en el primero el agente químico a probar es introducido en una planta viva intacta que semeja las condiciones encontradas en los campos agrícolas y en el segundo el agente es incubado con un homogeneizado vegetal estéril o con un cultivo de células de un tejido vegetal con o sin cofactores y finalmente se realiza el análisis bioquímico y genético de los metabolitos de los tejidos de la planta o de los cultivos celulares (Plewa 1978, Plewa *et al.* 1984, 1988). En ambos, la acción del metabolismo vegetal sobre un mutágeno potencial es rápidamente ensayado con un microorganismo indicador como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc., o en células de mamífero, para determinar su actividad genética y evaluar sus propiedades genotóxicas (Plewa *et al.* 1984). Con estos procedimientos se ha demostrado que algunos insecticidas, fungicidas y herbicidas, tales como el aldrin, dialate, 2-acetilaminoflureno, benzydina, hidrazida málica, fenilurea, entre otros, que pueden ser activados a compuestos

mutagénicos, por los extractos y/o los homogeneizados enzimáticos de semillas de soya, maíz, cebada, raíz de haba, cebolla, bulbos de tulipán, hojas de maíz y tabaco (Plewa 1978, Scott *et al* 1978, Constantin y Nilan 1982, Takehisa *et al.* 1982, Takehisa y Kanaya 1983, 1986, Higashi 1988, Seo *et al.* 1993). Estos métodos para investigar el papel de la activación vegetal se basan en la extracción de agentes mutagénicos activados por plantas completas (Plewa y Gentile 1978), homogeneizados de tejidos vegetales (Plewa y Gentile 1982, Rasquinha *et al.* 1988) o la fracción microsómica de células vegetales (Gentile *et al.* 1986). Asimismo, de estas técnicas surgió una prueba novedosa en la cual las células vegetales cultivadas en suspensión se usa como el sistema de activación y microorganismos como organismos indicadores de daño genético (Plewa y Gentile 1982, Plewa y Wagner 1993). Este ensayo fue denominado prueba de coincubación células vegetales/microorganismo indicador. Se han realizado estudios *in vitro* empleando a *Salmonella typhimurium* para evaluar el daño mutagénico y distintas plantas usando homogeneizados libres de células de diversas plantas o bien la fracción microsómica que posee la actividad enzimática requerida para el metabolismo (Higashi *et al.* 1981, Higashi 1988). Los extractos principalmente utilizados han sido los de trigo (Rasquinha *et al.* 1988), maíz (Plewa 1978, Plewa *et al.* 1983), *Tradescantia* (Scott *et al.* 1978), tubérculos de papa y tabaco (Gentile *et al.* 1982, 1985)

En vista de que numerosos plaguicidas pueden ser activados por las plantas y actuar como mutágenos en sistemas animales, incluyendo al hombre y considerando como antecedente que en nuestro país, los herbicidas tiocarbámicos son ampliamente usados en la agricultura, lo cual representa una fuerte amenaza para la salud de la población y teniendo como referencia que son escasos los estudios citogenéticos del molinate y bulilate, en este trabajo se evaluó su potencial mutagénico en tres sistemas. Primero se realizaron tratamientos a los cultivos de linfocitos humanos con los extractos de raíces de *Vicia faba* que fueron previamente tratadas con diferentes concentraciones de los dos compuestos (sistema de activación vegetal *in vivo*), segundo se coincubaron los cultivos de sangre periférica junto con la mezcla S10 y las distintas concentraciones de los dos herbicidas (sistema de activación vegetal *in vitro*) y finalmente se evaluó el efecto genético de los mismos compuestos sobre el DNA de las células meristemáticas de *Vicia faba*, que ha demostrado ser sumamente sensible al efecto de plaguicidas (Gómez-Arroyo *et al.* 1988, 1992, 1995, 1997, Gómez-Arroyo y Villalobos Pietrini 1995), además de ser metabólicamente activa, ya que posee la fracción enzimática S10 (Takehisa *et al.* 1982, 1988,

Takehisa y Kanaya 1983, 1986, Calderón-Segura 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995). Se empleó como prueba de daño citogenético al intercambio de cromátidas hermanas (ICH), así mismo su influencia sobre la cinética de proliferación celular y el índice mitótico en los cultivos de linfocitos. Con el objeto de que la concentración de proteínas en los sistemas de activación *in vivo* e *in vitro* no influyera en la respuesta mutagénica se determinó el contenido de proteínas totales por el método de Biorad (Bradford 1976) y el pH de los cultivos de los linfocitos en ambos sistemas de activación metabólica.



## II. OBJETIVOS

1. Evaluar el daño genotóxico de los herbicidas molinate y butilate a diferentes concentraciones en células meristemáticas de *Vicia faba*, mediante el análisis de los intercambios de cromátidas hermanas (ICH).
2. Determinar si el molinate y el butilate son promutágenos a través del metabolismo vegetal de las raíces de *Vicia faba* (activación metabólica *in vivo*), utilizando como prueba del efecto genético al ICH en cultivos linfocitos humanos.
3. Corroborar el potencial de biotransformación de la raíz de *Vicia faba*, empleando a la fracción enzimática S10 de las raíces del haba (activación metabólica *in vitro*) coincubándola con las distintas concentraciones de los dos herbicidas y los linfocitos en cultivo utilizando la misma prueba de evaluación de daño.
4. Analizar los efectos de los dos herbicidas sobre la cinética de proliferación celular y el índice mitótico con y sin la participación de la activación metabólica de *Vicia faba in vivo* e *in vitro*
5. Establecer la concentración adecuada de proteínas totales por el método de Biorad en el sistema de activación *in vitro*.
6. Valorar la concentración de proteína total por el método de Biorad, en los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con los dos herbicidas tiocarbámicos.

### III. HIPÓTESIS:

Si los herbicidas tiocarbámicos butilate y molinate son promutágenos activados por los vegetales, entonces, los metabolitos producidos inducirán intercambios de cromátidas hermanas y alteraciones en la cinética de proliferación celular y en el índice mitótico en los linfocitos humanos en cultivo, previa transformación metabólica por las raíces de *Vicia faba* en los tratamientos *in vivo* e *in vitro* y este mismo efecto genotóxico se evidenciará en los cromosomas de las células meristemáticas de la misma planta

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Propiedades fisicoquímicas del butilate y molinate

1.1. El butilate (S-etil N,N-diisobutiltiocarbamato, Sután) cuya estructura química se muestra en la figura 4, tiene un peso molecular de 217.4, es un líquido claro, con olor aromático, su punto de fusión es de 130 °C/10 mmHg y de vaporización 170 mPA (25 °C), su densidad 0.9402, soluble en agua 46 mg/l (20°C), miscible con acetona, etanol, queroceno, 4-metilpentano-2-uno y xileno, su estabilidad es menor a 200 °C

1.2. El molinate (S-etil azepina-1-carbamato, Ordram) del cual se presenta su estructura química en la figura 5, tiene un peso molecular de 187.3 es un líquido claro, con olor aromático, su punto de ebullición 202 °C/10 mmHg, presión de vapor  $5.6 \times 10^{-3}$ /10 mmHg a 25 °C, de vaporización 46 mPA (25 °C), su densidad 1.063, soluble en agua 880 mg/l (21°C), miscible con acetona, etanol, benceno, 2-propanol, metanol, queroceno, 4-metilpentano-2-uno y xileno, su inestabilidad es de un mes a 120 °C y a temperatura ambiente no es corrosivo y es inestable a la luz.

### 2. Tratamientos directos con butilate, molinate y etanol a los cultivos de linfocitos humanos

Se prepararon soluciones madre de los herbicidas tiocarbámicos (72% de pureza, 720 AI/L) con agua destilada de las cuales se obtuvieron las concentraciones siguientes en ppm y (molares): 6.25 ( $3 \times 10^{-5}$ ), 12.50 ( $5.8 \times 10^{-5}$ ), 50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ ) y 300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ ) para butilate, 25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $4 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $1 \times 10^{-3}$ ) y 300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ ) para molinate.

A frascos de cultivo se les agregó 4.5 ml de medio RPMI 1640 (Gibco) complementado con 0.035 ml de fitohemaglutinina más 8 gotas de sangre heparinizada de un donador sano, se incubaron por 24 horas a 37 °C y después se les adicionaron diferentes concentraciones de butilate, molinate y etanol  $1 \times 10^{-1}$  M más 100 µl bromodesoxiuridina (5-BrUd, 20 µg/ml) y al

testigo solo la 5-BrUd por 24 h a 37 °C. A las 70 h se les aplicó 100 µl de colchicina y a las 72 h se cosecharon las células y se realizó la tinción diferencial con fluorescencia más Giemsa (Perry y Wolff 1974).

### 2. 1. *Cosecha de linfocitos humanos*

1. Cada cultivo se transfirió a un tubo y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
2. Se eliminó el sobrenadante e inmediatamente se resuspendió el botón con KCl (Merck) 0.075 M a 37 °C, se dejaron reposar durante 20 min en la incubadora
3. De nuevo se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min.
4. Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió rápidamente con el fijador metanol-ácido acético (Sigma) 3:1 dejándolos reposar durante 20 min
5. Se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min.
6. Se desechó el sobrenadante, se mezcló el botón con el fijador y se les permitió reposar durante 10 min a temperatura ambiente.
7. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 0.5 ml de fijador, después se hicieron las preparaciones
8. Cada preparación se elaboró por goteo, realizándose como mínimo 4 para cada tubo
9. Se dejaron secar verticalmente al aire.
10. Las preparaciones con metafases fueron reetiquetadas con clave desconocida para el observador posteriormente fueron teñidas.

### 2. 2. *Tinción diferencial de las cromátidas hermanas*

1. Las preparaciones con metafases se sumergieron en el colorante fluorocromado Hoesch 33258 -agua destilada (1:9) y fueron mantenidas en la obscuridad por 20 min en cajas de Koplín.
2. Se enjuagaron con agua de la llave y se dejaron secar al aire verticalmente.
3. Posteriormente fueron colocadas en citrato de sodio salino (CSS, 0.03M) y se irradiaron con luz ultravioleta durante 60 min.

4. Se limpiaron con agua corriente y se secaron al aire verticalmente.
5. Después fueron introducidas en cajas de Koplín con CSS, en baño María a 60 °C durante 60 min.
6. Se lavaron con agua de la llave y se secaron al aire verticalmente.
7. Se tiñeron con el colorante Giemsa (Merck)-agua destilada (1:10) durante 2 min.
8. Se enjuagaron con agua de la llave y se dejaron secar verticalmente al aire.
9. Se analizaron las frecuencias y los tipos de intercambios de cromátidas hermanas (ICH).

### 3. Activación metabólica *in vivo*

#### 3. 1. Preparación de los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con butilate, molinate y etanol y su aplicación a los cultivos de linfocitos humanos

Las semillas de *Vicia faba* (var. minor) se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave, cuando las raíces alcanzaron una longitud entre 4 y 6 cm, 40 plántulas se introdujeron en las concentraciones siguientes: ppm (molares) 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ ), 300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ ), 400 ( $1.8 \times 10^{-3}$ ), 500 ( $2.3 \times 10^{-3}$ ), 750 ( $3.5 \times 10^{-3}$ ), 1000 ( $4.6 \times 10^{-3}$ ), 1500 ( $6.9 \times 10^{-3}$ ), 2000 ( $9.2 \times 10^{-3}$ ) de butilate y 100 ( $5.3 \times 10^{-3}$ ), 200 ( $1 \times 10^{-3}$ ), 300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ ), 400 ( $2.1 \times 10^{-3}$ ), 500 ( $2.7 \times 10^{-3}$ ), 750 ( $4 \times 10^{-3}$ ), 1000 ( $5.3 \times 10^{-3}$ ), 1500 ( $8 \times 10^{-3}$ ), 2000 ( $1 \times 10^{-2}$ ) de molinate durante 4 h en la obscuridad y a temperatura ambiente. Para tener la certeza de la capacidad metabólica de *Vicia faba* se empleó como testigo positivo al etanol (EtOH, 98% de pureza, Sigma)  $3600 (1 \times 10^{-1} M)$ , el cual ha demostrado ser un promutágeno en esta planta a incrementar significativamente la frecuencia del ICH. El testigo negativo fue solo agua destilada, ambos testigos estuvieron bajo las mismas condiciones experimentales. Transcurridas las 4 h, se lavaron con agua de la llave tres veces y en dos ocasiones con agua destilada, posteriormente se cortaron 2 cm de la raíz principal, se maceraron con amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M, pH 7.4, a temperatura entre 0-4 °C, y se homogeneizaron en un macerador de tejidos vegetales de 1 a 2 min. La relación de volumen de la solución amortiguadora (ml) con el peso fresco de los cortes de la raíz (g) fue de 1:1 (Takehisa *et al.* 1982).

El homogeneizado fue ultracentrifugado por 15 min a 15000 rpm a 4 °C. El sobrenadante con los metabolitos de las transformaciones del butilate, molinate y etanol, así como la fracción enzimática S10 (testigo negativo) fueron esterilizados por filtración miliporo (0.45 µm) e inmediatamente usados para los tratamientos de los linfocitos en cultivo.

Se añadieron 100 µl de los extractos de las raíces tratadas con los dos herbicidas, el etanol y los testigos negativos:

(1) cultivo de linfocitos humanos + 5-BrdU

(2) cultivo de linfocitos humanos + 5-BrdU+ 100 µl de los extractos de las raíces sin tratamiento.

El positivo, cultivo de linfocitos humanos + 5-BrdU+ 100 µl de los extractos de las raíces tratadas con etanol ( $1 \times 10^{-1}$  M) a los linfocitos a las 24 h de cultivo junto con la 5-BrdU permaneciendo 48 h a 37°C y se continuó con la técnica mencionada en el punto 2.1

#### 4. Activación metabólica *in vitro*

##### 4. 1. Obtención de la fracción enzimática S10 de la raíz de *Vicia faba*

Las semillas de *Vicia faba* (var. minor) se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave, cuando las raíces alcanzaron una longitud de 4 cm, a 40 plántulas se les cortó 2 cm de la punta para obtener un peso de 2 g, se maceraron con amortiguador de fosfatos de sodio (0.1 M) pH 7.4, más manitol 1mM (Baker), ditiotreititol 1 mM (Sigma), EDTA 1 mM (Sigma) y polivinilpirrolidona 10% (peso/volumen) (PVPP, Sigma) a temperatura entre 0-4 °C, se homogeneizaron en un macerador de tejidos vegetales durante 2 min. La relación de volumen de la solución amortiguadora (ml) a peso fresco de los cortes de la raíz (g) fue de 1.1 (Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa *et al* 1988).

El homogeneizado fue ultracentrifugado por 15 min a 15000 rpm a 4 °C, el sobrenadante (fracción enzimática S10) (Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa *et al*. 1988), fue esterilizado por filtración miliporo (0.45 µm), e inmediatamente se determinó el contenido de proteínas por el método de Biorad (Bradford 1976) y usado para la activación metabólica *in vitro* de los dos herbicidas y de los testigos negativo y positivo coincubado con los cultivos de linfocitos humanos.

#### *4.1.2. Mezcla enzimática S10*

La mezcla S10 se preparó con la fracción microsómica S10 de *Vicia faba* en una relación 1:9 (volumen/volumen) con los siguientes compuestos:  $8 \times 10^{-3}$  M MgCl (Baker),  $3.3 \times 10^{-3}$  M KCl (Baker),  $5 \times 10^{-3}$  M Glucosa-6 fosfato (Sigma),  $4 \times 10^{-3}$  M NADP (Sigma) y NAD (Sigma) y  $10^{-1}$  M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Baker) (pH 7.4).

##### *4.2.1. Coincubación de las diferentes concentraciones de butilate, de molinate y de etanol con los cultivos de linfocitos humanos*

A cada cultivo de linfocitos humanos de 48 h de incubación se le agregó las siguientes concentraciones en ppm y (molares). 25 ( $1 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $9.2 \times 10^{-4}$ ) y 200 ( $1.4 \times 10^{-3}$ ) de butilate, 25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $4 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $1 \times 10^{-3}$ ), 300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ ) de molinate y 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ ) de etanol por 4 h.

##### *4.2.2. Coincubación de las diferentes concentraciones de butilate, de molinate y de etanol con los cultivos de linfocitos humanos y la mezcla S10*

A cada cultivo de linfocitos humanos de 48 h de incubación se le aplicó 500  $\mu\text{l}$  de la mezcla S10 más las siguientes concentraciones en ppm y (molares): 25 ( $1.1 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ) y 200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ ) de butilate y 25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $4 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $1 \times 10^{-3}$ ), 300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ ) de molinate y 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ ) de etanol por 4 h.

Los testigos negativos fueron

- (1) el cultivo de sangre periférica +5-BrdU
- (2) el cultivo de sangre periférica + 5-BrdU + 500  $\mu\text{l}$  de la mezcla S10
- (3) el testigo positivo, el cultivo de sangre periférica + 5-BrdU+ 500  $\mu\text{l}$  de la mezcla S10 + etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$  M)

El tratamiento fue por 4 h (2 h en reposo más 2 h en agitación constante, 100 rpm) a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo todos los cultivos se centrifugaron a 1000 rpm

durante 10 min para eliminar el sobrenadante (en el cual se encontraban los metabolitos de las transformaciones del butilate, del molinate y del etanol, así como la fracción enzimática S10). Se lavaron dos veces con suero fisiológico de NaCl (0.9%, PISA) esterilizado y se les adicionó el medio Gibco RPMI 1640 complementado con 0.12 ml de fitohemaglutinina, más 100 µl de 5-BrdU y se continuó con la técnica descrita en el punto 2.1.

Todos los medios de cultivo, la 5-BrdU, la fitohemaglutinina, la mezcla S10, las soluciones madre del butilate, del molinate y del etanol se esterizaron por filtración miliporo (0.45 µm).

## 5. Evaluación de la cinética de proliferación celular y del índice mitótico

Con el objeto de estimar el posible efecto citotóxico de los dos herbicidas tiocarbámicos en los linfocitos humanos en cultivos se analizaron la cinética de proliferación celular a través del índice de replicación y también se estableció el índice mitótico. El índice de replicación se determinó examinando en 100 células metafásicas las que estuvieran en primera, segunda y tercera divisiones de acuerdo a Lamberti *et al.* (1983) de la siguiente forma:

$$\text{Índice de replicación (IR)} = M1 + 2M2 + 3M3/100$$

donde M1, M2 y M3 representaron los porcentajes de metafases de primera, segunda y tercera divisiones celulares. Se consideraron M1 aquellas células cuyo DNA se replicó una vez después de la adición de 5-BrdU, M2 a células cuyo DNA se replicó dos veces en presencia de la 5-BrdU y M3, aquellas que presentan mayor número de cromátidas bifilarmente incorporadas ya que estuvieron tres ciclos con la 5-BrdU (Fig. 3).

Para el índice mitótico se cuantificó el número de metafases en 1000 células estimuladas en cada experimento de la siguiente manera

$$\text{Índice mitótico (IM)} = \text{No. de metafases} / 1000 \text{ células estimuladas y}$$

$$\% \text{ IM} = \text{IM} \times 100$$

La cinética de proliferación celular se estimó al contrastar las células M1, M2 y M3 de la siguiente forma

a) M1, M2 y M3 contra el testigo negativo



- b) M1+ M1, M2 y M3 contra el testigo negativo
- c) M1+ M2 y M3 contra el testigo negativo
- d) M1+ M3 y M2 contra el testigo negativo
- e) M2 y M3 contra el testigo negativo
- f) M1 y M3 contra el testigo negativo
- g) M1 y M2 contra el testigo negativo

## 6. Análisis citogenético de los dos herbicidas sobre el DNA de las células meristemáticas de *Vicia faba*

### 6. 1. Tratamientos directos con butilate y molinate en las raíces de *Vicia faba*

Por otra parte, con la finalidad de verificar el efecto de los dos herbicidas en la planta misma se analizó la frecuencia de ICH en cromosomas de meristemas apicales de *Vicia faba* que ha probado ser un sistema sumamente sensible a mutágenos.

Las semillas de *Vicia faba* (var. minor) se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave, cuando las raíces alcanzaron una longitud de 1.5 a 2.0 cm de longitud, 10 plántulas se sometieron a una solución de 100  $\mu\text{M}$  de 5-bromodesoxiuridina (BrdU), 5  $\mu\text{M}$  de uridina (Urd) y 0.1  $\mu\text{M}$  de 5-fluorodesoxiuridina (FdU) para un primer ciclo de replicación por 20 h a temperatura de 21 °C en la obscuridad, después se limpiaron y se sumergieron 10 raíces para cada concentración en ppm y (molares): 25 ( $1.1 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ ) y 300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ ) de butilate y 25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $4 \times 10^{-4}$ ) y 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ) de molinate y el testigo fue solo agua destilada por 4 h a temperatura de 21 °C y en la obscuridad

Después del tratamiento las raíces se lavaron dos veces con agua de la llave y en una ocasión con agua destilada, se limpiaron y se introdujeron en una solución fresca de análogos: 100  $\mu\text{M}$  de BrdU, 5  $\mu\text{M}$  de Urd y 0.1  $\mu\text{M}$  de FdU (segundo ciclo de replicación) por 20 h, a 21 °C y en la obscuridad. Pasado este lapso, se cortaron 2 mm de las puntas, se colocaron en colchicina 0.5 % por 3 h en la obscuridad a 21 °C. Transcurrido este tiempo los meristemas se

transfirieron a ácido acético 100% a 21 °C en la obscuridad durante una hora, posteriormente fueron fijadas en etanol-ácido acético (3:1) por 48 h a -20 °C. A continuación se pusieron en etanol 70% en baño María a 28 °C por 15 min, posteriormente se trataron con HCl 5 N en baño María a 28 °C por 80 min, se les quitó el exceso del ácido lavándolos tres veces con agua destilada y se tiñeron con el reactivo de Schiff por 45 min a temperatura ambiente y en la obscuridad.

Los meristemos apicales una vez teñidos se sometieron a pectinasa 2% (disuelta en amortiguador de fosfatos de citratos, pH 4.7) en baño María a 28 °C por 25 min, después se pusieron en ácido acético 45% durante 10 min y se transfirieron a etanol 70% frío por 30 min (Scheid 1976).

Las laminillas se hicieron por aplastamiento del tejido en monocapa ('squash') utilizando ácido acético 45% y fueron hechas permanentes mediante la técnica del hielo seco (Conger y Fairchild 1953), deshidratando dos veces con butanol absoluto y se montaron con bálsamo de Canadá. Para su lectura, las preparaciones se reetiquetaron con clave desconocida para el observador.

Por cada concentración se utilizaron 4 laminillas como mínimo, registrando los ICH en 50 cromosomas metacéntricos (M) y 250 submetacéntricos (S), que corresponden a los cromosomas de 25 células.

## 7. Análisis estadístico

Para cuantificar los ICH se registraron 25 metafases de segunda división. Con el fin de evitar prejuicios en las observaciones se reetiquetaron las laminillas. En todos los casos se realizaron dos experimentos cuyos valores se compararon entre sí mediante análisis de varianza (ANOVA),  $P < 0.0001$ . Posteriormente a los promedios se les aplicó la prueba de comparación múltiple de Neuman-Keuls,  $P < 0.001$  y la  $X^2$  para los índices de replicación y mitótico,  $P < 0.05$ .

## 8. Determinación de proteínas totales por el método de Biorad

### 8. 1. Extractos de *Vicia faba* tratadas con butilate, molinate y etanol aplicados a los cultivos linfocitos humanos

La concentración de la proteína total en los extractos utilizados en los tratamientos con activación metabólica *in vivo*, se estimó utilizando el método de Biorad (Bradford 1976) en la siguiente forma:

#### Reactivo de Bradford

Se disolvieron 100 mg del colorante azul brillante G-250 85% (Aldrich), en 50 ml de etanol (Sigma) 95% de pureza y se aforó a un litro con ácido fosfórico (Aldrich) 85% de pureza. Esta mezcla se agitó durante 12 h en la obscuridad, posteriormente fue filtrada con papel filtro (no.4) y mantenida a 4 °C en un frasco ámbar.

A tubos de ensaye se les colocó 25 µl de los extractos de las raíces tratadas con las diferentes concentraciones de molinate, butilate y etanol, además los testigos: negativo (extractos de las raíces sin tratamiento) y positivo (extractos de las raíces tratadas con etanol  $1 \times 10^{-1}$  M) más 75 µl de agua destilada y 5 ml del reactivo de Bradford, se agitaron en un vórtex e inmediatamente se realizaron las lecturas a 565 nm en un Espectrofotómetro Zeiss PMQ11 que se llevó a cero en D.O (densidad óptica) con el blanco de SSB (blanco solución salina). Para el cálculo de las concentraciones de proteínas se realizó la curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA, Aldrich), haciendo diluciones a partir de una solución con una concentración de 1:1 con agua destilada. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

Se aplicó la prueba de ANOVA para establecer las diferencias estadísticas entre los grupos testigo y experimentales.

### 8. 2. Mezcla S10, sistema de activación metabólica *in vitro*

El contenido de proteínas totales en la mezcla S10 fue determinada en la fracción enzimática S10 de la raíz de *Vicia faba* sin tratamiento utilizada en el sistema de activación

vegetal *in vitro*, para que fuera constante en los 500  $\mu$ l agregados en la coincubación con los dos herbicidas, en los testigos negativo y positivo, en volúmenes de 25 y 50  $\mu$ l, las lecturas se realizaron como se explica en el punto 8.1 (Bradford 1976).

### 8.3. *Determinación del pH a los cultivos de linfocitos humanos en los sistemas de activación metabólica in vivo e in vitro*

Se valoró el pH de los cultivos de linfocitos humanos (1) tratados directamente por 4 y 48 h con las diferentes concentraciones de los herbicidas butilate y molinate, (2) con los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con las distintas concentraciones de ambos herbicidas y (3) junto con la mezcla y diferentes concentraciones de los herbicidas, asimismo, testigos negativo y positivo (de los sistema de activación *in vivo e in vitro*).

## V. RESULTADOS

### 1. Tratamientos directos con butilate, molinate y etanol a los cultivos de linfocitos humanos

Al aplicar directamente 6.25 ( $3 \times 10^{-5}$ ), 12.50 ( $5.8 \times 10^{-5}$ ), 50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ ) y 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ), de butilate y 25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $4 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ ) y 200 ( $1 \times 10^{-3}$ ) de molinate y de etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ ) a los cultivos de linfocitos humanos, no se modificaron las frecuencias de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), pero a concentraciones elevadas con ambos herbicidas se provocó la muerte celular (Tablas I y II)

### 2. Activación metabólica *in vivo*

#### 2.1. Aplicación de los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con las diferentes concentraciones de butilate, molinate y etanol a los cultivos de linfocitos humanos

Los valores de cada experimento y su réplica con los dos herbicidas no reflejaron diferencias significativas al compararse entre sí mediante el análisis de variancia (ANOVA),  $P < 0.0001$ , por tal razón, se agruparon los datos de las 50 observaciones y se promediaron, aplicándoles la prueba de Neuman-Keuls. En las tablas I y II, se nota que las diferencias con los testigos no son significativas.

Los extractos de las raíces tratadas con 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ ), 300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ ) y 400 ( $1.8 \times 10^{-3}$ ) de butilate y 100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $1 \times 10^{-3}$ ) y 300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ ), de molinate y 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ ) de etanol aplicados a los cultivos de linfocitos incrementaron significativamente las frecuencias de los ICH comparados con los testigos, aumentando conforme lo hace la concentración (Tablas I y II). Con 500 ppm ( $2.3 \times 10^{-3}$ ) de butilate se bloqueó la mitosis de los linfocitos en cultivo (Tabla I) y a partir de 400 ppm ( $2.1 \times 10^{-3}$ ) de molinate no hubo diferencias significativas en ICH con respecto a los testigos (Tablas II) pero tuvieron efecto tóxico para las raíces ya que produjeron necrosis celular, el análisis del tejido vegetal mostró deterioro celular e inhibición de la mitosis.

### **3. Activación metabólica *in vitro***

#### *3. 1. Coincubación de diferentes concentraciones de butilate, molinate y de etanol con los cultivos de linfocitos humanos*

Cuando se coincubaron 25 ( $1.1 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ ) y 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ) de butilate y 25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $4 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ ) y 200 ( $1 \times 10^{-3}$ ) de molinate y de etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ ) más los linfocitos, no hubo efecto sobre la inducción del ICH al ser contrastados con los testigos. En los caso del butilate a 200 ppm ( $9.2 \times 10^{-4}$ ) y del molinate a 300 ppm ( $1.6 \times 10^{-6}$ ) se provocó la muerte celular (Tablas III y IV).

#### *3. 2 Coincubación de la mezcla microsómica S10 de las raíces de Vicia faba con las diferentes concentraciones de butilate, molinate y de etanol y los cultivos de linfocitos humanos*

En presencia de la mezcla S10, con 25 de butilate ( $1.1 \times 10^{-4}$ ) y de molinate ( $1.3 \times 10^{-4}$ ) no se observó efecto sobre ICH en los linfocitos humanos en cultivo (Tablas III y IV), pero a partir de 50 de butilate ( $2.3 \times 10^{-4}$ ) y de molinate ( $1.3 \times 10^{-4}$ ) y 3600 ppm de etanol ( $1 \times 10^{-1}$ ), se obtuvo respuesta positiva en la inducción de ICH con respecto a los valores testigos (Tablas III y IV). Con el butilate hubo una relación concentración-respuesta, pero no con el molinate. Con 300 ppm ( $1.6 \times 10^{-3}$ ) de molinate no hubo influencia sobre el ICH ya que el valor fue similar al testigo a esta misma concentración con el butilate se produjo la muerte celular (Tablas III y IV).

### **4. Evaluación de la cinética de proliferación celular e índice mitótico**

En los tratamientos directos con 6 25 y 12 50 ppm de butilate por 48 h a los cultivos de linfocitos humanos (CLH), no hubo efecto sobre el IM y el IR, pero a partir de 50 ppm se retardó el ciclo celular y ascendió la frecuencia de células de primera división celular (M1). Los valores de

IR e IM descendieron hasta que se indujo la muerte celular (Tabla V). En el caso del molinate el efecto fue parecido con 25 y 50 ppm sobre los parámetros, pero a partir de 75 ppm se retrasó el ciclo y se incrementaron las células M1. Con 200 ppm el IM y en 300 ppm se produjo muerte celular (Tabla VI).

En el sistema de activación metabólica *in vivo*, al aplicar los extractos de las raíces tratadas con 100 y 200 ppm de butilate a los CLH por 48 h, no se alteró el IR y el IM, pero con 300 y 400 ppm el IM disminuyó, se aceleró el ciclo celular y aumentaron la frecuencia de células (M3), y a 500 ppm fue tóxico hasta que se ocasionó la muerte celular (Tabla V). Cuando se agregó el extracto de las raíces tratadas con 100 ppm de molinate a los CLH no se modificaron los parámetros pero con los extractos de las raíces tratadas con 200 y 300 ppm, el efecto fue inverso sobre la cinética de proliferación celular (CPC), ya que se incrementó M1 y disminuyó M3. El IM también se redujo (Tabla VI). Con 400 ppm de molinate, estos puntos fueron semejantes al testigo en los linfocitos ya que previamente tuvo acción tóxica para las raíces del haba (Tabla VI).

Al aplicar los tratamientos directos (4 h) con 25 y 50 ppm de butilate a los cultivos de linfocitos humanos, no hubo diferencias significativas en el índice mitótico (IM) y el índice de replicación (IR), con respecto al testigo, pero 75 y 100 ppm produjeron aceleración del ciclo y aumento en la frecuencia de células de tercer ciclo (M3) y con 200 ppm se causó la muerte celular (Tabla VII). Los efectos fueron similares en el caso del molinate, con el mismo esquema de tratamiento, notándose que con 25, 50, 75, 100 y 200 ppm disminuyeron los valores del IM (Tabla VIII) y con 300 ppm se indujo la muerte celular (Tabla VIII).

Cuando se coincubaron los dos herbicidas con la mezcla S10 más los CLH (sistema de activación metabólica *in vitro*), con 25, 50, 75 y 100 de butilate no se mostraron efectos sobre la CPC, pero con 200 ppm se estimuló la CPC e incrementaron las células M3 con relación al testigo y con 300 ppm se ocasionó la muerte celular (Tabla VII), este comportamiento fue semejante con 25, 50, 75, 100, 200 y 300 ppm de molinate y no tuvo efecto sobre el ciclo celular (Tabla VIII).

Por otra parte, los tratamientos con etanol sin y con activación metabólica *in vivo* e *in vitro* no tuvieron acción sobre la CPC y el IM con respecto al testigo (CLH más 5-BrdU) (Tablas V a VIII). Sin embargo, este compuesto con y sin activación *in vitro* estimuló el ciclo celular y aumentó la frecuencia de células M3 (Tablas VII y VIII). La fracción enzimática y la

mezcla S10 de las raíces de *Vicia faba* utilizadas en los dos sistemas de activación metabólica *in vivo* e *in vitro* no interfirieron sobre los criterios evaluados al ser comparados con el testigo (Tablas V a VIII).

#### 5. Análisis citogenético del butilate y molinate sobre el DNA de las células meristemáticas de *Vicia faba*

La frecuencia de los ICH en los dos experimentos con los dos herbicidas no mostraron diferencias significativas entre sí mediante el análisis de varianza (ANOVA), por tal razón se agruparon los datos de las 50 observaciones, y se promediaron, aplicándoles la prueba de comparación múltiple de Neuman-Keuls (Tabla IX) y notándose que con 25 ( $1.1 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ ) y 75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ) y 200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ ) de butilate y 25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $4 \times 10^{-4}$ ) y 200 ( $5.3 \times 10^{-4}$ ) de molinate la inducción ICH fue significativa y se incrementó en relación directa con la concentración. Con 300 ppm ( $1.4 \times 10^{-3}$ ) de butilate y 100 ppm ( $4.6 \times 10^{-4}$ ) de molinate se inhibió la mitosis (Tabla IX).

#### 6. Análisis estadístico

En los tres sistemas de evaluación se llevaron a cabo 2 experimentos, para cuantificar la frecuencia de ICH se registraron 25 metafases de segunda división para cada caso, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos y la de comparación múltiple de Newman-Keuls entre los testigos y los experimentales (Tablas I a IV y IX). Para el análisis estadístico de los índices de replicación y mitótico se usó la  $\chi^2$ . Para los niveles de proteínas en los extractos de *Vicia faba* tratadas con las diferentes concentraciones de los dos herbicidas y en la mezcla S10, se aplicó el análisis de ANOVA (Tablas XIV y XV).



## 7. Determinación de proteínas totales por el método de Biorad

### 7.1 Activación metabólica *in vivo*

#### 7.1.1. Extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con butilate, molinate y etanol aplicados a los cultivos de linfocitos humanos

El contenido de proteínas totales en los extractos de las raíces tratadas con 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ ), 300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ ), 400 ( $1.8 \times 10^{-3}$ ), 500 ( $2.3 \times 10^{-3}$ ), 750 ( $3.4 \times 10^{-3}$ ), 1000 ( $4.6 \times 10^{-3}$ ), 1500 ( $6.9 \times 10^{-3}$ ), 2000 ( $9.2 \times 10^{-3}$ ) de butilate y 100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $1 \times 10^{-4}$ ) y 300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ ) de molinate no variaron significativamente con respecto al valor testigo (Tablas X y XI). No obstante, a partir de 400 ( $2.1 \times 10^{-3}$ ) de molinate disminuyeron significativamente al ser comparados con el valor testigo (Tabla XI).

### 7.2. Activación metabólica *in vitro* (Mezcla S10)

En el sistema de activación metabólica *in vitro* la concentración de proteínas usada en la mezcla S10 fue constante de 10 mg/500  $\mu$ l en los dos experimentos.

## 8. Determinación del pH de los cultivos de linfocitos humanos

### 8.1. Activación metabólica *in vivo*

El pH de los cultivos de linfocitos humanos en los tratamientos directos y con los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con las diferentes concentraciones de butilate, de molinate y de etanol a las 48 h y 70 h de iniciado el cultivo no se modificó (Tablas XII y XIII).

## 8. 2. Activación metabólica *in vitro*

El pH de los cultivos de linfocitos humanos coincubados con las diferentes concentraciones de los herbicidas y del etanol a las 48 h y 70 h de iniciado el cultivo no se alteró con respecto al testigo y al rango fisiológico normal (Tablas XIII y XIV), lo mismo ocurrió en el sistema de activación *in vitro* (CLH más la mezcla S10 y las diferentes concentraciones de los dos herbicidas) (Tablas XIV y XV).

## VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se evidencia a través de los tratamientos directos con ambos herbicidas que no son mutágenos directos en los cultivos de linfocitos humanos (CLH) ya que no hubo respuesta al aplicarlos (Tablas I y II). Los resultados negativos con el butilate directo concuerdan con los encontrados por Plewa *et al.* (1984), ya que no detectan efecto mutagénico de este compuesto con el ensayo en el locus ceroso (*waxy*) de maíz. Kuroda *et al.* (1992), describen efectos negativos con el molinate en la inducción de ICH en células V79 de criceto dorado en la prueba de Rec de *Bacillus subtilis*.

Cuando se aplicaron los extractos de las raíces tratadas con los dos herbicidas en los CLH por 48 horas se observa respuesta positiva al incrementar las frecuencias de ICH (Tablas I y II). Esto demuestra que ambos herbicidas requieren del metabolismo de *Vicia faba* para producir daño al DNA, lo que significa que el sistema enzimático de la raíz del haba transforma ambos herbicidas en metabolitos mutagénicos o en productos altamente reactivos al DNA.

Los herbicidas tiocarbámicos butilate y molinate son fácil y rápidamente transportados y metabolizados en las hojas, en los coleóptilos y en las raíces de varias especies vegetales y transferidos a tallos, hojas y frutos. Los pasos iniciales de su biotransformación en plantas y en mamíferos ocurren por sulfoxidación y N-desalquilación (reacciones de la Fase I), catalizadas principalmente por el grupo de monooxigenasas dependientes del sistema citocromo P-450 conocidas como oxidasas de función mixta (OFM) para formar sulfóxidos de molinate y butilate (Figs. 6 a 8), N-alquilados y de sulfonas; los productos oxidados son conjugados con el glutatión (GSH) por el sistema enzimático de GSH-S-T transferasas o sin la intervención de enzimas (reacciones de Fase II) (Casida *et al.* 1974, 1975a, b, Lay *et al.* 1975, Hubell y Casida 1977, Debaun *et al.* 1978a,b, Tjeerdema y Grosby 1987). En los animales, los conjugados son eliminados en la orina en forma de ácidos mercaptúricos y en las plantas almacenados y/o incorporados en diversos componentes de la célula vegetal (reacciones de Fase III) (Figs. 6 a 8) (Casida *et al.* 1974, 1975a,b, Lay *et al.* 1975, Fang 1975, Hubell y Casida 1977, Nakamura *et al.* 1977, Carringer *et al.* 1978, Debaun *et al.* 1978a, b, Imai y Kuwatsuka 1984).

Trabajos recientes sobre el metabolismo del herbicida tiocarbámico EPTC ó eptam (cuya estructura química es similar al butilate) en fracciones microsómicas aisladas de coleóptilos y de

raíces de maíz, han evidenciado la formación de sulfóxido de EPTC, por sulfoxidación dependiente de la citocromo P450 (Jablonkai y Hatzios 1994).

Como varios estudios han indicado que las formas activas de los herbicidas son los sulfóxidos tiocarbámicos que tienen acción alquilante (Fuerts 1987), posiblemente los sulfóxidos de molinate y butilate estén implicados en el daño genético provocado en los linfocitos en cultivo ya que estos metabolitos se comportan como agentes alquilantes y son las formas activas de esta clase de herbicidas, por lo tanto, son los candidatos para interactuar potencialmente con el DNA (Figs. 1 y 2) (Lay *et al.* 1975, Hubell y Casida 1977, Carringer *et al.* 1978). Otra manera potencial de daño de estos productos metabólicos es la posibilidad de unirse covalentemente a biomoléculas que contienen grupos sulfhidrilos o tiol que pueden interferir con el metabolismo de la CoA u otros procesos bioquímicos (Carringer *et al.* 1978, Caldwell 1984, Hellyer *et al.* 1985) Su conjugación con el GSH es un ejemplo de su reactividad química al unirse covalentemente con una molécula sulfhidrilo, alternativamente los conjugados CoA con los sulfóxidos pueden obstaculizar competitivamente otras reacciones que utilizan la acetil CoA u otros intermediarios CoA. Además los conjugados CoA son formados *in vivo* en ciertos tejidos de mamíferos y se ha sugerido que estos podrían inhibir enzimas cuyos sustratos son la CoA o acilCoA (Figs. 1 y 2) (Lay *et al.* 1975, Carringer *et al.* 1978, Lamoreux y Frear 1979, Leavit y Penner 1979, Caldwell 1984, Harwood 1989) También es probable la alquilación de las enzimas que tienen grupos tiol como sitios activos o alostéricos, como la coenzima A involucrada en varios procesos metabólicos de las células vegetales y animales (Fuerts 1987).

Investigaciones recientes en mamíferos han demostrado inhibición de la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) en mitocondrias de hígado de ratones inyectados intraperitonealmente con 8 mg/Kg de tiobencarb, pebulate, vernolate, trialate, cicloate, eptam o EPTC, molinate y sus metabolitos sulfóxidos después de 2 h del tratamiento. Posterior a la aplicación 40 mg/kg de los mismos herbicidas se administra etanol (1000 mg/kg) y muestran el mismo efecto sobre la ALDH pero correlacionado con el aumento de la concentración del acetaldehído en sangre y en cerebro, de los 8 tiocarbamatos administrados, el EPTC y sus metabolitos fueron inhibidores más potentes de la ALDH y en menor grado el butilate y sus metabolitos (Quistad *et al.* 1994).

La correlación de la toxicidad observada en las raíces tratadas a concentraciones mayores de molinate con el bajo contenido de proteínas (Tabla XV), aún cuando se iguala a la misma

concentración del testigo, apoya el hecho de que al morir las células de la raíz no ocurre el metabolismo del herbicida y por lo tanto no se presentan actividades genotóxica ni citotóxica en las células humanas en cultivo al aplicarle los extractos. Mientras que en el caso de los tratamientos con butilate a las mismas concentraciones no hubo toxicidad y el tejido vegetal se observa normal, conteniendo la cantidad de proteínas similar en todos los casos (Tablas XIV y XV). Sin embargo, a concentraciones mayores los extractos tienen acción tóxica para los cultivos de linfocitos ya que no se encuentran células de ningún ciclo de división, pero se hallan algunos núcleos estimulados, lo que puede explicarse con base en la respuesta de toxicidad diferencial de las células humanas a los metabolitos del herbicida. Es decir el molinate es altamente tóxico para las células vegetales, mientras que el butilate lo es para las humanas (Tablas I y II).

Cuando molinate y butilate son ensayados directamente con la mezcla S10 (sistema de activación *in vitro*) se confirma la capacidad de biotransformación llevada a cabo *in vivo* por la raíz de *Vicia faba* con la constitución de metabolitos altamente reactivos al DNA, reflejado en la inducción significativa de ICH en células humanas (Tablas III y IV)

A pesar de que algunos estudios han demostrado que no hay muchas variaciones en los experimentos de activación mutagénica con sistemas de plantas completas y homogeneizados (Streibig 1988), en esta investigación se notan diferencias en la respuesta genética, ya que en el método de activación *in vitro* se observa que a partir de 50 ppm de butilate la inducción de ICH es exponencial, mientras que para el molinate el comportamiento es asintótico (Tablas III y IV). El incremento de ICH al coincubar el molinate más los cultivos de linfocitos con la mezcla S10 (sistema de activación metabólica *in vitro*) donde se observa significancia con 50 y 75 ppm y con 100 y 200 ppm fue asintótica, posteriormente los valores declinan hacia las cifras del testigo (Tabla IV). Se puede inferir que la meseta mencionada (Tabla IV) sea el resultado de una saturación enzimática con respecto a la concentración del herbicida, comportamiento semejante al observado en las enzimas Mikhaelianas. El decremento de ICH a frecuencias del testigo en 300 ppm de molinate posiblemente sea debido a la desnaturalización de las enzimas contenidas en la fracción S10, ocasionada por la elevada concentración del plaguicida, sin que hayan sido afectadas las células humanas pues no se observa inhibición de la mitosis ni daño citogenético (Tabla IV). Además al comparar la respuesta genotóxica, es mayor en la activación *in vivo* que en el esquema *in vitro* y se nota una clara relación concentración-respuesta (Tablas I a IV). Las diferencias en las frecuencias de ICH en los linfocitos entre los dos procedimientos de activación

metabólica (*in vivo e in vitro*) puede estar relacionada con el tiempo de exposición de las células a los metabolitos activos ya que en el ensayo *in vivo* son incubadas por 48 h mientras que en el sistema *in vitro* únicamente 4 horas y probablemente en ambos métodos activación se formen los mismos metabolitos por las reacciones de oxidación asistidas por el sistema MFO, pero con distintas concentraciones y actividades sobre los linfocitos en cultivo.

En experimentos sobre el metabolismo de algunos herbicidas en cultivos de células vegetales y en plantas completas de varias especies se han obtenido curvas similares de concentración-respuesta, concluyendo que no hay diferencias cualitativas en el metabolismo de los herbicidas en ambos sistemas (Zilkah y Gressel 1977, Schuphan *et al.* 1979, 1984, Camper y McDonald 1989, Harm y Kottuts 1990, Olofsdotter *et al.* 1994) No obstante pueden existir variaciones cuantitativas entre los dos ensayos por numerosos factores que afectan la respuesta en las células en cultivo con una fracción enzimática como son la ausencia de membrana y de pared celular, de tejidos y de organelos; por el contenido y/o tipo de proteínas, en sus actividades enzimáticas y biológicas, ocurriendo dos tipos respuestas la positiva en *in vivo* y la negativa *in vitro* o lo contrario (Casida *et al.* 1974, 1975, Carringer *et al.* 1978, Barak *et al.* 1983, Hess 1985, 1987, Grover 1988, Grover y Cessna 1991, Hatzios 1991). Sin embargo, en este trabajo se evidenció respuesta genotóxica positiva en los dos esquemas de activación metabólica pero con diferencias cualitativas y cuantitativas en la inducción de ICH y en las concentraciones utilizadas de los dos herbicidas.

En el sistema activación *in vitro* se utilizaron concentraciones más bajas, debido a que los dos tiocarbámicos estuvieron directamente con la fracción enzimática S10, no así cuando se aplicaron a las raíces, las vías de entrada, absorción y translocación fueron diferentes ya que en muchos casos pueden atravesar la pared celular o la membrana plasmática a los organelos celulares hasta alcanzar su sitio de acción, almacenarse y causar fitotoxicidad. Las características bioquímicas de la molécula herbicida, incluyendo sus propiedades lipofílicas y la acidez, son esenciales en la permeabilidad de las membranas celulares para que la célula vegetal controle la absorción y la incorporación. Muchos herbicidas se mueven a través de membranas celulares vía difusión no facilitada debido a que la bicapa lipídica es permeable a xenobióticos neutros y lipofílicos. La absorción activa de los herbicidas lipofílicos, iónicos o ácidos débiles pueden ser mediados por un mecanismo de canales iónicos, en donde la forma menos lipofílica o aniónica se deposita en compartimientos alcalinos de la célula, también los herbicidas pueden acumularse en

las células vegetales por conversión de metabolitos no fitotóxicos uniéndose a los constituyentes celulares ó a los lípidos. Existen evidencias de que también los herbicidas tiocarbámicos se mueven a través de las membranas celulares mediante procesos mediados acarreadores donde su incorporación es dependiente de energía y la absorción puede ser saturada y/o disminuída por inhibidores metabólicos y compuestos de estructuras similares (Nalejawa 1964, Nalejawa *et al.* 1968, Nakamura *et al.* 1977, Schupan *et al.* 1984, Devine 1989, Devine y Vanden-Born 1991, Hatzios 1991, Sterling 1994). La exposición de las raíces de *Vicia faba* por 4 h, con las concentraciones del butilate y de molinate, manifestaron ser las adecuadas para su absorción y transporte, a través de la membrana y pared celulares de raíz de *Vicia faba* y su posterior modificación enzimática, dentro de la célula vegetal, a metabolitos genotóxicos que interaccionaron con el DNA de los linfocitos en cultivo.

Para tener la certeza de la capacidad metabólica de la raíz de *Vicia faba* tanto *in vivo* como *in vitro*, se empleó al etanol como testigo positivo que mostró ser un promutágeno activado por el haba en ambos sistemas al duplicar el valor de los ICH sobre los linfocitos, que cuando se aplicó directamente. Este comportamiento concuerda con el obtenido por Takehisa y Kanaya (1983,1986), Takehisa *et al.* (1982, 1988) en células de criceto dorado y en linfocitos humanos por Calderón-Segura (1993) y Gómez-Arroyo *et al.* (1995) con el mismo sistema de activación vegetal. El etanol es metabolizado a acetaldehído por la acción de la enzima citosólica alcohol deshidrogenasa (ADH), la cual requiere al nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) como cofactor y a ácido acético por la aldehído deshidrogenasa (ALDH) dependiente de NAD, reacción que ocurre principalmente en las mitocondrias y en el citoplasma. El acetaldehído es el principal inductor de ICH en linfocitos humanos *in vitro* en presencia de la enzima ADH y del cofactor NAD (Obe y Ristow 1970, Obe *et al.* 1979, 1986).

Adicionalmente al análisis citogenético, en ésta investigación se evaluaron los efectos que sobre el cultivo de linfocitos tienen los dos herbicidas tiocarbámicos mediante la cinética de proliferación celular a través del índice de replicación, así como también se hicieron determinaciones del índice mitótico para detectar la citotoxicidad, encontrándose que en los tratamientos de 48 horas en los cuales se aplicó el butilate directamente a los cultivos, se observa que en las concentraciones de 50, 75 y 100 ppm aumenta la cantidad de células M1 y disminuye las de M3, lo que implica que este herbicida está provocando un retraso en la progresión del ciclo celular, este hecho se refleja en la disminución del índice de replicación. En el IM se nota que a

medida que se incrementa la concentración disminuyen los valores hasta que se provoca la muerte celular, en estos casos no se encuentran núcleos estimulados (Tabla V)

En los tratamientos de 48 horas con los extractos de la raíz de *V. faba* que contienen los metabolitos del butilate, se observa un comportamiento totalmente distinto, ya que en las concentraciones mayores (300 y 400 ppm) disminuye la cantidad de células M1 y aumentan las M3, lo cual significa que hay una aceleración del ciclo celular, lo que sugiere que se está ocasionando un estímulo. Sin embargo, este hecho no se refleja en el IR donde las diferencias no son significativas, lo cual justifica el empleo de la  $\chi^2$  modificada que permite contrastar de manera independiente las células M1, M2 y M3. Con respecto al IM, se advierte que disminuye a medida que aumenta la concentración, hasta que se produce la muerte celular, en donde tampoco se encontraron células estimuladas (Tabla V).

Con el molinate en los tratamientos directos al cultivo de linfocitos por 48 horas se evidencia un comportamiento similar al del butilate. A partir de 75 ppm se incrementa la cantidad de células M1 y decrece la de M3, lo que significa que este herbicida también causa retraso en la progresión del ciclo celular, este efecto se ve claramente reflejado en el IR, que decrece respecto al testigo de acuerdo a la concentración. El IM a partir de 50 ppm se reduce de manera proporcional a la concentración del molinate, hasta originar la muerte celular, ya que no se observaron células estimuladas (Tabla VI).

En los tratamientos en los cuales se aplican por 48 horas los extractos de *V. faba* que contienen los metabolitos del molinate, solo en 200 y 300 ppm se observa efecto, ya que se incrementa la cantidad de células M1 y disminuyen las M3, al igual que con el butilate se está provocando retraso en la progresión del ciclo, este hecho se evidencia en la disminución del IR. En 400 ppm no hay cambios en estos parámetros, debido a que el molinate causa la necrosis de las raíces de *Vicia faba*, lo que probablemente evita que se realice el metabolismo del herbicida y por lo tanto no hay efecto (Tabla VI).

Respecto al IM se observa que a medida que aumenta la concentración disminuyen los valores, sin llegar a inhibir la mitosis. El hecho de encontrar diferencias significativas en 400 ppm, implica que el IM es un criterio de evaluación sumamente sensible, ya que es probable que antes de morir las células de *V. faba* llevan a cabo cierta actividad que produce metabolitos en bajas cantidades, que no es posible detectar con el ICH y el IR



Al aplicar a los linfocitos por 48 horas el extracto de *V. faba* sin tratamiento (fracción S10), ninguno de los puntos analizados se altera. Este mismo comportamiento es observado para el etanol agregado en forma directa o en los extractos que contienen sus metabolitos (Tablas V y VI)

En los tratamientos de 4 horas en los cuales se induce el metabolismo *in vitro*, se nota que con butilate se provoca disminución de células M1 y aumento de M3, lo cual como anteriormente se menciona significa que este herbicida produce aceleración del ciclo, sin embargo otra vez, este hecho no se refleja en el IR. Con respecto al IM en estas condiciones de tratamiento por 4 horas no hay una caída paulatina, ya que en 200 ppm se produce la muerte celular. Cuando además del butilate se adiciona la mezcla S10, a partir de 75 ppm se observa el mismo comportamiento, pero se disminuye la toxicidad ya que la muerte celular ocurre en 300 ppm (Tabla VII).

Con el molinate aplicado directo a los linfocitos por 4 horas en los ensayos de metabolismo *in vitro* se advierte nuevamente la disminución de células M1 y el aumento de M3 únicamente en 100 y 200 ppm, en este caso dicho fenómeno tampoco se refleja en el IR. En relación al IM a partir de 50 ppm se aprecia que baja de manera similar en todas las concentraciones y en la mayor (300 ppm) sucede la muerte celular. Al agregar además del molinate la mezcla S10 a los cultivos de linfocitos no se perciben diferencias significativas en ninguno de los casos, por lo que al ser metabolizado el herbicida es menor su toxicidad (Tabla VIII).

Al añadir a los cultivos solamente la mezcla S10, no se observan alteraciones, mientras que con el etanol, con y sin la mezcla se encuentra aceleración en la progresión del ciclo, ya que hay disminución de células M1 y M2 y aumento de M3, de nuevo este comportamiento no se ve reflejado en el IR. El IM no se altera (Tablas VII y VIII).

El retraso de la progresión del ciclo celular de los linfocitos humanos en cultivo provocado por el butilate y el molinate y sus metabolitos, indica que posiblemente las moléculas originales de los dos herbicidas y sus productos de la activación, interfirieron con la estimulación de la fitohemaglutinina, con la disponibilidad de los nutrientes y otros factores que afectaron a las células humanas a proseguir su ciclo celular normal. Kuroda *et al.* (1992) encuentran disminución del índice mitótico (IM), en las células de la línea VT9 de criceto dorado *in vitro* dependientes de las diversas concentraciones entre 10 y 100 ppm de molinate aplicadas. Este comportamiento coincide con el del butilate y molinate agregados directamente (tratamiento por 48 h) y el molinate activado *in vivo* (Tablas V y VI).

La modificación de la proliferación celular de los linfocitos humanos inducida por un mitógeno ha sido propuesta como un biomarcador de daño de exposición a los agentes tóxicos (Snyder y Valle 1991, Rojas *et al.* 1992, Ostrosky 1994, Gonsebatt *et al.* 1995). Muchos agentes químicos que son inmunosupresores en los seres humanos, también muestran acción carcinogénica (Tomatis *et al.* 1989). Sin embargo no existen evidencias que demuestren alguna correlación entre éstos dos procesos, pero se ha sugerido que si un agente químico carcinogénico altera los patrones normales de la proliferación o diferenciación celular debe ser considerado como un agente inmunotóxico (Luster *et al.* 1992).

El estímulo de la proliferación de los linfocitos al ser tratados con el molinate, el etanol activado *in vitro*, el butilato y sus metabolitos quizás se deba a que aumentan la respuesta mitogénica a la fitohemaglutinina y/o activan a proteínas u otros factores que inducen el proceso de división celular.

La respuesta de los linfocitos en cultivo a la exposición de los dos compuestos tiocarbámicos y a sus metabolitos, en los dos esquemas de activación metabólica *in vivo* e *in vitro*, fue diferencial, siendo las células más sensibles al daño a tiempos más prologandos (48 h), que a los tratamientos cortos (4 h), posiblemente las diferencias de los efectos sobre la proliferación celular y el índice mitótico se deba al tiempo de tratamiento y a la sensibilidad de las poblaciones celulares con DNA sustituido por la 5-BrdU, ya que en el método *in vivo* se aplican tratamientos por 48 h, en células de 24 h cultivo cuyo DNA se duplica en presencia de la 5-BrdU y no están sustituidas sus hebras, mientras que en el ensayo *in vitro* por 4 h es en células que fueron sembrados 48 horas antes, las cuales han pasado un ciclo en presencia del análogo y sus cromátidas están unifilarmente incorporadas

Con la fracción S10 y el etanol activado *in vivo* no se observa efecto sobre la proliferación y el índice mitótico, datos que se corroboran a los obtenidos por Calderón-Segura (1993) y Gómez-Arroyo *et al.* (1995), con el mismo sistema de activación vegetal

Las alteraciones de la proliferación celular y el índice mitótico de los linfocitos en cultivo puede indicar la actividad inmunotóxica de los plaguicidas, lo cual debe ser considerado como un riesgo inicial para la salud humana y animal, ya que de ésta clase de herbicidas son muy escasas las investigaciones sobre estos criterios de evaluación

El efecto citogenético obtenido en las células de los meristemos apicales de la raíz de *Vicia faba* con ambos tiocarbamatos indicó que no sólo el DNA de las células humanas es el blanco de acción sino también el de la planta misma. El promedio de 30.32 ICH/metafases en el testigo (raíces de *Vicia faba*, sin tratamiento), coincide con los valores descritos por Kihlman y Andersson (1982, 1984), para cromosomas cuyo DNA ha pasado por dos ciclos de replicación en presencia de la 5-BrdU (TB-BB, Fig. 3) y de otros estudios con el haba (Kihlman y Kronborg 1975, Scheid 1976), al igual que en el sistema *in vivo*, se encontró un claro comportamiento de concentración-respuesta y se observó que de los dos herbicidas ensayados, el molinate tiene mayor efecto fitotóxico que el butilate (Tabla IX). A pesar de que hay pocas investigaciones sobre efectos genéticos inducidos por los herbicidas tiocarbámicos en vegetales, se ha descrito que el dialate y el trialate provocan aberraciones cromosómicas, células multinucleadas, micronúcleos, alteraciones en la morfología de los cromosomas e inhiben la mitosis en meristemos apicales de hojas de trigo (Nalewaja 1964, Nalewaja *et al.* 1968, Banting 1970, Hess 1987, Vaughn y Lehnen 1991). Gómez-Arroyo *et al.* (1992), producen con el molinate aberraciones cromosómicas en metafase como rompimientos cromatídicos e isocromatídicos y anillos cromatídicos; en anafase, fragmentos y puentes sencillos, cromosomas con el centrómero inactivado, isocromosomas y alteraciones en el huso mitótico, en concentraciones mayores causa muerte celular. Estos resultados apoyan que el molinate y quizás el butilate se comportan como agentes alquilantes y por lo tanto con un comportamiento S-dependiente en la inducción de los ICH tanto en células vegetales como en las animales (Carringer *et al.* 1978, Lamoreux y Frear 1979, Leavit y Penner 1979, Caldwell 1984), ya que el ICH es considerado como un evento que requiere de la fase de síntesis (S) (Painter 1982).

Por otra parte, cuando se ensaya la actividad mutagénica de agentes químicos por el metabolismo animal o vegetal, *in vitro* o *in vivo*, en ambos sistemas el efecto depende no únicamente de la estructura y de la dosis de estos agentes sino que existen otros factores, tales como el estado del ciclo celular en el momento de la exposición, la tensión de oxígeno y bióxido de carbono, la luz, el pH, la temperatura y el contenido de proteínas de la fracción microsómica aislada de la planta y de la planta misma en el momento del tratamiento (Brusick 1986, Kurkdjian y Gruern 1989, Kanaya *et al.* 1992). Estos factores correlacionados con las propiedades fisicoquímicas del compuesto pueden dar respuestas falsas positivas en células humanas en

cultivo, sin que necesariamente se deban a los metabolitos involucrados (Brusick 1986, Streibig 1988, Kanaya *et al.* 1992, Olofsdotter *et al.* 1994, Sterling 1994).

En los experimentos realizados tanto con los extractos de las raíces de *Vicia faba* como con la mezcla S10 con el butilate, el molinate y los testigos negativo y positivo aplicados a los cultivos de linfocitos humanos de 4 h y 48 h de tratamiento, el pH osciló entre 7.0-7.2 (Tablas XII a XV), rango normal que no tiene influencia sobre el efecto mutagénico. La concentración de proteína utilizada fue constante en la mezcla S10 (activación metabólica *in vitro*) y en los extractos de las raíces tratadas con los dos herbicidas y los testigos positivos, aplicados a los cultivos de linfocitos en los dos experimentos, excepto para las concentraciones mayores de molinate las cuales disminuyeron significativamente, en este caso se llevó a igual concentración con la fracción microsómica S10. Este efecto secundario fue similar al obtenido con el insecticida propoxur con el mismo esquema de tratamiento (Gómez-Arroyo *et al.* 1995), el cual es inducido por la mayoría de los tiocarbámicos en diferentes órganos de diversas especies de plantas (Ashton *et al.* 1977, Fuerts 1987, Mann *et al.* 1965, Moreland *et al.* 1969).

Los resultados mostrados en las tablas (I a IV y IX), indican que ambos herbicidas son eficientes inductores de ICH tanto *in vivo* como *in vitro* en linfocitos humanos en cultivo, previa activación metabólica por *Vicia faba* y en el DNA de las células meristemáticas de la planta misma. Muchos agentes químicos han mostrado ser mutagénicos y/o carcinogénicos tanto en sistemas animales como en vegetales *in vitro* e *in vivo*. Otros compuestos inducen daño *in vivo* pero *in vitro* no o viceversa o son débilmente positivos Xing y Zhang (1990) demostraron efecto mutagénico más potente en meristemas apicales de *Vicia faba* de 12 agentes inductores de ICH que en cultivo de linfocitos humanos. Asimismo, Zhang *et al.* (1991) comprobaron el mismo efecto con otros compuestos en meristemas de raíces de *Vicia faba*, *Hordeum vulgare* y *Secale cereale*. La respuesta mutagénica provocada por los dos herbicidas sobre el DNA de las células meristemáticas de *Vicia faba*, siendo más potente el butilate que el molinate aunque este último más fitotóxico (Tablas IX) corrobora que esta planta es un sensor de agentes químicos mutagénicos y que la utilización de los ICH tanto en plantas como en animales es un método citogenético adecuado para detectar mutágenos y/o carcinógenos químicos (Kihlman 1975, Grant 1994).

## VII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados de esta investigación se puede concluir lo siguiente

- Los herbicidas tiocarbámicos butilate y molinate son mutágenos indirectos que se activan a través del metabolismo vegetal.
- Los extractos de *Vicia faba* obtenidos de las raíces expuestas a butilate y molinate (tratamientos *in vivo*) contenían los metabolitos que fueron capaces de inducir ICH de manera significativa, con una clara respuesta de concentración-efecto
- Al coincubar *in vitro*, los dos herbicidas con la mezcla S10 de las raíces de *Vicia faba* y los linfocitos humanos en cultivo, se llevó a cabo su biotransformación y al ser activados provocaron ICH, siendo una respuesta asintótica para el caso del molinate y de concentración-efecto la del butilate.
- Los linfocitos en cultivo disminuyen sus índices de replicación y mitótico, cuando son tratados por 48 horas con los extractos de las raíces tratadas *in vivo* con butilate y molinate, presentando respuesta concentración-efecto. En el caso del butilate se observa estímulo en la división de los linfocitos humanos y a concentraciones elevadas disminuye el índice mitótico.
- El butilate sin y con activación metabólica por la mezcla S10, estimula el ciclo celular de los linfocitos en cultivo y no modifica su índice mitótico. Con el molinate tiene el mismo efecto sobre el ciclo, pero disminuye el índice mitótico y no cambia el índice de replicación. Sin embargo, activado *in vitro* no altera ninguno de los parámetros.
- Los índices de replicación y mitótico de los linfocitos, estimulados por la fitohemaglutinina son más afectados por los dos herbicidas tiocarbámicos sin y con activación metabólica *in vivo* y con tratamientos más prolongados.

- El butilate con y sin activación metabólica por la raíz de *Vicia faba in vivo e in vitro*, es más tóxico en los linfocitos humanos, que el molinate.
- Los dos herbicidas tiocarbámicos a concentraciones elevadas inhiben la mitosis de las células meristemáticas de *Vicia faba* y ocasionan la muerte celular de los linfocitos humanos en cultivo. Pero el molinate es más fitotóxico para la raíz de *Vicia faba* que el butilate y éste último lo es para los linfocitos.
- El butilate y el molinate son genotóxicos en las células meristemáticas de *Vicia faba* al incrementar significativamente los ICH, de manera dependiente a la concentración
- La raíz de *Vicia faba* es un biomonitor de daño genotóxico de herbicidas tiocarbámicos y de promutágenos, mostrado por el aumento significativo de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), en los cromosomas de la planta misma y en los linfocitos humanos en cultivo, aunado a este efecto se evidencia su acción citotóxica al provocar muerte celular a concentraciones elevadas.
- Los herbicidas molinate y butilate son plaguicidas que en nuestro país son asperjados en los cultivos de maíz y arroz de manera irracional y en condiciones inapropiadas de protección y el hecho de que esta planta biotransforme a estos compuestos y ejerzan su acción sobre el DNA y alteren la proliferación de las células del sistema inmune, deben de considerarse ya que pueden representar un peligro potencial para la salud humana y animal, tanto la molécula original como sus metabolitos, ya que estos últimos podrían quedar almacenados e inactivos en la célula de cualquier órgano como en las hojas, en los tallos o en los frutos de los cultivos y en el momento de ser ingeridos por los seres humanos y los animales, posiblemente les induzcan este tipo de alteraciones u otros efectos fisiológicos y metabólicos.

## VIII. REFERENCIAS

- Anina I. A., Medved I. L. y Proklin T. L. (1975). Gonadotoxic action of pesticidal thiocarbamate acid derivatives. *Farmakol Toksikol. (Moscú)* **38**, 90-93.
- Akulov A. A. V., Verkhovskiy A. P. y Yerdokimov S. M. (1972) Triallate poisoning of animals *Veterinariya* **10**, 105-106.
- Ashton F. M., De Villiers O.T., Glenn R.K. y Duke W. B. (1977). Localization of metabolic sites of action of herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**, 122-141
- Ashton F. M. y Grafts A. S. (1981). Thiocarbamate. En: *In mode of action of herbicides* Wiley, Nueva York, pp. 303-327.
- Bailey H. C. (1993). Acute and chronic toxicity of the rice herbicides thiobencarb and molinate to opossum shrimp (*Neomysis mercedis*) *Mar. Environ. Res.* **36**, 197-215
- Banting J. D. (1970). Effects of diallate and triallate on wild oat and wheat cells *Weed Sci* **18**, 80-84.
- Barak E., Dinnor A. y Jacoby B. (1983). Adsorption of systemic fungicides and a herbicides by some components of plant tissues, in relation to some properties of the pesticides. *Pestic. Sci.* **14**, 213-219.
- Bignami M., Morphurgo G., Pagliani R., Carere A., Conti G. y Di Giuseppe G. (1974) Non-disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in *Aspergillus nidulans*. *Mutat. Res.* **26**, 159-170.
- Bolton P. y Harwood J. L. (1976). Effect of thiocarbamate herbicides on fatty acid synthesis of potato. *Phytochem* **15**, 1507-1509.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem.* **72**, 248-254.
- Breaux E. J. (1986). Identification of initial metabolites of acetochlor in corn and soybean seedling. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1098-1104.
- Breaux E. J. (1987). Initial metabolisms of acetochlor in tolerant and susceptible seedling *Weed Sci.* **35**, 474-478.
- Brusick D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environ. Mutagen* **8**, 879-886.

- Calderón-Segura M. E (1993). Intercambios de cromátidas hermanas inducidos por propoxur previa activación metabólica por *Vicia faba* Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, D. F. México.
- Caldwell J. (1984). Xenobiotic acyl-coenzymes A: critical intermediates in the biochemical pharmacology and toxicology of carboxylic acids. *Biochem. Soc. Trans.* 12, 9-11.
- California Department of Fish and Game. (1982). Colusa Basin drain and reclamation slough monitoring studies, 1980 and 1981. Report No. 82-3. Sacramento C. A., pp. 52
- California Department of Fish and Game. (1983) Rice herbicide concentrations in Sacramento river and associated agricultural drains. 1982. Report No 83-5 Sacramento C. A., pp 16-33.
- California Department of Food and Agriculture. (1981). Pesticide use report (1980). Sacramento.C. A., pp.255
- California Department of Food and Agriculture (1985). Pesticide use report (1984). Sacramento.C. A., pp.109.
- California State Water Resources Control Board. (1984). Rice herbicides: molinate (Ordram) and thiobencard (Bolero), Special Projects Report. No. 84-94 sp. Sacramento C. A., pp. 176.
- Camper N. D. y McDonald S. K. (1989). Tissue and cell cultures as model systems in herbicide research. *Rev. Weed Sci.* 4, 169-190.
- Carere A. y Morpurgo G. (1981). Comparison of the mutagenic activity of pesticides *in vitro* short term assays. *Progr. Mutat. Res.* 2, 87-104.
- Carringer R. D., Rieck C. E. y Bush L. P. (1978). Metabolism of EPTC in corn (*Zea mays*). *Weed Sci.* 26, 157-171.
- Cashman J. R. y Olsen L. D. (1989). S-oxygenation of eptam in hepatic microsomes from fresh and saltwater striped bass (*Morone saxatilis*). *Chem. Res Toxicol.* 2, 392- 399.
- Casida J. E., Gray R. A. y Tilles H. (1974). Thiocarbamate sulfoxides: potent, selective, and biodegradable herbicides. *Science* 184, 573-574.
- Casida J. E., Kimmel E. C., Lay M. M., Ohkawa H., Rodebush J. E., Gray R. A., Tseng C. K. y Tilles H. (1975a). Thiocarbamate sulfoxide herbicides. *Environ. Qual. Saf Dupl.* III. 675-679.
- Casida J. E., Kimmel E. C., Ohkawa H. y Ohkawa R. (1975b). Sulfoxidation of thiocarbamate herbicides and metabolism of thiocarbamate in living mice and liver enzyme systems. *Sci. Pestic. Biochem Physiol.* 7, 122-141.



- Chen Y. S y Casida J. E. (1978) Thiocarbamate herbicide metabolism: microsomal oxygenase metabolism of EPTC involving mono-and dioxygenation and the sulfur and hidroxilation at each alkyl carbon. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 263-267
- Cohen S. S., Flaks J. G., Barner H. D., Loeb M. R y Lichtenstein J (1958). The mode of action of 5-fluorouracil and its derivatives. *Proc Natl. Acad Sci (USA)* **44**, 1004-1012.
- Conger, A.D. and L.M. Fairchild (1953). A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technol.* **28**, 281-283.
- Constantin M. J. y Nilan R. A. (1982). Arylamine N-oxidation by microsomal fraction of germinating pea seedling (*Pisum sativum*). *J. Agric. Food Chem.* **31**, 1276-1282.
- Cooper I. P. (1991). Effects of pesticides on wild life. En: Hayes W. J. Jr. y Laws E. R. Jr. (Eds.). *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, Nueva York, pp. 1347-1402.
- Dawson J. H. (1963). Development of barnyardgrass seedling and their response to EPTC. *Weeds* **11**, 60-66.
- Deal L. M., Reeves J. T., Larkins B. A. y Hess F. D. (1980). Use of an *in vitro* protein synthesizing system to test the mode of action of chloroacetamides. *Weed Sci.* **28**, 334-360.
- Debaun J. R., Bova D. L., Finley K. A. y Menn J. J. (1978a). Metabolism of [ring-<sup>14</sup>C] ordram (molinate) in the rat. 1. Balance and tissue residue study. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1096-1098.
- Debaun J. R., Bova D. L., Tseng C. K. y Menn J. J. (1978b). Metabolism of [ring-<sup>14</sup>C] ordram (molinate) in the rat. 2. Urinary metabolite identification. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1098-1104.
- DGEIE (Dirección General de Estadística Informática y Evaluación). (1995). Informe Anual Agrícola. México D. F.
- Devine M. D. (1989). Phloem translocation of herbicides. *Rev. Weed Sci.* **4**, 191-213.
- Devine M. D. y Vanden-Born W. H. (1991). Absorption and transport in plants. En: Grover R. y Cessna A. J. (Eds.). *Environmental Chemistry of Herbicides*. Vol II. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, pp. 119-140
- Dodge A. D. (1989). Herbicides and plant metabolism. Cambridge, Nueva York. pp. 77- 102
- Doloshitsky S. L. (1969) Hygienic standardization of herbicide avadex containing chlorine in water. *Hyg. Sanit.* **34**, 21-25.

- Douglas G. R., Nestmann E. R., Grant C. E., Bell R. D. L., Wytsma J. M. y Kowbel D. J. (1981). Mutagenic activity of diallate and triallate determined by a battery of *in vitro* mammalian and microbial tests. *Mutat. Res.* **85**, 45-56.
- Duke W. B., Slife F. W., Hanson J. B., y Butler H. S. (1975). An investigation on the mechanism of action of propachlor. *Weed Sci.* **23**, 142-147.
- Ebert E. (1980). Herbicidal effects of metolachlor [2-chloro-n-(2-ethyl-6-methyl-N-(2-methoxy-1-methyl)acetamide)] at the cellular level in sorghum. *Pestic. Biochem. Physiol.* **13**, 227-236.
- Evans H. J. y Scott D. (1964). Influences of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by x-rays and maleic hidrazide in *Vicia faba*. *Genetics* **49**, 17-33
- Fang S. C. (1976). Thiocarbamates. En: Kearney P. C. y Kaufman D. D. (Eds). *Degradation of Herbicides* Marcel Dekker Nueva York, pp. 147-164.
- Finlayson B. J. y Faggella G. A. (1986). Comparison of laboratory and field observations of fish exposed to the herbicides molinate and thiobencarb. *Trans. Amer. Fish Soc.* **324**, 124-132.
- Fuerst E. P. (1987) Understanding the mode of the action of the chloroacetamide and thiocarbamate herbicides. *Weed Technol.* **1**, 270-277.
- Fuhremann T. W., Lichtenstein E. P. y Stratman F. W. (1978). Effects of naturally occurring food plant components on insecticide degradation in rats. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1068-1075.
- Fuhremann T. W., Lamoureux G. L. y Rusness D. G. (1987). EPTC metabolism in corn, cotton, and soybean: identification of a novel metabolite derived from the metabolism of a glutathione conjugate. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 1-7.
- Fry D. H. (1979). Anadromous fishes of California California department of fish and game. Sacramento C. A., pp.112.
- Gentile J. M., Gentile G. J., Bultman J., Sechriest R., Wagner E. D. y Plewa M. J. (1982) An evaluating of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* **101**, 19-29.
- Gentile J. M., Gentile G. J., Toesen S. y Plewa M. J. (1985). *In vitro* activation enhancement of the mutagenicity of 4-nitro-0-phenylenediamine by plant S9. *Environ. Mutagen.* **7**, 73-85
- Gentile J. M., Gentile G. J. y Plewa M. J. (1986) *In vitro* activation of chemicals by plants a comparison of techniques. *Mutat. Res.* **164**, 53-58.

- Gómez-Arroyo S., Hernández-García A y Villalobos-Pietrini R (1988) Induction of sister chromatid exchanges in *Vicia faba* by arsenic-contaminated drinking water. *Mutat Res* 208, 219-224.
- Gómez-Arroyo S., Rodríguez-Madrid L. y Villalobos-Pietrini R. (1992). Chromosomal alterations induced by the thiocarbamate herbicide molinate (Ordran ) in *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8, 77-80.
- Gómez-Arroyo S. y Villalobos-Pietrini R. (1995) Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. En: Butterworth F. M., Corkum L. D. y Guzmán-Rincón J. (Eds). *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, Nueva York, pp 95-113.
- Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M. E. y Villalobos-Pietrini R. (1995) Sister chromatid exchanges in human lymphocytes induced following plant activation by *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 324-330.
- Gómez-Arroyo S., Armienta M. A., Cortés-Eslava J. y Villalobos-Pietrini R. (1997). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic-contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, México. *Mutat. Res.* 394, 1-7.
- Gonsebatt M. E., Herrera L. A. y Ostrosky-Wegman P. (1995). Lymphocyte proliferation as a biomarker in environmental monitoring. 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. 81-94.
- Gordon J. S., Bell G. Y., Martinson H. C. y Rutter W. J. (1976). Selective interaction of 5-bromodeoxyuridine substituted DNA with differential chromosomal proteins. *Biochem.* 15, 4778-4786.
- Grant W. F. (1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.* 310, 175-185.
- Gray L. (1991). Behavior persistence and degradation of carbamate and thiocarbamate herbicide in the environmental. En: Proceeding of the California Weed Control Conference, pp. 128-134.
- Gronwald W. J. (1991). Lipid biosynthesis inhibitors. *Weed Sci.* 39, 435-449
- Grover R. (1989). *Environmental Chemistry of Herbicides*. Vol I. CRC. Press, Inc. Boca Ratón, Florida, pp. 2-15.
- Grover R. y Cessna A. J. (1991). *Environmental Chemistry of Herbicides*. Vol II CRC. Press, Inc. Boca Ratón, Florida, pp 120-135.

- Harm H y Kottuts E (1990) Bioconversion of xenobiotics on different plant systems cell suspension cultures, root cultures and intact plants En: proceeding of the VII International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, pp. 650-655
- Harwood J. L. (1989). The properties and importance of acetyl coenzyme A, carboxilase in plants Proc Brighton Crop. Prot. Conf Weeds 1, 155-162.
- Hatzios K. K y Penner D (1982). *Metabolism of Herbicides in Higher Plants*. Burgess Publishing, Mineapolis, pp. 77-98.
- Hatzios K. K. (1991). Biotransformations of herbicides in higher plants. En: Grover R. y Cessna A. J. (Eds.). *Environmetal Chemistry of Herbicide*. CRC. Press, Boca Ratón, Florida, pp 141-185
- Hayes W. J. Jr. (1991). Production and use of pesticides: En: Hayes W. J. Jr., Laws E. R. Jr. (Eds) *Handbook of Pesticide Toxicology*. Vol II. Academic Press, Nueva York, pp. 143-156.
- Heath A.G., Cech J. J., Zinkl J. G. y Steele M. D. (1993). Sublethal effects of three pesticides on Japanese Medaka. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 25, 485-491.
- Hellyer A., Bambridge H. E. y Slabas A. R. (1985) Plant acetyl-CoA carboxylase. Biochem. Soc. Trans. 14, 565-568.
- Hepler P. K. y Jackson W. T. (1989). Isopropyl N-phenylcarbamate affects spindle microtubule orientation in dividing endosperms cells of *Haemanthus katherinae* Baker J. Cell Sci. 5, 727-743.
- Hess F. D. (1985). Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerances and susceptibility. En: Duke S. O (Ed.). *Weed Physiology*. Vol 2. *Herbicide Physiology*. CRC. Press Inc. Boca Ratón, Florida, pp. 191-214.
- Hess F. D. (1987). Herbicide effects on the cell cycle meristematic plant cells. Rev. Weed Sci. 3, 183-203
- Higashi K., Nakashima k., Karasaki Y., Fukunaga M. y Mizugashi K. (1981) Activation of benzo [a] pyrene by microsomes of higher plant tissues and their mutagenicity. Biochem. Int. 2, 373-380.
- Higashi K. (1988). Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. Mutat. Res 197, 273-288
- Horvath L. y Pulay A. (1980). Metabolism of EPTC in germinating corn: sulfone as the truecarbamoylating agent. Pestic Biochem. Psysiol. 14, 265-269.
- Hubbell J. P. y Casida J. E. (1975). Dichloroacetamide antidotes for thiocarbamate herbicides: mode of action Science. 189,287-289

- Hubbell J. P. y Casida J. E. (1977) Metabolic fate of the N,N-dialkylcarbamoyl moiety of thiocarbamate herbicides in rats and corn. *J. Agric. Food Chem.* **25**, 404-413.
- Huckle K. R. y Milburn P. (1982) Biochemical mechanisms of amino acid conjugation of xenobiotics. En: Hutson D. H. y Roberts T. R. (Eds.) *Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology*, Vol. II. Londres, pp. 127
- Hutson D. H. y Roberts T. R. (1988). *Environmental Fate of Pesticides* Vol. 7 Wiley, Nueva York, pp. 23-75.
- IARC (1976). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to man Vol 12 Some carbamates, thiocarbamates and carbazides. International Agency for Research on Cancer Lyon, pp. 245-270.
- Imai Y. y Kuwatsuka S. (1984). Uptake, translocation and metabolic fate of the herbicide molinate in plants. *J. Pestic. Sci.* **9**, 79-90.
- Innes J. R. M., Ulland B. M., Valerio M. G., Petrucelli L., Fishbein E. R., Hart A. J., Pallotta R. R., Bates H. L., Falk J. J., Gart M., Klein I., Mitchel I. y Peters J. (1969). Bioassays of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: preliminary note *J. Natl. Cancer Inst.* **42**, 1101- 1113.
- Jablonkai I. y Hatzios K. K. (1994). Microsomal oxidation of the herbicides EPTC and acetochlor and of the safener MG-191 in maize *Pestic. Biochem. Physiol.* **48**, 98-109.
- Julli M. y Krassoï R. (1995). Acute and chronic toxicity of the thiocarbamate herbicide, molinate, to the Cladoceran *Moina australiensis* Sars. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **54**, 690-694.
- Kanaya N., Takehisa S., Nicoloff H., Nikolova T. y Damianova V. (1992). Plant extracts induced chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells and human lymphocytes. *Mutat. Res.* **281**, 47-54.
- Karunen P. y Wilkinson R. E. (1975). Influence of S-ethyl dipropylthiocarbamate (EPTC) on wheat root phospholipid fatty acid composition. *Physiol. Plant.* **35**, 228-231
- Kato H. (1974). Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatid exchanges. *Nature* **252**, 739-741.
- Kato H. (1977). Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BrdU-labelling method *Nature* **251**, 70-72.
- Kihlman B. A. (1971). Root tips studying the effects of chemicals on chromosomes. En Hollaender A. (Eds). *Chemicals Mutagens Principles and Methods for their Detection*. Vol. 2. Plenum Press, Nueva York, pp. 489-514.

- Kihlman B. A. (1975). Sister-chromatid exchange in *Vicia faba*. II. Effects of thiotepa, and 8-ethoxycaffeine on the frequency of SCEs. *Chromosoma* 51, 11-18
- Kihlman B. A. y Kronborg D. (1975). Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*: demonstration by a modified fluorescent plus Giemsa (FPG) technique. *Chromosoma* 51, 1-10.
- Kihlman B. A. y Andersson H. C. (1982). Sister-chromatid exchanges in plants. En: Wolff S. (Ed). *Sister-Chromatid Exchange in Plants*. Wiley, Nueva York, pp. 243-256.
- Kihlman B.A. y Andersson H.C. (1984). Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. En Kilbey B. J., Legator M., Nichols W. y Ramel C. (Eds.). *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2a ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 531-554.
- Kolattukudy P. E. y Brown L. (1974). Inhibition of cuticular lipid biosynthesis in *Pisum sativum* by thiocarbamates. *Plant Physiol* 53, 903-906.
- Kurkdjian A. y Gruern J. (1989). Intracellular pH: measurement and importance in cell activity *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 271-303.
- Kuroda K., Yamaguchi Y. y Endo G. (1992). Mitotic toxicity, sister chromatid exchange and Rec assay of pesticides *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 13-18.
- Lamberti L., Bigatti P. P. y Ardito G. (1983). Cell kinetics and sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 120, 193-199.
- Lamoureux G. L. y Frear D. S. (1979). Pesticide metabolism in higher plants En: Paulson G. D., Frear D. S. y Marks E. P. (Eds.). *Xenobiotic Metabolism. In vitro Methods*. Sym Series 97. Amer Chem Soc. Washington, pp. 77-128
- Lamoureux G. L. y Rusness D. G. (1987). EPTC metabolism in corn, cotton, and soybean. identification of a novel metabolite derived from metabolism of a glutathione conjugate. *J. Agric. Food Chem.* 35, 1-7.
- Latt S. A. (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Nat. Acad. Sci U S A* 71, 3162-3166.
- Lay M. M., Hubbell J. P. y Casida J. E. (1975). Dichloroacetamide antidotes thiocarbamate herbicides detoxification. Mode of action. *Science* 189, 287-288.
- Lay M. M. y Casida J. E. (1976). Dichloroacetamide antidotes enhance thiocarbamate sulfoxide detoxification by elevation corn root glutathione content and glutathione S-transferase activity. *Pestic. Biochem. Physiol* 6, 442-456
- Lay M. M. y Menn J. J. (1979). Mercapturic acid occurrence in fish bile: a terminal product of metabolism of the herbicide molinate. *Xenobiotica* 9, 669-673

- Leavitt J. R. C. y Penner D. (1979). *In vitro* conjugation of glutathione and other thiols with acetanilide herbicides and EPTC sulfoxide and the action of the herbicide antidote R-25788. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 533-536.
- Luster M. I., Portier C., Pait D. G., White Jr. K. L., Gennings C., Munson A. y Rosenthal G. J. (1992). Risk assessment in immunotoxicology. *Fundam. Appl. Toxicol.* **10**, 2-19
- Lyon M. B. (1970). Search for a mechanism for the increased sensitivity of 5-bromouracil-substituted DNA of ultraviolet radiation. II. Single-strand breaks in the DNA of irradiated 5-bromouracil-substituted T3 coliphage. *Biochem. Biophys. Acta* **209**, 24-33
- Mann J. D., Jordan S. L. y Day B. E. (1965) A survey of herbicides for their effects upon protein synthesis. *Plant Physiol.* **40**, 840-843.
- Menn, J. J. (1978). Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. *Environ Health Perspect.* **27**, 113-124
- Mc Clintock B. (1938). The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behaviour of ring-shaped chromosomes. *Genetics* **23**, 315-376.
- Medved I. e Ivanova Z. V. (1971). Higienic establishment of working conditions during Eptam application in agriculture. *Gigi Sanit.* **2**, 29-32 (En Ruso).
- Minakawa O., Ishii S. y Konnot T. (1978). Analytical method of residue of molinate a herbicide in paddy field, and actions of molinate to living bodies. *Jpn. J. Public Health* **25**, 645-651. (En Japonés).
- Moreland D. E., Malhotra S. S., Gruenhagen R. D. y Shokrah T. E. (1969). Effects of herbicides on RNA and protein synthesis. *Weed Sci.* **17**, 556-563.
- Murnik M. R. (1976). Mutagenicity of widely-used herbicides. *Genetics* **83**, 554 (Abstract)
- Murnik M. R. y Nash C. L. (1977). Mutagenicity of the herbicides atrazine, cyanazine and simazine in *Drosophila melanogaster*. *J. Toxicol. Environ. Health* **3**, 691-697
- Nakamura Y., Ishikawa K. y Kuwatsuka S. (1977). Uptake and translocation of benthicarb (thiobencarb) herbicide by plants. *Agric. Biol. Chem.* **38**, 1129-1135
- Nalewaja J. D. (1964). Uptake, translocation of diallate in wheat, barley, flax and wild oat. *Weed Sci.* **16**, 309-312.
- Nalewaja J. D., Behrens R. y Schmid A. R. (1968) Uptake, translocation, and fate of EPTC-C<sup>14</sup> in alfalfa. *Weeds* **12**, 269-272.

- Obe G. y Ristow H. (1970). Acetaldehyde, but not ethanol, induces chromatid exchanges in Chinese hamster cells *in vitro*. *Mutat Res* 56, 269-272
- Obe G., Natajara A. T., Meyers A y Den Hertog A (1979) Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood *in vitro* by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutat Res.* 68, 291-294.
- Obe G., Jonas R y Schmidt S. (1986). Metabolism of ethanol *in vitro* produces a compound wich induces sister-chromatid exchange in human peripheral lymphocytes *in vitro*: acetaldehyde not ethanol is mutagenic. *Mutat. Res.* 174, 47-51.
- Olofsdotter M., Olesen A., Andersen S. B. y Streibig J. C. (1994). A comparison of herbicide in cell cultures and whole plants. *Weed Res.* 34, 387-394.
- Ostrosky-Wegman P. (1994). El indice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico *Gaceta Méd Méx.* 130, 432-437.
- Painter R. B. (1982). A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* 70, 337-341.
- Pagano M., Draetta G. y Jansen-Durr P. (1992a). Association of cdk2 kinase with the transcription factor E2F during S phase. *Science* 255, 1144-1147.
- Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W. y Draetta P. (1992b). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO. J.* 11, 961-971.
- Pagano M., Pepperkok R., Lukas J., Baldin V, Ansorge W., Bartek J. y Draetta P. (1993). Regulation of the cell cdk2 protein kinase in culture human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 121, 101-111.
- Parker O. S. (1963). Factors affecting the selectivity of 2, 3-dichloroallyldiisopropyl thiocarbamate (diallate) against *Avena* spp. in wheat and barley. *Weed Res.* 3, 259-276.
- Perry P. y Evans H. J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange *Nature (London)* 258, 156-158
- Perry P. y Wolff S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid. *Nature (London)* 251, 156-158.
- Peterle J. T (1991) *Wildlife Toxicology*. Van Nostrand Reinhold, Nueva York, pp, 9-20.
- Pintér A., Csik M., Torok G., Surján A., Kelecsényi Zs. y Kocsis Zs. (1990). Cytogenetic effect of the thiocarbamate herbicides butylate, molinate and vernolate, in the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.* 242, 279-283.
- Plewa M. J. (1978) Activation of chemical into mutagens by green plants. A preliminary discussion. *Environ. Health Perspect.* 27, 45-50



- Plewa M. J. y Gentile J. M. (1982). The activation 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. 401-420
- 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 suppresses the plant activation assay for the analysis of plant-activated promutagen. *Mutat. Res.* **197**, 207-209.
- Plewa M. J. y Wagner E. D. (1993). Activation of promutagens by green plants. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 93-113.
- Quistad G. B., Sparks S. E. y Casida J. E. (1994). Aldehyde dehydrogenase of mice inhibited by thiocarbamate herbicides. *Life Sci.* **55**, 1537-1544.
- Rasquinha I. A., Wildeman A. G. y Nassar R. N. (1988). Studies on the use of plant extracts in assessing the effects of the plant metabolism on the mutagenicity and the toxicity of pesticides. *Mutat. Res.* **197**, 261-272.
- Rebrin V. G. y Aleksandrova L.G. (1971). Toxicohygienic characteristics of the new herbicide Ronit. *Urach. Delo.* **12**, 118-121 (En Ruso)
- Rojas E., Herrera L. A., Sordo M., Gonsebatt M. E., Montero R., Rodríguez R. y Ostrosky-Wegman P. (1993). Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti. Cancer Drugs* **4**, 637-640.
- Sanderman H., Arjmad M., Gennity I. y Winkler R. (1990). Animal bioavailability of defined xenobiotic lignin metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1877-1880.
- Sanderman H. Jr. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* **17**, 82-84.
- Sanderman H. Jr., Musick T. J. y Aschbacher P. W. (1992). Animal bioavailability of a 3,4-dichloroaniline-lignin metabolite fraction from wheat. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2001-2007.
- Sandhu S. S., Waters M. D., Mortelmans K. E., Evans E. Y., Jotz M. M., Mitchell A. D. y Kasica V. (1984). Evaluation of diallate and triallate herbicides for genotoxic effects in a battery of *in vitro* and short-term *in vivo* tests. *Mutat. Res.* **136**, 171-183.
- Scheid W. (1976). Mechanism of differential staining of BrdU-substituted *Vicia faba* chromosomes. *Exp. Cell Res.* **101**, 55-58.
- Schuphan I., Rosen J. D. y Casida J. E. (1979). Novel activation mechanism for the promutagen herbicide diallate. *Science* **205**, 1013-1015.

- Schupan I, Hague A y Ebing W. (1984). Echochemical assessment of environmental chemicals Part 1. Standard screening procedure to evaluate chemicals in plant cell cultures *Chemosphere* **13**, 301-313.
- Schvartzman J. B. (1987). Sister chromatid exchanges in higher plant cells: past and perspectives. *Mutat. Res.* **181**, 127-147.
- Scott B. R., Sparrow A. H., Schwemmer S. S y Schairer L. A. (1978). Plant metabolic activation of 1,2-dibromoethane (EDB) to a mutagen of greater potency *Mutat. Res.* **49**, 203-212
- Seo K. Y., Riley J., Cortez D. y Wagner E. D. (1993) Characterization of stable high molecular weight mutagenic product(s) of plant-activated m-phenylenediamine. *Mutat. Res.* **299**, 111-120
- Sikka H. C. y Florezyk P. (1978). Mutagenic activity of thiocarbamate herbicides in *Salmonella typhimurium*. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 146-148.
- Shimabukuro R. H., Lamoreux G. L. y Frear F. S. (1981). Pesticide metabolism in plants: principles and mechanisms. En: Matsumura F. (Ed.). *Biological Degradation of Pesticides*. Plenum Press, Nueva York, pp. 123-145.
- Shimabukuro R. H., Lamoreux G. L. y Frear F. S. (1982). Pesticide metabolism in plants reactions and mechanisms. En: Matsumura F y Murti C. R. K. (Eds.). *Biodegradation of Pesticides*. Plenum Press, Nueva York, pp. 21-66.
- Stephenson G. R., Bunce N. J., Makowski R. I., Bergsma M. D. y Curry J. C. (1979) Structure-activity relationships for antidotes to thiocarbamate herbicides in corn *J. Agric. Food Chem.* **27**, 543-547.
- Sterling T. M. (1994). Mechanisms of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells. *Weed Sci.* **42**, 263-276.
- Still G.G., Davis D. G. y Zander G. L. (1970). Plant epicuticular lipids: alteration by herbicidal carbamates. *Plant Physiol.* **46**, 307-314.
- Streibig J. C. (1988). Herbicide bioassays. *Weed Res.* **28**, 479-489.
- Snyder C. A., y Valle C. D. (1991). Lymphocyte proliferation assays as potencial biomarkers for toxicant exposures. *J. Toxicol. Environ. Health* **34**, 127-139
- 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. y Kanaya N. (1983). A comparison of *Vicia faba* root 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. y Kanaya N. (1986). Pro-mutagen activation by *Vicia faba* measurement with SCE induction in CHO cells. *Bil. Zbl* **105**, 37-40
- Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. (1988). Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on the sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res* **197**, 195-205.
- Taylor J. H., Woods P. S. y Hughes W. L. (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Proc Nat. Acad. Sci USA* **43**, 122-128.
- Tempelaar M. J., de Boer M. T. J. y Versteegh. J. E. G. (1982) Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Feulgen staining procedure for *Vicia faba*. *Mutat. Res* **103**, 321-326
- Tjerdema R. S. y Grosby D. G. (1987). The biotransformation of molinate (ordram) in the striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquatic Toxicol.* **9**, 305-317.
- Tomatis L., Aitio A., Wilbourn J. y Shuker L. (1989). Human carcinogens so far identified. *Jpn J. Cancer Res.* **80**: 795-807
- Vaughn K. C. y Vaughn M. A. (1989). Mitotic disrupter from higher plants. *Am. Chem. Soc. Symp.* **380**, 273-293.
- Vaughn K.C. y Lehnen L. P. (1991). Mitotic disrupter herbicides. *Weed Sci.* **39**, 450-457.
- Voytenko G. A. y Medved I. L. (1973). Effect of some thiocarbamates on reproductive functions. *Gig. Sanit.* **38**, 11-114 (En Ruso).
- Weisshaar H. y Boger P. (1987) Primary effects of chloroacetamide inhibition of fatty acid synthesis. *Pestic. Biochem Physiol.* **32**, 212-216.
- WHO (World Health Organization). (1988) Thiocarbamate pesticides. A general introduction *Environ. Health. Crit.* Vol. **76**. Ginebra.
- Wilkinson R. E. y Smith A. E. (1975a). Reversal of EPTC induced fatty acid synthesis inhibition. *Weed Sci.* **23**, 90-92.
- Wilkinson R. E. y Smith A. E. (1975b). Thiocarbamate inhibition of fatty acid biosynthesis in isolated spinach chloroplasts. *Weed Sci.* **23**, 100-104
- Wilkinson R. E. y Smith A. E. (1976). Butylate, pebulate, and vernolate inhibition of plant fatty acid biosynthesis. *Phytochem* **15**, 841-842.
- Wilkinson R. E., Glaze N. C., Dowler C. C. y Joung C. T. (1979) Turnip green, cucumber, spapbean, and southern pea response to pesticides in intensive-cropping sequences. *J Agric Food Chem.* **27**, 900-904.

- Wilkinson R. E. (1987). S-ethyl dipropylthiocarbamate (EPTC) and 2,2-dichloro-N,N-di-2-propenylacetamide (dichlormid) inhibitions of synthesis of acetyl-coenzyme A derivatives. *Pestic. Biochem. Physiol.* **28**, 38-43.
- Woo Y. (1983). Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of carbamates, thiocarbamates and related compounds: an overview of structure-activity relationships and environmental concerns *J. Environ. Sci. Health* **1**, 97-153
- Wolff S. (1974). Sister chromatid exchange: the most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic carcinogenic. *Expert. Conference Oslo, Noruega*, pp 11-13.
- Wolff S., Bodycote J. y Painter R. B. (1974). Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S. *Mutation Res.* **25**, 73-81.
- Xing W. y Zhang Z. (1990). A comparison of SCE test in human lymphocytes and *Vicia faba*. a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens. *Mutat Res* **241**, 109-113.
- Yamaguchi Y., Fukushima M., Fujita T. y Yamada A (1991). Distribution and seasonal variation of pesticide in Yodo rivers basin. *J. Environ. Chem* **1**, 56-63.
- Zhang Z., Yang J., Zhang Q. y Cao X. (1991). Studies on the utilization of a plant SCE test in detecting potencial mutagenic agents. *Mutat. Res.* **261**, 69-73.
- Zilkah S y Gressel J. (1977). Cell cultures vs wole plants for measuring phytotoxicity **III**. Correlations between phytotoxicity in cell suspension cultures and seedling. *Plant Cell Physiol.* **18**, 815-820

# T A B L A S

TABLA I. INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR BUTILATE SIN Y CON LA ACTIVACION METABOLICA POR *Vicia faba in vivo*<sup>a</sup>

	$\bar{X}^b$	±	E.E
Testigo	5.30	±	0.15
Cultivo de linfocitos Tratamientos directos con butilate ppm (molaridad)			
6.25 ( $3 \times 10^{-5}$ )	5.26	±	0.14
12.50 ( $5.8 \times 10^{-5}$ )	5.48	±	0.12
50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ )	5.14	±	0.24
75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ )	6.22	±	0.25
100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ )	6.56	±	0.26
200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ )	Muerte celular <sup>c</sup>		
Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	4.84	±	0.33
Testigo Negativo Cultivo de linfocitos + Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> sin tratamiento	6.44	±	0.23
Testigo Positivo Cultivo de linfocitos + Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	11.68*	±	0.50
Cultivo de linfocitos + Extractos de <i>Vicia faba</i> tratadas con butilate ppm (molaridad)			
100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ )	8.48*	±	0.58
200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ )	14.16*	±	0.46
300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ )	17.00*	±	0.84
400 ( $1.8 \times 10^{-3}$ )	24.23*	±	1.20
500 ( $2.3 \times 10^{-3}$ )	0**		
750 ( $3.4 \times 10^{-3}$ )	0**		
1000 ( $4.6 \times 10^{-3}$ )	0**		
1500 ( $6.9 \times 10^{-3}$ )	0**		
2000 ( $9.2 \times 10^{-3}$ )	0**		

<sup>a</sup>Promedio de dos experimentos

<sup>b</sup>n=50 metafases

<sup>c</sup>No se observaron células estimuladas

\*\* No se encontraron metafases de ningún ciclo de división, pero sí núcleos estimulados

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento por análisis de varianza F=129.92, el valor de P<0.0001, entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. P < 0.001

TABLA II. INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS  
 POR MOLINATE SIN Y CON LA ACTIVACION METABOLICA  
 POR *Vicia faba in vivo*<sup>a</sup>

	$\bar{X}^b$	$\pm$	E.E
Testigo	5.36	$\pm$	0.14
Cultivo de linfocitos Tratamientos directos			
Con molinate ppm (molaridad)			
25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ )	6.64	$\pm$	0.20
50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ )	6.18	$\pm$	0.22
75 ( $4 \times 10^{-4}$ )	6.68	$\pm$	0.21
100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ )	5.40	$\pm$	0.19
200 ( $1 \times 10^{-3}$ )	5.32	$\pm$	0.14
300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ )	Muerte celular <sup>c</sup>		
Etolanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	4.84	$\pm$	0.33
Testigo Negativo			
Cultivo de linfocitos + Extractos de <i>Vicia faba</i>			
Sin tratamiento	6.44	$\pm$	0.22
Testigo Positivo			
Cultivo de linfocitos + Extractos de <i>Vicia faba</i>			
Tratadas con Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	11.00*	$\pm$	0.05
Cultivo de linfocitos + Extractos de <i>Vicia faba</i>			
Tratadas con molinate ppm (molaridad)			
100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ )	8.02*	$\pm$	0.30
200 ( $1 \times 10^{-3}$ )	12.40*	$\pm$	0.18
300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ )	17.78*	$\pm$	0.23
400 ( $2.1 \times 10^{-3}$ ) <sup>d</sup>	4.46	$\pm$	0.20
500 ( $2.7 \times 10^{-3}$ )	6.12	$\pm$	0.13
750 ( $4 \times 10^{-3}$ )	5.48	$\pm$	0.11
1000 ( $5.3 \times 10^{-3}$ )	6.34	$\pm$	0.24
1500 ( $8 \times 10^{-3}$ )	6.00	$\pm$	0.21
2000 ( $1 \times 10^{-2}$ )	5.45	$\pm$	0.16

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos

<sup>b</sup> n=50 metafases

<sup>c</sup> No se observaron células estimuladas

<sup>d</sup> Raíces necrosadas

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento por análisis de varianza F=28.80, el valor de P<0.0001, entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls, P<0.001.

TABLA III. INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR BUTILATE SIN Y CON LA ACTIVACION METABOLICA *in vitro*, POR LA MEZCLA S10 DE *Vicia faba*<sup>a</sup>

	$\bar{X}^b$	$\pm$	E.E
Testigo	5.06	$\pm$	0.41
Cultivo de linfocitos Tratamientos directos Con butilate ppm (molaridad)			
25 ( $1.1 \times 10^{-4}$ )	4.16	$\pm$	0.29
50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ )	4.34	$\pm$	0.38
75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ )	3.72	$\pm$	0.28
100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ )	4.16	$\pm$	0.25
200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ )	Muerte celular <sup>c</sup>		
Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	4.60	$\pm$	0.28
Testigo Negativo Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 de <i>Vicia faba</i>	5.28	$\pm$	0.39
Testigo Positivo Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 de <i>Vicia faba</i> + Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	8.78*	$\pm$	0.28
Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 de <i>Vicia faba</i> + butilate ppm (molaridad)			
25 ( $1.1 \times 10^{-4}$ )	5.05	$\pm$	0.58
50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ )	6.70*	$\pm$	0.40
75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ )	6.88*	$\pm$	0.59
100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ )	7.82*	$\pm$	0.50
200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ )	8.20*	$\pm$	0.48
300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ )	Muerte celular <sup>c</sup>		

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos

<sup>b</sup> n=50 metafases

<sup>c</sup> No se observaron metafases de ningún ciclo de división y células estimuladas

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento por análisis de varianza  $F=17.692$ , el valor de  $P<0.0001$ , entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.  $P<0.001$ .



TABLA IV. INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS  
 POR MOLINATE SIN Y CON LA ACTIVACION METABOLICA  
*in vitro*, POR LA MEZCLA S10 DE *Vicia faba*<sup>a</sup>

	$\bar{X}^b$	$\pm$	E.E
Testigo	4.96	$\pm$	0.59
Cultivo de linfocitos Tratamientos directos con molinate ppm (molaridad)			
25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ )	5.10	$\pm$	0.40
50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ )	4.12	$\pm$	0.24
75 ( $4 \times 10^{-4}$ )	4.78	$\pm$	0.33
100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ )	5.26	$\pm$	0.34
200 ( $1 \times 10^{-3}$ )	5.42	$\pm$	0.41
300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ )	Muerte celular <sup>c</sup>		
Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	4.60	$\pm$	0.28
Testigo Negativo Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 de <i>Vicia faba</i>	5.28	$\pm$	0.39
Testigo Positivo Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 de <i>Vicia faba</i> + Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	8.78*	$\pm$	0.28
Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 de <i>Vicia faba</i> + molinate ppm (molaridad)			
25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ )	5.74	$\pm$	0.36
50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ )	7.06*	$\pm$	0.37
75 ( $4 \times 10^{-4}$ )	8.30*	$\pm$	0.56
100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ )	7.36*	$\pm$	0.44
200 ( $1 \times 10^{-3}$ )	6.14*	$\pm$	0.41
300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ )	5.58	$\pm$	0.34

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos

<sup>b</sup> n=50 metafases

<sup>c</sup> No se observaron, metafases de ningún ciclo de división y células estimuladas

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamiento por análisis de varianza F= 13,107, el valor de P<0,0001, entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls, P<0,001

**TABLA V. FRECUENCIAS DE CELULAS EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES E INDICES DE REPLICACION Y MITOTICO DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO TRATADOS CON BUTILATE SIN Y CON LA ACTIVACION METABOLICA DE *Vicia faba* in vivo<sup>a</sup>**

	Tratamientos directos (48 h)					Activación <i>in vivo</i> (48 h)				
	M1	M2	M3	%IR <sup>b</sup>	%IM <sup>c</sup>	M1	M2	M3	%IR <sup>b</sup>	%IM <sup>c</sup>
Testigo	38.0	30.0	32.0	1.9	4.7	35.5	30.0	34.5	2.0	4.7
Butilate										
ppm (molaridad)										
6.25 (3X10 <sup>-4</sup> )	30.0	32.5	37.5	2.1	3.4*					
12.50 (5.8X10 <sup>-4</sup> )	32.0	34.0	34.0	2.0	3.0*					
50 (2.3X10 <sup>-4</sup> )	41.0*	40.0*	19.0*	1.8*	2.4*					
75 (3.5X10 <sup>-4</sup> )	46.0*	38.0*	16.0*	1.7*	1.3*					
100 (4.6X10 <sup>-4</sup> )	79.5*	11.5*	9.0*	1.3*	0.3*	42.5	34.5	23.0	1.8	3.1*
200 (9.2X10 <sup>-4</sup> )			Muerte celular <sup>d</sup>			24.0	32.5	43.5	2.2	2.8*
300 (1.4X10 <sup>-3</sup> )						18.0*	25.0*	57.0*	2.4	1.4*
400 (1.8X10 <sup>-3</sup> )						12.0*	31.0*	57.0*	2.5	1.2*
500 (2.3X10 <sup>-3</sup> )						Muerte celular <sup>d</sup>				
Fracción S10						35.0	35.0	30.0	2.0	4.6
Etanol 3600 (1X10 <sup>-1</sup> )	33.0	36.0	31.0	2.0	3.2	33.0	30.0	37.0	2.0	4.0

<sup>a</sup>Promedio de dos experimentos

<sup>b</sup>Indice de Replicación

<sup>c</sup>Indice Mitótico, n= 2000 células

<sup>d</sup>No se encontraron células estimuladas

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y cada grupo experimental con X<sup>2</sup>, P<0.05

TABLA VI. FRECUENCIAS DE CELULAS EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES E INDICES DE REPLICACIÓN Y MITÓTICO DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO TRATADOS CON MOLINATE SIN Y CON LA ACTIVACIÓN METABÓLICA DE *Vicia faba in vivo*<sup>a</sup>

	Tratamientos directos (48 h)					Activación <i>in vivo</i> (48 h)				
	M1	M2	M3	%IR <sup>b</sup>	%IM <sup>c</sup>	M1	M2	M3	%IR <sup>b</sup>	%IM <sup>c</sup>
Testigo	38.0	30.0	32.	1.9	4.7	35.5	30.0	34.5	2.0	4.7
Molinate										
Ppm (molaridad)										
25 (1.3X10 <sup>-4</sup> )	31.1	38.5	30.4	1.9	4.0					
50 (2.7X10 <sup>-4</sup> )	30.5	32.5	37.0	2.0	2.8*					
75 (4X10 <sup>-4</sup> )	47.5*	32.5*	20.0*	1.7*	2.0*					
100 (5.3X10 <sup>-4</sup> )	65.5*	25.0*	9.5*	1.4*	1.0*	35.5	34.5	30.0	1.9	2.9*
200 (1X10 <sup>-4</sup> )	72.0*	25.0*	3.0*	1.3*	0.8*	51.1*	35.0*	14.0*	1.6*	2.6*
300 (1.6X10 <sup>-3</sup> )						68.0*	25.0*	7.0*	1.4*	1.9*
400 (2.1X10 <sup>-3</sup> ) <sup>e</sup>						36.0	36.0	28.0	1.9	3.2*
Fracción S10						35.0	35.0	30.0	1.9	4.6
Etanol 3600(1X10 <sup>-1</sup> )	33.0	36.0	31.0	2.0	3.2	33.0	30.0	37.0	2.0	4.0

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos

<sup>b</sup> Índice de Replicación

<sup>c</sup> Índice mitótico, n= 2000 células

<sup>d</sup> No se encontraron células estimuladas

<sup>e</sup> Raíces de *Vicia faba* necrosadas (sistema de activación metabólica *in vivo*)

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y cada grupo experimental con X<sup>2</sup>, P< 0.05

TABLA VII. FRECUENCIAS DE CÉLULAS EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES E ÍNDICES DE REPLICACIÓN Y MITÓTICO DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO TRATADOS CON BUTILATE SIN Y CON LA ACTIVACIÓN METABÓLICA DE *Vicia faba in vitro*<sup>a</sup>

	Tratamientos directos (4 h)					Activación <i>in vitro</i> (4 h)				
	M1	M2	M3	%IR <sup>b</sup>	%IM <sup>c</sup>	M1	M2	M3	%IR	%IM <sup>c</sup>
Testigo	35.5	30.5	34.0	2.0	3.2	35.0	30.5	34.5	2.0	3.2
Butilate										
Ppm (molaridad)										
25 (1.1X10 <sup>-4</sup> )	28.0	27.5	44.5	2.2	3.1	26.0	30.0	44.0	2.2	3.0
50 (2.3X10 <sup>-4</sup> )	25.0*	26.0*	49.0*	2.0	2.3	24.0	43.0	33.0	2.1	3.1
75 (3.5X10 <sup>-4</sup> )	14.0*	34.0*	52.0*	2.4	3.2	20.0*	33.5*	46.5*	2.3	2.6
100 (4.6X10 <sup>-4</sup> )	10.0*	30.0*	60.0*	2.8	3.1	10.5*	23.0*	66.5*	2.3	3.0
200 (9.2X10 <sup>-4</sup> )						11.5*	15.5*	73.0*	2.6	2.5
300 (1.4X10 <sup>-3</sup> )										
Mezcla S10						16.0	49.0	35.0	2.2	4.0
Etanol 3600 (1X10 <sup>-1</sup> )	21.0*	17.0*	62.0*	2.4	3.1	15.5*	20.0*	64.5*	2.5	2.6

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos

<sup>b</sup> Índice de Replicación

<sup>c</sup> Índice Mitótico, n= 2000 células

<sup>d</sup> No se encontraron células estimuladas

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y cada grupo experimental con X<sup>2</sup>, P< 0.05

TABLA VIII. FRECUENCIAS DE CELULAS EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES E ÍNDICES DE REPLICACIÓN Y MITÓTICO DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO TRATADOS CON MOLINATE SIN Y CON LA ACTIVACIÓN METABÓLICA DE *Vicia faba in vitro*<sup>a</sup>

	Tratamientos directos (4 h)					Activación <i>in vitro</i> (4 h)				
	M1	M2	M3	%IR <sup>b</sup>	%IM <sup>c</sup>	M1	M2	M3	%IR <sup>b</sup>	%IM <sup>c</sup>
Testigo	35.5	30.5	34.5	2.0	3.2	35.5	30.5	34.5	2.00	3.2
Molinate										
Ppin (molaridad)										
25 (1.3X10 <sup>-4</sup> )	28.0	43.5	28.5	2.0	2.3	18.0	31.5	50.5	2.3	4.1
50 (2.7X10 <sup>-4</sup> )	20.5	29.0	50.5	2.3	1.8*	21.0	37.5	41.5	2.2	3.3
75 (4X10 <sup>-4</sup> )	19.0	33.0	48.0	2.3	1.9*	19.5	34.5	46.0	2.3	5.5
100 (5.3X10 <sup>-4</sup> )	17.0*	30.5*	52.5*	2.4	2.1*	26.5	31.0	42.5	2.2	3.9
200 (1X10 <sup>-3</sup> )	15.0*	25.5*	59.5*	2.5	1.9*	19.5	32.5	48.0	2.3	3.8
300 (1.6X10 <sup>-3</sup> )			Muerte celular <sup>d</sup>			19.0	28.5	52.5	2.3	3.0
Mezcla S10						26.0	48.0	21.0	2.0	3.1
Etanol 3600 (1X10 <sup>-1</sup> )	21.0*	17.0*	62.0*	2.4	3.1	15.5*	20.0*	64.5*	2.0	2.6

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos

<sup>b</sup> Índice de Replicación

<sup>c</sup> Índice Mitótico, n= 2000 células

<sup>d</sup> No se encontraron células estimuladas

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y cada grupo experimental con X<sup>2</sup>. P< 0,05

TABLA IX. INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR BUTILATE Y MOLINATE EN *Vicia faba*<sup>a</sup>

	$\bar{X}^b$	$\pm$	E.E
Testigo	30.32	$\pm$	2.97
<b>Butilate</b>			
ppm (molaridad)			
25 ( $1.1 \times 10^{-4}$ )	37.47*	$\pm$	2.10
50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ )	57.17*	$\pm$	3.44
75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ )	62.11*	$\pm$	1.20
100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ )	69.50*	$\pm$	2.23
200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ )	106.76*	$\pm$	3.08
300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ )	Muerte celular <sup>c</sup>		
<b>Molinate</b>			
Ppm (molaridad)			
25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ )	50.21*	$\pm$	2.96
50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ )	66.71*	$\pm$	3.50
75 ( $4.0 \times 10^{-4}$ )	72.23*	$\pm$	3.50
100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ )	Muerte celular <sup>c</sup>		

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos

<sup>b</sup> n=50 metafases

<sup>c</sup> No se observaron metafases de ningún ciclo de división

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y cada grupo de tratamiento por análisis de varianza  $F_{Distribuc}=67.34$ ,  $F_{Molinate}=13.11$ , el valor de  $P < 0.0001$ , entonces se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls,  $P < 0.001$

**TABLA X. DETERMINACION DE PROTEINAS EN LOS EXTRACTOS DE LAS RAICES DE *Vicia faba* TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BUTILATE POR EL METODO DE BIORAD<sup>a</sup>**

	$\bar{X} \pm E.E$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Testigo negativo	
Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> sin tratamiento	$4.49 \pm 0.14$
Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	$4.57 \pm 0.16$
Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con butilate	
Ppm (molaridad)	
100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ )	$3.91 \pm 0.26$
200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ )	$3.95 \pm 0.04$
300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ )	$3.99 \pm 0.00$
400 ( $1.8 \times 10^{-3}$ )	$4.43 \pm 0.07$
500 ( $2.3 \times 10^{-3}$ )	$4.18 \pm 0.17$
750 ( $3.4 \times 10^{-3}$ )	$4.60 \pm 0.10$
1000 ( $4.6 \times 10^{-3}$ )	$4.73 \pm 0.10$
1500 ( $6.9 \times 10^{-3}$ )	$4.45 \pm 0.00$
2000 ( $9.2 \times 10^{-3}$ )	$4.19 \pm 0.06$

<sup>a</sup>Promedio de dos experimentos

**TABLA XI. DETERMINACION DE PROTEINAS EN LOS EXTRACTOS DE LAS RAICES DE *Vicia faba* TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MOLINATE POR EL METODO DE BIORAD<sup>a</sup>**

	$\bar{X}^a \pm E.E$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
Testigo negativo	
Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> sin tratamiento	4.49 $\pm$ 0.14
Extractos de raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	4.57 $\pm$ 0.16
Extractos de <i>Vicia faba</i> Tratadas con molinate Ppm (molaridad)	
100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ )	4.26 $\pm$ 0.26
200 ( $1 \times 10^{-4}$ )	4.56 $\pm$ 0.18
300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ )	4.09 $\pm$ 0.83
400 ( $2.1 \times 10^{-3}$ ) <sup>b</sup>	3.24* $\pm$ 0.13
500 ( $2.7 \times 10^{-3}$ )	2.80* $\pm$ 0.24
750 ( $4 \times 10^{-3}$ )	2.17* $\pm$ 0.30
1000 ( $5.3 \times 10^{-3}$ )	1.90* $\pm$ 0.16
1500 ( $8 \times 10^{-3}$ )	1.31* $\pm$ 0.18
2000 ( $1 \times 10^{-3}$ )	1.03* $\pm$ 0.43

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos

<sup>b</sup> Raíces necrosadas

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y de cada concentración por análisis de varianza (ANOVA) F= 14.55, el valor de P<0.0001



**TABLA XII. DETERMINACION DEL pH A LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS DE RAICES DE *Vicia faba* TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BUTILATE<sup>a</sup>**

	48 h DE CULTIVO	70 h DE CULTIVO
Testigo negativo		
Cultivo de linfocitos + 5-BrdU	7.1	7.2
Cultivo de linfocitos		
Tratamientos directos		
Con butilate		
Ppm (molaridad)		
6 25 ( $3 \times 10^{-5}$ )	7.1	7.2
12.50 ( $5.8 \times 10^{-5}$ )	7.1	7.2
50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ )	7.2	7.2
75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.2
100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.0
200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ )	7.0	7.0
Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	7.1	7.1
Testigo Negativo		
Cultivo de linfocitos + Extractos de raices de <i>Vicia faba</i> sin tratamiento	7.2	7.2
Testigo Positivo		
Cultivo de linfocitos + Extractos de raices de <i>Vicia faba</i> tratadas con Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	7.2	7.1
Cultivo de linfocitos + Extractos de raices de <i>Vicia faba</i> tratadas		
Con butilate		
ppm (molaridad)		
100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ )	7.2	7.1
200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ )	7.2	7.1
300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ )	7.3	7.0
400 ( $1.8 \times 10^{-3}$ )	7.2	7.2
500 ( $2.3 \times 10^{-3}$ )	7.2	7.2
750 ( $3.4 \times 10^{-3}$ )	7.2	7.3
1000 ( $4.6 \times 10^{-3}$ )	7.2	7.2
1500 ( $6.9 \times 10^{-3}$ )	7.1	7.1
2000 ( $9.2 \times 10^{-3}$ )	7.2	7.2

<sup>a</sup>Promedio dos experimentos

TABLA XIII. DETERMINACION DEL pH A LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS DE RAICES DE *Vicia faba* TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MOLINATE<sup>a</sup>

	48 h DE CULTIVO	70 h DE CULTIVO
Testigo		
Cultivo de linfocitos + 5-BrdU	7.1	7.2
Cultivo de linfocitos		
Tratamientos directos		
Con molinate		
Ppm (molaridad)		
25 ( $1.7 \times 10^{-4}$ )	7.2	7.1
50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.2
75 ( $4 \times 10^{-4}$ )	7.2	7.1
100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.1
200 ( $1 \times 10^{-3}$ )	7.3	7.2
300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ )	7.2	7.2
Etol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	7.1	7.1
Testigo Negativo		
Cultivo de linfocitos + Extractos de las raices de <i>Vicia faba</i> sin tratamiento	7.3	7.2
Testigo Positivo		
Cultivo de linfocitos + Extractos de raices de <i>Vicia faba</i> tratadas con Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	7.2	7.0
Cultivo de linfocitos + Extractos de raices de <i>Vicia faba</i> tratadas		
Con molinate		
Ppm (molaridad)		
100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.1
200 ( $1 \times 10^{-3}$ )	7.2	7.1
300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ )	7.3	7.1
400 ( $2.1 \times 10^{-3}$ ) <sup>b</sup>	7.2	7.2
500 ( $2.7 \times 10^{-3}$ )	7.3	7.3
750 ( $4 \times 10^{-3}$ )	7.1	7.1
1000 ( $5.3 \times 10^{-3}$ )	7.2	7.1
1500 ( $8 \times 10^{-3}$ )	7.3	7.2
2000 ( $1 \times 10^{-2}$ )	7.2	7.3

<sup>a</sup>Promedio de dos experimentos

<sup>b</sup>Raices necrosadas

**TABLA XIV. DETERMINACION DEL pH A LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BUTILATE Y LA MEZCLA S10 DE LA RAIZ DE *Vicia faba*<sup>a</sup>**

	48 h DE CULTIVO	70 h DE CULTIVO
Testigo negativo		
Cultivo de linfocitos + 5-BrdU	7.1	7.1
Cultivo de linfocitos		
Tramientos directos		
Con butilate		
ppm (molaridad)		
25 ( $1.1 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.1
50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.1
75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.1
100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ )	7.2	7.2
200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.1
Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	7.1	7.1
Testigo Negativo		
Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 de <i>Vicia faba</i>	7.2	7.2
Testigo Positivo		
Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 de <i>Vicia faba</i> + Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	7.2	7.2
Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 de <i>Vicia faba</i> + butilate		
ppm (molaridad)		
25 ( $1.1 \times 10^{-4}$ )	7.2	7.1
50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ )	7.0	7.0
75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ )	7.2	7.2
100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ )	7.2	7.2
300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ )	7.3	7.3

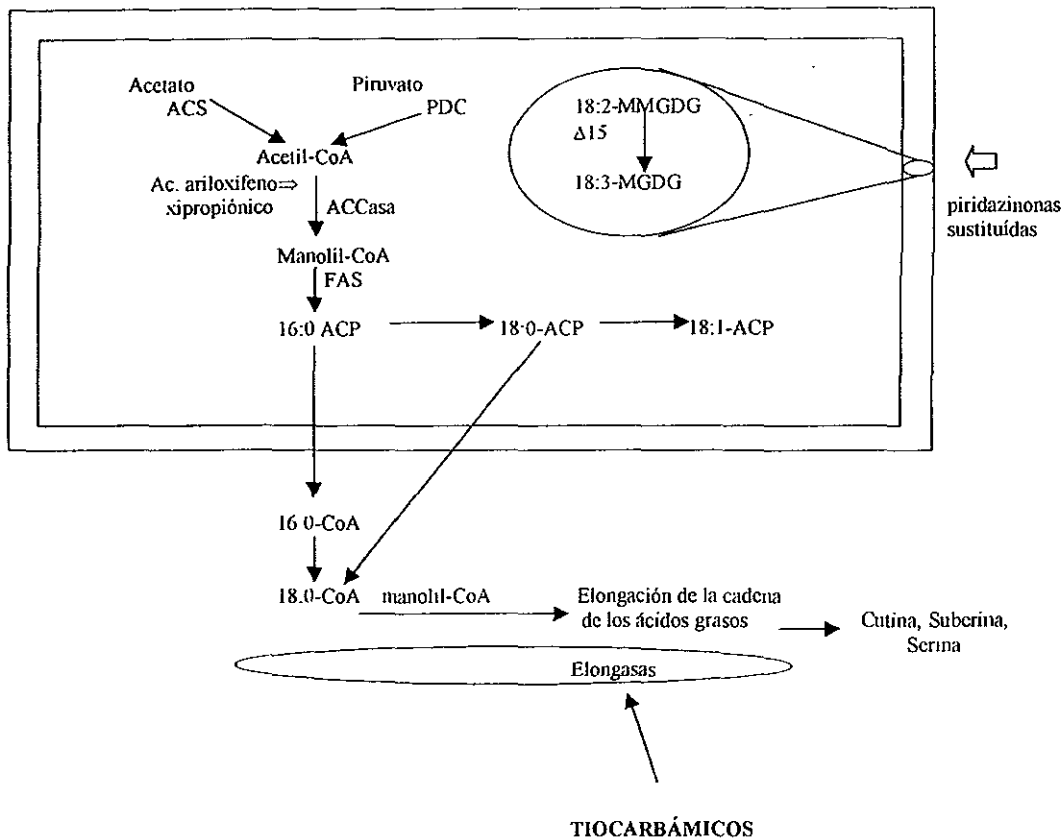
<sup>a</sup>Promedio de dos experimentos

TABLA XV. DETERMINACION DEL pH A LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS CON LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MOLINATE Y LA MEZCLA S10 DE LA RAIZ DE *Vicia faba*<sup>a</sup>

	48 h DE CULTIVO	70 h DE CULTIVO
Testigo		
Cultivo de linfocitos+ 5-BrdU	7.1	7.2
Cultivo de linfocitos Tratamientos directos		
Con molinate ppm (molaridad)		
25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.2
50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ )	7.2	7.1
75 ( $4 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.1
100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ )	7.3	7.2
200 ( $1 \times 10^{-3}$ )	7.2	7.3
300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ )	7.3	7.3
Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	7.1	7.1
Testigo Negativo		
Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 de <i>Vicia faba</i>	7.3	7.1
Testigo Positivo		
Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 + Etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ )	7.2	7.0
Cultivo de linfocitos + Mezcla S10 de <i>Vicia faba</i> + molinate ppm (molaridad)		
25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.2
50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ )	7.2	7.1
75 ( $4 \times 10^{-4}$ )	7.1	7.1
100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ )	7.3	7.2
300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ )	7.3	7.3

<sup>a</sup>Promedio de dos experimentos

# FIGURAS



ACCasa = Acetil-CoA carboxilasa  
 ACP = Proteína acarreadora del acil  
 ACS = Acetil-CoA sintetasa  
 CoA = Coenzima A  
 FAS = Sintetasa del ácido graso  
 MGGDG = Monogalactocildiacilglicerol  
 PDG = Piruvato deshidrogenasa

Fig. 1. Esquema simplificado de la biosíntesis de los ácidos grasos en plantas superiores, ilustrando los sitios de acción de los tiocarbámicos y otras clases de herbicidas (Harwood 1989, Gronwald 1991)

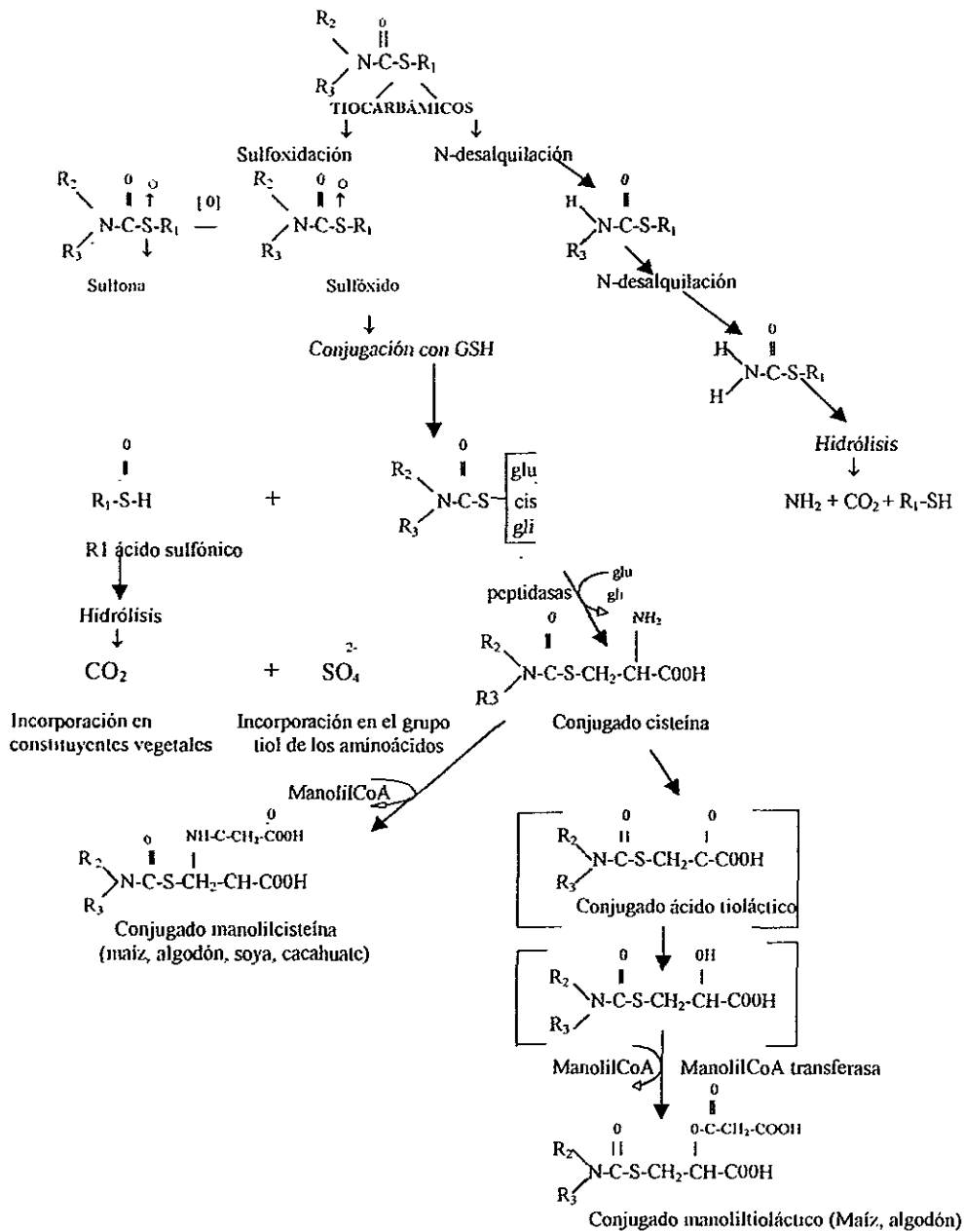
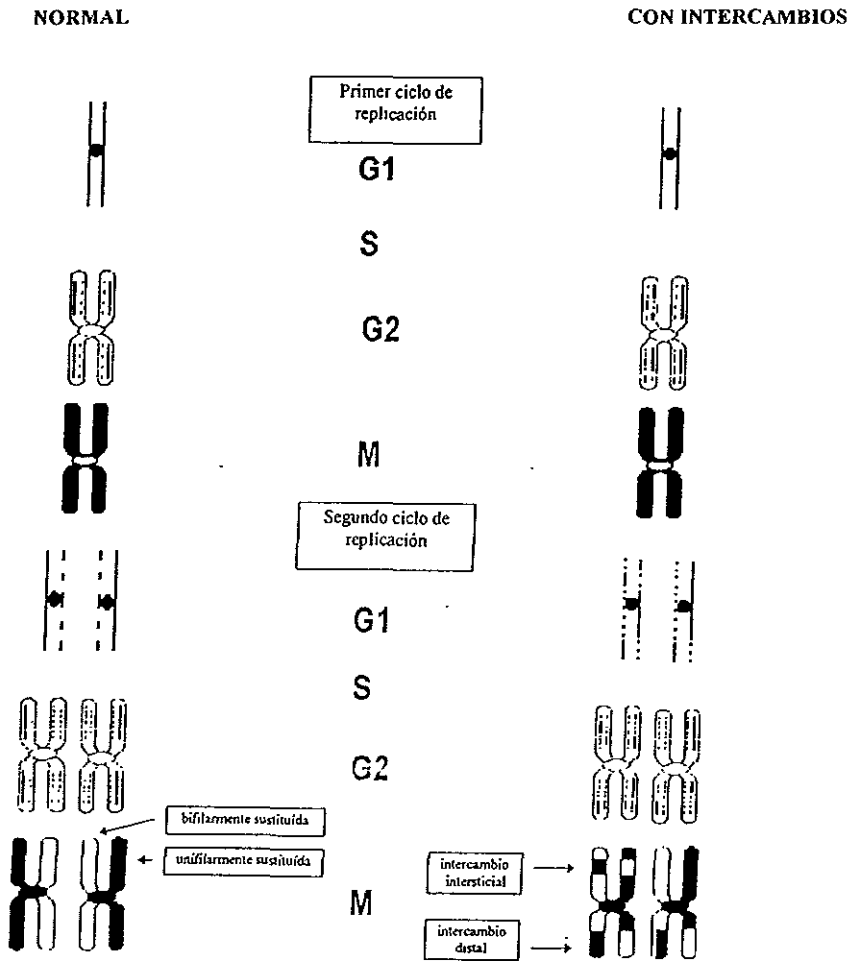


Fig. 2. Vía metabólica general de los herbicidas tiocarbámicos en plantas superiores (Hatzios y Penner 1982).



**Fig. 3** Mecanismo de la formación de intercambios de cromátidas hermanas incluyendo a la replicación cromosómica y a la incorporación de la 5-bromodesoxiuridina(5-BrdU), durante dos ciclos de división celular.



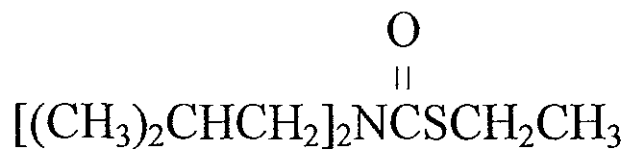
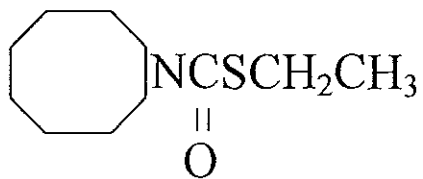
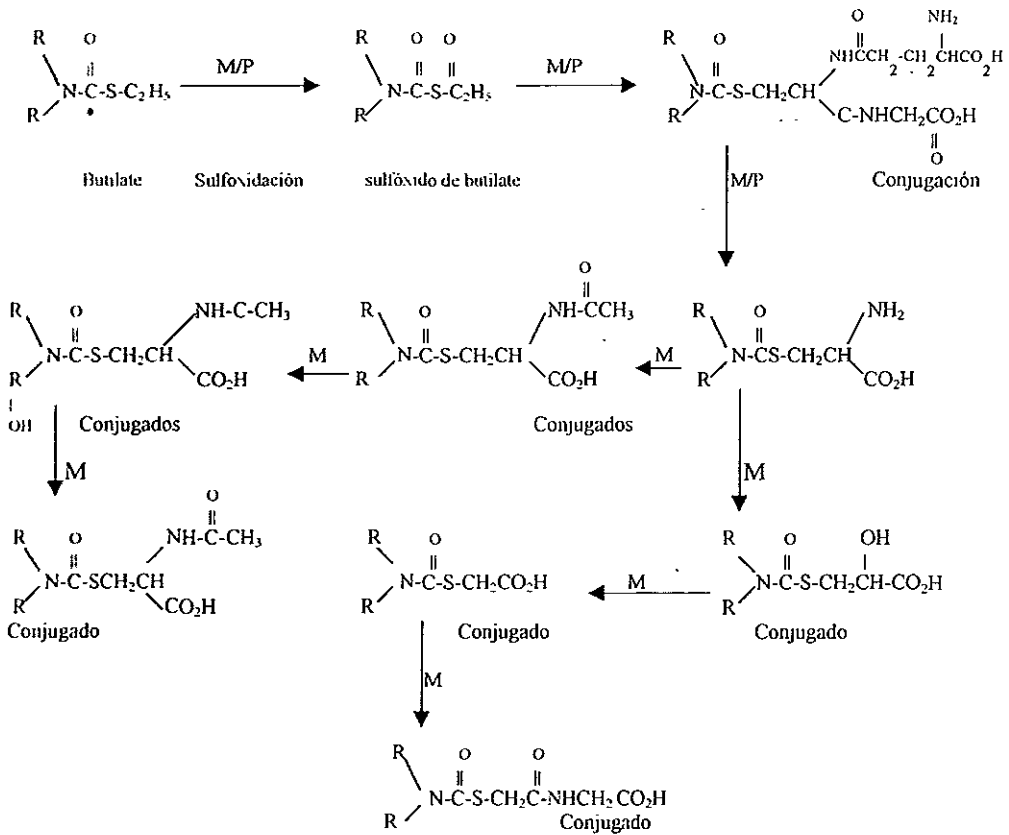


Fig. 4. Estructura química del herbicida tiocarbámico butilate (Shimabukuro *et al.* 1982).



**Fig. 5** Estructura química del herbicida tiocarbámico molinate (Debaun *et al.* 1978a)



M=Mamíferos  
 P= Plantas  
 R=n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; \* i-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> Butilate

Fig. 6. Via metabólica del herbicida tiocarbámico butilate en plantas y en animales superiores (Shimabukuro *et al.* 1982)

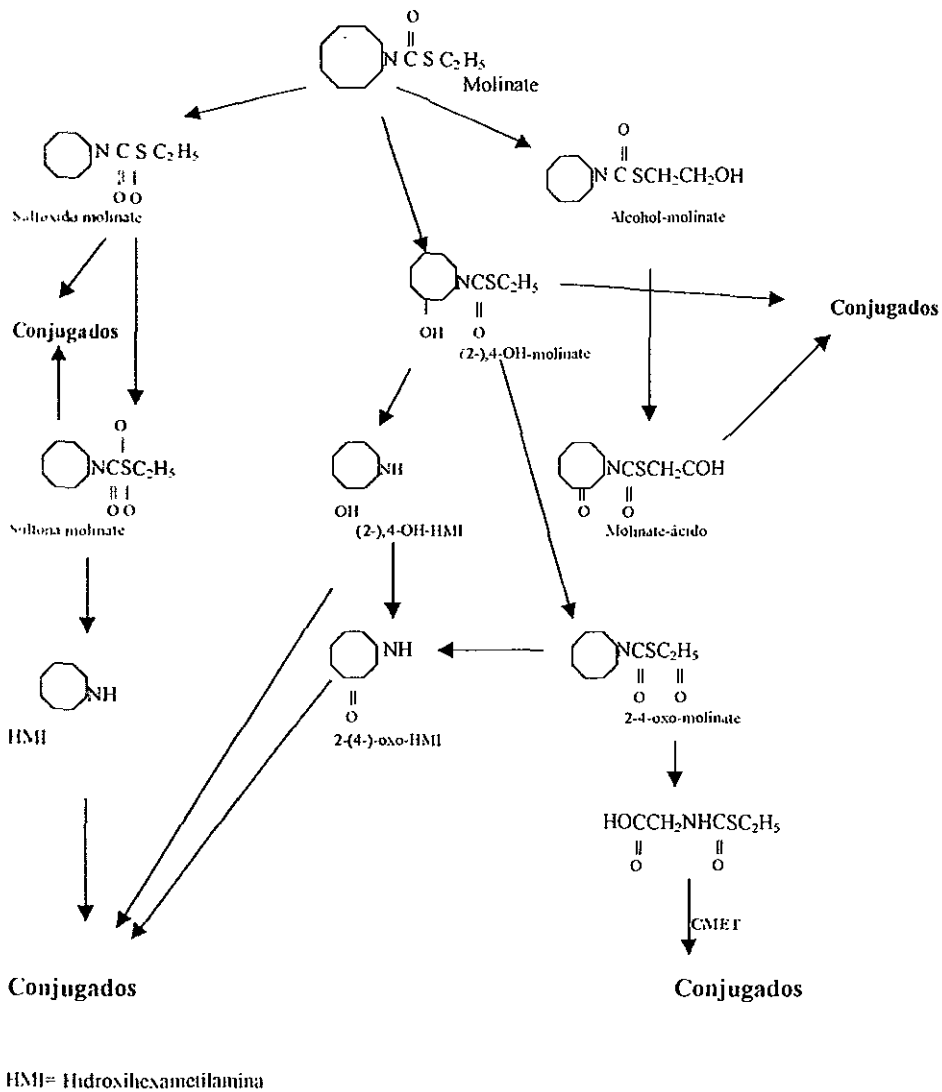
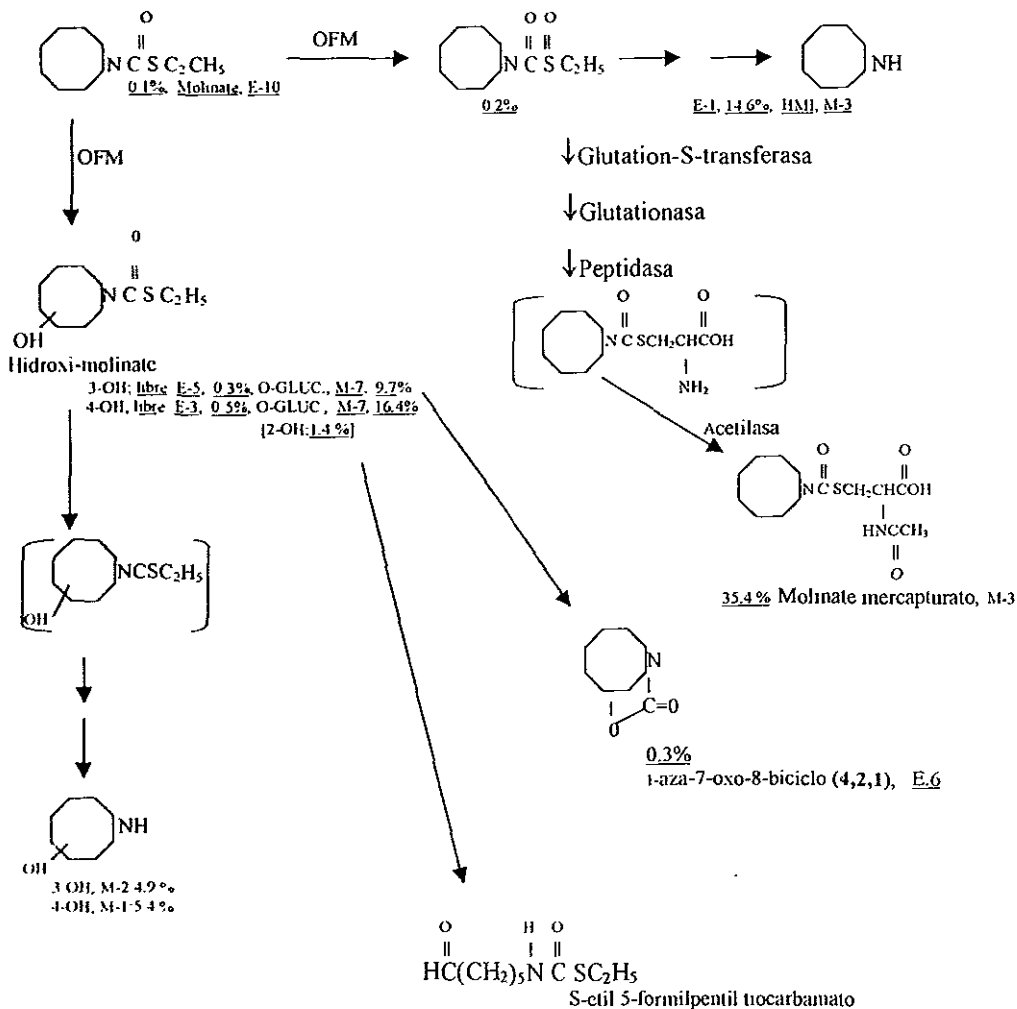


Fig. 7. Via metabólica del herbicida tiocarbámico molinate en plantas (Imai y Kuwatsuka 1984).



OFM=Oxidasa de función mixta  
HMI= Hidroxihexametilamina

Fig. 8 Vía metabólica del molinate en mamíferos, los porcentajes son los valores promedio de los metabolitos marcados con  $^{14}\text{C}$ , determinados en orina de ratas, después de administrar oralmente 72 mg/kg de molinate en intervalos de 0-4 horas. (Debaun *et al.* 1978a, b).