

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

100

FACULTAD DE CIENCIAS

GENOTOXICIDAD DEL HERBICIDA AMETRINA EN
LINFOCITOS HUMANOS, PREVIA ACTIVACIÓN
METABÓLICA POR *Vicia faba* MEDIANTE EL ENSAYO
COMETA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

LUCINA LÓPEZ GONZÁLEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

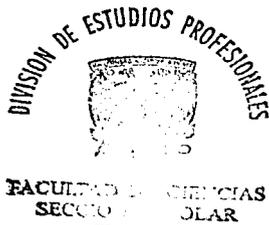
DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA



Facultad de Ciencias
UNAM

MÉXICO, D. F.

2003



A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Genotoxicidad del herbicida ametrina en linfocitos humanos, previa activación metabólica por Vicia faba mediante el ensayo cometa.

realizado por López González Lucina

con número de cuenta 8621669-4 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. María Elena Calderón Segura

Propietario

Dra. Sandra Gómez Arroyo

Propietario

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Suplente

M. en C. Josefina Cortés Eslava

Suplente

M. en C. Ana Rosa Flores Marquez

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

13

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, Alma Mater de millones de mujeres y hombres que hemos encontrado en su espíritu la fuerza de la ciencia por la cual hablamos, esperando que sea en beneficio de la humanidad.

Al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica** (PAPIIT – UNAMIN 216098), por su aporte de recursos económicos para la obtención de equipo de laboratorio necesario, lo que permitió el desarrollo del presente trabajo y de otros muchos más que nos dan a futuros investigadores, científicos o docentes la oportunidad de aplicar nuestros conocimientos en el ejercicio profesional.

A la **Dirección General de Asuntos de Personal Académico** (DGAPA), que con sus servicios de apoyo a nuestros maestros fortalece su sapiencia en beneficio de nosotros sus alumnos.

A la **Facultad de Ciencias de la UNAM, Departamento de Biología**, a todo su plantel docente y en especial aquellos que fueron y seguirán siendo por siempre mis maestros.

Al **Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM, Laboratorio de Citogenética**, espacio de investigación científica que me brindó la oportunidad de realizar mi servicio social y la elaboración de la presente tesis para obtener mi licenciatura en biología.

Al **Instituto Nacional de Pediatría, Laboratorio de Genética**, que en momentos difíciles para nuestra universidad nos abrió sus puertas para el avance de nuestros trabajos de laboratorio en el *ensayo cometa*, durante mi servicio social. Mi agradecimiento a la **Dra. Bertha Molina**.

A la **Dra. María Elena Calderón Segura**, quien no solo me abrió las puertas de su área de trabajo en el Centro de Ciencias de la Atmósfera, sino sus brazos solidarios y su conocimiento de excelencia en la dirección de la presente tesis.

Al **Dr. Rafael Villalobos Pietrini**, de quien no alcancé a distinguir cual es su mayor grandeza la de hombre de ciencia o la de un CABALLERO. Mi admiración, y reconocimiento.

A la **Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo**. La mujer de por si ya es valiosa, la mujer de ciencia lo es más y la que además es docente y suma a esto el amor por sus semejantes, es invaluable. Gracias doctora por sus sabios consejos y enseñanzas.

A la **Dra. Josefina Cortés Eslava**, que sin condición me brindó siempre su apoyo y orientación aun cuando no formaba parte de su grupo de tesis.

A la **M. en C. Ana Rosa Flores Márquez**, en quien siempre encontré comprensión y apoyo.

Al **M. en C. Miguel Ángel Meneses**, maestro, vecino y colaborador en el laboratorio de citogenética, quien siempre me brindó su apoyo.

A todos mis maestros de la **Escuela Secundaria para Trabajadores número 54**, y del **Colegio de Ciencias y Humanidades, Plantel Sur de la UNAM**.

A la **Sra. Concepción González Cárdenas**^ª, mi tía abuela y madre adoptiva quien cuidó de mi niñez, adolescencia y el inicio de mi juventud, de quien aprendí los valores morales y sentimientos humanos que forjaron mi carácter en la firmeza y dulzura de la mujer de la perla de occidente.

A la **Sra. Alicia del Valle González**, mi madre biológica que amorosamente siempre ha estado pendiente de mi bienestar, quien me ha brindado toda su comprensión, sus consejos, sus caricias y sus halagos. Recuerdo mamá tus guisos que me recuerdan nuestra patria chica, Guadalajara.

Al **Dr. Moisés López González**, tío y hermano por adopción, admirable universitario, destacado neurólogo, por quien siempre he sentido respeto y admiración.

Al **Lic. Javier González Montaño**, quien con su tesis profesional aportó ideas reformadoras a las leyes de seguridad social que hoy hacen posible la protección de los estudiantes mexicanos, maestro de trabajadores y campesinos, pero sobre todo esposo amoroso que ha sabido darme apoyo e impulso para que yo logre mi licenciatura, como primer escalón para mi desarrollo en la ciencia de la biología.

A mi hijo **Javier González Montaño y López**, con todo mi amor y con la esperanza de que muy pronto el también alcance su licenciatura. Hijo por ti y para ti es todo mi esfuerzo.

A mi sobrino político **Dr. Carlos Nápoles González**, médico de firmes valores humanos, profesional de la epidemiología, quien me asesoró en varios temas que él domina y con la metodología estadística que avala los resultados de este trabajo. Hago extensivo mi agradecimiento a su esposa Paty e hija Dalia Amalinali.

A todos mis demás familiares consanguíneos y políticos que reconocieron mi esfuerzo y me animaron para continuar con mis estudios, sin descuidar mi calidad de madre y esposa, gracias.

A todos mis compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias y del Laboratorio de Citogenética, en especial a: **Lilia Cuéllar, Leticia Gómez de la Cruz, Ivonne Romero, Selene y Leonel.**

Al personal del Centro de Ciencias de la Atmósfera, en especial a las secretarias: **Emma y Luzma.**

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN	4
I. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Clasificación de los plaguicidas.	9
1.2 Riesgos de la exposición a los plaguicidas.	10
1.3 Efectos toxicológicos de los plaguicidas.	12
1.4 El papel de los plaguicidas en la agricultura.	14
1.5 Efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos de los plaguicidas.	15
II. ANTECEDENTES	18
2.1 Características de las triazinas	18
2.2 Metabolismo de las triazinas	20
2.2.1 En las plantas	24
2.2.2 Reacciones primarias de oxidación o de Fase I Sulfoxidación y N-desalquilación.	25
2.2.3 Reacciones secundarias de conjugación o de Fase II. Conjugación con glutatión, azúcares o aminoácidos.	26
2.2.4 Reacciones terciarias o de Fase III.	27
2.3 La Fracción enzimática S9 .	30
2.4 La Fracción enzimática S10 .	30
2.5 El herbicida triazínico Ametrina.	31
2.5.1 Características generales del herbicida ametrina.	31
2.5.2 Efectos toxicológicos.	32
2.5.3 Efectos ecológicos.	33
2.5.4 Metabolismo de la ametrina.	33
2.5.4.1 En plantas.	33
2.5.4.2 En animales.	33

	Páginas
2.5 El papel del metabolismo vegetal en la activación de promutágenos ambientales.	37
2.6 Los sistemas biológicos de prueba.	37
2.7 Electroforesis unicelular alcalina " <i>ensayo cometa</i> ".	39
2.8 Ventajas del uso del ensayo cometa.	40
2.9 Linfocitos humanos de sangre periférica.	41
2.10 Factores que influyen en el daño genético.	41
III. JUSTIFICACION	42
IV. OBJETIVOS	43
V. MATERIALES Y METODOS	44
5.1 Propiedades físicas y químicas del herbicida ametrina.	44
5.2 Aplicaciones de la ametrina	45
5.3 La electroforesis unicelular alcalina	46
5.4 Aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica.	47
5.5 Cuantificación de linfocitos humanos.	47
5.6 Análisis de la viabilidad linfocitaria.	48
5.7 Tratamientos directos con el herbicida Ametrina a los linfocitos humanos.	48
5.8 Elaboración de geles con monocapa de agarosa más células con/sin tratamiento.	48
5.8.1 Lisis celular.	49
5.8.2 Electroforesis unicelular alcalina.	49
5.8.3 Neutralización.	49
5.9 Tinción del ADN.	49
5.10 Análisis del daño sobre el ADN.	50
5.11 Activación metabólica vegetal <i>in vivo</i> .	50
5.11.1 Preparación de los extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con ametrina y su aplicación a los linfocitos humanos	50

	Páginas
5.12 Esquema de tratamiento (dos horas) con los extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con diferentes concentraciones de ametrina.	51
5.13 Determinación de proteínas totales por el método de Bradford.	52
5.13.1 Extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> con y sin tratamiento con ametrina aplicados a los linfocitos humanos.	52
6. Evaluación del daño al ADN de los linfocitos humanos.	52
6.1 Análisis de cometas.	53
VI. ANALISIS ESTADÍSTICO	53
VII. RESULTADOS	54
7.1 Tratamientos directos con ametrina y mitomicina C (MMC) a los linfocitos humanos.	54
7.2 Tratamientos con los extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con ametrina y etanol a los linfocitos humanos <i>in vitro</i> .	54
7.3 Evaluación del efecto citotóxico de la ametrina y etanol con activación metabólica de <i>Vicia faba in vivo</i> .	54
7.4 Determinación de proteínas totales por el método de Biorad de Bradford en los extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> .	55
VIII. DISCUSIÓN	56
IX. CONCLUSIONES	62
X. REFERENCIAS	63
TABLAS	79
GRÁFICAS	84

RESUMEN

El herbicida triazínico ametrina es ampliamente utilizado en el cultivo de maíz, sorgo, caña de azúcar, café, piña etc, de la agricultura mexicana y en el mundo. Sin embargo, hay poca información sobre su mutagenicidad y genotoxicidad en seres humanos, animales y plantas.

En este trabajo se investigaron los efectos genotóxico y citotóxico de la ametrina y el papel del metabolismo de *Vicia faba in vivo*, para biotransformar al herbicida triazínico ametrina y como prueba para analizar el daño al ADN el ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina, empleando a la raíz de *Vicia faba in vivo* como sistema de activación metabólica vegetal, para lo cual se expusieron directamente al herbicida, así como a los extractos de la planta, a los linfocitos humanos periféricos (LHP).

Se llevaron a cabo tratamientos directos con concentraciones de 1, 2, 3, 5, 6 y 10 ppm de ametrina a los LHP por 2 h en tres experimentos consecutivos, los resultados evidenciaron que no aumentan las frecuencias de los linfocitos con daño (con cometas) y la migración del ADN con relación a los valores del testigo negativo. Sin embargo, al coincubar los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm de ametrina más los linfocitos interfásicos, se incrementó la actividad genotóxica del herbicida, observando del 40% al 60 % de células con cometa y mayor migración del ADN. Con 1000 ppm de ametrina se indujo 100% de linfocitos con daño e incremento en la migración del ADN comparados con los datos del testigo negativo (fracción S10 de la raíz de *Vicia faba* sin tratamiento).

La viabilidad de linfocitos coincubados con ametrina con y sin activación metabólica *in vivo*, disminuyó significativamente con relación de concentración-respuesta contrastados con el testigo negativo. Con 10 ppm de ametrina directo se ocasionó muerte celular.

La mitomicina C (MMC, testigo positivo directo) produjo 22% de cometas y migración del ADN. El etanol (testigo positivo indirecto), previamente activado por la raíz de *Vicia faba* indujo el 100% de células con daño (con cometas), ambos testigos no afectaron la viabilidad linfocitaria. Estos resultados demostraron que el etanol es

un buen testigo positivo en el sistema de activación metabólica vegetal *in vivo* al inducir significativamente daño al ADN ó un promutágeno adecuado para detectar genotoxicidad mediante electroforesis unicelular alcalina. La fracción S10 no mostró acciones genotóxica y citotóxica sobre los linfocitos al no obtener frecuencias elevadas de cometas ni descenso de la viabilidad linfocitaria.

Se concluyó que la ametrina requiere del sistema enzimático de la raíz de *Vicia faba* para aumentar el daño al ADN de células humanas. Posiblemente los metabolitos hidroxí-ametrina son los principales inductores de la fragmentación de la cadena del ADN, reflejados en la formación de cometas.

I. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos están expuestos a la acción de numerosos agentes potencialmente tóxicos, físicos, químicos y biológicos, que provocan efectos fisiológicos, bioquímicos, patológicos y genéticos. Los xenobióticos, sustancias que no existen de manera natural y muchas de ellas dañinas al ambiente, son principalmente introducidas por actividades humanas y su uso se ha incrementado en las últimas décadas de forma considerable. A finales del siglo pasado se han desarrollado muchos compuestos orgánicos sintéticos que han conducido a la producción de grandes cantidades de agentes químicos que finalmente se adicionan al ambiente, ya sea intencionalmente o por accidente. Un ejemplo de este tipo de sustancias son los plaguicidas que son utilizados ampliamente para el control químico de plagas (Brock y Madigan 1991).

Este uso de plaguicidas coincide con la "era química", que ha transformado la sociedad desde el año de 1950. En lugares donde se practica el monocultivo los plaguicidas constituyen el método habitual de lucha contra los fitopatógenos. Sin embargo, estos productos son también la causa de numerosos problemas entre los cuales destacan las intoxicaciones humanas (Márquez 1975, Herrera y Rodas, 1983).

Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, basadas en numerosos estudios desarrollados en diversos países del mundo, se provocan aproximadamente un millón de intoxicaciones agudas accidentales al año, de las cuales cerca del 70% se debe a exposiciones profesionales y el resto a intoxicaciones por consumo de alimentos contaminados. Además se calculan hasta dos millones de intoxicaciones agudas deliberadas. En total entre los dos grupos la mortalidad alcanza la cifra de 22,000 defunciones al año (OMS 1990).

El rendimiento de las cosechas agrícolas en México depende cada día más del empleo de estos agentes químicos y debido a la resistencia desarrollada por algunas plagas, cada vez se necesitan aplicar cantidades mayores de plaguicidas para mantener la producción promedio de cada cultivo.

Un "plaguicida" se define como una sustancia o mezcla en cualquier estado físico cuya finalidad sea la de controlar, combatir y/o prevenir plagas o enfermedades y en general tienen el objetivo de proteger al hombre de organismos que afectan su ambiente, animales y/o alimentos. En la agricultura mexicana, se utilizan diversos tipos de plaguicidas como son herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, rodenticidas etc. (Estrada 1998, Robledo 1998, Ortiz-Hernández *et al.* 1997).

La mayoría de los plaguicidas que se utilizan en México, se aplican con más frecuencia en las cosechas del algodón, caña de azúcar y arroz, por ejemplo, en el algodón, inicialmente los campos se rociaban de 5 a 7 veces por ciclo de cultivo y ahora sobrepasan las 30 aplicaciones (Ecología Humana y Salud 1983).

La necesidad de aumentar el empleo de plaguicidas ha ocasionado que los productos sean cada vez más tóxicos y que en algunas ocasiones, estén prohibidos en los países desarrollados, tal es el caso del DDT que fue el más conocido entre los organoclorados y usado extensamente para el control de plagas hasta su prohibición en 1979, sus metabolitos (productos secundarios de su degradación) se han encontrado contaminando el suelo y el agua, así como en tejidos animales y en humanos (Ecología Humana y Salud 1983, Waleszewski y Szymczynski 1990).

Por desgracia, los beneficios aportados por la agroquímica han ido acompañados de una serie de perjuicios, algunos de ellos tan graves que ahora representan una amenaza para la supervivencia a largo plazo de importantes ecosistemas, como consecuencia de la perturbación de las relaciones depredador-presa y la pérdida de biodiversidad. Además, los plaguicidas pueden tener importantes consecuencias en la salud humana (Ecología Humana y Salud 1983, Waleszewski y Szymczynski 1990).

La Ley de Sanidad Fitopecuaria de México, considera en sus artículos 2, 26, 27, 28, 42, 49 y 140, que el uso de plaguicidas agrícolas es responsabilidad de comerciantes, agricultores, asesores técnicos, aplicadores y empacadores de productos agrícolas (SARH 1980).

Como en la carga ambiental de productos químicos tóxicos figuran compuestos tanto agrícolas como no agrícolas, es difícil separar los efectos ecológicos y sanitarios de los plaguicidas y los ocasionados por compuestos

industriales que de forma intencionada o accidental se liberan en el ambiente. No obstante, hay pruebas abrumadoras de que el uso de los plaguicidas en la agricultura tiene importantes efectos en la calidad del agua y provoca serias consecuencias ambientales. Sin embargo, este avance industrial y económico, es la causa de que el hombre abuse en la aplicación de agentes físicos y químicos en el campo que son mutagénicos, aumentando así los riesgos para la salud y la contaminación ambiental (Reyes y Sánchez 1975).

En México, en un estudio realizado durante el ciclo agrícola de 1974 en la Comarca Lagunera, región situada al norte del país cuya economía depende principalmente de la agricultura, se encontraron aumentos en la incidencia de casos de intoxicación por plaguicidas, en la época en la que se realiza la mayor aplicación de los plaguicidas o sea en mayo y septiembre (Reyes y Sánchez 1975).

Los grupos afectados se clasificaron por ocupación: agricultores y fumigadores (91.4%), manejadores o transportadores de herbicidas en expendios (6.1%), jóvenes que realizaban labores agrícolas (1.5%) y amas de casa que ayudan en el campo (0.5%).

El aumento continuo en el empleo de plaguicidas ha provocado efectos deletéreos en el ambiente y en la salud de las personas, especialmente cuando implican aspectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos (WHO 1972, Wild 1975), además de alergias, alteraciones de las vías respiratorias e intoxicaciones que en algunas ocasiones conllevan a la muerte (Barberá 1975, Ecobichon y Joy 1984).

A pesar de que existen evidencias de que la ocurrencia de intoxicaciones agudas y crónicas por plaguicidas constituye un problema importante de salud pública en el país, no hay suficiente información enfocada a los trabajadores agrícolas que permita hacer un diagnóstico preventivo y un control acerca de las medidas de protección que se deben tomar al aplicar los plaguicidas, así como acciones que capaciten al personal médico en la identificación y en el tratamiento de intoxicaciones causadas por estos compuestos (Molly 1984, Reyes y Sánchez 1975, Coye 1982, Maddy y Edmiston 1981).

También es necesario crear programas regionales, para vigilancia y monitoreo entre la población expuesta. En algunos países ya se cuenta con programas de monitoreo basados en pruebas biológicas para evaluar la protección del trabajador (Molly 1984, Reyes y Sánchez 1975, Coye 1982, Maddy y Edmiston 1981).

1.1. Clasificación de los plaguicidas

Debido a la gran variedad de compuestos que son utilizados como plaguicidas existen diferentes clasificaciones, de las cuales las más difundidas son las que consideran su uso, su estructura química y su toxicidad aguda o crónica.

La clasificación según su empleo está basada en el organismo sobre el que actúan: insecticidas, acaricidas, herbicidas, rodenticidas, fungicidas, nematocidas, etc. De acuerdo con su estructura química se dividen en:

- o Compuestos organofosforados: paratión, malatión, diazinón, etc.
- o Compuestos organoclorados: diclorodifenil-tricloroetano. Derivados del lindano (clordano, heptacloro, aldrín, dieldrín, endrín, hexaclorobenceno).
- o Carbamatos.
- o Derivados del cloronitrofenol.
- o Compuestos orgánicos del estaño.
- o Derivados de bupiridilos.
- o Derivados del ácido fenoxiacético.
- o Derivados de triazinas.
- o Compuestos químico-inorgánicos: arsénico, talio, fluoruros, mercurio, cianuros, antimonio, selenio, plomo, bromuro de metilo, fósforo blanco, etc.
- o Piretroides.

La Organización Mundial de la Salud (OMS 1990) desarrolló en 1978, una clasificación en la que se consideran cuatro categorías según la toxicidad del plaguicida expresada en **CL₅₀** (mg/kg):

Clase I A	Extremadamente peligrosos: paratión, dieldrín.
Clase I B	Altamente peligrosos: aldrín, diclorvos.
Clase II	Moderadamente peligrosos: DDT, clordano.
Clase III	Ligeramente peligrosos: malatión

1.2. Riesgos de la exposición a los plaguicidas

Cuando los plaguicidas son aplicados en los campos de cultivo, el suelo recibe gran cantidad de estos productos que pueden ser arrastrados por el agua y contaminar corrientes y embalses. Parte de estas sustancias pueden incorporarse al aire y viajar grandes distancias; otras son absorbidas por plantas que serán ingeridas por animales y por el hombre (Márquez 1975).

De acuerdo con las características que posea cada plaguicida, se podrá determinar el grado en el que estos productos contaminarán agua, aire y alimentos (Vega 1985). De esta forma, la población en general, expuesta a través de la contaminación de agua, aire y alimentos constituye el grupo de bajo riesgo, salvo en casos accidentales como el ocurrido en la ciudad de Tijuana, Baja California, donde hubo 16 víctimas por ingerir pan con altos niveles de paratión (Márquez 1975).

La exposición a los agentes tóxicos puede presentarse en forma aguda, es decir, en un sólo episodio de manera accidental, cuando ingresan al organismo cantidades elevadas de alguna toxina. El efecto crónico, ocurre cuando un organismo está expuesto a pequeñas dosis, no letales y repetidas, de una sustancia potencialmente peligrosa. Respuestas crónicas bien conocidas a diferentes compuestos incluyen silicosis, cáncer pulmonar, daño cerebral, así como necrosis de hígado y riñones (Hassall 1990).

El grupo de exposición de alto riesgo lo forman las personas que manipulan directamente los plaguicidas, como los agricultores y del personal que participa en su fabricación, formulación, envase y distribución de los productos, así como las personas que los aplican en las campañas sanitarias.

De acuerdo con la figura 1, según sea la concentración, el tipo de agroquímico y la duración de la exposición a los herbicidas, existen dos grupos el de alto riesgo (personas que tiene contacto directo y continuo con estas sustancias) y el de bajo riesgo o exposición moderada (la población general) (Hassall 1990).

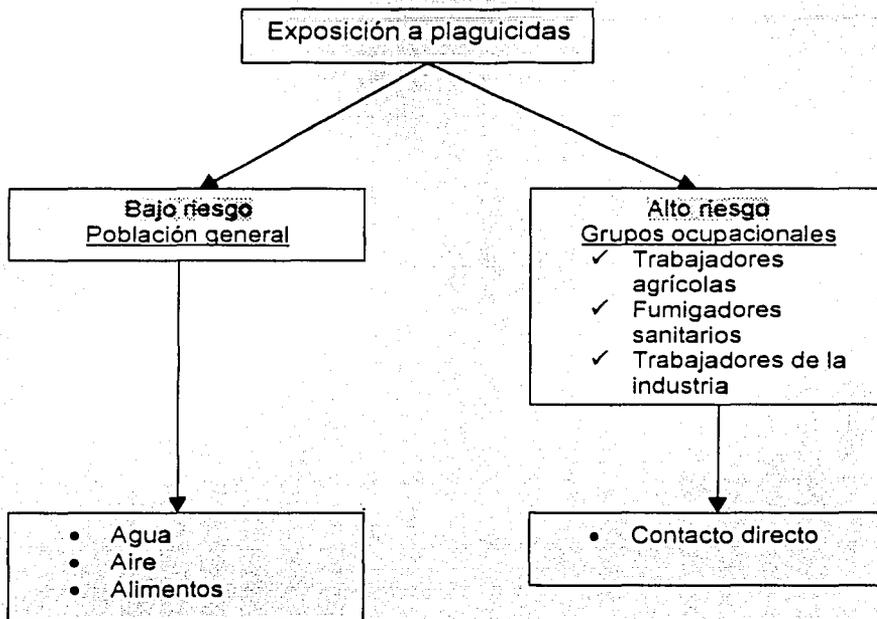


Figura 1. Exposición a plaguicidas (Hassall 1990)

1.3. Efectos toxicológicos de los plaguicidas

La toxicología estudia los mecanismos de ingreso, transformación y excreción de las sustancias químicas así como a nivel molecular y celular de los procesos de producción de daño y de desintoxicación (Peña *et al.* 2001).

Los efectos tóxicos que producen los plaguicidas dependen básicamente del tipo de sustancia, de la vía de penetración al organismo (oral, dérmica o inhaladora), de la intensidad de la dosis y de la duración de la exposición (De la Jara 1985, Casarett y Doull 1975). La concentración de las sustancias en el cuerpo se puede medir analizando la sangre, la orina y el pelo. Los procesos que controlan el destino final de un compuesto en el ambiente son el transporte, la transformación y la transferencia del mismo. El transporte de los agentes químicos en el ambiente se debe principalmente a fuerzas naturales, como el viento y el agua, cuya dirección y velocidad determinan su concentración (Rodríguez y Lozada 1984).

La transformación es un cambio en la estructura física o química de un compuesto, puede pasar de sólido-líquido-gas o transformarse por reacciones de oxidación-reducción, procesos que se llevan a cabo en los organismos, estos factores los inactiva, los activa o los degrada (Rodríguez y Lozada 1984).

Un agente químico presente en el agua puede volatilizarse, pasando al aire, ser luego transferido al suelo por acción de la lluvia para incorporarse de manera inmediata a la cadena alimenticia. Esto da como resultado, una distribución de toxinas en el ambiente y por lo tanto, el aumento de riesgo a la exposición. Es muy importante determinar el destino final de un producto químico en los seres vivos, ya que muchos son capaces de concentrarse en órganos y tejidos en cantidades elevadas, ejemplos serían los peces y el ganado, los que alteran la cadena alimenticia que finalmente llega al hombre (Rodríguez y Lozada 1984).

La respuesta de los organismos a los agentes tóxicos depende de varios factores, siendo los más importantes las propiedades específicas, físicas y químicas del compuesto y la cantidad a la que estén expuestos. Para que una sustancia tóxica ejerza sus efectos en un ser vivo debe ponerse en contacto con el organismo. La piel en los animales y la corteza en las plantas son barreras naturales que separan a los

organismos del medio. Sin embargo, una vez que ingresa una toxina al organismo, por cualquier ruta, ésta es absorbida y distribuida por el torrente sanguíneo hasta alcanzar a las células blanco, que contienen los receptores para un compuesto químico específico. Los agentes tóxicos pueden eliminarse de la circulación al ser excretados por el riñón o quizás acumularse en los tejidos grasos o bien biotransformarse en las células del hígado y de otros órganos (Rodríguez y Lozada 1984).

Los plaguicidas se incluyen en una gran variedad de microcontaminantes orgánicos que tienen efectos ecológicos. Las distintas categorías de plaguicidas tienen diferentes tipos de repercusión en los organismos vivos, por lo que es difícil hacer afirmaciones generales. Aunque los plaguicidas tienen sin duda efectos en la superficie terrestre, el principal medio de daños ecológicos es el agua contaminada por la filtración de los plaguicidas. Los dos mecanismos más importantes son la bioconcentración y la bioampliación (Rodríguez y Lozada 1984).

Varias clases de herbicidas entre ellos las triazinas, son diseñadas exclusivamente para combatir las malezas sin causar daño a los cultivos. Esta selectividad resulta de la desintoxicación metabólica del herbicida por la planta cultivada pero no por la maleza. En otros casos, la selectividad del herbicida se da por su aislamiento o captura dentro de un compartimiento interno de la planta cultivada que las malezas no poseen o es poco funcional. Alternativamente, barreras externas como la cutícula vegetal pueden prevenir la penetración del herbicida (Lanfranconi *et al.* 1993, Smeda *et al.* 1993).

En la actualidad, la utilización de las triazinas en la práctica agrícola ha incrementado los niveles de los compuestos xenobióticos en suelo, agua y aire. Esto representa problemas serios para el ambiente de las plantas y la salud humana (Higashi 1985, 1988, Ikonen *et al.* 1988, Tu 1992, Junnila *et al.* 1993, Porter *et al.* 1993, Brusick 1994, Davies *et al.* 1994).

1.4. El papel de los plaguicidas en la agricultura

En México, ha aumentado el empleo de plaguicidas como las triazinas, entre ellas, la ametrina, es selectiva para maíz, sorgo, trigo y caña de azúcar entre otros. Sin embargo, hay poca información sobre el daño causado al ADN y sus efectos en humanos, animales y plantas. Numerosos estudios, han corroborado que los plaguicidas inducen modificaciones al ADN en los seres vivos, aún a bajas concentraciones (Pimentel *et al.* 1991).

El estado de la República con más incidentes reportados es Nayarit con 277, le siguen el Estado de México con 145, Michoacán con 115, Jalisco con 112, Guerrero con 99 y Morelos con 88. La mayor tasa de intoxicaciones es de 31% en Nayarit, le sigue Baja California Sur con 10%, Morelos con 7%, Aguascalientes y Campeche con 5% (SSA 1993). En los siguientes años se reportan 154 defunciones por envenenamiento químico en la lista básica de la Dirección General de Estadística Informática y Evaluación (DGEIE 1995).

Algunas investigaciones sobre las triazinas indican que intoxican agudamente a diversos organismos acuáticos (Veber *et al.* 1981, Carder y Hoagland 1998, Tang *et al.* 1998), macrofitas (Hoberg 1993, Kirby y Sheahan 1994, Lytle y Lytle 1998), organismos bentónicos (Solomon y Schettler 2000), zooplancton (Oris *et al.* 1991) y peces (Kopriva 1981, Davies *et al.* 1994).

Tchounwoul *et al.* (2000) demostraron reducción en la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* expuesta a varias triazinas tales como: atrazina, ametrina, prometrina, propazina, atratón y bladex y con tres metabolitos de la atrazina dietil-atrazina, deisopropil-atrazina y dialquil-atrazina observando una relación de concentración-respuesta, además mostraron que la ametrina es más tóxica y la menos tóxica la propazina de los herbicidas ensayados.

En las plantas, las triazinas producen incremento en la frecuencia de células anormales en la punta de la raíz de *Tradescantia* y *Vicia faba* (Roloff *et al.* 1992a, b) y son mutagénicos para *Zea mays*, *Salmonella thyphimurium* y *Sacharomyces cerevisiae* con y sin la activación microsómica del hígado de rata y de plantas (Plewa *et al.* 1984, 1988, Means *et al.* 1988).

1.5 Efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos de los plaguicidas

Las triazinas se han considerado como posibles agentes tumorales de humanos, clasificándolos en el grupo C por su modo de acción, por los síntomas inducidos o por la actividad de sus derivados químicos, basado en el incremento de tumores en glándulas mamarias de animales de laboratorio (USEPA 1994, Donna *et al.* 1989, Tchounwoul *et al.* 2000). En pruebas de evaluación de ICH, micronúcleos, y aberraciones cromosómicas se observa que las triazinas requieren de la actividad metabólica de la planta para ser genotóxicos *in vitro* (Ribas *et al.* 1998).

Donna *et al.* (1984, 1989) describen efecto de la exposición a las triazinas en la incidencia de cáncer de ovario en mujeres del campo que laboran en la Provincia de Alessandria del Norte (Italia); el trabajo incluyó a 60 mujeres con cáncer de ovario mesotelial y a 127 mujeres casadas sin evidencia de cáncer como testigo; se consideró el tiempo (años de trabajo) y residencia; la exposición fue estimada como: mujeres de exposición definitiva, probable o expuestas, encontrando un riesgo relativo (RR) no significativo de 2.20 en mujeres con probable exposición y con un RR significativo de 4.38 en mujeres con cáncer de ovario expuestas a herbicidas comparadas con los testigos.

El interés del potencial carcinogénico de los herbicidas y otros agroquímicos, ha sido estudiado y se ha reportado una posible asociación entre los agricultores y ciertos tipos de cáncer, incluyendo leucemia, enfermedad de Hodgkin's, linfoma de no-Hodgkin's, mieloma múltiple y cánceres de estómago, piel (melanótico y no melanótico), próstata, cerebro y tejido conectivo (Blair y Zahm 1991, Blair *et al.* 1992, Pearce y Reif 1990).

Los herbicidas comúnmente usados son las S-triazinas. La mayor investigación epidemiológica se ha enfocado en la evaluación de la carcinogenicidad de los herbicidas fenoxi y clorofenoles (Pearce y Reif 1990). En realidad hay poca investigación acerca de los efectos teratogénicos que puede incrementar el riesgo de cáncer en humanos (USEPA 1987, 1989).

La atrazina es el herbicida más extensamente aplicado en los Estados Unidos de 70 a 75 millones de libras fueron usados en 1993, principalmente en maíz. La cianazina de 30 a 35 millones de libras empleados en los Estados Unidos en 1993, sobre el maíz y algodón. Simazina de 3 a 6 millones de libras asperjado en 1993, es usado para el control de pastos anuales y malezas de maíz, cítricos y otras frutas, nueces, plantas ornamentales y pastos (Meister 1992).

Brusick (1994) sugiere una relación con la alta incidencia de cáncer de ovario en mujeres italianas campesinas que asperjan la atrazina en los campos agrícolas, con base en los estudios con animales de laboratorio que desarrollaron tumores después del tratamiento con el herbicida.

Los trabajos de investigación con cierto tipo de herbicidas del grupo de las triazinas (atrazina, deisopropilatrazina, metribuzina, simazina, cianazina y ciprazina) se han enfocado en la persistencia de los metabolitos en el suelo, en la forma de afectar la productividad del cultivo y en la toxicidad genética en seres humanos y en otros organismos, así como también sobre sus efectos en el ambiente (Murnik y Nash 1977, Scorgie y Cooke 1979, Kulshrestha *et al.* 1982, Ghiazza *et al.* 1984, Roloff *et al.* 1992 a, b, Venkatesh *et al.* 1992, Ademola *et al.* 1993, Guigas *et al.* 1993, Krugar *et al.* 1993, Porter *et al.* 1993, Smeda *et al.* 1993, Dunkelbert *et al.* 1994, Herelia *et al.* 1994, Peterson *et al.* 1994, Loosli 1995, Sathiakumar y Delzell 1997, Taets *et al.* 1998).

Venkatesh *et al.* (1992) detectan que los microsomas de la dermis del ratón metabolizan atrazina, simazina y terbutrin con actividad de 2% a 5 % con respecto a los microsomas de hígado.

Herelia *et al.* (1994) reportan que la cianazina aplicada en médula ósea de ratas y en linfocitos humanos *in vitro*, no inducen incrementos significativos en la frecuencia de micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas ni aberraciones cromosómicas.

Ribas *et al.* (1998) revelan que no existen efectos significativos de la atrazina con y sin activación microsómica (S9) en la inducción de intercambio de cromátidas

hermanas en linfocitos humanos *in vitro*, pero es citotóxica con 25 y 200 $\mu\text{g/ml}$ del herbicida.

Ochoa-Alejo y Crocomo (1988), en cultivo de células NA56-79 expuestas a 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, y 160 mg/L de ametrina por 20 días encuentran disminución del crecimiento y a 80 y 160 mg/L inhibición del proceso celular con reducción en el metabolismo de las proteínas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Características de las triazinas

Las triazinas constituyen un grupo importante de herbicidas. Cuando se realizan diversas sustituciones en el núcleo de la triazina se producen compuestos con propiedades químicas y biológicas muy diferentes, son heterocíclicos nitrogenados, triazinas simétricas. Esta clase de productos presenta un amplio espectro de selectividad y actividades biológicas (Smith 1988).

El núcleo fundamental de la triazina se observa en la figura 2.

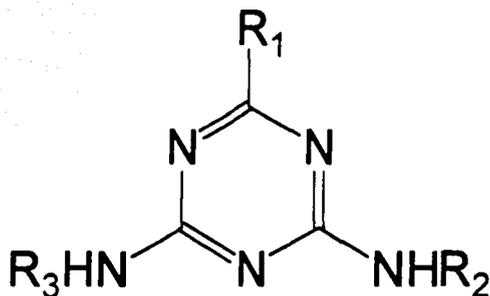


Figura 2. Estructura química del grupo funcional de los herbicidas S-triazinas (Roberts et al. 1998).

Con la estructura química de la triazina se encuentran algunos sustituyentes que se han empleado para obtener materiales biológicamente activos como:

Simazina	Cl	-etilamina	-etilamino
Atrazina	Cl	-etilamino	-isopropilamino
Propazina	Cl	-isopropilamino	-isopropilamino
Prometrona	OCH	-isopropilamino	-isopropilamino
Prometrina	SCH	-isopropilamino	-isopropilamino
Ametrina	SCH	-etilamino	-isopropilamino

Son absorbidos fácilmente por la planta y los tejidos animales, su desintoxicación y degradación se realiza por hidrólisis, N-desalquilación y conjugación. Algunos investigadores demuestran que las triazinas son convertidas en sus correspondientes compuestos 2-hidroxi por una variedad de plantas, microorganismos y animales (Pacóková *et al.* 1996, Roberts *et al.* 1998).

Los productos químicos que se comercializan como herbicidas del grupo triazinas son: simazina, simetrón, simetrina, atrazina, atratón, cianazina, ametrina, propazina, prometrón, prometrona, prometrina, trietazina, propazina, cloarazina, desmetrina, terbutrin, ciprazina y metribuzina (Brian 1979).

El grupo de las triazinas destaca entre los herbicidas más empleados tanto por los agricultores de los Estados Unidos de América, como por los de México (Bayer 1994, CIBA-GEIGY MEXICANA 1996).

El grupo de las triazinas fue introducido en 1950 para el control de malezas a través de la inhibición de la fotosíntesis (Worthing 1987).

Los herbicidas triazínicos más comúnmente usados son: atrazina, cianazina y simazina.

2.2 Metabolismo de las triazinas

El metabolismo es el factor determinante de la toxicidad de un compuesto. Los seres vivos tienen capacidades metabólicas distintas, ya que los sistemas enzimáticos son característicos de cada especie (Rodríguez y Lozada 1984). La degradación de las triazinas comienza por la microflora del suelo mediante procesos de deshalogenación biológica y no biológica que convierten a la triazina intacta en metabolitos desalquilados que corresponden a formas hidroxiladas. Las triazinas y sus metabolitos son muy contaminantes del agua. En Alemania, Italia y otros países de Europa han sido prohibidas por no cumplir con las normas rigurosas de la Unión Europea sobre el agua potable. Prohibida en Italia, Alemania, Suecia, Países Bajos, Austria, Hungría y restringida en el Reino Unido (FAO/PNUMA, 1997, Di Corcia *et al.* 1999).

En el grupo de las triazinas, principalmente atrazina y simazina, se han podido caracterizar las vías de acción metabólica en diferentes plantas (Ashton y Bayer 1979, Naylor 1979). De la degradación abiótica de las atrazinas por catálisis microbiana en el suelo se obtienen productos no tóxicos, como es el caso de la dietilatrazina y la deisopropilatrazina y/o ocasionalmente la hidroxiatrazina en suelos minerales y humus (Roberts *et al.* 1998, Di Corcia *et al.* 1999) (Figura 3).

Se ha determinado que las atrazinas y las simazinas son absorbidas igualmente por la raíz, pero hay diferencias en la velocidad con la cual son metabolizadas (Hatzios y Penner 1982). Los herbicidas s-triazinas son rápidamente absorbidos y translocados por toda la planta (Hatzios y Penner 1982, Kulshrestha *et al.* 1982, Hatzios 1988).

Tanto en animales como en las plantas, muchas de las enzimas que intervienen en el metabolismo de los xenobióticos se localizan en el retículo endoplásmico del hígado de rata (Veleminsky y Gichner 1988), sin embargo, en los vegetales varias enzimas que participan en la activación mutagénica, no sólo se han detectado en este organelo, sino también en el citoplasma y en la región de la pared celular (Sandermann 1988). Además de las reacciones enzimáticas que aparecen en los vegetales incluyen las denominadas enzimas de conjugación secundaria, las

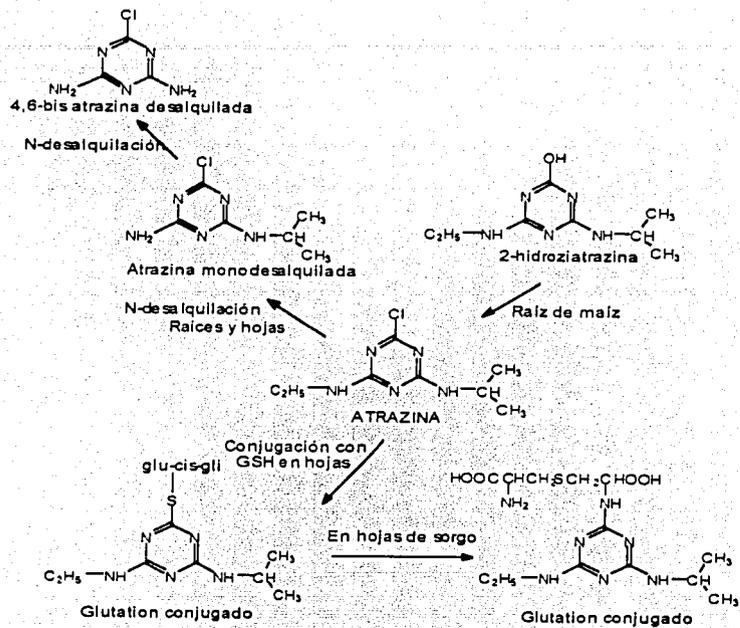


Figura 3. Metabolismo de las triazinas en plantas (Roberts et al. 1998)

cuales forman metabolitos insolubles en agua y por lo general son biológicamente inactivos y pueden depositarse en compartimientos específicos de la célula vegetal (Shimabukuro *et al.* 1982).

Dado el impacto ambiental que tienen los residuos de los compuestos xenobióticos y su participación en las vías metabólicas de la célula vegetal, los investigadores en toxicología ambiental han comenzado a darles mayor importancia.

Una de las características más principales de las plantas es la gran diversidad de citocromos P-450 que poseen, lo que permite que la mayoría de los herbicidas puedan ser convertidos en varios metabolitos (Werck-Reichhart *et al.* 2000). Los citocromos P-450 son proteínas hemo que utilizan NADPH para la transferencia de electrones (e-) y catalizan la oxidación del oxígeno molecular (Figura 4) (Werck-Reichhart *et al.* 2000).

Las enzimas citocromos P-450 se localizan en el retículo endoplásmico, mientras que las de conjugación (metabolismo de Fase II) como glutatión-SH-transferasas y sulfurotransferasas son predominantemente citosólicas. Se considera que la oxidación dependiente del citocromo P-450 es normalmente una ruta de activación y la de conjugación una ruta de desintoxicación (Shimabukuro *et al.* 1981).

Las reacciones del metabolismo oxidante son catalizadas por oxigenasas de función múltiple (OFM) cuya actividad es insertar un átomo de oxígeno a partir de O₂ para producir agua. Las OFM tienen citocromo P-450 (Cit P-450) con actividad de oxidasa terminal, éstas han sido detectadas en microsomas de más de 30 especies de plantas (Higashi *et al.* 1983, Higashi 1985) consideradas como análogas al Cit P-450 de la fracción microsómica de hígado de rata (Rich y Bendall 1975, Higashi 1985, 1988). El Cit P-450 de plantas superiores tiene una alta especificidad a sustratos y es menos heterogéneo que el de mamíferos. Este sistema ha sido involucrado en la inducción de metabolitos secundarios que son mutagénicos a partir de varios promutágenos como benzo(a)pireno y 2-aminofluoreno. La nicotinamida dinucleótido fosforilada reducida (NADPH) es la mejor fuente de electrones para la reducción del Cit P-450, en tanto que en animales es el NAD (Frear *et al.* 1969, Higashi 1985, Calderón-Segura 1993, Coleman *et al.* 1997, Calderón-Segura *et al.* 1999, Gómez-Arroyo *et al.* 2000).

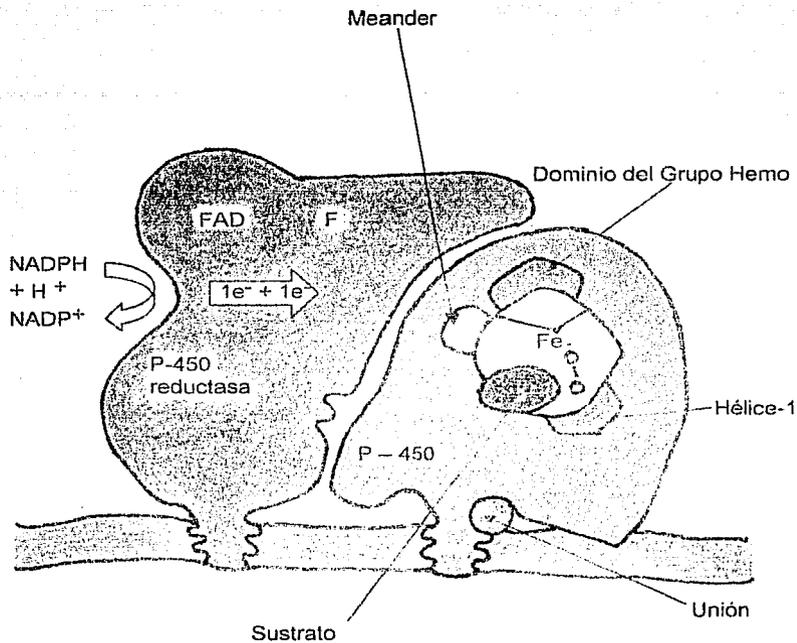


Figura 4. Estructura del citocromo P-450 de plantas (Werck-Reichhart et al. 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La estructura tridimensional está determinada por las interacciones entre los residuos de los aminoácidos de la cadena polipeptídica (Figura 5) (Werck-Reichhart *et al.* 2000).



*Figura 5. Estructura Tridimensional del Cit-P450
(Werck-Reichhart et al. 2000)*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.2.1 En las plantas

La biotransformación se considera constituida por tres grupos de reacciones, las de óxido-reducción (Fase I), las de conjugación (Fase II) y las de compartimentalización (Fase III). En plantas es una forma de desintoxicación e inmovilización de los metabolitos, el proceso bioquímico es para su protección e

incluye reacciones que originan productos que pueden ser mutagénicos y/o carcinogénicos (Sandermann 1988, Sandermann *et al.* 1990, Ducruet *et al.* 1993).

Las reacciones primarias ó de Fase I, incluyen la sulfoxidación y la N-desalquilación, las secundarias o de Fase II, la conjugación con glutatión, azúcares o aminoácidos y las terciarias o de Fase III, la incorporación en productos naturales de la planta (Shimabukuro *et al.* 1981, 1982, Grover y Cessna 1991, Coleman *et al.* 1997).

2.2.2 Reacciones primarias de oxidación ó de Fase I

Sulfoxidación y N-desalquilación

Las transformaciones oxidantes ocurren en la fase primaria del metabolismo, son procesos no sintéticos y pueden activar o desactivar el compuesto original. Estas reacciones dependen del sistema enzimático de los citocromos P-450, conocidas como oxidasas de función mixta (MFO), las cuales intervienen en la desintoxicación de los xenobióticos, 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 reducido (NADH) que son muy específicas e inducibles por sus sustratos (Higashi 1985, 1988).

Las peroxidasas y otras oxigenasas también intervienen en el metabolismo oxidante. La oxidación del átomo de azufre de algunos plaguicidas tiocarbámicos y triazínicos forma sulfóxidos y/o hidroxí-triazina que tienen mayor solubilidad en el agua y son más reactivos y tóxicos que la molécula original. Los sulfóxidos son capaces de reaccionar con los sulfhidrilos y son potentes agentes carbamílicos 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 (Casida *et al.* 1974, 1975 a, b, Hubell y Casida 1975, 1977, Lay *et al.* 1975, Carringer *et al.* 1978, Chen y Casida 1978, Gray 1991, Hatzios 1991).



Fig. 6. Reacción de catálisis por los citocromos P-450 en las reacciones de Fase I (Weirck-Reichhart et al. 2000).

La Fase I incluye procesos no sintéticos tales como la oxidación, reducción e hidrólisis que modifican al grupo funcional del sustrato original, las reacciones son catalizadas por el sistema de citocromos P-450, produciendo metabolitos fitotóxicos o no reactivos (Coleman et al. 1997).

2.2.3 Reacciones secundarias de conjugación ó de Fase II.

Conjugación con glutatión, azúcares ó aminoácidos

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 o incluyen la síntesis o formas conjugadas de metabolitos con una baja o nula fotólisis, con un sustrato endógeno que puede ser el glutatión, los azúcares, aminoácidos y en menor frecuencia, las proteínas. El sustrato principal es el glutatión, abreviado comúnmente como GSH, está presente en todas las células vegetales y en las animales en su forma reducida, el grupo estructural sulfhidrilo (SH) de la cisteína, es el más importante en su interacción con muchos xenobióticos (Chen y Casida 1978, Fuhremann et al. 1978, Stephenson et al. 1979, Breaux 1986, 1987).

2.2.4 Reacciones terciarias ó de Fase III

En la Fase III los productos metabólicos de las reacciones de las Fases I y II pueden ser compartimentalizados en vacuolas, transferidos al espacio extracelular o a la pared celular por mecanismos enzimáticos desconocidos, parece ser que se une a moléculas específicas como ligninas, taninos, pectinas, polisacáridos (celulosa, almidón) y algunos polipéptidos (globulinas) u otros componentes vegetales y de sus estructuras (tejidos, órganos, etc.) (Sandermann 1988, 1992, Sandermann *et al.* 1990, Coleman *et al.* 1997).

Tanto en animales como en vegetales, el paso final en la biotransformación de la molécula es la conjugación, los conjugados son fácilmente excretados en animales, mientras que en las plantas como no existen sistemas excretores son polimerizados y/o incorporados a sus componentes estructurales (Coleman *et al.* 1997).

De tal manera que los productos iniciales, los intermedios y los finales pueden seguir varias rutas: primero, causar daño en ellos mismos, segundo conjugarse y/o almacenarse e inactivarse en la planta y liberarse en el tracto gastrointestinal o en otros órganos y activarse cuando son consumidos por los animales o por el hombre situación que en particular puede ocurrir después de la aplicación de pesticidas, en plantas alimenticias o en los sistemas de riego con aguas negras (Sandermann *et al.* 1990, Coleman *et al.* 1997).

La absorción de los herbicidas está en función de numerosos factores como las propiedades fisico-químicas del compuesto, del suelo y del ambiente (temperatura, luz, humedad) y la especie vegetal, entre otros (Devine 1989, Devine y Vanden -Born 1991, Sterling 1994).

Las propiedades mutagénicas de los compuestos xenobióticos y sus metabolitos, están siendo estudiadas ya que varios agentes químicos carcinogénicos son también mutagénicos. A diferencia de la actividad carcinogénica, la mutagénica puede ser determinada fácilmente mediante una amplia gama de sistemas de ensayo

como son microbianos, mamíferos y vegetales (Plewa y Gentile 1982a, b, Plewa et al. 1988, Sandermann 1988, Plewa y Wagner 1993).

A pesar de que se han publicado numerosos trabajos para intentar la comprensión del metabolismo de diversos herbicidas, en el grupo de las triazinas, principalmente atrazina y simazina, se han podido caracterizar las vías de acción metabólica en diversas plantas pero no en animales (USEPA 1994).

Es importante el papel que el metabolismo vegetal puede tener en la mutagénesis ambiental, porque muchas cosechas agrícolas son tratadas con pesticidas previamente a ser consumidas por el hombre. Además en el caso de algunos pesticidas los productos metabólicos difieren entre plantas y animales (Menn 1978). También se ha evidenciado que la atrazina puede metabolizarse por esta vía siguiendo: inicialmente una reacción de *N-desalquilación* y con producción de *2-cloro-4,6-diamino-s-triazina* (Menn 1978). Por consiguiente se ha mencionado que los herbicidas del grupo de las triazinas, reducen la cantidad de glucosa, fructuosa y/o sacarosa en plantas, sin embargo, este es uno de los primeros efectos de inhibidores de la fotosíntesis (Ashton y Bayer 1979).

Se ha observado que la hidroxilación ocurre predominantemente en la raíz. La habilidad para hidroxilar 2-cloro-s-triazinas no siempre asegura la resistencia a estos herbicidas por las plantas, esto sugiere la idea de que existe otra ruta de desintoxicación. Esta puede ser a través de la producción de conjugados peptídicos. La simazina forma estos productos químicos en las yemas de maíz y de sorgo. Sólo una enzima involucrada en la producción del conjugado ha sido purificada y caracterizada sin descartar la participación de otras que aún no han sido identificadas. Esta es la glutaniona S-transferasa que tiene un peso molecular de 40 kDa y se ha encontrado en hojas de maíz, caña de azúcar (Hatzios y Penner 1982, Kulshrestha et al. 1982)

Tanto la atrazina como la simazina son absorbidas similarmente por la raíz, pero presenta diferencias en la velocidad de metabolización. Varios de los metabolitos de la transformación de las triazinas no han sido caracterizados químicamente, pero por la importancia toxicológica ambiental y su potencial perjudicial en la cadena alimenticia se hace necesaria su identificación. Otro factor de

la selectividad es la cantidad que llega a la planta. Los estudios iniciales sobre el metabolismo de las clorotriazinas sugieren que un metabolito inactivo es su derivado hidroxilo. Las plantas de maíz convierten las clorotriazinas al derivado hidroxilo, el 2,4-dihidroxi-8-metoxi-1,4-benzoxazina-3-ona (Hatzios y Penner 1982, Kulshreshtha *et al.* 1982). Esta misma vía metabólica ha sido demostrada en otras plantas (Hatzios y Penner 1982, Hatzios 1988).

En microorganismos hay otros mecanismos de degradación como la desalquilación a clorotriazinas (Ikonen *et al.* 1988, y Arru *et al.* 1997).

Algunas plantas, principalmente las gramíneas (maíz, sorgo y caña de azúcar) no son afectadas por la atrazina y la simazina. La falta de sensibilidad probablemente resulta de la capacidad para neutralizar o metabolizar estos compuestos. Los herbicidas s-triazinas son rápidamente absorbidos y translocados por toda la planta (Grover y Cessna 1991).

Numerosos plaguicidas son biotransformados por el sistema enzimático animal o vegetal a productos que son potencialmente genotóxicos en varios sistemas de prueba (Plewa *et al.* 1988).

La mayoría de los xenobióticos no son fácilmente liberados, por lo que las enzimas celulares los convierten en compuestos hidrofílicos que pueden ser fácilmente eliminados del cuerpo, que conducen a la formación de metabolitos reactivos que logran unirse covalentemente a macromoléculas de varios tejidos, causando daño al ADN, efectos bioquímicos e incluso la muerte celular (Sandermann 1992).

2.3 La fracción enzimática S9

En los animales el hígado es el órgano principal en donde ocurre el metabolismo de los xenobióticos y en menor grado en intestino, pulmón, riñón y cerebro. Los hepatocitos tienen diferentes niveles e isoformas de enzimas Cit-P450 capaces de biotransformar a gran diversidad de agentes químicos o xenobióticos a productos muy reactivos a micro y macromoléculas celulares ocasionando efectos adversos en el funcionamiento de los órganos e incluso se les ha asociado a la manifestación del cáncer (González *et al.* 2003).

El sistema metabolizador usado en la mayoría de los estudios *in vitro* con diversas células es la fracción enzimática S9. Esta fracción está formada por enzimas microsómicas que se obtiene de homogeneizados de hígado de rata y es útil para la activación de promutágenos ya que semeja el metabolismo realizado *in vivo* (Ames *et al.* 1975).

2.4 La fracción enzimática S10

En las plantas existen diversas fuentes de enzimas Cit-P450 y los homogeneizados dependen del órgano vegetal usado como sistema metabolizador de xenobióticos como son la S1 de tallo, las S4 y S5 de la raíz y la S1 de hojas de plantas como papa, trigo, zanahoria, entre otros. Diversos estudios han demostrado la activación de plaguicidas a promutágenos con la fracción enzimática S10 de las raíces de *Vicia faba* tratadas con propoxur, molinate, butilate y otros herbicidas que inducen intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en cultivo de linfocitos humanos tanto *in vitro* como *in vivo* (Gómez Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999, Flores-Maya 2000, Gómez de la Cruz 2001). Se ha reportado la biotransformación de sistemas enzimáticos de plantas a compuestos mutagénicos específicos para la hidracida málica y la fenil urea (Plewa *et al.* 1988).

2.5 El herbicida triazínico, ametrina

2.5.1 Características generales del herbicida ametrina.

La ametrina (Gesapax), 2 etilamino-4-(isopropilamino)-6-(metiltio)-s-triazina (Figura. 7). Tiene los nombres comerciales siguientes: Doruplant, Mebatrina, Evick, Ametrex, Gesapax (USEPA 1989, 1994). Clasificación Toxicológica III.

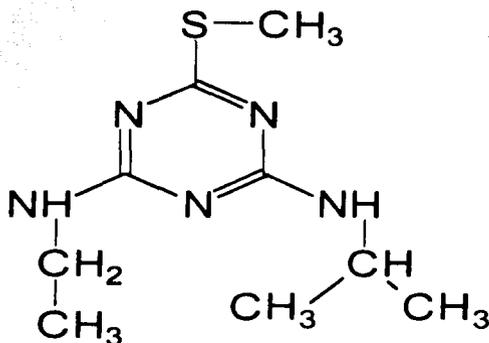


Figura 7. Estructura química del herbicida ametrina (Roberts et al. 1998).

Es un herbicida s-triazina sintetizado por primera vez en 1962; actúa inhibiendo la fotosíntesis y otros procesos enzimáticos; es absorbida por hojas, raíz, translocado en el xilema y acumulada en los meristemos apicales (Roberts et al. 1998).

La ametrina es metabolizada tanto en plantas tolerantes como en plantas sensibles, el proceso metabólico incluye la hidroxilación y la desalquilación. Presenta una degradación microbiana primaria temprana en el suelo con valores de CL_{50} y rango de 70 a 129 días (Roberts et al. 1998).

2.5.2 Efectos toxicológicos

Asongalem y Akintonwa (1997) demuestran que dosis altas de ametrina afectan a la madre (rata y conejo) y a sus fetos, lo que se evalúa por la presencia de hipoactividad, decremento en el consumo de alimentos, y en la toma de agua, disminución del peso fetal con reabsorción prematura y osificación tardía de huesos craneales, sacro y coccígeo.

En comunidades de la zona sur del Estado de México (Villa Guerrero, Tenancingo e Ixtapan de la Sal), en donde las mujeres participan en actividades de floricultura y horticultura, fueron registrados por el sector salud (SSA), nacimientos de niños anencefálicos y con malformaciones genéticas, presumiblemente debido al uso de la ametrina por parte de las madres jornaleras agrícolas; las campesinas informan que en su trabajo no utilizan guantes ni máscaras protectoras, además almacenan los plaguicidas en sus viviendas y algunas emplean los envases vacíos como recipientes de agua y comida (DGEIE 1995).

Estudios recientes consideran muy tóxica a la ametrina en humanos ya que induce efectos agudos como la irritación severa de ojos. Se le relaciona con defectos de nacimientos; se le asocia con incremento de tumores de ovarios, cáncer de mamas y limfoma no-Hodgkin's. Investigaciones realizadas en Nebraska y Iowa, indican que las comunidades que usan agua contaminada con triazinas tienen mayor incidencia de nacimientos de bebés con piernas reducidas y otras malformaciones congénitas.

Ensayos de laboratorio con ratas expuestas a la ametrina han demostrado alteraciones en el funcionamiento del corazón, hígado y riñón, además es un disruptor endócrino causando problemas en la fertilidad; En ratas hembras provoca cáncer de mama y de útero, y tumores en los testículos de ratas machos; Otros trabajos revelan incremento en la incidencia de leucemias, limfomas y mesoteliomas. (USEPA 1994).

2.5.3 Efectos ecológicos

Asongalem y Akintonwa (1997) reportan anomalías esqueléticas en fetos de ratas hembras albinas tratadas con ametrina. Lombardi *et al.* (2001) muestran toxicidad en diferentes especies de crustáceos y peces expuestos en rangos de 0.1 µg/l a 450 µg/l de ametrina.

Peterson *et al.* (1994) evalúan la fitotoxicidad de 23 pesticidas incluyendo 5 triazinas, en nueve especies de algas, una cianobacteria y en la planta acuática *Lemna minor*, con el fin de proveer un margen aceptable de seguridad para detectar el riesgo presentado por estos productos químicos en ambientes acuáticos. Los resultados evidencian que los herbicidas triazínicos bloquean los mecanismos de absorción de carbón de todas las algas y de la cianobacteria por más del 50% e inhiben su crecimiento, son clasificadas como triazinas muy fitotóxicas.

2.5.4 Metabolismo de la Ametrina

2.5.4.1 En plantas

Existe limitada información sobre la degradación y metabolismo de la ametrina en suelos y plantas, pero el metabolismo en animales ha sido recientemente revisado. Al parecer, su selectividad depende en gran parte de la capacidad enzimática de las plantas (USEPA 1994).

2.5.4.2 En animales.

Se ha comparado el metabolismo de la ametrina en ratas, cabras y gallinas, fue eficientemente absorbida, metabolizada y excretada en esas especies (figuras 8 y 9), las reacciones de transformación son la N-desalquilación y las formas ametrina monoalquiladas (3 y 4) y ametrina dialquiladas (5); los conjugados de glutatión son

inestables y excretados como mercapturatos, el principal conjugado es el ácido glucorónico (6) (Grover y Cessna 1991, Roberts *et al.* 1998).

El metabolismo de la ametrina en diferentes animales: usando dosis simple y múltiples. En la rata este herbicida fue excretado en forma de metabolitos, el 50% en orina después de 24 horas, a las 48 horas el 39 % en heces y el 2% acumulado en tejidos. En las cabras lactantes fueron identificados el 61% en orina, 8% en heces, 1% en leche materna y el 6% en tejidos. En gallinas el 73% en orina, 0.1% en huevos, 6% en tejidos. Un total de 13 metabolitos primarios fueron aislados de orina en una alta dosis producidos principalmente por reacciones de mono y dialquilación (Fig. 8) (Grover y Cessna 1991, Roberts *et al.* 1998, Wu *et al.* 1992). Los metabolitos hidroxilados fueron identificados en mayor cantidad en orina y en tejidos de cabras y gallinas (Figura 9).

Los conjugados de ametrina producidos por las reacciones de fase II, fueron inestables y excretados principalmente como mercapturatos y un conjugado con el ácido glucorónico (6). Los intermedios de las reacciones de oxidación, hidroxilación y desaminación pueden conjugarse con el N-acetilcisteína (9-14) constituyeron rutas metabólicas menores. El compuesto sulfatado (15) posiblemente fue derivado del 4 hidroxí. Los metabolitos formados en la rata (2 a 5) también se describen en la cabra y la gallina, más los metabolitos hidroxilados (6 a 20) (Roberts *et al.* 1998).

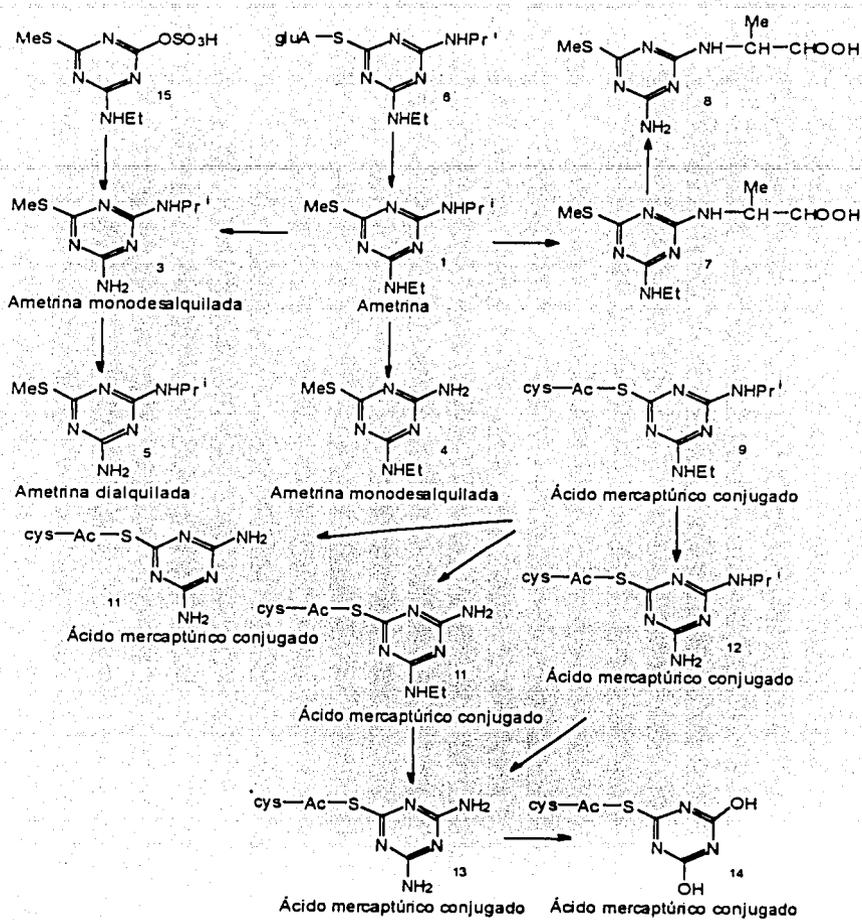


Figura 8. Metabolismo de la ametryn en ratas (Roberts et al. 1998).

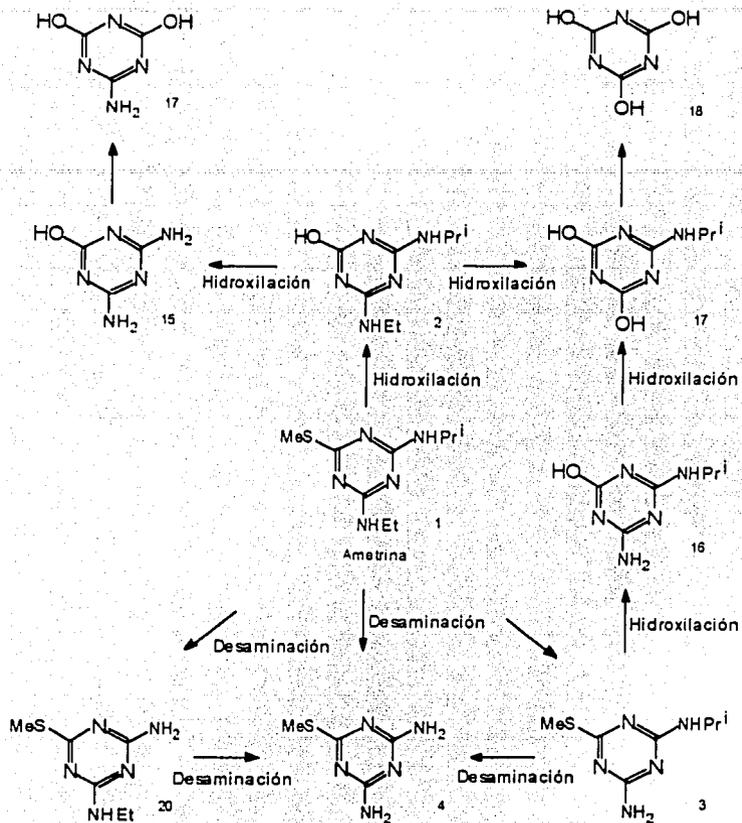


Figura 9. Metabolismo de la ametryn en cabra y gallina (Roberts et al. 1998)

2.6. El papel del metabolismo vegetal en la activación de promutágenos ambientales

En numerosos estudios se ha corroborado que algunos agentes químicos inducen directamente modificaciones al ADN, en tanto que otros requieren del metabolismo realizado por la fracción S9 de las células hepáticas de mamíferos para activarse y así provocar daño. Durante décadas pasó inadvertido en los vegetales dicho metabolismo o la presencia de sistemas enzimáticos, sin embargo, se ha demostrado la activación de compuestos químicos y plaguicidas por las plantas a mutágenos, los cuales muestran su actividad genotóxica en diversos sistemas biológicos que se consideran sensores o indicadores del daño genético. A los agentes químicos que por sí mismos no son mutagénicos y que requieren de la activación metabólica previa (sea de plantas o animales) para ejercer dicho efecto se les denomina "promutágenos" o "mutágenos indirectos" (Plewa 1978). El término activación vegetal, denota el proceso mediante el cual un agente químico no mutagénico es transformado por la acción enzimática de una planta en mutágeno (Plewa 1978, Gentile *et al.* 1982, 1986, Plewa y Gentile 1982a, Plewa *et al.* 1984, Gómez-Arroyo *et al.* 1995).

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

En ambos métodos la acción del metabolismo vegetal sobre un mutágeno potencial se prueba en un microorganismo indicador como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Aspergillus nidulans*, etc, o en células de mamífero tales como linfocitos humanos periféricos, células de ovario de criceto dorado, etc, analizando la inducción de mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas, para evaluar así las propiedades genotóxicas

de los agentes químicos y/o sus metabolitos (Plewa 1978; Plewa y Gentile 1982 a, b, Takehisa *et al.* 1982, Plewa *et al.* 1984, Veleminski y Gichner 1988, Plewa y Wagner 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999).

La inducción de daño al ADN por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varias etapas. Durante el proceso, el agente xenobiótico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas. Una vez dentro de la célula, el agente químico puede tener acción por sí mismo *in vivo* (acción directa) o bien puede ser activado por las enzimas metabólicas, en cuyo caso es de acción indirecta y la interacción con el ADN, puede ser reparada eficiente o ineficientemente de manera tal que el daño inicial se fija o no, expresándose en las diferentes células (Rodríguez y Lozada 1998).

Los mecanismos de reparación es posible que funcionen antes o después de la replicación del ADN. Su eficiencia varía, ya que pueden reparar eficientemente, sin errores, situación que se presenta cuando la exposición a agentes genotóxicos es baja o bien reparar de manera ineficiente, promoviendo errores en el ADN, lo que depende de la saturación del primer mecanismo, que generalmente ocurre cuando es mayor la exposición. Sin embargo, ambos mecanismos son afectados por numerosas variables además de la exposición, como la estructura química del mutágeno, el tipo de aducto formado y la cantidad de daño inducido (Rodríguez y Lozada 1998, González *et al.* 2003).

2.7 Los sistemas biológicos de prueba

Con el fin de detectar los efectos genotóxicos provocados por la gran variedad de mutágenos tanto físicos como químicos, se han desarrollado diversos sistemas de evaluación de daño genético que forman parte de una batería de pruebas que permiten detectar el riesgo que representa para el ser humano, éstos sistemas utilizan gran variedad de organismos tanto animales como vegetales, que se usan como indicadores del daño genético. Muchos sistemas de prueba han sido empleados para determinar el daño inducido al ADN por los diversos agentes como

son las aberraciones cromosómicas, los aductos, los intercambios de cromátidas hermanas, los micronúcleos, las mutaciones puntuales y recientemente el ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina (Ashby *et al.* 1985). Existen otros tipos de ensayos, que evalúan la reparación del ADN después de la exposición a un xenobiótico, lo que permite descubrir mecanismos de acción de los agentes químicos que dificultan la reparación. (González *et al.* 2003).

Los bioensayos de plaguicidas a largo plazo con animales son considerados como los procedimientos más adecuados para evaluar la genotoxicidad, sin embargo estos son caros, por ello se han implementado otros ensayos en vegetales y en cultivos celulares, que aportan valiosa información a corto plazo y son más económicos (González *et al.* 2003).

Las pruebas de genotoxicidad con plantas constituyen sistemas de evaluación sensibles que han proporcionado importantes datos cuantitativos, en los que se utilizan células meristemáticas de *Vicia faba* y linfocitos de sangre periférica (Gómez-Arroyo *et al.* 2000)

2.8 Electroforesis unicelular alcalina “ensayo cometa”

La electroforesis unicelular alcalina o en gel de células individuales (ensayo cometa), detecta directamente el daño al ADN de células individuales. Fue introducido por Östling y Johanson en 1984, para evaluar el daño en células recuperadas de pacientes bajo terapia. Éste método se aplica internacionalmente en los proyectos de análisis genotóxico y mutagénico, es considerado como un ensayo con elevada sensibilidad para detectar rompimientos del ADN. Este sistema se aplica con cualquier tipo de células interfásicas o en división celular, y no se requiere su cultivo en medios específicos, así pueden utilizarse linfocitos de sangre periférica de donadores sanos o de pacientes con desórdenes genéticos, líneas celulares de linfoblastoides, fibroblastos, queratinocitos de piel, entre otras (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 1990, 1991, 1992, 2000)

Paralelamente a esta prueba se puede estimar el efecto citotóxico del agente químico ó físico, a través de la viabilidad celular que se determina con las mismas suspensiones celulares que las usadas para evaluar la genotoxicidad por el ensayo cometa, colocando un volumen 1:1 de células con una mezcla de 2 fluorocromos. Los análisis de estos dos parámetros se realizan preferencialmente en un microscopio de fluorescencia de triple banda (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 1990, 1991, 1992, 2000).

La primera versión propuesta por Singh *et al.* (1988) utiliza la electroforesis neutra alcalina (pH13) capaz de detectar rompimientos de una cadena, sitios lábiles sensibles al álcali y sitios retardados de reparación del ADN en células individuales. La segunda versión de Olive *et al.* (1990) modifica la técnica de Östling y Johanson (1984), al emplear solución de lisis alcalina seguida por una electroforesis neutra para verificar rompimientos de cadena doble. Los resultados de este ensayo están caracterizados por las condiciones de pH de la solución de lisis y la electroforesis, ya que si hay cambios de estas condiciones, la sensibilidad es afectada (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

2.9 Ventajas del uso del ensayo cometa

El ensayo cometa es una prueba rápida, de bajo costo y con una sensibilidad que supera a las pruebas citogenéticas y permite detectar roturas de simple o doble cadena y sitios lábiles sensibles a los álcalis. Este ensayo puede ser aplicado a cualquier célula eucarionte. Se utiliza además para el biomonitorio ambiental y el análisis de sensibilidad a radiaciones. En el biomonitorio humano, es accesible a cualquier población celular (leucocitos, granulocitos, linfocitos, células bucales, gástricas, nasales y espermáticas (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

2.10 Linfocitos humanos de sangre periférica

Las células del tejido sanguíneo y en especial los linfocitos, tienen grandes ventajas que las hacen adecuadas para los estudios de genotoxicidad ya que se puede obtener fácilmente una población celular numerosa (Evans y O'Riordan 1975).

Los linfocitos circulantes están normalmente en G₀ (en fase de reposo) del ciclo celular mitótico, usualmente son utilizados en esta fase, ó en división estimulados con mitógenos sintéticos ó extractos vegetales con propiedades mitogénicas (Evans y O'Riordan 1975).

2.11 Factores que influyen el daño genético

Los agentes alquilantes inducen daño en el ADN y son capaces de producir rupturas durante su reparación y también en los sitios lábiles sensibles en un medio alcalino. La *electroforesis unicelular alcalina*, permite la detección de estas lesiones en función del tiempo (Tice *et al.* 2000).

El daño ocasionado se debe a factores múltiples como, el genotipo o polimorfismo genético, metabolismo, la edad, el sexo, la dieta y la capacidad para "reparar" el ADN, por la generación de radicales libres por estrés oxidante, por el tipo y tiempo de exposición a los agentes químicos. Muchas pruebas se han desarrollado para detectar daño al ADN, desde las bioquímicas espectrofotométricas, citogenéticas y las basadas en la sedimentación del ADN dañado, pero todas tienen diversos inconvenientes que pueden resumirse en que a mayor sensibilidad del ensayo, mayor costo (Morley *et al.* 1983).

III. JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud clasifica al grupo de las triazinas: atrazina, simazina, cianazina, metribuzina y a la ametrina entre otros, como los plaguicidas más tóxicos y que en condiciones generales de uso se acumulan en los tejidos de los vegetales y los animales e implican riesgo mutagénico, carcinogénico, y teratogénico para los seres vivos (Ribas *et al.* 1998, Junnila *et al.* 1993, Davies *et al.* 1994). Varios autores han descrito una relación entre la exposición de ciertos tipos y mezclas de las triazinas y la manifestación de neoplasias tanto en animales como en el hombre (Sathiakumar y Delzell 1997).

En México así como en otras partes del mundo los herbicidas triazínicos, como la ametrina, son asperjados en diversos cultivos de maíz, sorgo, caña de azúcar, café, piña, zanahoria, etc. Sin embargo, son pocos los estudios sobre sus actividades mutagénicas y citogénicas en humanos, animales y plantas. Con base en estos antecedentes se investigaron los efectos genotóxico y citotóxico de la ametrina y el papel del metabolismo de *Vicia faba in vivo*, para biotransformar al herbicida en promutágeno y como prueba para analizar el daño al ADN el ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina, empleando a la raíz de *Vicia faba in vivo* como sistema de activación metabólica vegetal, para lo cual se expusieron directamente al herbicida y a sus extractos junto con los linfocitos humanos de sangre periférica.

IV. OBJETIVOS

1. Evaluar el daño genotóxico directo del herbicida ametrina aplicado a diferentes concentraciones en los linfocitos humanos de sangre periférica (LHSP), mediante el ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina.
2. Determinar si la ametrina es un promutágeno a través del metabolismo vegetal (activación metabólica *in vivo*) realizando tratamientos en las raíces de *Vicia faba*, coincubando sus extractos junto con los LHSP y utilizando al ensayo cometa como prueba de la actividad genotóxica de los metabolitos.
3. Analizar el efecto citotóxico del herbicida ametrina en los linfocitos con y sin la participación de la activación metabólica de *Vicia faba in vivo*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Propiedades físicas y químicas del herbicida ametrina

COMPOSICIÓN:	500 g/L de (Ametryne).
NOMBRE COMERCIAL:	Ametrex, Gesapax.
NOMBRE QUIMICO:	(IUPAC) (2-etilamino-4-isopropilamino-6-metiltio-s-triazina)
TIPO DE PLAGUICIDA:	Herbicida selectivo del grupo químico de las triazinas, pre- y post-emergente.

Este compuesto es una sustancia blanca con fórmula molecular de C₉H₁₉N₅S, peso molecular de 227.3 g/mol, punto de fusión de 84-85° C, presión de vapor de 8.4×10^{-7} mm Hg a 20° C y solubilidad limitada en agua de 185 mg/L, su Pka es de 4.1 (base).

Es muy soluble en muchos disolventes orgánicos incluyendo hexano, tolueno, metanol y acetona (USEPA 1987, 1994); no es inflamable ni corrosivo, estable en soluciones neutras, ácidos débiles o básicos, se hidroliza en soluciones de ácido fuerte (pH 1) y/o base fuerte (pH 13) a un derivado inactivo, el 6-hidroxi (Roberts *et al.* 1998), se descompone lentamente por la luz UV. Concentración CL₅₀ oral (Rata) = 1.405 mg/kg.

CATEGORÍA TOXICOLÓGICA:	Producto técnico Clase III
PERSISTENCIA:	Moderadamente persistente
EFFECTOS ADVERSOS AL AMBIENTE:	Muy tóxico
Tratamiento en caso de intoxicación:	No hay antídoto ni tratamiento específico, sintomático

Este herbicida es muy tóxico en los humanos, los síntomas que presentan por una exposición aguda a las dosis altas incluye náuseas, vómito, diarrea, debilidad muscular y salivación excesiva, irritación moderada de ojos, piel y el tracto respiratorio. Su CL₅₀ oral para ratas es de 1,750 mg/kg (80% WP) (USEPA 1989). La CL₅₀ dérmica para conejo es > 10.2 mg/kg, para rata CL₅₀ > 3100 mg/Kg. Por inhalación en ratas albinas es > 27 mg/l por un período de 4 horas la CL₅₀ > 2.2 mg/Lt por 4 horas (USEPA 1994, Asongalem y Akintonwa 1997).

La ametrina se considera tóxica en aves y abejas, porque la CL₅₀ por 8 días en la codorniz blanca es de 30,000 mg/kg y para el pato real es de 23,000 mg/kg (The Agrochemicals Handbook 1984) (Diccionario de Especialidades Agroquímicas 1999).

Para organismos acuáticos es moderadamente tóxica; la CL₅₀ para la trucha arco iris expuesta por 96 h es de 8.8 mg/l, en cambio para la agalla azul es de 4.1 mg/l y para el pez arco iris es de 14.1 mg/l (Meister 1992). Y altamente tóxica en crustáceos (>1.0) y moderadamente tóxica en moluscos (Briggs 1992).

5.2 Aplicaciones de la ametrina

La Ametrina es un herbicida con acción residual prolongada, se usa para el control pre-emergencia y post-emergencia de malezas de hoja ancha y gramíneas (USEPA 1994).

Asimismo es útil para el control de malezas de hoja ancha, en las plantas o en vegetales comestibles; maíz, sorgo, trigo, papa, caña de azúcar, café, té, palma de coco, piña, plátano; en árboles de toronja, de naranja, de papaya, para el control de toda la vegetación de: verdolaga, bledo, batatilla, amor seco, ambrosía, garrachuelo, mostaza, hoja de terciopelo, hierba ganso, cola de zorra, y gramíneas, paja mona y guarda rocío (USEPA 1994).

La vida media de esta clase de herbicidas es de uno a seis meses dependiendo del tipo de suelo y las condiciones de intemperismo, su movimiento es por lixiviación debido a la gran solubilidad en agua (USEPA 1994).

La ametrina es estable a pH neutro, débilmente estable en medios alcalinos. En hidrólisis, es un ácido más fuerte de pH =1 y fuertemente alcalino a pH =13, en forma de 6-hidroxiderivativo es un herbicida inactivo (PM). Se ha reportado que tiene una degradación microbiana temprano primaria, en suelos con CL₅₀. Valuados en el rango de 70-129 días (PM) (USEPA 1994).

5.3 La electroforesis unicelular alcalina

La electroforesis unicelular alcalina es fácil de realizar y se tienen resultados aproximadamente a las 48 horas. La base experimental-teórica del ensayo cometa consiste en cuantificar el daño inducido en el ADN en células expuestas a agentes químicos, físicos o biológicos utilizando suspensiones celulares mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión que se dispersan sobre un portaobjetos con una capa de gel de agarosa de fusión normal. Después las células son colocadas en una solución de lisis celular, y posteriormente se hace el corrimiento a diferentes voltajes y amperajes con un amortiguador a pH alcalino, bajo estas condiciones los fragmentos del ADN de las células con daño migran fuera del núcleo para desplazarse en dirección al ánodo. Cuando el gel es teñido con un colorante fluorescente como el bromuro de etidio, cada célula da como resultado una imagen similar a la de un cometa con cabeza y cola brillantes y las células sin lesiones tienen núcleos intactos o sin cometas. El tamaño de la cauda depende del número de fragmentos rotos producidos por el genotóxico. De esta manera, la intensidad y la longitud de la cola del cometa son parámetros del daño inducido al ADN, pero además se puede evaluar también la sensibilidad diferencial intra e interindividual de las poblaciones celulares, la resistencia y la reparación del genoma dañado, la inducción de la apoptosis (muerte celular programada (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 1990, 1991,

1992, 2000). Además con éste método se puede establecer la relación concentración-efecto de los rompimientos inducidos por contaminantes ambientales.

5.4. Aislamiento de linfocitos humanos de sangre periférica

Se centrifugaron a 2500 rpm por 30 minutos, 10 mL de sangre heparinizada de un donador sano, se aisló la fase de linfocitos y se transfirió a dos tubos de centrifuga estériles con 3 mL de solución de Hanks (Gibco); los linfocitos humanos se pasaron con pipeta Pasteur estéril a otros tubos con un gradiente de Ficol (Gibco) con 5 mL, se centrifugaron a 1200 rpm durante 25 minutos.

Se transfirió la fase de linfocitos a tubos estériles con 5 mL de solución salina de Hank's balanceada (Gibco), se mezclaron y lavaron dos veces el botón celular y luego se centrifugaron dos veces a 1200 rpm durante 10 minutos (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se agregaron 5 mL de medio RPMI 1640 (Gibco) más 5 µL de antibiótico (1%) para incubarse a 37 °C.

5.5. Cuantificación de linfocitos humanos

Se mezcló bien el botón celular y se registró la cantidad de linfocitos/mL de medio en la cámara de Neubauer.

Se tomaron 10 µL del botón celular y se colocaron en la cámara de Neubauer (se requieren alrededor de 10 000 células por muestra). La fórmula utilizada para el conteo es la siguiente:

$$\begin{aligned} & \text{N}^\circ \text{ Linfocitos / mL} \\ \text{N}^\circ \text{ Lin} &= \frac{(n\text{Lin}) (2) (10000)}{4} = \text{N}^\circ \text{ LH/mL} \end{aligned}$$

5.6 Análisis de la viabilidad linfocitaria

Se determinó el porcentaje de la viabilidad linfocitaria dentro del rango fisiológico de (94 %) con el objeto de estimar el posible efecto citotóxico del plaguicida a los linfocitos antes y después del tratamiento. Se mezclaron 10 μ L del botón celular más 10 μ L de tinción dual, (diacetato de fluoroceína-bromuro de etidio) por 3 minutos cuantificando el número de células vivas (verdes) y muertas (rojas) en 100 células consecutivas, en el microscopio de fluorescencia marca *Olympus* con el objetivo 40X por duplicado (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

5.7 Tratamientos directos con el herbicida ametrina a los linfocitos humanos

Se coincubaron 25 x 10⁴ linfocitos (mayor a 94 % de viabilidad) con 1, 2, 3, 5, 6 y 10 ppm de herbicida (disueltas en agua desionizada), a volumen final de 500 μ L, el testigo negativo fue el medio RPMI 1640 y el positivo, la mitomicina C (MMC, 400 ng/mL) por 2 horas a 37 °C. (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

5.8. Elaboración de geles con monocapa de agarosa más células con/sin tratamiento

Después del tratamiento todos los lotes experimentales se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min, se eliminaron 450 μ L del sobrenadante y se agregaron 50 μ L del medio RPMI 1640, el botón celular se mezcló bien se tomaron entre 5 y 10X10⁵ células en un tubo para analizar la viabilidad linfocitaria para cada lote experimental, así como de los testigos negativos y positivos y una mezcla de células (5 y 10X10⁵) a un microtubo. Después se agregaron 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA 0.5%) a 37 °C, se transfirió a cada portaobjetos esmerilado (gel) (dos geles por lote) con una monocapa de agarosa normal (NMA 1% Gibco), se le colocó un

ubreobjetos a las laminillas y se mantuvieron a 4 °C por 5 min, se quitó el cubreobjetos y se adicionó 75 µL de LMPA (0.5% Gibco) manteniendo la preparación a 4 °C por 5 minutos (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

5.8.1 Lisis celular

Se colocó en una solución de lisis final 2.5 M NaCl (Sigma), 100 mM EDTA (Sigma), 10 mM Trisma base (pH 10.0) (Sigma), DMSO (Sigma), 10%, Lauril sarcosinato de sodio (1%), Tritón X-100 (1%) (Sigma), aforada a 100 ml con 1 ml de Tritón X-100 1% y 10 ml de DMSO 10% en vasos Koplín a 4 °C, 1h antes de terminar el tratamiento (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

5.8.2 Electroforesis unicelular alcalina

Después se colocaron los portaobjetos en la cámara de electroforesis y se cubrieron con amortiguador de NaOH (300 mM) (Sigma) + 1 mM EDTA (pH >13.0) en luz amarilla, a temperatura ambiente por 20 minutos para desenrollar el ADN, la electroforesis fue constante a 300 mA y 25 V por 20 minutos (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

5.8.3 Neutralización

Los geles se lavaron 3 veces con amortiguador neutralizante Tris (0.4 M pH= 7.5) por 5 minutos en obscuridad (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

5.9 Tinción del ADN

Para la observación de las laminillas en el microscopio de fluorescencia, a los geles se les agregaron 50 µL de bromuro de etidio (10%) en obscuridad, por 3 minutos para teñir el ADN y visualizar el daño (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

5.10 Análisis del daño sobre el ADN

Para analizar el daño del ADN en 50 células consecutivas se cuantificó el número de células, sin y con daño (sin y con cometas), para determinar el porcentaje de migración del ADN se midió el diámetro de la cola y la longitud del cometa con el objetivo micrométrico en un microscopio de fluorescencia, con filtros de excitación de 515-560 nm y de barrera de 590 nm, la observación se hizo por triplicado con objetivo 40X (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000).

5.11. Activación metabólica vegetal *in vivo*

5.11.1 Preparación de los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con ametrina y su aplicación a los linfocitos humanos

Las semillas de *Vicia faba* (var. minor) se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave, hasta que las raíces principales alcanzaron entre 4 y 6 cm de longitud, se sumergieron en las siguientes concentraciones: de 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm de ametrina (disueltas en agua desionizada) y el testigo negativo fue solamente agua desionizada, durante 4 horas en obscuridad y a temperatura ambiente. Para comprobar la capacidad metabólica de *Vicia faba* se empleó como testigo positivo etanol (EtOH, 98% de pureza (Sigma) 3600 ppm (1×10^{-1} M) bajo las mismas condiciones experimentales, el cual ha mostrado ser promutágeno activado por el haba al incrementar la frecuencia de ICH en células de criceto dorado tanto *in vivo* como *in vitro* (Takehisa *et al.* 1982, 1988) y en linfocitos humanos en cultivo (Calderón-Segura 1993, Gómez- Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999). Transcurrido el tiempo de tratamiento las raíces se lavaron con agua de la llave tres veces y dos ocasiones con agua bidestilada y desionizada. Posteriormente, se cortaron 2 cm de la raíz principal, se maceraron y se homogeneizaron con una solución amortiguadora de fosfatos de sodio monobásico y

dibásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, respectivamente) 0.1 M a pH =7.4, a temperatura de 4 °C, 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 se ultracentrifugó por 30 min a 11,500 rpm a 4 °C. El sobrenadante en el cual se encontraron los productos genotóxicos del plaguicida y del etanol, así como la fracción enzimática S 10 (testigo negativo) se esterilizaron por filtración miliporo (0.45 μm) (Takehisa y Kanaya 1983) y se aplicaron posteriormente a los linfocitos humanos interfásicos.

Testigos negativos

- a) 25×10^4 de linfocitos humanos interfásicos + RPMI 1640
- b) 25×10^4 de linfocitos humanos interfásicos + RPMI 1640 + 20 μL de extractos de las raíces sumergidas en agua desionizada (fracción microsómica S10).

Testigo positivo

- a) 25×10^4 de linfocitos humanos interfásicos + RPMI 1640 + 20 μL de extractos de las raíces tratadas con etanol (0.1 M) y se continuó la técnica como en los tratamientos directos.

El volumen final en los grupos experimentales, en los testigos negativo y positivo fue de 500 μl .

5.12. Esquema de tratamiento (2 horas) con los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con diferentes concentraciones de ametrina

20 μL de los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm se aplicaron a los linfocitos interfásicos.

5.13 Determinación de proteínas totales por el método de Bradford

5.13.1 Extractos de las raíces de *Vicia faba* con y sin tratamiento con ametrina aplicados a los linfocitos humanos

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

En tubos de ensaye se colocaron 20 μ L de los extractos de las raíces tratadas con ametrina y los testigos negativo (extractos de las raíces sumergidas en agua desionizada) y positivo (extractos de las raíces tratadas con etanol 1×10^{-1} M) más 200 μ L del reactivo de Bradford, 780 μ L de agua desionizada se agitaron en un vórtex e inmediatamente se realizaron las lecturas a 595 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ11 que fue llevado a cero en densidad óptica con el blanco de agua desionizada más el colorante y la 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.

6. Evaluación del daño del ADN de los linfocitos humanos

Para analizar el daño del ADN de los linfocitos humanos tratados directamente y con los extractos de las raíces tratadas con las diferentes concentraciones con ametrina, se determinó el porcentaje de daño en 100 células consecutivas la presencia y ausencia de células con y sin cometa en el microscopio de fluorescencia Olympus (con objetivos de 16X y 40X con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm).

6.1 Análisis de los Cometas

Para determinar la migración del ADN se midió longitud de la cola o cauda (μm) y la cabeza o núcleo con objetivo el micrométrico a 40X como se muestra en la siguiente figura:

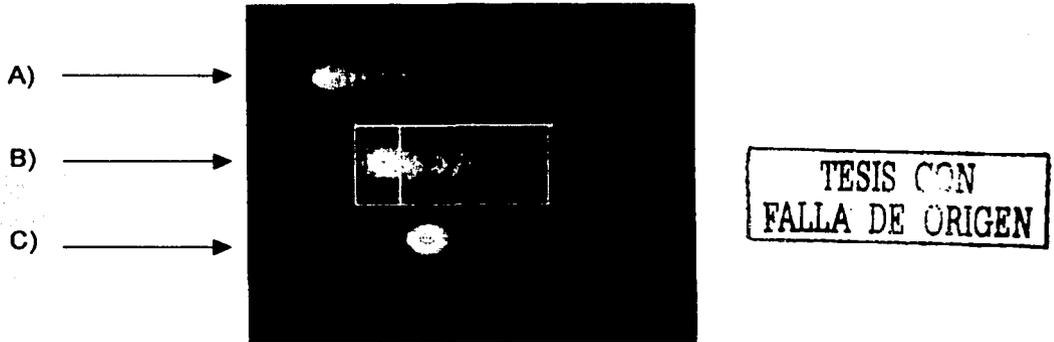


Figura 10. A) Linfocito humano con daño al ADN en forma de cometa. B) Medición del diámetro del núcleo y la longitud de la cola o cauda. C) Linfocitos sin daño al ADN (sin cometa) (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000)

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el fin de evitar prejuicios en las observaciones, se reetiquetaron los geles. en todos los casos se realizaron tres experimentos cuyos valores se compararon entre sí, mediante una prueba "t" de Student, posteriormente se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

VII. RESULTADOS

7. 1 Tratamientos directos con ametrina y mitomicina C a los linfocitos humanos

Los tratamientos directos con 1, 2, 3, 5 y 6 ppm del herbicida ametrina a los linfocitos interfásicos por 2 h mostraron resultados negativos en la inducción en la frecuencia de células con daño (con cometas) y migración del ADN, con respecto a los valores del testigo negativo (Tabla I y gráfica I).

El testigo positivo, la mitomicina C (MMC, 400 ng/mL), produjo incremento de células con daño (con cometas) y migración del ADN con respecto al testigo negativo (Tabla I y gráfica I).

7. 2 Tratamientos con los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con ametrina y etanol a los linfocitos humanos *in vitro*

Al coincubar los linfocitos humanos con los extractos de las raíces de *Vicia faba* (sistema de activación metabólica *in vivo*, tratadas con 50, 100, 200, 500 ppm incrementaron del 40 % al 60% las frecuencias de células con daño (con cometas) y aumentó la migración del ADN (Tablas II y gráfica II) y con 1000 ppm de ametrina obteniendo una relación de concentración-respuesta. Con el etanol previamente activado por la raíz de *Vicia faba* se indujo 100% de células con daño (con cometas) y mayor migración del ADN (Tabla II y gráfica II), al ser comparados con los datos del testigo negativo (fracción S10 de la raíz de *Vicia faba* sin tratamiento) (Tabla II y gráfica II).

7.3 Evaluación del efecto citotóxico de la ametrina y etanol con activación metabólica de *Vicia faba in vivo*

El análisis citotóxico de los linfocitos expuestos directamente con 1, 2, 3, 5 y 6 ppm de ametrina reveló disminución de la viabilidad celular hasta provocar muerte celular con 10 ppm del herbicida con relación a los valores del testigo negativo (Tabla III y gráfica III).

Cuando se coincubaron los linfocitos humanos *in vitro* con los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con 50, 100, 200, 500 ppm y 1000 ppm de ametrina (sistema de activación metabólica vegetal *in vivo*), descendió la viabilidad linfocitaria en todas las concentraciones ensayadas contrastadas con los datos del testigo negativo (fracción enzimática S10 sin tratamiento) (Tabla IV). En el caso del etanol previamente activado por la raíz de *Vicia faba* no se evidenció alteración en la viabilidad de las células humanas (Tablas IV y gráfica IV).

7.4 Determinación de proteínas totales por el método de Biorad de Bradford en los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con ametrina

La concentración de proteínas totales en los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con las diferentes concentraciones de ametrina, etanol (testigo positivo) y en la fracción S10 (testigo negativo) usados en los tratamientos con los linfocitos humanos *in vitro* fue de 0.5 µg/20 µl. El pH del medio de cultivo (RPMI 1640) más linfocitos humanos coincubados con la ametrina y con los extractos de las raíces de *Vicia faba* expuestas a diferentes concentraciones de la triazina estuvo dentro del rango normal de 7.2-7.4 del testigo negativo.

VIII. DISCUSION

La ametrina es un herbicida triazínico ampliamente usada en la agricultura mexicana para el control de malas hierbas de diversos cultivos de importancia económica como maíz, sorgo, caña de azúcar, piña, café etc.

Algunos estudios han evidenciado efectos genotóxicos y mutagénicos de algunas triazinas en sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro*, sin y con activación metabólica animal y vegetal. Torres *et al.* (1992) demostraron mutagenicidad con la atrazina en *Drosophila melanogaster*. Venkant *et al.* (1995) revelaron baja genotoxicidad de la atrazina con el ensayo de microplaca SOS en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

Ribas *et al.* (1995) encontraron incremento significativo en la migración del ADN en linfocitos humanos en cultivo coincubados con la atrazina; Clements *et al.* (1997) demostraron daño al ADN en eritrocitos del ajolote de la *Rana catesbeina* con 5 triazinas, atrazina, metalochlor, amsol, glifosat y metribuzina con el ensayo cometa, sin relación de concentración-respuesta;

Hay poca información sobre las acciones mutagénicas y genotóxicas del herbicida ametrina en humanos, animales y plantas. Asongalem y Akintonwa (1997) reportaron embriotoxicidad en ratas hembras expuestas a 185 ppm de ametrina y su persistencia en las raíces de los cultivos de plátano y algodón, en peras y en una variedad de granos como el trigo. Por lo cual en este trabajo se investigaron los efectos genotóxico y citotóxico y el papel del metabolismo de *Vicia faba in vivo*, para biotransformar al herbicida triazínico ametrina en un promutágeno y como sistema evaluador del daño al ADN al ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina, para ello se expusieron a los linfocitos interfásicos de sangre periférica con diferentes concentraciones directas del herbicida y con los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con ametrina.

Los resultados de los tratamientos directos con 1, 2, 3, 5, 6 y 10 ppm de ametrina mostraron que no es un compuesto genotóxico directo en los linfocitos humanos *in vitro* (Tabla I y gráfica I) al no inducir incremento en la frecuencia de cometas (células con cometa) y migración del ADN (fragmentos rotos) en ninguna de

las concentraciones ensayadas (Tabla I y gráfica I) comparados con los datos del testigo negativo (Tabla I y gráfica I), esta respuesta coincide con la obtenida por Flores-Maya (2000) y Gómez de la Cruz (2001) que observaron resultados negativos en el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos humanos en cultivo tratados con ametrina y metribuzina directamente por 4 y 48 horas. Asimismo Kligerman *et al.* (2000a) no evidenciaron incremento de ICH y aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos *in vitro* expuestos con las triazinas simazina, atrazina y cianazina; el mismo efecto negativo fue evidenciado con el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón (Kligerman *et al.* 2000 b), Kaya *et al.* (2000) reportaron actividad no mutagénica de las triazinas metribuzina, amitrole, prometrina y terbutrin con las pruebas de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster*.

Cuando se coincubaron los extractos de las raíces de *Vicia faba* expuestas con 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm de ametrina por 4 h con los linfocitos interfásicos durante 2 horas, una vez más se comprobó la eficiencia metabólica de la planta para transformar al herbicida ametrina a intermedios metabólicos con capacidad para interactuar con el ADN e incrementar del 40 % al 60 % en la frecuencia de cometas y mayor migración del ADN con una relación de concentración-respuesta (Tabla II y gráfica II). Con 1000 ppm de ametrina se provocó el 100 % de daño al ADN al obtener 100 % de células con cometas y mayor migración del ADN (Tabla II y gráfica II), comparados con los resultados del testigo negativo (fracción S10 de la raíz de *Vicia faba* sin tratamiento) (Tabla II y gráfica II).

De Marco *et al.* (1992) encontraron frecuencias elevadas de micronúcleos en las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* tratadas con el herbicida atrazina. Este efecto genotóxico fue similar al descrito por Flores-Maya (2000) ya que hubo inducción significativa de ICH en los meristemos apicales de la raíz de *Vicia faba* con las triazinas ametrina y metribuzina por 4 horas y en los linfocitos humanos en cultivo coincubados con los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratados con ambos plaguicidas por 48 horas. Asimismo Gómez de la Cruz (2001) encontró resultados positivos en ICH en linfocitos humanos en cultivo por 4 h con las mismas triazinas en presencia de la mezcla enzimática S10 de *Vicia faba*.

Shah *et al.* (1997) describen mayor formación de aductos en el ADN de timo de ternera *in vitro* por algunos metabolitos de la triazina metribuzina y otros plaguicidas organoclorados y organosfosforados en presencia de la S9 de hígado de rata.

Moretti *et al.* (2002) visualizaron aumento en la migración del ADN en leucocitos humanos coincubados con la triazina terbutrin en presencia y ausencia de la fracción S9 de hígado de rata, sin relación de concentración-respuesta mediante electroforesis unicelular alcalina.

Se tiene publicado que la ametrina es metabolizada en mamíferos y aves principalmente por reacciones de hidroxilación y desalquilación a diversos intermedios metabólicos y posiblemente los metabolitos Hidroxi-ametrinas 2 y 4-hidroxi-ametrina (figuras 8 y 9), estén implicados en la inducción de rompimientos de cadena sencilla del ADN visualizados en la forma de cometas y en la migración de los fragmentos rotos del material genético, esta hipótesis se apoya con evidencias de que los hidroxí- y sulfóxidos-triazinas son los metabolitos altamente reactivos o con centros nucleofílicos a macromoléculas como el ADN y ARN, con actividad electrofílica a grupos tiol de proteínas (Shah *et al.* 1997, Roberts *et al.* 1998, Tchounwoul *et al.* 2000, Farré *et al.* 2002).

El efecto genotóxico directo de la mitomicina C, ha sido estudiada en diversos sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro* usando distintas pruebas de evaluación del daño al ADN, las cuales indican que es un buen agente inductor de aberraciones cromosómicas, ICH, micronúcleos, aductos y migración del ADN por electroforesis unicelular alcalina o neutra, además es muy conocida su acción como agente intercalante ADN-ADN. Con tales antecedentes en este trabajo se utilizó a la MMC (400 ng/mL) como testigo positivo, la cual produjo el 22 % de células con daño (o con cometas) y migración significativa del ADN con relación a los valores testigo negativo (Tabla I) dicho comportamiento es similar a los publicados por Tomasz (1994a, b), Pfuler y Wolf (1996) y Merck y Speit (1999) con diferentes líneas celulares con electroforesis unicelular alcalina.

La activación vegetal *in vivo* e *in vitro* del etanol ha demostrado que es un promutágeno activado por la raíz de *Vicia faba* y un excelente productor de ICH en

el cultivo de células de criceto chino y en linfocitos humanos (Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999). Con base a lo anterior en el presente estudio se consideró al alcohol como un testigo positivo en el sistema de activación vegetal *in vivo*. Los resultados del análisis del daño al ADN en los linfocitos expuestos a los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con 3600 ppm de etanol por 2 h evidenciaron una vez más que es un promutágeno activado por el metabolismo del haba al provocar 100 % de cometas y mayor migración del ADN con relación al testigo negativo (S10) (Tabla II y gráfica II).

Está demostrado que el etanol es metabolizado por las raíces de *Vicia faba* principalmente por reacciones de óxido-reducción a acetaldehído por la enzima citosólica alcohol deshidrogenasa (ADH), la cual requiere de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y en ácido acético por la aldehído deshidrogenasa (ALDH) también dependiente del NAD. Estas reacciones ocurren principalmente en las mitocondrias y el citoplasma (Obe y Ristow 1977, Obe *et al.* 1979, 1986, Obe y Anderson 1987, Singh y Khan 1995). El acetaldehído es el principal metabolito que provoca ICH en linfocitos humanos *in vitro* en presencia de la enzima ADH y de NAD (Obe *et al.* 1986) y quizás el mejor candidato para ocasionar rompimientos en la cadena del ADN visualizados en forma de cometas (Tabla II y gráfica II). Varios estudios indican que el acetaldehído tiene múltiples formas de interactuar con el ADN ocasionando frecuencias elevadas de mutaciones, rompimientos del ADN, muerte celular o apoptosis, así como efectos carcinogénicos y teratogénicos (Woutersen *et al.* 1984, Olive *et al.* 1990), entrecruzamientos del ADN y modificación de algunas proteínas (Singh y Khan 1995).

El análisis de la viabilidad celular en los linfocitos humanos expuestos con 1, 2, 3, 5 y 10 ppm de ametrina mostró que la molécula original ejerce citotoxicidad disminuyéndola del 87% al 72% con relación de concentración-respuesta hasta provocar muerte celular con 10 ppm del herbicida (Tablas III y gráfica III), estos resultados coinciden con datos para las triazinas, terbutrin, metribuzin y atrazina en linfocitos humanos en cultivo (Clements *et al.* 1997, Kligerman *et al.* 2000, Flores Maya 2000, Gómez de la Cruz 2001, Hartmann *et al.* 2001 Moretti *et al.* 2002). En los tratamientos con los extractos (donde se encuentran los intermedios metabólicos)

de las raíces de *Vicia faba* (con activación metabólica vegetal *in vivo*) tratadas con 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm del herbicida (Tabla IV y gráfica IV) descendió del 80% al 76 % de la viabilidad de las células humanas con relación de concentración-respuesta sin provocar la muerte celular a concentraciones elevadas (500 y 1000 ppm) comparadas con los valores del testigo negativo (Tabla IV y gráfica IV), lo que indica un mecanismo de desintoxicación que las enzimas de la raíz de *Vicia faba*, este fenómeno es congruente con los datos reportados por Gómez-Arroyo *et al.* (1995), Calderón-Segura *et al.* (1999) para algunos plaguicidas como el propoxur y el molinate con activación metabólica por la raíz de *Vicia faba* y para las triazinas tebutrin y la atrazina en presencia de la S9 de hígado de rata (Tennant *et al.* 2000, Moretti *et al.* 2002).

Los datos de la viabilidad de los linfocitos tratados con ametrina directa y previa activación metabólica *in vivo* por *Vicia faba* indicaron que el efecto citotóxico no influye en la acción genotóxica de la ametrina ya que no se encontró relación entre la frecuencia de células con daño (o cometas) y migración del ADN y disminución de la viabilidad linfocitaria (Tablas I- IV y gráficas I-IV). Con 10 ppm donde se produjo muerte celular no hubo células con daño ni migración del ADN (Tabla III y gráfica III).

La viabilidad linfocitaria en los tratamientos indirectos con ametrina (extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con diferentes concentraciones de la triazina) estuvo dentro del rango del 70-73 % aceptable para no interferir con el efecto genotóxico por el ensayo cometa (Tabla IV y gráfica IV) (Vigreux *et al.* 1988, Merck y Speit 1999, Tice *et al.* 2000, Hartmann *et al.* 2001, 2003) ya que se ha mencionado que la toxicidad puede causar daño al ADN por mecanismos secundarios (Kohn 1979, Barrat *et al.* 1985, Helander y Lindahl-Kiessling 1991, Henderson *et al.* 1998).

Los valores de la viabilidad celular de los testigos positivos directo e indirecto, MMC y el etanol respectivamente comprueba lo anterior ya que con ambos compuestos no se alteró la viabilidad de los linfocitos pero aumentaron significativamente las frecuencias del daño al ADN (Tablas I-IV y gráficas I-IV) (Vigreux *et al.* 1988, Merck y Speit 1999, Tice *et al.* 2000, Hartmann *et al.* 2001, 2003).

Los resultados de esta investigación corroboran que la triazina ametrina requiere de la activación metabólica por la raíz de *Vicia faba* para actuar como promutágeno y aumentar el daño al ADN en los linfocitos humanos *in vitro*, lo cual debe ser considerada como un agroquímico de gran riesgo para la salud humana y animal, además este herbicida es asperjado por los agricultores de manera inadecuada y sin precaución. Su persistencia en el agua, en el suelo y en los productos alimenticios como son los cereales, hortalizas y frutos, es otro factor de riesgo adicional ya que la molécula original o sus metabolitos podrían ocasionar efectos deléteros en el funcionamiento de diversos órganos (Stevens y Summer 1991, Tu 1992, Solomon *et al.* 1996, Tang *et al.* 1998, Tadeo *et al.* 2000).

IX. CONCLUSIONES

- Se corroboró la capacidad metabólica de la raíz *Vicia faba* para biotransformar el herbicida triazina ametrina en un promutágeno, con el incremento significativo de linfocitos humanos con daño (con cometas) y migración del ADN mediante electroforesis unicelular alcalina.
- Los testigos positivos; directo la mitomicina C e indirecto el etanol (3600 ppm) previamente activado por las raíces de *Vicia faba*, producen 25% y 100% cometas y mayor migración del ADN, respectivamente, siendo más potente el alcohol metabolizado, lo cual indica que es un excelente testigo en el *ensayo cometa*.
- La ametrina con y sin activación metabólica vegetal *in vivo* disminuye la viabilidad de los linfocitos y sólo en forma directa ocasiona muerte celular.
- La fracción enzimática S10, no interfiere con la genotoxicidad ni con la citotoxicidad al no producir significativamente linfocitos con daño (con cometas) y migración del ADN, sin alterar la viabilidad de las células humanas.
- El *ensayo cometa* es un sistema adecuado para evaluar el daño al genoma humano con plaguicidas con y sin activación metabólica vegetal *in vivo*.

X. REFERENCIAS

- Ademola J.I., Sedik L.E., Wester R.C. y Maibach H.I. 1993. *In vitro* percutaneous absorption and metabolism in man of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamine-s-triazine (atrazine). Arch. Toxicol. **67**, 85-91.
- Ames B. N., Mc Cann J. y Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella mammalian* mutagenicity test. Mutat. Res. **3**, 347-363.
- Arru G., Congiu A. M., Burdino E. y Ugazio G. 1997. Toxicity of atrazine and its metabolite deethylatrazine in *Thamnocephalus platyurus* y *Dugesia gonocephala*. G. Ital. Med. Lav. Ergon. **19**, 17-19.
- Asbhy J. Burlinson B., Lefevre P. A. y Tapham J. 1985. Non-genotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to the mouse bone marrow and the rat liver: implications for its carcinogenicity. Arch. Toxicol. **58**, 14-19.
- Ashton M. F. y Bayer E. D. 1979. Effect on solute transport and plant constituents. En: *Herbicides; physiology, biochemistry, ecology*. (Auds. J. L. Eds.). Academic Press, Londres, Vol. **1**, pp. 220-250.
- Asongalem A. y Akintonwa A. 1997. Embriotoxic effects of oral ametryn exposure in pregnant rats: Bull Environ. Contam. Toxicol. **58**, 184-189.
- Barberá C. 1975. *Pesticidas agrícolas*. Omega, Barcelona. 425 p.
- Barrat R., Bradley M., Douglas G., Glauert H., Lakhanisky T., Martin C. y Probst G. 1985. Summary report on the performance of assays for DNA damage. En Ashby J., De Serres F. L.(Eds.). Progress in Mutation Research. Vol **5** Elsevier Amsterdam pp. 59-67.
- Bayer A. G. 1994. Tratamiento en la introducción por plaguicidas. Guías para médicos. Sector Agrochemical Crop Protection Business Group.
- Blair A. y Zahm S. H., 1991. Cancer among farmers, Occup. Med. State of the Art Reviews **6**, 335-354.
- Blair A. y Zahm S. H., Pearce, N. E., Heinman, E. F., Fraumeni, J.F., Jr., 1992. Clues to cancer etiology from studies of farmers, Scand J. Work Environ. Health **18**, 209-215.
- 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 acetachlor in corn and in soybean seedling. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1098-1104.

Breaux E. J. 1987. Initial metabolism of acetachlor in tolerant and susceptible seedling. *Weed Sci.* **35**, 474-478.

Brian C. R. 1979. The history and classification of herbicides. En: *Herbicides: physiology, biochemistry, ecology* (J.L. Audus, Ed.). Academic Press, Londres, Vol. **1**, pp 1-54

Briggs S. 1992. *Basic Guide to pesticide*. Hemisphere Publishing. Washington, D.C.

Brock T. y Madigan M. 1991. *Microbiología*. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México.

Brusick J. D. 1994. An assessment of the genetic toxicity of atrazine: Relevance to human health and environmental effects. *Mutat. Res.* **317**, 133-144.

Calderón-Segura M. E. 1993. Intercambio de cromátidas hermanas inducidos por propoxur previa activación metabólica por *Vicia faba*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F.

Calderón-Segura M. E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Ramírez M. 1999. *In vivo* and *in vitro* promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* **438**, 81-88.

Carder J. C. y Hoagland K. D. 1998. Combined effects of alachlor and atrazine on benthic algal communities in artificial streams. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1415-1420.

Carringer R. D., Rick C. E. y Bush L. P. 1978. Metabolism of EPTC in corn (*Zea mays*). *Weed Sci.* **26**, 157-171.

Casarett L. y Doull J. 1975. *Toxicology: The basic science of poisons*. United States of América: Mc Millan Publishing Co.

Casida J. E., Gray R. A. y Tilles H. 1974. Thiocarbamates 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., y Ohkawa R. 1975b. Sulfoxidation of thiocarbamate herbicides and metabolism of thiocarbamate in living mice and liver enzyme system. *Sci. Pestic. Biochem. Physiol.* **7**, 122-141.

Clements C. H., Steven R. y Petras M. 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ. Mol. Mutagen.* **29**, 277-288.

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.

CIBA-GEIGY MEXICANA 1996. Manual de protección de cultivos. 3ª ed., Ciba Geigy, México, 334 p.

Coleman J. O. D., Blake-Kalff M. M. A y Emyr Davies T.G. 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemicals modification and vacuolar compartmentation. *Rev. Trends Plant Sci.* **2**, 144-151.

Coye M. 1982. Vigilancia de los trabajadores expuestos a plaguicidas. Taller de adiestramiento. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud/Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste. San Cristóbal de las Casas, México: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud/Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste.

Davies P. E., Cook L. S. J. y Geonarso D. 1994. Sublethal response to pesticidas of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 1341-1354.

De Marco A., De Simone C., Ranglione M., Testa A. y Trinca S. 1992. Importance of type of soil for the induction of micronuclei and the growth of primary roots of *Vicia faba* treated with the herbicides atrazine, glyphosate, and maleic hidrazide. *Mutat. Res.* **279**, 9-13.

DGEIE (Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación). 1995. *Informe Anual Agrícola*. México, D.F.

De la Jara F. 1985. *Manual de toxicología y tratamiento de intoxicaciones con plaguicidas agrícolas*. México: Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes.

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: *Environmental Chemistry of Herbicides*. (Grover R. y Cessna A.J. Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. Vol. II, 119-140.

Diccionario de Especialidades Agroquímicas. 1999. Ed. PLM. México. 1372 pp.

Di Corcia A., Barra C. A., Crescenzi C., Giulano G., Murtas S. y Samperi R. 1999. Subcritical water extraction followed by liquid chromatography mass spectrometry for determining terbutylazine and its metabolites in aged and incubated soils. *Pesticide Sci.* **18**, 1345-1351.

Donna A., Betta P.G., Robutti F., Crosignani P., Berrino F. y Bellingeri D. 1984. Ovarian mesothelial and herbicides: A case-control study. *Carcinogenesis* **5**, 941-942.

Donna A., Crosignani P., Robutti F., Betta P.G., Bocca R., Mariani N., Ferrario F., Fissi R., y Berrino F. 1989. Triazine herbicides and ovarian epithelial neoplasma. *Scand. J. Work. Environ. Health* **15**, 47-53.

Ducruet J. M., Sixton H. y García-Bauin J. M. 1993. Using chlorophyll fluorescence induction for a quantitative detoxification assay with metribuzin and chlorotoluron in excised wheat (*Triticum sativum* y *T. durum*) leaves. *Pesticide Sci.* **38**, 295-301.

Dunkelbert H., Fuchs J., Hengstler J.G., Klein E., Oesch F. y Strüder K. 1994. Genotoxic effects of the herbicides alachlor, atrazine, pendimethaline, and simazine in mammalian cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52**, 498-504.

Ecobichon D. J. y Joy R. 1984. *Pesticides and Neurological Disease*. C.R.C. Press. Boca Ratón, Florida. pp. 285-310.

Ecología Humana y Salud. 1983. Editorial. Ecología Humana y Salud. **2**, 1-5.

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

Evans J. H. y O'Riordan M. L. 1975. Human peripheral blood lymphocytes for analyses of chromosome aberrations in mutagen test. *Mutat. Res.* **31**, 135-148.

FAO/PNUMA. Actualización de la Circular ICPVI. 1997. Farm Chemicals Handbook '97. Pesticides Dictionary. USA:

Farré M., Fernández J., Páez M., Granada L., Barba L., Gutiérrez H. M., Pulgarin C. y Barceló D. 2002. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn biodegradation. *Anal. Biochem.* **373**, 704-709

Flores-Maya S. 2000. Intercambio de cromátidas hermanas inducido por dos herbicidas del grupo químico triazina en cultivo de linfocitos humanos previa

activación metabólica por un biomonitor vegetal (*Vicia faba*). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D. F.

Frear D. S., Swanson L. y Tanaku F. S. 1969. N-demethylation substituted 3-(phenyl)-methylureas: isolation and characterization of microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochem.* **8**, 2157-2169.

Fuhremann T. W., Lichtenstein E. P. y Stratman F. W. 1978. EPTC metabolite in corn, cotton and soybean: identification of a novel metabolite derived from the metabolism of glutathione conjugate. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 1-7.

Gentile J. M., Gentile G. J., Bultman J., Sechriest R., Wagner E. D. y Plewa M. J. 1982. An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* **101**, 19-29.

Gentile J. M., Gentile G. J. y Plewa M. J. 1986. *In vitro* activation of chemicals by plants: a comparison of techniques. *Mutat. Res.* **164**, 53-58.

Ghiazza G., Zavarise G., Laner M. y Ferraro G. 1984. Sister chromatid exchanges induced in human lymphocyte chromosomes by triflurolin, atrazine and simazine. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **60**, 2149-2153.

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

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

Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M. E. y Villalobos-Pietrini R. 2000. *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change 2*. Edited by Butterworth et al. *Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York*. p. 439-455.

Gómez-de la Cruz L. 2001. Efecto citogenético de los productos de activación metabólica *in vitro* por la raíz de *Vicia faba* de los herbicidas triazinas ametrina y metribuzina en linfocitos humanos en cultivo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D. F.

González M., Soloneski S., Reigosa M. A. y Larramendy M. L. 2003. Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azurro. IV. DNA damage and repair kinetics assessed by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat. Res.* **534**, 145-154.

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.

Grover R. y Cessna A. J. 1991. *Environmental Chemistry of Herbicides*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. Vol II, pp. 2-15.

Guigas C., Pool-Zobel B. L. y Dile J. F. 1993. The combination effects of quercetin with the herbicides atrazine, cyanazine and gesaprim in mutagenicity tests. *Z. Ernährungswiss* **32**, 131-138.

Hassall K. A 1990. *The Biochemistry and Uses of Pesticides*. 2ª edición, Mc Millan Press, Hong Kong.

Hatzios K. K. y Penner D. 1982. *Metabolism of herbicides in higher plants*. Burgess Publishing, Minneapolis. pp. 77-98.

Hatzios K.K. 1988. Biotransformations of herbicides in higher plants. En: *Environmental chemistry of herbicides*. (R.Grover y A.J.Cessna, Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. Vol II, pp. 142-175.

Hatzios K.K. 1991. Biotransformation of herbicides in higher plants. En: *Environmental Chemistry of Herbicide*. (Grover R. y Cessna A.J. Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 141-185.

Hartmann A., Kiskinis E., Fjällman A. y Suter W. 2001. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* **497**, 199-212.

Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schaab S., Burlinson B., Clay P., Collins, Smith A., Speit G., Thybaud V. y Tice R. R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis* **18**, 45-51.

Henderson L Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C. y Windebank S. 1998. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* **13**, 89-94.

Helander C. y Lindahl-Kiessling K. 1991. Increased frequency of acetaldehyde-induced sister-chromatid exchanges in human lymphocytes treated with an aldehyde dehydrogenase inhibitor. *Mutat. Res.* **264**, 103-107.

Herelia P., Viigagni F., Maffei F., Morotti M., Colacci A., Perocco P. y Grillo S. 1994. Genetic safety evaluation of pesticides in different short-term tests. *Mutat. Res.* **321**, 219-228.

- Herrera C. y Rodas M. 1983. Determinación de la actividad de colinesterasa en personas expuestas a insecticidas organofosforados en el municipio de Tapachula, Chiapas, México. Universidad Autónoma de Chiapas, Area de Ciencias Químicas.
- Higashi K., Ikeuchi K., Karasaki I. y Obara M. 1983. Isolation of immunochemically distinct form of cytochrome P-450 from microsomes of tulips bulbs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**, 46-52.
- Higashi K. 1985. Microsomal cytochrome P-450 in higher plants. En: *P-450 and chemical carcinogenesis*. (Tagashira Y. y Omura T. Eds.). Gaun Monogr. Cancer Res. **30**, pp. 49-66.
- Higashi K. 1988. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* **197**, 273-288.
- Hoberg J. R. 1993. Atrazine technical: Toxicity to duckweed (*Lemna gibba*). SLI Report. 934755 Springborn Laboratories, Wareham, MA.
- Hubell J. P. y Casida J. E. 1975. Dichloroacetamide antidotes for thiocarbamate herbicides: mode of action. *Science* **189**, 287-289.
- Hubell 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.
- Ikonen R., Kangas J. y Savolainen H. 1988. Urinary atrazine metabolitos as indicators for rat and human exposure to atrazine. *Toxicol. Lett.* **44**, 109-112.
- Junnila S., Heinonen-Tanski H., Ervio L.R. y Laitinen P. 1993. Phytotoxic persistence and microbiological effects of metribuzin in different soils. *Weed Res.* **33**, 213-223.
- Kaya B., Yanikoglu A., Creus A. y Marcos R. 2000. Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* **465**, 77-84.
- Kirby M. F. y Sheahan D. A. 1994. Effects of atrazine, isoproturon and mesoprop on the macrophyte *Lemna minor* and the alga *Scenedesmos subspicatus*. *Bull. Environ. Toxicol.* **53**, 120-126.
- Kligerman A. D., Doerr C. L., Tennant A. y Zucker R. M. 2000a. Cytogenetic studies of three triazines herbicides I. *In vitro* studies. *Mutat. Res.* **465**, 53-59.
- Kligerman A. D., Doerr C. L., Tennant A. y Peng B. 2000b. Cytogenetic studies of three triazines herbicides II. *In vivo* micronucleus studies in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* **47**, 107-112.

Kopriva J. 1981. The toxicity of triazine and diazine based herbicides to fishes. *Agrochimica* **21**, 344-347.

Kohn K., W. 1979. DNA as a target in cancer chemotherapy: Measurement of macromolecular DNA damage produced in mammalian cells by anticancer agents and carcinogens. En: De vita Jr. V. T., Bush H. (Eds). *Methods in Cancer Research*. Vol **16**, Academic Press New York pp. 291-345.

Kulshrestha G., Yaduraju N.T. y Mani V.S. 1982. The relative toxicity of the S-triazine herbicides atrazine and simazine to crops. *J. Environ. Sci. Health* **4**, 341-354.

Krugar E. L., Somosundaram L., Kanwar R. S. y Coats J. R. 1993. Persistent and degradation (C14) deisopropylatrazina as affected by soil depth and moisture conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 1959-1967.

Lanfranconi L. E., Bellinder R. R. y Wallace R. W. 1993. Grain rye residues and weed control strategies in reduced tillage potatoes. *Weed Technol.* **7**, 23-28.

Lay M. M., Hubbell J. P. y Casida J. E. 1975. Dichloroacetamide antidotes thiocarbamate herbicides detoxification. Mode of action. *Science* **189**, 287-288.

Loosli R. 1995. Epidemiology of atrazine. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **143**, 47-57.

Lombardi J. V., Machado-Neto J. G., Brossi-García A. L., Marques H. L. A. y Kubo E. 2001. Acute toxicity of the pesticides endosulfan and ametryne to the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de man. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **67**, 665-671.

Lytle J. S., y Lytle T. F. 1998. Atrazine effects on stuarine macrophytes *Sartina alterniflora* and *Juncus roemerianus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1972-1978.

Maddy K. y Edmiston S. 1981. Pesticide Safety. Program of the California Department of Food and Agriculture Based upon Measurements of Potential Workplace Exposure and the Elimination of Excess Exposures. Pesticides Residues and Exposure. Washington, D.C. American Chemical Society, pp. 75-81.

Márquez E. 1975. *Los plaguicidas agrícolas y la contaminación ambiental*. Salud Pública México. **17**, 829-834.

Means, J. C., Plewa, M. J. y Gentile M. J. 1988. Assessment of the mutagenicity of fractions from s-triazine-treated *Zea mays*. *Mutat. Res.* **197**, 225-336.

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

Meister R. T. 1992. Farma chemicals handbook '92. Meister Publishing company, Willoughby, pp 455

Merck O. y Speit G. 1999. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* **33**, 167-172.

Molly J. 1984. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides; I. Cholinesterase activity determinations; II. Monitoring of intact pesticides and their metabolites, California: Department of Food and Agriculture.

Morley L. L., Trainos K. J., Seshdrin R. y Ryall R. G. 1983. Measurement of *in vivo* mutation in human lymphocytes. *Nature* **302**, 155-156.

Moretti M., Marcarelli M., Villarini M., Fatigoni C., Scassellati-Sforzolini G. y Pasquini R. 2002. *In vitro* testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: cytogenetic and primary DNA damage. *Toxicology in Vitro* **16**, 81-88.

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.

Naylor W. A. 1979. Herbicide metabolism in plants. En: *Herbicides, physiology, biochemistry, ecology*. (Audus J. L. Eds.). Academic Press, Londres, Vol. **1**, pp. 397-442.

Obe G. y Ristow H. 1977. Acetaldehyde, but not ethanol, induces chromatid exchanges in Chinese hamster cells *in vitro*. *Mutat. Res.* **56**, 211-213.

Obe G., Natarajan T., Meyers A. y Den Hertog A. 1979. Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood *in vitro*, and of SCE in bone-marrow cells of mice *in vivo* by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutat. Res.* **68**, 291-294.

Obe G., Jonas R. y Schmith S. 1986. Metabolism of ethanol *in vitro* produces a compound which induces sister-chromatid exchange in human peripheral lymphocytes *in vitro*: acetaldehyde not ethanol is mutagenic. *Mutat. Res.* **174**, 47-51.

Obe G. y Anderson D. 1987. Genetic of ethanol. *Mutat. Res.* **186**, 177-200.

Ochoa-Alejo N. y Crocomo O.J. 1988. Inhibition of growth and interference with ¹⁴C-leucine uptake and incorporation into protein in non-chlorophyllaceous sugarcane cells by Ametryn. *Turrialba* **38**, 59-63.

Olive P. L., Banáth J. P. y Durand R. E. 1990. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 779-783.

OMS (Organización Mundial de la Salud). 1990. Plaguicidas. Informe técnico N° 12.

Oris J. T., Winner R. W., y Moore M. V. 1991. A four-day survival and reproduction toxicity for *Ceriodaphnia dublia*. Environ. Toxicol. Chem. **10**, 217-224.

Ortiz-Hernández, M, Sánchez-Salinas E., Vázquez-Duhalt R. y Quintero-Ramírez, R. 1997. Plaguicidas Organofosforados y Ambiente. Biotecnología. México. **3**, 129-151.

Ostling O. y Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. **123**, 291-298.

Pacókova V., Stulik K. J. y Jiskra J. 1996. High-performance separations in the determination of atrazine herbicides and their residues. J. Chromat. A. **754**, 17-31.

Pearce N. y Reif, J. S. 1990. Epidemiologic studies of cancer in agricultural workers, Am. J. Ind. Med. **18**, 133-148.

Peña C, Dean E. Carter C. y Ayala-Fierro F. 2001. *Toxicología Ambiental. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. Instituto Nacional de Ciencias de la Salud Ambiental del Gobierno de los Estados Unidos de América. Universidad de Arizona.

Peterson H. G., Boutin C., Martin P. A., Freemark K.E., Rueckrer N.J. y Moody M. J. 1994. Acuatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. Acuatic. Toxicol. (Amsterdam) **28**, 275-292.

Pimentel, P., Draw J. y G. W. Steel. 1991. *Metabolic of the thiocarbamates in plants*. Pestic. Biochem. Physiol. **3**, 110-119.

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. 1982a. The activation of chemicals into mutagens by green plants. En: *Chemical mutagens: Principles and methods for their detection* (Hollaender, A., Ed.). Plenum Press, Nueva York, Vol. **7**, pp. 401-420.

Plewa M. J. y Gentile J. M. 1982b. Mutagenicity of atrazine: a maize microbe bioassay. Mutat. Res. **38**, 287-292.

Plewa M. J., Wagner E. D., Gentile M. 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 assay for the analysis of plant activated promutagens. *Mutat. Res.* **197**, 207-209.

Plewa M. J. y Wagner D .E. 1993. The activation of chemical promutagens by green plants. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 93-113.

Porter W. P., Green S. M., Debbink N. L. y Carlson I. 1993. Groundwater pesticides interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* **40**, 15-34.

Reyes R. y Sánchez E. 1975. Intoxicación por plaguicidas en la Comarca Lagunera durante el ciclo agrícola de 1974. *Salud Pública Méx.* **17**, 687-698.

Ribas G., Frenzelli G., Barale R. y Marcos R. 1995. Herbicide induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single cell gel electrophoresis CGE assay *Mutat. Res.* **344**, 41-54.

Ribas G., Surrallé J., Carbonell E., Creus A., Xamena N. y Marcos R. 1998. Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* **416**, 93-99.

Rich P. R. y Bendall D. S. 1975. Cytochrome components of plant microsomes. *Eur. J. Biochem.* **55**, 333-341.

Roberts R. T., Huston H. D., Lee W. P., Nicholls H. P., Plimmer R. J. 1998. Metabolic pathways of agrochemicals. *Herbicides and plant growth regulators.* *Roy. Soc. Chem.* 625-628, 662-669.

Robledo N. 1998. Análisis de residuos de plaguicidas en hortalizas. Memorias, Ciclo de conferencias "Hacia una renovación ambiental en México". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.

Rodríguez E. y Lozada O. 1984. Efectos fitotóxicos ocasionados por herbicidas usados en caña de azúcar (*Saccharum* híbrido interespecifico) sobre el desarrollo del cultivo. En: *Jornadas Técnicas 84. Resúmenes.* Maracay. Venezuela.

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

Roloff B., Belluck D. y Meisner E. 1992a. Cytogenetic studies of herbicide interactions *in vitro* and *in vivo* using atrazine and linuron. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **22**, 267-271.

Roloff B., Belluck D., y Meisner L. 1992b. Cytogenetic effect of cyanazine and metolachlor on human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutat. Res.* **281**, 295-298.

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

Sandermann H. Jr., Arjmad M., Gennity I. y Winkler R. 1990. Animal bioavailability of defined xenobiotic lignin metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1877-1880.

Sandermann H. Jr. 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* **17**, 82-84.

Shah R. G. Lagueux J., Kapur S., Levallois P., Ayotte P., Tremblay M., Zee J. y Poirier G. C. 1997. Determination of genotoxicity of the metabolites of the pesticides guthion, sencor, lorox, reglone, daconil and admire by ³²P-postlabeling. *Mol. Cell Biochem.* **169**, 177-184.

Sathiakumar N. y Delzell E. 1997. A review of epidemiology studies of triazine herbicides and cancer. *Crit. Rev. Tox.* **27**, 599-612.

SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos) 1980. Reglamento de la Ley de Sanidad Fitopecuaria de los Estados Unidos Mexicanos, en Materia de Sanidad Vegetal. México: Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Dirección General de Salud Vegetal.

SSA (Secretaría de Salud). Anuario Estadístico. 1993. Dirección General de Estadística Informática y Evaluación. Octubre, México. D.F.

Scorgie H.R. y Cooke A.S. 1979. Effects of the triazine herbicide cyanatryn on aquatic animals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **22**, 135-142.

Shimabukuro R. H., Lamoreux G. L. y Frear F. S. 1981. Pesticide metabolism in plants principles and mechanisms. En: *Biological Degradation of Pesticides*. Matsumara F. (Ed.). 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: *Biodegradation of Pesticides*. (Matsumara F. y Murti C.R.K. Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 21-66.

Singh N. F, McCoy M. T, Tice R. R, Scheneider E .L.1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184-191.

Singh N. P. y Khan A. 1995. Acetaldehyde: genotoxicity and citotoxicity in human lymphocytes. *Mutat. Res.* **337**, 9-17.

Smeda R. J., Hasegawa P. M., Goldsbrough P. B., Singh N. K. y Weller S. C. 1993. A serinethreonine substitution in the triazine herbicide-binding protein in potato cells results in atrazine resistance without impairing productivity. *Plant Physiol.* **103**, 911-917.

Smith E. A. 1988. Transformations in soil. En: *Environmental chemistry of herbicides* (R. Grover y A.J. Cessna, Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Florida, Vol 1, pp. 171-200.

Solomon K. R., Baker D. B., Richards R. B., Daxon K. R., Klame S. J., LaPont T. W., Kendall R. J., Weiskropf C. P., Giddings J. M., Giesy J. P., Hall L. W. y Williams W. M. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in north American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 31-76.

Solomon M. G. y Schettler T. 2000. Environment and health: 6 Endocrine disruption and potential human health implications. *Canadian Medical Association or its licensors.* **163**, 1471-1476.

Stephenson G. R., Brunce N. J., Makowski R. I., Bergsma M. D. y Curry J. C. 1979. Structure activity relationship for antidotes to thiocarbamate herbicides in corn. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 543-547.

Sterling T. M. 1994. Mechanism of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells. *Weed Sci.* **42**, 263-276.

Stevens, J. T. y Summer D. D. 1991. Herbicides. En: *Handbook of Pesticide Toxicology*. (W. J. Hayes Jr., E. R. Laws, Jr. Eds.). Academic Press, San Diego. USA. pp 1317-1408.

Tadeo J. L., Sánchez-Brunet C., Pérez R. A., Fernández D. M. 2000. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *J. Chromat. A*, **882**, 175-191.

Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. 1982. induction of sister chromatid exchange in CHO cells by extract 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 hidrazide and cyclophosphamide as measured by sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **197**, 195-205.

Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. 1988. Promutagen activation by *Vicia faba*: and assay on the sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **197**, 206-209.

Taets C., Aref S. y Rayburn A.L. 1998. The clastogenic potential of triazine herbicide combinations found in potable water supplies. *Environ. Health Perspect.* **4**, 197-201.

Tang J., Hoaglad K. D. y Siegfried B. 1998. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1085-1090.

Tennant A. H., Peng B., Kligerman A. H. 2001. Genotoxicity studies of three triazines herbicides: *in vivo* studies using the alkaline single cell gel assay. *Mutat. Res.* **493**, 1-10.

The Agrochemicals Handbook. 1994. Royal Society of Chemistry Information Systems. Tercera edición Unwind Brothers LTD., Surrey, England.

Tchounwoul P. B., Wilson B. I., Ransome R., Huang M. J. y Leszczynski J. 2000. Toxic assessment of atrazine and related triazine compounds in the microtox assay, and computational modeling for their structure-activity relationship. *Int. J. Mol. Sci.* **1**, 63-74.

The Agrochemicals Handbook. 1994. Royal Society of Chemistry Information Systems. Tercera edición Unwind Brothers LTD., Surrey, England.

Tice R. R., Andrews P. W. y Singh N. P. 1990. The single cell gel assay: A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. En: *Methods for detection of DNA damage in human cells.* (Sutherland B.M. and Woodhead A.D. Eds.). Plenum Press, New York. pp. 291-230.

Tice R.R., Andrews P. W., Hirai O. y Singh N. P. 1991. The single cell gel assay (SCG): An electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cell. En: *Biological reactive intermediates IV, molecular and cell effects and their impact on human health.* (Witmer C.R., Snyder R.R., Jollow D.J., Kalf G.F., Kocsis J.J. y Sipes I.G. Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 157-164.

Tice R. R., Strauss G. H. S. y Peters W. P. 1992. High-dose combination alkylating agents with autologous bone marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* **271**, 101-113.

Tice R. R. Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C. y Sasaki Y. F. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206-221.

Tomasz M. 1994a. DNA adducts of the mitomycins. En: *DNA adducts: identification and biological significance.* (Hemminki K, Dipple A, Shuker DEG, Kadlubar FF, Segerback D, Bartsch H, Eds.). Lyon: IARC. 349-357.

Tomasz M. 1994b. The mitomycins: natural cross-linkers of DNA. En: *Molecular aspects of anticancer drug-dna interactions.* (Neidle S, Waring M. Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. Vol **2**, 313-349.

Torres C., Ribas G., Xamena N., Creus A. y Marcos R. 1992. Genotoxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid tested in somatic and germ line cells of *Drosophyla*. *Mutat. Res.* **280**, 291-295.

Tu C. M. 1992. Effect of some herbicides on activities of microorganisms and enzymes in soil. En: *Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*. J. Environ. Sci. Health part B. **27**, 695-709.

USEPA 1987. Office of Drinking Water: Ametryn Health Advisory. EPA. Washington, D.C.

USEPA 1989. Health Advisory Summary: Ametryn. U.S. EPA. Washington, D.C.

USEPA 1994. Atrazina, simazine and cynazine. Notice of Initiation of Special Review. Fed. Reg. **59**, 60412-60443.

Veber K., Sarandi K.J., Breyll I. Y. Kredl F. 1981. Toxic effects of atrazine on algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **27**, 872-876.

Vega S. 1985. *Aspectos específicos de la toxicología de algunos contaminantes*. México: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud OPS/OMS. 135-137.

Veleminsky J. y Gichner T. 1988. Mutagenic activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. *Mutat. Res.* **197**, 221-242.

Venkant J. A., Shami S., Davis K. Nayaak M., Plimmer J. R. y Nair P. P. 1995. Relative genotoxic activities of pesticides evaluated by a modified SOS microplate assay. *Environ. Mol. Mutagen.* **25**, 67-76.

Venkatesh K., Levi P. E., Inman A. O., Monteiro-Riviere N. A., Misra R. y Hodgson E. 1992. Enzymatic and immunohistochemical studies on the role of cytochrome P-450 and the flavin-containing monooxygenase of mouse skin in the metabolism of pesticides and other xenobiotics. *Pesticide Biochem. Physiol.* **43**, 53-66.

Vigreux C., Paul J.M., Deslandes E., Lebailly P., Godard T., Sichel T., Henry-Amar M. y Gauduchon P. 1988. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOKI cells. *Mutat. Res.* **419**, 79-90.

Waleszewski S. M. y Szymczynski G. A. 1990. Simple low-cost method for determination of selected chlorinated pesticides in fat samples. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* **65**, 677-679.

Werck-Reichhart D., Hehn A. y Didierjean L. 2000. Cytochromes P-450 for engineering herbicide tolerance. *Science* **5**, 116-122.

WHO (World Health Organization). 1972. Health Hazard of Human Environment. Ginebra. pp. 97-105.

WHO (World Health Organization). 1976. Technical Report Series N° 365. *Safe use of pesticides in public health*. WHO Finlandia. (Eds.). pp. 1-40.

Wild D. 1975. Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutat. Res.* **32**, 133-150.

Worthing R.C. 1987. *The Pesticide Manual. A world compendium*. 9ª. ed. Worthing R.C: y Walter, R.J. (Eds.). The British Crop Protection Council, 336 p.

Woutersen R. A., Appelman L. M., Feron V. J. y Van Der Heiden C. A. 1984. Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats, II: Carcinogenicity study interim results 15 months. *Toxicology* **31**, 123-133.

Wu J., Liu, D. D. W., Robinson, R. A., Itterly, W. y Capps, T. M. 1992. (Hutson D. H., Hawkins D. H., Paulson G. B. y Struble, C.B. Eds). ACS Symposium Series. **503**, 168-169.

TABLAS

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TABLA I. FRECUENCIA DE LINFOCITOS CON COMETAS Y MIGRACIÓN DEL ADN INDUCIDAS POR EL HERBICIDA AMETRINA, SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA POR *Vicia faba in vivo*^a

TRATAMIENTOS DIRECTOS CON EL HERBICIDA AMETRINA A LOS LINFOCITOS INTERFÁSICOS	FRECUENCIA DE COMETAS ^b			LONGITUD DE LA COLA O CAUDA ^b (migración del ADN) (μm)		
	ppm	\bar{X}^b	\pm	E.E. ^c	\bar{X}^b	\pm
1	3	\pm	1.98	17.23	\pm	1.33
2	3	\pm	1.76	15.21	\pm	1.75
3	2	\pm	1.54	20.80	\pm	1.48
5	3	\pm	1.44	10.90	\pm	1.99
6	2	\pm	1.22	15.21	\pm	1.32
10	Muerte celular					
Testigo positivo Mitomicina C (MMC) 400 ng/ml	*22	\pm	3.56	*52.11	\pm	1.03
Testigo negativo Linfocitos interfásicos en RPMI 1640	2	\pm	2.88	15.21	\pm	1.44

^a = Promedio de tres experimentos

^b = En 300 células interfásicas

^c = Error estándar.

* Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamientos, utilizando un análisis de varianza (ANOVA) donde $F = 4.302$ a $p < 0.0001$ y aplicando la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls el valor de $p < 0.001$

TABLA II. FRECUENCIA DE LINFOCITOS CON COMETAS Y MIGRACIÓN DEL ADN INDUCIDAS POR EL HERBICIDA AMETRINA, CON ACTIVACIÓN METABÓLICA POR *Vicia faba in vivo*^a

TRATAMIENTOS CON EXTRACTOS DE <i>Vicia faba</i> CON HERBICIDA AMETRINA A LOS LINFOCITOS INTEFÁSICOS	FRECUENCIA DE COMETAS ^b			LONGITUD DE LA COLA O CAUDA ^b (migración del ADN) (μm)		
	ppm	\bar{X}^b	\pm	E.E. ^c	\bar{X}^b	\pm
50	*42	\pm	1.98	*97.18	\pm	2.66
100	*50	\pm	1.76	*99.08	\pm	2.15
200	*63	\pm	1.10	*100.00	\pm	3.25
500	*75	\pm	1.07	*104.99	\pm	1.95
1000	*100	\pm	1.10	*111.81	\pm	2.03
Testigo positivo Extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con etanol (3600 ppm)	*100	\pm	1.10	*127.65	\pm	2.32
Testigo negativo Extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> sin tratamiento	2	\pm	1.87	8.83	\pm	1.39

^a = Promedio de tres experimentos.

^b = En 300 células Interfásicas.

^c = Error estándar.

*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamientos, utilizando un análisis de varianza (ANOVA) donde $F = 57.42$ a $p < 0.0001$ y aplicando la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls el valor de $p < 0.001$

TABLA III. VIABILIDAD DE LINFOCITOS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON AMETRINA POR DOS HORAS, SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA *in vivo*^a

TRATAMIENTOS DIRECTOS CON AMETRINA A LOS LINFOCITOS INTERFÁSICOS	EXPERIMENTO I ^b	EXPERIMENTO II ^b	EXPERIMENTO III ^b	$\bar{X}^a \pm E.E^c$
Ppm	%	%	%	%
1	88	90	84	*87 ± 1.76
2	77	82	85	*81 ± 2.33
3	77	79	79	*78 ± 0.67
5	75	72	70	*72 ± 1.66
6	75	70	70	*72 ± 1.66
10	Muerte celular			
Testigo positivo Mitomicina C(MMC) 400 ng/ml	96	94	96	95 ± 0.66
Testigo negativo Linfocitos interfásicos en RPMI1640	98	90	94	94 ± 2.30

^a = Promedio de tres experimentos.

^b = En 100 células interfásicas consecutivas.

^c = Error estándar.

* Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamientos, utilizando un análisis de varianza (ANOVA) donde $F = 32.82$ a $p < 0.0001$ y aplicando la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls el valor de $p < 0.001$

TABLA IV. VIABILIDAD DE LINFOCITOS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON AMETRINA POR DOS HORAS, CON ACTIVACIÓN METABÓLICA *in vivo*^a

EXTRACTOS DE LAS RAÍCES DE <i>Vicia faba</i> TRATADAS CON AMETRINA	EXPERIMENTO I ^b	EXPERIMENTO II ^b	EXPERIMENTO III ^b	$\bar{X}^a \pm E.E^c$
PPM	%	%	%	%
50	80	78	82	*80 ± 1.15
100	70	81	82	*77 ± 3.84
200	75	72	78	*75 ± 1.73
500	73	70	79	*74 ± 2.64
1000	76	74	77	*76 ± 0.88
Testigo positivo Extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con etanol (3600 ppm)	96	96	97	96 ± 0.33
Testigo negativo Extractos de las raíces de <i>Vicia faba</i> tratadas con etanol (3600 ppm)	98	94	96	96 ± 1.15

^a = Promedio de tres experimentos

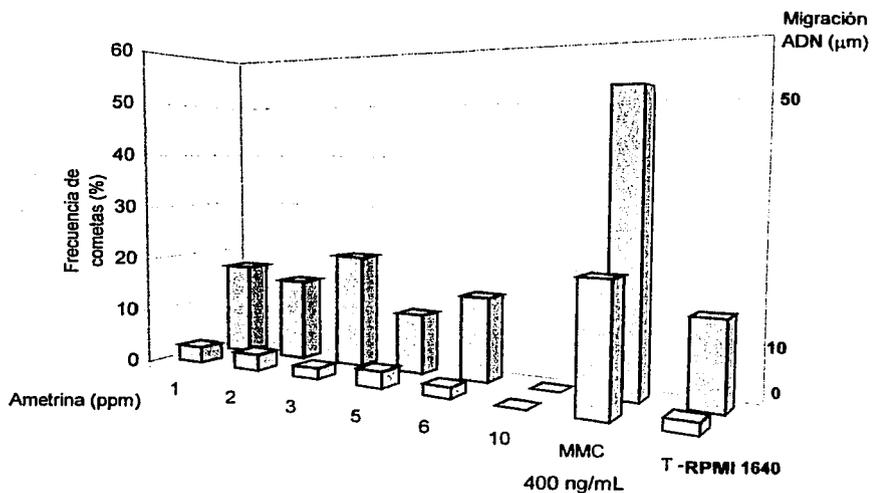
^b = En 100 células interfásicas consecutivas

^c = Error estándar

*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo de tratamientos, utilizando un análisis de varianza (ANOVA) donde $F = 23.77$ a $P < 0.0001$ y aplicando la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls el valor de $p < 0.001$

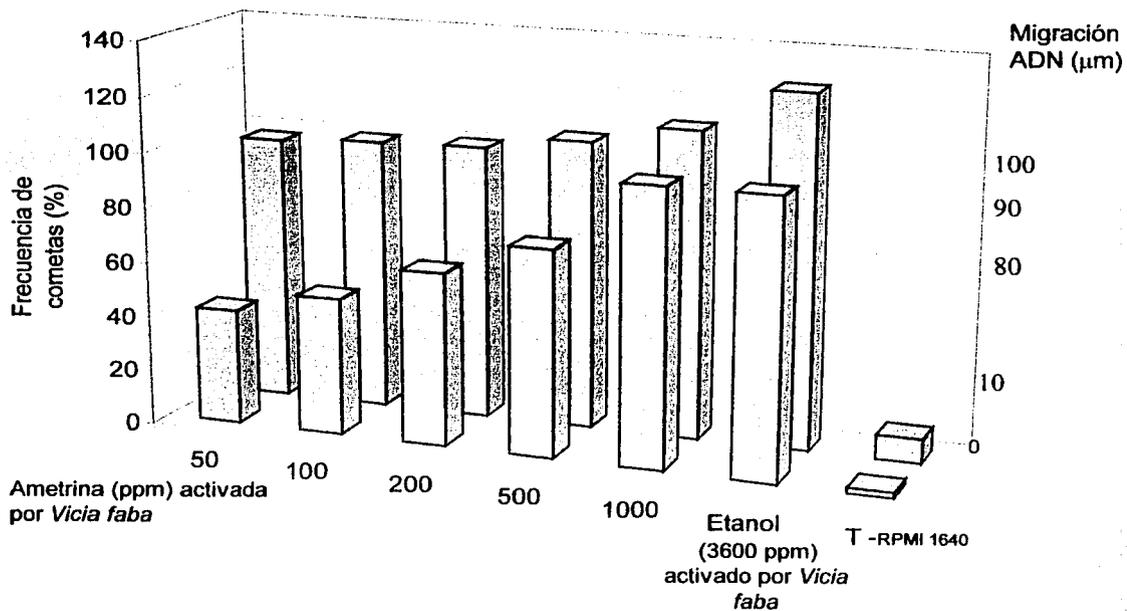
GRÁFICAS

GRÁFICA I. PROMEDIOS DE FRECUENCIA DE LINFOCITOS CON COMETAS Y MIGRACIÓN DEL ADN INDUCIDAS POR EL HERBICIDA AMETRINA, SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA POR *Vicia faba* in vivo.



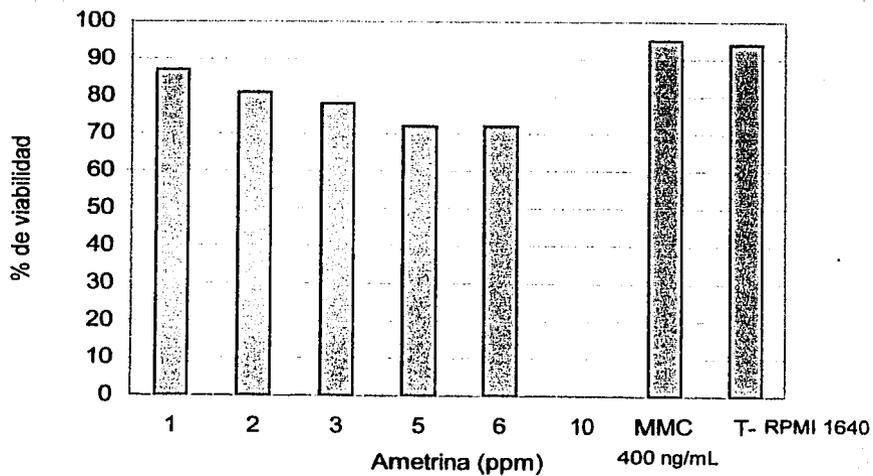
TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN

GRÁFICA II. PROMEDIOS DE FRECUENCIA DE LINFOCITOS CON COMETAS Y MIGRACIÓN DEL ADN INDUCIDAS POR EL HERBICIDA AMETRINA, CON ACTIVACIÓN METABÓLICA POR *Vicia faba* in vivo.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

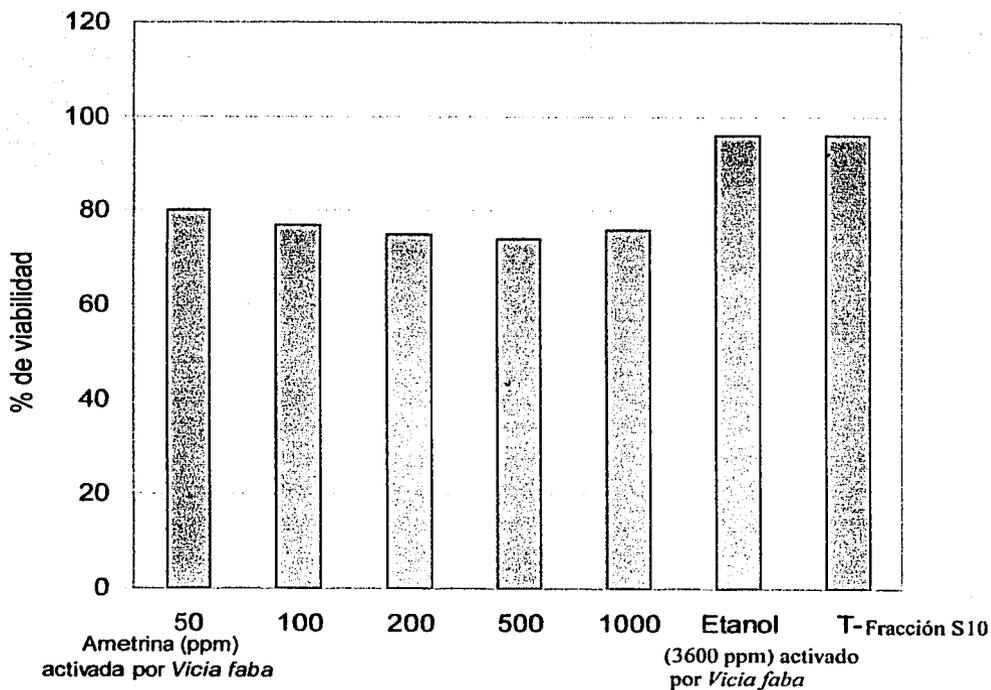
GRÁFICA III. PROMEDIOS DE VIABILIDAD DE LINFOCITOS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON AMETRINA POR DOS HORAS, SIN ACTIVACIÓN METABÓLICA *in vivo*



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

87

GRÁFICA IV. PROMEDIOS DE VIABILIDAD DE LINFOCITOS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON AMETRINA POR DOS HORAS, CON ACTIVACIÓN METABÓLICA *in vivo*



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN