



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LOS  
PLAGUICIDAS METAMIDOFOS, ENDOSULFAN, ZETA-  
CIPERMETRINA Y AZADIRACTINA EN CULTIVO DE  
LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO, CON Y SIN  
METABOLISMO ANIMAL

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 :  
CAROLINA GONZÁLEZ TORRES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

2005



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCIÓN ESCOLAR

m344496



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recensional.

NOMBRE: Carolina González Torres

FECHA: 26/05/05





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Evaluación del efecto genotóxico de los plaguicidas metamidofos, endosulfan, zeta-cipermetrina y azadiractina en cultivo de linfocitos humanos in vitro, con y sin metabolismo animal."

realizado por Carolina González Torres

con número de cuenta 9717304-1 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director  
Propietario

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Propietario

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Propietario

Dra. María Elena Calderón Segura

Suplente

Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro

Suplente

M. en C. Ana Rosa Flores Márquez

Consejo Departamental de **Biología**

FACULTAD DE CIENCIAS



M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. Sandra Gómez Arroyo por su aceptación, dirección e invaluable apoyo para la realización de este trabajo y por el cariño brindado.*

*Al Dr. Rafael Villalobos Pietrini por su valiosa revisión al trabajo de tesis.*

*A la Dra. María Elena Calderón Segura por haberme enseñado la parte técnica de los ensayos y por la revisión de este trabajo.*

*A la Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro por incentivar esta tesis y por sus sugerencias en la revisión del trabajo escrito.*

*A la M. en C. Ana Rosa Flores, por sus acertadas sugerencias y por la revisión de este trabajo.*

*A la Bióloga Selene Andrade por su asesoría y apoyo técnico.*

*Al laboratorio de Citogenética Ambiental.*

*Al Centro de Ciencias de la Atmósfera.*

*A mis maestros.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México.*

## DEDICATORIAS

*A mis padres Andrés González y María Elena Torres por darme la vida, el amor, apoyo, paciencia y ejemplo en todo momento, ya que sin ellos la realización de este sueño no sería posible. ¡Gracias!*

*A mis hermanos Julio Andrés, Jorge y Lalo por ser como son y por los momentos felices que me han brindado.*

*A mis abuelos Felipe y Rosa, así como mis tíos Yolanda y Enrique por permitirme ser parte de su familia.*

*A Alejandro Parrales por todo el cariño y amor que me ha dado, por su ayuda en la realización de este trabajo y por incentivar-me día con día.*

*A Emmanuel Ramírez por su invaluable amistad y cariño.*

*A mis compañeros del Laboratorio de Citogenética Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM: Rocio, Rodrigo, Alejandro F, Martha, Ana Vianey, César, Lilia, Isabel, Erika, Conny, Sofia e Ivonn.*

*A Selene y Toño por su amistad y apoyo.*

*A las señoras: Emma y Vicky del Centro de Ciencias de la Atmósfera de la UNAM.*

*Y a todos aquellos que incentivaron la realización de este trabajo.*

## RESUMEN

El empleo de plaguicidas ha contribuido al combate de diversas plagas que inhiben la producción de las cosechas, paradójicamente con estos beneficios, ha provocado graves problemas ambientales ya que son persistentes en el ambiente, lo que también implica riesgos para la salud humana.

En este trabajo se comparó el efecto provocado por los plaguicidas endosulfán (organoclorado), metamidofos (organofosforado), zeta-cipermetrina (piretroide) y azadiractina (triterpeno derivado del neem), aplicados de forma directa y posteriormente se agregó la mezcla S9 a los cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica mediante el ensayo de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), la cinética de proliferación celular (CPC) y los índices de replicación (IR) y mitótico (IM).

Se utilizaron como testigos positivos mitomicina C (MMC) para ensayos directos y ciclofosfamida (CP) para el ensayo con activación, que como se esperaba provocaron aumento significativo en la frecuencia de ICH.

Los cuatro plaguicidas evaluados en este estudio fueron aplicados a las mismas concentraciones de 90, 180, 360 y 450 mg/L, los resultados indicaron que no hubo diferencia significativa de la frecuencia de ICH provocada por los plaguicidas con respecto al testigo en presencia y en ausencia de la mezcla S9.

En los ensayos sin activación metabólica disminuyó significativamente el IR para los plaguicidas endosulfán (en la concentración de 450 mg/L), metamidofos, azadiractina (con 180 a 450 mg/L) y zeta-cipermetrina (con 90 a 180 mg/L, el incremento de estas concentraciones impidieron que se completaran las metafases). Con respecto al IM, endosulfán presentó disminución con 360 a 450 mg/L, azadiractina con 450 mg/L y zeta-cipermetrina de 360 a 450 mg/L. El IM con metamidofos no mostró ninguna alteración.

Estos resultados sugieren un retraso en la cinética de proliferación celular conforme aumenta la concentración de los plaguicidas, que a su vez se evidenció por el aumento en el número de metafases de primera división con respecto a las de segunda y terceras divisiones.

En lo que se refiere al ensayo aplicando la mezcla S9 junto con los plaguicidas, la CPC, el IR y el IM no fueron afectados, sugiriendo que los metabolitos derivados de la transformación de los plaguicidas en estas concentraciones no afectan a los linfocitos, lo que implica un efecto de desintoxicación por parte del sistema enzimático. Sin embargo, la concentración de 450 mg/L de zeta-cipermetrina aplicado en forma directa, manifestó alteración en la cinética de proliferación celular lo que no sucedió en presencia de la mezcla enzimática S9.

## ÍNDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>Páginas</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Organoclorados.....	4
1.1.1 Ciclodianos.....	5
1.1.2 Endosulfán.....	6
1.2 Organofosforados.....	7
1.2.1 Metamidofos.....	10
1.3 Piretroides.....	11
1.3.1 Zeta-cipermetrina.....	13
1.4 Plaguicidas de origen vegetal.....	14
1.4.1 Neem.....	14
1.4.2 Azadiractina.....	15
1.5 Metabolismo en mamíferos.....	17
1.6 Sistema de prueba.....	20
1.7 Intercambio de cromátidas hermanas.....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>26</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>43</b>
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>9. CUADROS</b> .....	<b>63</b>
<b>10. FIGURAS</b> .....	<b>68</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Históricamente el hombre ha luchado para mejorar sus condiciones de vida desarrollando intensamente agrosistemas que le permitan producir el alimento necesario para su subsistencia. Para ello ha tenido que combatir a las diversas plagas que atacan la producción de las cosechas, mediante el empleo de plaguicidas, insecticidas o herbicidas (Restrepo 1992).

En el mundo se emplean cantidades enormes de plaguicidas, en los últimos 20 años casi se triplica su producción y aplicación hasta sumar actualmente más de 4 millones de toneladas. Un total de 890 ingredientes activos están registrados como plaguicidas en Estados Unidos de América y conforman parte de aproximadamente 20, 700 productos de marcas registradas (Bolognesi 2003).

En México, como en todos los países la agricultura es crucial para la alimentación y el desarrollo socioeconómico, por ello con la modernización de los sistemas agrícolas se ha visto en la necesidad de incrementar el uso de plaguicidas.

La aplicación intensa de plaguicidas sintéticos en México comenzó en 1948, estando relacionada sobre todo con los cultivos de algodón y posteriormente con los sistemas de agricultura acelerada conocida como "Revolución verde" (Albert *et al.* 1985).

Datos de la Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes señalan que en 1995 el volumen de plaguicidas empleados ascendió a 54, 678.96 toneladas de las cuales 47% corresponden a insecticidas, 29% a herbicidas, 17% a funguicidas y 7% a otros compuestos relacionados. Los cultivos que utilizan un mayor volumen de estos productos son: maíz, caña de azúcar, algodón y frijol (SEMARNAP 1997).

## Exposición a plaguicidas

Además de los beneficios que han aportado los plaguicidas a la sociedad también han producido efectos negativos derivados de su uso inadecuado y excesivo. Los plaguicidas han tenido efectos en los ecosistemas debido a su persistencia en el ambiente, aumentando la mortalidad de la flora y la fauna, contaminando suelos, agua (continentales, mantos freáticos) y creando resistencia en los organismo-plaga (Bolognesi 2003).

Desde el punto de vista económico, México sufre rechazo de alimentos de exportación, porque no cumplen con los reglamentos del país importador en cuanto a su contenido de residuos de plaguicidas (Albert *et al.* 1985).

Se ha descubierto que los plaguicidas son un riesgo para la salud humana. Todas las personas están inevitablemente expuestas a estos agentes químicos a través de la contaminación ambiental, principalmente por residuos o durante la manufactura y la aplicación de los mismos (Bolognesi 2003). Entre los efectos potencialmente peligrosos que pueden provocar está el desarrollo de cáncer, por acción mutagénica y genotóxica (Klopman *et al.* 1985, Bolognesi 2003).

Es posible la acumulación de plaguicidas en diferentes tejidos de plantas y animales e incluso del hombre, lo que produce alteraciones en el funcionamiento de diversos sistemas como el cardiovascular y el reproductor (Cooper 1991, Julli y Krassoi 1995). Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que un largo tiempo de exposición a plaguicidas puede estar asociado con alteraciones gastrointestinales, neurológicas, así como degeneración de la retina (Cole *et al.* 1998, Kamel *et al.* 2000).

Los plaguicidas pueden provocar la muerte por intoxicación. La OMS (Organización Mundial de la Salud), señala que anualmente se intoxican 2 millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas.

Debido al potencial carcinogénico y/ o mutagénico de estos compuestos, a su prolongada persistencia en el ambiente y a la exposición a la que todos los seres vivos están sujetos, es que los plaguicidas han sido objeto de amplia investigación. El evaluar el daño que provocan estas sustancias es importante para obtener un mejor control de su uso (Sobti *et al.* 1982, Ashby *et al.* 1993).

## Definición y Clasificación de plaguicidas

Los plaguicidas son productos químicos tóxicos, diseñados para bloquear los distintos procesos fisiológicos en los organismos plaga.

Los usos y aplicaciones de éstos en zonas rurales consisten en proteger los cultivos, así como al ganado combatiendo a ectoparásitos. Asimismo, son empleados en programas de salud pública, previniendo y controlando vectores que transmiten enfermedades humanas como el paludismo. En zonas urbanas se emplean en actividades como la jardinería (Restrepo 1992, Andrade-Morales 2001).

Los plaguicidas pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de fitopatógeno que controlan, su modo de acción, su concentración, origen y composición química, persistencia y uso al que se destina (COP 1998).

La AMIPFAC (Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes 1985) los clasifica basándose en su estructura química conformando grupos toxicológicos (Cuadro I).

**Cuadro I.** Clasificación de plaguicidas (AMIPFAC 1985).

<b>Grupos toxicológicos</b>	<b>Características (estructura química)</b>
Organoclorados	Contienen enlaces entre átomos de carbono y cloro
Organofosforados	Moléculas orgánicas que contienen fósforo
Carbamatos	Derivados del ácido carbámico
Piretroides	Se derivan del piretro, sustancia extraída de las cabezas florales del crisantemo

## 1.1 Organoclorados

Los compuestos organoclorados (OC) ó hidrocarburos clorados, han sido ampliamente usados a escala internacional desde el descubrimiento de sus propiedades insecticidas, demostrándose muy eficaces y económicos en cuanto a su producción.

El hexaclorociclohexano descubierto en Francia e Inglaterra en 1940, fue uno de los primeros insecticidas exitosos, seguidos del lindano y del DDT.

Muchos de los productos comerciales, especialmente los que pertenecen al grupo de los ciclodianos como aldrin, dieldrin y heptacloro se desarrollaron durante 1950 (Krieger 2001, Kamrin 1997).

Desde 1960 a la fecha, su uso ha sido restringido debido a sus propiedades químicas. Estos compuestos son estables, demasiado persistentes y tienden a acumularse en el tejido adiposo en donde pueden alcanzar concentraciones muy elevadas (Kaufer 1984, Teschke *et al.* 1993).

Hoy en día el uso principal de los organoclorados es en salud pública, para la erradicación de enfermedades parasitarias como la malaria (Kaloyanova y El Batawi 1991, Ambrosini y Witt 2000). Sin embargo, aún son utilizados para la protección de gran variedad de cultivos alimenticios, así como de plantas ornamentales.

### Estructura química y clasificación

Los compuestos organoclorados (O-C), se caracterizan por tener uno o más átomos de cloro colocados alrededor de uno o más anillos de hidrocarburos (Kamrin 1997). Pueden ser divididos de acuerdo con su estructura química en los siguientes grupos (Hayes 1991, Kaloyanova y El Batawi 1991):

- 1) Derivados de clorobenceno (DDT)
- 2) Derivados de ciclohexano (HCH, Lindano)
- 3) Ciclodianos (aldrin, dieldrin, endosulfán, entre otros)
- 4) Canfenos clorados (clordeconam, toxcifén, etc.)

## **Modo de acción**

Los organoclorados actúan contra los insectos principalmente por contacto e ingestión (Ferrer 2003).

El sistema nervioso central es uno de los órganos blanco de estos compuestos o de sus metabolitos. Actúan cambiando las propiedades electrofisiológicas y enzimáticas de las membranas de la célula nerviosa, principalmente a nivel axonal (Narahashi *et al.* 1992). Más específicamente los miembros de este grupo producen alteración en la cinética del flujo de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana neuronal.

Como resultado de ésta alteración se produce la propagación de potenciales de acción múltiples para cada estímulo (Tordoir y Van Sittert 1994, Kamrin 1997, Ferrer 2003), causando entre otros síntomas convulsiones. En intoxicaciones agudas la muerte puede resultar por paro respiratorio (Tordoir y Van Sittert 1994).

### **1.1.1 Ciclodianos**

Los compuestos ciclodianos, así como muchos otros insecticidas organoclorados, actúan como neurotóxicos. El modo de acción primario es el bloqueo del complejo receptor canal de GABA (ácido  $\gamma$  - aminobutírico).

Normalmente el neurotransmisor GABA se une al receptor canal de GABA, este complejo se abre y permite el paso de corrientes de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) al interior de la célula, lo cual modula de forma negativa la formación de nuevos potenciales de acción, polarizando la membrana nerviosa. Por tanto el bloqueo de este complejo puede conducir a una hiperexcitación neuronal (Narahashi *et al.* 1992, Tordoir y Van Sittert 1994, Perry *et al.* 1998).

Los ciclodianos causan una excesiva liberación del neurotransmisor acetilcolina (Ach) en la hendidura sináptica pero no por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AchE). No afectan ningún otro sistema enzimático sin embargo, existe evidencia de su interacción con la ATPasa del cordón nervioso y músculo (Perry *et al.* 1998).

## Efectos de organoclorados

Algunos estudios describen que en ratones dosis altas de ciclodianos (aldrin, dieldrin y endrin) inducen carcinoma hepatocelular (Tordoir y Van Sittert 1994).

Investigaciones epidemiológicas han sugerido, una asociación de anomalías reproductivas en poblaciones humanas expuestas a concentraciones elevadas de compuestos organoclorados o sus metabolitos, debido a su potencial como "alteradores endócrinos" (Colborn *et al.* 1993, Rivero *et al.* 2001). Tales anomalías en humanos incluyen reducción en la calidad de semen (disminución del número de espermatozoides) e incremento del riesgo de desarrollo de cáncer testicular (Toft *et al.* 2004).

### 1.1.2 Endosulfán

El endosulfán es un compuesto organoclorado (6, 7, 8, 9, 10, 10-hexacloro-1, 5, 5, 6, 9, 9<sup>a</sup>-hexahidro-6, 9-metano-2, 4, 3-benzodioxatrepin-3-oxido) que pertenece al grupo ciclodiano, conocido comercialmente como tiodán. Fue introducido por la compañía HOECHST Ag. (AgrEvo) y registrado en 1956. En su forma comercial, generalmente está compuesto de dos isómeros  $\alpha$ -endosulfán (80%) y  $\beta$ -endosulfán (20%). Es considerado por la EPA (2001) como un insecticida de empleo restringido.

El endosulfán es de amplio campo de acción insecticida, actúa incluso sobre algunos ácaros. Se utiliza en gran cantidad de cultivos incluyendo viñedos, lechuga, tomate, alfalfa, maíz, arroz, sorgo, algodón y se aplica sobre madera para su preservación (Ware 1978, De Liñán 1997, Kamrin 1997, Lu *et al.* 2000, Krieger 2001).

Este plaguicida produce alteraciones en espermatogonias y anomalías morfológicas en espermatozoides en estudios *in vivo*, además de una reducción en la cantidad de espermatozoides, estas anomalías son asociadas con reducción en la fertilidad en humanos y animales (Topham 1983, Pandey *et al.* 1990, Sinha *et al.* 2001). En aves, impide el desarrollo del tracto genital (EPA 2001).

El endosulfán es mutagénico en células germinales de *Drosophila melanogaster* (Velazquez *et al.* 1984). Induce incremento de micronúcleos en células de médula ósea de ratón (Usha *et al.* 1980), en cultivo de linfocitos de oveja (Pistl *et al.* 2001), así como en la línea celular HepG2, hepatocitos humanos *in vitro* (Lu *et al.* 2000). En ratones albinos ha demostrado su potencial como “alterador endocrino” (Hiremath y Kaliwal 2002).

Mostró efectos clastogénicos en meristemas de la raíz de *Allium cepa* (Rao *et al.* 1988) y puede retrasar la madurez sexual e interferir con la síntesis de hormonas sexuales (Saiyded *et al.* 2003)

## 1.2 Organofosforados

Los primeros compuestos organofosforados (OF) fueron sintetizados en 1854, pero su marcada toxicidad no fue reconocida sino hasta 1930. Es durante este periodo que fueron desarrollados algunos compuestos organofosforados, tales como tabun y sarín, denominados gases nerviosos, usados durante la guerra, debido a su toxicidad elevada.

La acción insecticida de los compuestos organofosforados fue descubierta en 1937 en Alemania por Gerhard Schröder, que condujo a la síntesis de los primeros insecticidas organofosforados comerciales, como el tepp en 1937 y el paratión en 1944, entre otros (Perry *et al.* 1998, Krieger 2001).

Desde 1942 se han sintetizado más de 50, 000 productos de este tipo (Karalliedde *et al.* 2001).

### Estructura química

La gran familia de insecticidas que constituyen los organofosforados se caracterizan por ser ésteres derivados del ácido fosfórico, que pueden tener un grupo fosforil (P=O) ó tiofosforil (P=S) (Perry *et al.* 1998), como se muestra en la figura 1.

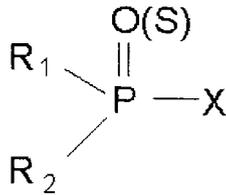


Figura 1. Estructura química de los organofosforados (Sogorb y Vilanova 2002).

R1 y R2 son grupos arilo o alquilo. X puede pertenecer a un amplio rango de grupos halógeno, alifático, aromático o heterocíclico. El grupo X también es llamado “grupo saliente” debido a que este átomo es desplazado del compuesto organofosforado, cuando es hidrolizado o al interactuar con la enzima acetilcolinesterasa (AChE), su proteína blanco (Sogorb y Vilanova 2002).

### Modo de acción

Actúan contra los insectos o ácaros por contacto e ingestión, otros son sistémicos o de acción fumigante (Benhumea-Partida 2001).

En los vertebrados, sus efectos tóxicos están relacionados con la capacidad del compuesto o de sus metabolitos para inhibir a la acetilcolinesterasa (AChE), enzima esencial que modula la cantidad o los niveles del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en la sinapsis y en las uniones neuromusculares (O’Brien 1969, Wooder y Wright 1981, Perry *et al.* 1998, Sogorb y Vilanova 2002). Al inhibir a la acetilcolinesterasa (AChE), se interrumpe el impulso en los sistemas nervioso central y periférico ocasionando alteraciones en los músculos y fallas respiratorias (Sultatos 1994, Perry *et al.* 1998).

El mecanismo de bloqueo de la AChE es producido por fosforilación del grupo hidroxilo serina en el sitio activo de la enzima por el compuesto organofosforado (Fest y Schmidt 1973).

Los organofosforados que tienen un grupo tiofosforil ( $P=S$ ), son débiles inhibidores de la acetilcolinesterasa, sin embargo al ser activados metabólicamente a sus análogos oxígeno correspondientes (oxón), se convierten en potentes inhibidores de la acetilcolinesterasa (Sultatos 1994).

### **Interacción de los organofosforados con el ADN**

Los organofosforados son agentes alquilantes débiles. Los que poseen un grupo  $P=O$  tienen mayor actividad alquilante a diferencia de los que incluyen un grupo  $P=S$  (Fest y Schmidt 1973).

La propiedad alquilante de este tipo de compuestos proviene de sitios electrofílicos ( $CH_3$  ó  $C_2H_5$ ), que pueden interactuar con átomos de oxígeno y nitrógeno de las bases nitrogenadas (adenina, guanina y citosina) del ADN y con los grupos fosfato, este es uno de los mecanismos más comunes que conllevan a la mutación (Wild 1975).

### **Efectos de organofosforados**

Estos compuestos han mostrado afectar el desarrollo celular por alteración de actividad y de reactividad de la adenilato ciclasa que forma parte de la cascada de señalización celular (Song *et al.* 1997).

Inducen incremento en anomalías morfológicas en espermatozoides (Wyrobek y Bruce 1975, Behera y Bhunya *et al.* 1989, Mathew *et al.* 1992, Jayashree *et al.* 1994), además de afectar otras características espermáticas, incluyendo la calidad de semen en humanos (Padungton *et al.* 1999). Las alteraciones espermáticas son importantes, ya que son usadas como indicadores de alteración genética seguidas de exposición paterna (Wyrobek *et al.* 1983). Los compuestos organofosforados han provocado daño genético, manifestando incremento de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en células de la médula ósea de ratón (Jayashree *et al.* 1994) y aneuploidias en espermatozoides humanos (Padungtod *et al.* 1999). Asimismo, la cromatina de espermatozoides es un blanco sensible a la exposición de organofosforados (Sánchez *et al.* 2004).

### 1.2.1 Metamidofos

El metamidofos es un compuesto organofosforado (O,S-dimetil fosforoamidotiolato) conocido comercialmente con el nombre de monitor o tamarón. Es un compuesto de amplio espectro de actividad insecticida y acaricida (Amer y Sayed 1986).

Fue introducido por la compañía química Chevron y Bayer (TomLin 1994) y sus propiedades insecticidas fueron descubiertas por Hamman (1970). Es considerado un insecticida restringido por la CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas) en México (1996). Tiene uso extenso en cultivos de maíz, tomate, arroz, papa, soya, lechuga, caña de azúcar, árboles frutales, algodón y tabaco, principalmente (WHO 1993, Prieto *et al.* 2002).

Este compuesto es inhibidor de la acetilcolinesterasa, y esta involucrado en la inducción del síndrome de polineuropatía retardada inducida por organofosforados en animales experimentales (Khasawinah *et al.* 1979, WHO 1993). La actividad anti-colinesterasa de metamidofos induce un decremento de esta enzima en plasma de ratón (Zayed *et al.* 1984). La exposición a metamidofos ha sido correlacionada con el incremento en el porcentaje de micronúcleos en células hematopoyéticas de ratón *in vivo* e *in vitro*, así como en eritrocitos policromáticos de médula ósea ratón *in vivo* (Amer y Sayed 1986). Este insecticida induce un alto porcentaje de metafases con aberraciones cromosómicas en cultivo de células de bazo de ratón (Amer y Sayed 1986) y tiene el potencial para producir efectos embrionarios adversos transmisibles, si la exposición paterna es aguda (Burrueal *et al.* 2000).

### 1.3 Piretroides

Los plaguicidas denominados piretroides tienen su origen en los insecticidas naturales derivados del extracto de piretro (obtenido de las flores de especies de crisantemo), conocidos como piretrinas.

La investigación para determinar la estructura química de las piretrinas comenzó en 1920 y concluyó a principios de 1970. Durante y posterior a esta investigación se emprendieron trabajos enfocados a la síntesis de análogos químicos de las piretrinas, con el fin de modificar dichos compuestos para mejorar sus propiedades químicas.

En 1940, fue introducido el primer insecticida comercial de gran éxito, llamado alletrin. En 1960 se sintetizan nuevos compuestos como la dimetrina, y en 1973 se comercializó el insecticida permetrina. Posteriormente, compuestos similares han sido producidos bajo el nombre general de piretroides (Kaloyanova y El Batawi 1991, Perry *et al.* 1998, Krieger 2000, Soderlund *et al.* 2002) existiendo actualmente más de 1,000 productos comercializados (Sogorb y Vilanova 2002).

Debido a su amplia actividad insecticida, incluso contra muchas plagas resistentes a compuestos organoclorados y organofosforados, y a sus bajos costos de elaboración, los piretroides constituyen una de las clases de plaguicidas de mayor uso, ocupando 30% de las marcas comerciales a nivel mundial (Kaloyanova y El Batawi 1991, Perry *et al.* 1998).

#### Estructura química y clasificación

Los piretroides sintéticos, están integrados por gran número de compuestos que se caracterizan por ser ésteres (Fig. 2).

La parte que conforma el ácido usualmente contiene un anillo dimetilciclopropano (carente de algunas estructuras), con un radical (R1) variable que puede corresponder a un ácido crisantémico o pirétrico, R2 pueden ser anillos aromáticos y en algunas ocasiones corresponde a un grupo ciano (Kaloyanova y El Batawi 1991, Sogorb y Vilanova 2002).

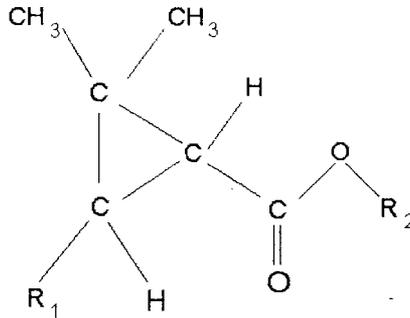


Figura 2. Estructura química general de los piretroides  
(Sogorb y Vilanova 2002)

Los piretroides generalmente son clasificados en dos tipos (He 1994, Perry *et al.* 1998):

- I: son aquellos que carecen de un grupo  $\alpha$ -ciano en su estructura química.
- II: contienen un grupo  $\alpha$ -ciano.

### Modo de acción

Los piretroides actúan contra insectos por contacto e ingestión (Perry *et al.* 1998, Ferrer 2003)

El sitio primario de acción de los piretroides es el sistema nervioso y tienen la capacidad de afectar a todas las clases neuronales (Perry *et al.* 1998).

El efecto tóxico fundamental de todos los piretroides, se debe a que provocan una modificación en la dinámica de los canales de  $\text{Na}^+$  de la membrana nerviosa, en insectos y vertebrados (He 1994, Perry *et al.* 1998).

Los canales de  $\text{Na}^+$  son responsables de la generación de potenciales de acción, normalmente se mantienen abiertos durante la despolarización de la membrana por algunos milisegundos.

Los piretroides interactúan directamente con los canales de  $\text{Na}^+$ , provocando que éstos incrementen su tiempo de apertura, prolongando la corriente de sodio a través de la membrana nerviosa (Narahashi *et al.* 1992, He 1994, Narahashi 1996). Esta interferencia en los canales de sodio genera

potenciales de acción repetidos que pueden conducir a hiperexcitación neuronal. Un efecto más agudo genera una despolarización completa de la membrana nerviosa, lo que puede alterar la transmisión sináptica e interrumpir los impulsos nerviosos resultando en parálisis y consecuentemente la muerte (Narahashi 1992, He 1994, Perry *et al.* 1998).

### **Efectos de piretroides**

Han sido generadas anormalidades cromosómicas y mitóticas después de la exposición a insecticidas piretroides en células de médula ósea de ratón (Chatterjee *et al.* 1982, Amer y Aboul-Ela 1985, Bhunya y Pati 1988, Pati y Bhunya 1989, Bhunya y Pati 1990, Agarwal *et al.* 1994), así como en células CHO (Caballo *et al.* 1992, Barrueco *et al.* 1994). En células germinales masculinas de *Drosophila melanogaster* provocan pérdida del cromosoma sexual y mutaciones letales recesivas ligadas al sexo. Las células meristemáticas de *Allium cepa* también son afectadas por la exposición a piretroides (Batiste *et al.* 1986, Chauhan *et al.* 1986).

Diversas investigaciones han determinado que los piretroides pueden inducir defectos genotóxicos y anormalidades morfológicas en espermatozoides humanos. Asimismo, se ha observado incremento en la frecuencia de aneuploidías espermáticas (Xia *et al.* 2004)

Por el contrario, las pruebas de actividad mutagénica de piretroides en *Salmonella typhimurium* fueron negativas (Herrera y Laborda 1988).

#### **1.3.1 Zeta-cipermetrina**

Zeta-cipermetrina es un piretroide sintético (S-ciano-(3-fenoxifenil) metil ± cis-trans-3-(2,2-dicloroetinizil)-2, 2-dimetilciclopropano carboxilato). Este compuesto es un isómero del piretroide cipermetrina (Soderlund *et al.* 2002).

Este insecticida se usa principalmente en cultivos de col, lechuga, maíz, papa, soya, tomate, café, árboles frutales, algodón y plantas ornamentales (De Liñán 1997). Es uno de los compuestos que se utiliza en campañas de salud pública, aunque los estudios de genotoxicidad de este plaguicida son limitados.

Zeta-cipermetrina indujo una débil pero positiva respuesta mutagénica mediante el ensayo de Ames con *Salmonella typhimurium* (EPA 1997).

#### 1.4 Plaguicidas de origen vegetal

Entre 1950 y 1960, los plaguicidas de origen vegetal fueron desplazados por compuestos sintéticos, los cuales mostraron mayor eficiencia en el control de plagas y tener bajos costos de producción (Hall y Menn 1999). Sin embargo, debido a los efectos adversos de los insecticidas sintéticos en el ambiente y el riesgo que representan para la población humana, la necesidad de alternativas seguras para el control de plagas en la agricultura es una de las preocupaciones primordiales.

Es por ello que se ha retomado el interés en el desarrollo y uso de productos de origen vegetal, considerados de menor riesgo, para el manejo de plagas, además de que constituyen una gran fuente de nuevas estructuras.

##### 1.4.1 Neem

El árbol del neem (*Azadiracta indica*) originario de la India subcontinental y sudeste asiático, miembro de la familia Meliaceae, cuyo nombre común es árbol de margosa (Schmutterer 1990, Biswas *et al.* 2002, Brahmachari 2004), forma parte importante de las plantas con alto potencial para el desarrollo de nuevos insecticidas.

Algunos extractos y partes del árbol del neem han sido usados por siglos en la India para el control de plagas de insectos y enfermedades, al igual que con fines terapéuticos (Rechcigl 1999). La actividad puede variar dependiendo de la fuente.

Los extractos crudos tienen una gran variedad de compuestos, los cuales exponiéndose a la luz se degradan rápidamente perdiendo su actividad. Desde 1942, más de 140 compuestos han sido aislados de diferentes partes (corteza, hojas, ramas, flores, frutos, semillas, aceite) del árbol del neem (Isman *et al.* 1990, Biswas *et al.* 2002).

## Uso del neem como plaguicida

Las sustancias con propiedades insecticidas pueden ser encontradas en cualquier parte del árbol del neem, aunque su mayor concentración está localizada en las semillas. Por lo que el aceite, derivado de los extractos de las semillas, ha sido preferentemente utilizado para la elaboración de plaguicidas (Jacobson 1995, Brahmachari 2004). Azadiractina es el compuesto de mayor actividad insecticida presente en los extractos del neem (Schmutterer 1990, Singh *et al.* 1993, Perry *et al.* 1998). Generalmente la actividad biológica de los aceites del neem esta altamente correlacionada con su contenido de azadiractina (Warthen *et al.* 1984).

Aunque los extractos del neem, usualmente tienen otros compuestos que pueden influenciar la actividad de azadiractina, los plaguicidas comerciales, sólo especifican el contenido de este compuesto (Krieger 2001).

Diversos productos relacionados con el neem han sido patentados desde 1970, principalmente en Estados Unidos de América y Europa. Aza A, fue el primer plaguicida comercial basado en azadiractina aprobado por la EPA en EUA en 1985, cuyo uso no incluía cultivos alimenticios.

En 1994, la compañía estadounidense W.R. Grace, introdujo el primer plaguicida con azadiractina para cultivos de plantas alimenticias, denominado neemix. En 1996, la misma compañía lanzó un nuevo plaguicida comercial basado en azadiractinal, el trilogy 90 EC (Kocken y Roozental 1997, Hall y Menn 1999).

### 1.4.2 Azadiractina

La azadiractina ( $C_{35}H_{44}O_{16}$ ), es un tetranortriterpeno del tipo limonoide, parecido a un esteroide (Bellés 1988, Schmutterer 1990, Singh 1993). Su estructura fue elucidada completamente en 1987 (Krieger 2001).

### Modo de acción

La azadiractina altera el crecimiento e induce cambios dramáticos en el desarrollo y en la reproducción de insectos (Schmutterer 1990) y bloquea la acción de la ecdisona, principal hormona que regula su muda. La alteración en el

proceso de muda no permite que las larvas y ninfas se desarrollen en adultos y este efecto puede conducir a la muerte de los insectos (Marco 1990, Perry *et al.* 1998, Ruberson 1999, Brahmachari 2004).

En insectos adultos, reduce o inhibe completamente la fecundidad, altera su comportamiento principalmente en la alimentación e interfiere con la oviposición (Ascher 1993, Ishaaya 1998, Perry *et al.* 1998, Ruberson 1999).

### **Efectos de azadiractina**

Se ha reportado que el extracto de hojas de neem, administrado a ratones albinos provocó disminución en el número de espermatozoides y decremento de su motilidad (Aladakatti *et al.* 2001). Asimismo, se ha observado que espermatozoides humanos expuestos a concentraciones elevadas de este extracto reducen su motilidad (Khillare y Shrivastav 2003).

En ensayos *in vivo* con ratones albino suizos el extracto de la hoja de neem causó anomalías espermáticas (Khan y Awasthy 2003). Así como incremento en el número de aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratón (Awasthy *et al.* 1995, 1999, Khan y Awasthy 2003).

El extracto de flores del árbol de neem es mutagénico en *Salmonella typhimurium* (Rojanapo y Tepsuwam 1992). Mientras que el extracto de aceite de semillas de *Azadiractina indica*, no mostró actividad mutagénica en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium* (Jongen y Koeman 1983).

### 1.5 Metabolismo de mamíferos

Los plaguicidas debido a su capacidad para destruir las plagas se han convertido en una poderosa herramienta para el control de las mismas en la agricultura y para vectores de enfermedades humanas (Ortega *et al.* 1994).

Millones de toneladas de plaguicidas son usadas anualmente, sin embargo, se estima que menos del 5% de estos productos atacan a sus organismos blanco. El resto puede afectar a diferentes organismos o depositarse en el suministro alimenticio, contaminar el suelo y trasladarse a la atmósfera (Pimental y Levitan 1986, Al-Saleh 1994, Van Eerd *et al.* 2003).

Para plantas y animales incluyendo al hombre, los plaguicidas representan una de las principales fuentes de exposición a agentes químicos tóxicos (Sierra *et al.* 1998).

Las plantas y los animales absorben los productos químicos, incluyendo los plaguicidas, sin embargo, estos compuestos pueden ser transformados por el metabolismo animal o vegetal, y con ello disminuir su toxicidad (Menn 1978, Sandermann 1982, González 1998). No obstante, en muchos casos los metabolitos derivados de esta transformación pueden ser más tóxicos que los compuestos originales. Tales xenobióticos son designados como promutágenos (Lu 1992, González 1998).

Los mutágenos ambientales son agentes físicos o químicos liberados al ambiente que pueden alterar el genoma. Los promutágenos son agentes químicos que no son mutágenos por si mismos, pero pueden ser transformados mediante el metabolismo para aportar productos mutagénicos (Plewa y Gentile 1982, Gichner *et al.* 2001).

Tanto animales como plantas pueden activar promutágenos a mutágenos (Plewa y Gentile 1982). El metabolismo de xenobióticos realizado por las plantas es diferente al que se lleva a cabo en animales (Sandermann 1982). Por tanto es de interés conocer el destino metabólico de estos xenobióticos tanto en plantas como en animales, ya que esto puede determinar su potencial tóxico.

## **Biotransformación en mamíferos**

La biotransformación es el proceso mediante el cual los xenobióticos que generalmente son compuestos lipófilos son convertidos en sustancias polares o hidrófilas, lo cual hace posible su eliminación por excreción en mamíferos.

Aunque la biotransformación es usualmente asociada a un proceso de desintoxicación no siempre es así (Timbrell 1991, Rivero *et al.* 2001).

El metabolismo de los xenobióticos depende de la estructura de los compuestos, de sus propiedades físico-químicas y de su disponibilidad, así como de las enzimas involucradas y presentes en el tejido expuesto (Timbrell 1991, Sterling 1994).

El hígado es el principal sitio del metabolismo de xenobióticos en mamíferos, pero existen otros órganos y tejidos como el intestino, pulmón, riñón y piel que también están involucrados. El hígado contiene la mayor cantidad de las enzimas que participan en la biotransformación, las cuales se ubican principalmente en las células hepáticas. Tienen localización subcelular particular, muchas son encontradas en el retículo endoplásmico, como las dependientes del citocromo P-450, otras son localizadas en el citosol, principalmente las transferasas involucradas en el proceso de conjugación (Coughtrie *et al.* 1998) y en menor cantidad en otros organelos como las mitocondrias.

El metabolismo de plaguicidas involucra las siguientes vías, llamadas reacciones de fase I y de fase II. Las primeras, llevan a cabo oxidaciones, reducciones e hidrólisis, agregando o exponiendo grupos funcionales (-OH, -SH, -NH, -COOH), constituyendo el sustrato para las reacciones de fase II. Las segundas, son conocidas como reacciones de conjugación que involucran la adición de compuestos endógenos, los cuales son generalmente polares a xenobióticos o a sus metabolitos. Las enzimas que catalizan estas reacciones de conjugación son principalmente glutatión S-transferasas (GSTs) y UDP-glucuronosiltransferasa (uridina difosfato glucuronosiltransferasa).

Las reacciones de conjugación, originan productos muy solubles en agua que son reabsorbidos en el tracto intestinal y finalmente son excretados por el

cuerpo (Timbrell 1991, 1995, Lu 1992, González y Gelboin 1993, Van Eerd *et al.* 2003).

Se considera que la oxidación dependiente de citocromo P-450 es normalmente una ruta de activación y la de conjugación es una ruta de desintoxicación (Snell y Mullock 1987).

Los citocromos P-450 son un grupo de hemoproteínas (Williams 1992) que reciben su nombre debido al hecho de que cuando el citocromo P-450 reducido se une al monóxido de carbono, hay absorción máxima de luz a 450 nm (Stumpf y Conn 1980). Estos citocromos P450 son parte de un sistema enzimático integrado por oxidasas de función mixta. Este sistema está involucrado principalmente en el metabolismo oxidante de xenobióticos tanto en animales como en plantas (Stumpf y Conn 1980), su función principal es convertir compuestos químicos a derivados que puedan ser fácilmente eliminados seguido por reacciones de conjugación. Sin embargo, para algunos compuestos se ha reportado que pueden formar intermediarios reactivos, que pueden ser electrófilos, radicales o especies activas de oxígeno, que interactúan directamente con el ADN (Sandermann 1988, Plewa y Wagner 1993).

Los citocromos P-450 que se encuentran en mamíferos, conforman una gran superfamilia de enzimas (Nelson *et al.* 1996) que incluye cuatro familias CYP1, CYP2, CYP3 y CYP4 que están involucradas en el metabolismo de xenobióticos (Nebert *et al.* 1996). Se ha reportado que la familia CYP1, que incluye CYP 1A1, 1B1, 2E1 y 3A4, es capaz de activar carcinógenos en algunos mamíferos (Buratti *et al.* 2002, Oesch-Bartlomowicz y Oesch 2004).

Los citocromos P-450, no son los únicos involucrados en el proceso de biotransformación, una gran variedad de enzimas puede estar involucradas en la activación metabólica de xenobióticos (Oesch-Bartlomowicz y Oesch 2004).

## 1.6 Sistema de prueba

Existen diversos métodos que permiten evaluar el daño citogenético provocado por agentes químicos en células sanguíneas, como lo es el análisis de aberraciones cromosómicas (AC), la presencia de micronúcleos (MN), la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y el ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina (Carrano y Natarajan 1988).

### Cultivo de linfocitos humanos

El sistema de linfocitos de sangre periférica es un indicador extremadamente sensible tanto *in vitro* como *in vivo* para el análisis citogenético del efecto de diversos agentes químicos.

El sistema de linfocitos tiene diversas ventajas, entre ellas es posible obtener gran cantidad de células, ya que 1 mL puede contener de 1 a 3 millones de linfocitos. Estas células permanecen generalmente en estado G0/G1 en circulación periférica y normalmente no se dividen *in vivo*, así que la inducción de lesiones causadas por algún agente químico permite la formación de ICH ó de AC que pueden permanecer en estas células por días o meses. Es fácil estimularlos para crecer en cultivo en presencia de fitohemaglutinina (lectina que estimula la división celular). En dichas células las primeras mitosis aparecen a las 36 horas de haber iniciado el cultivo y a las 48 horas ya hay metafases (Sandberg 1982).

## 1.7 Intercambios de cromátidas hermanas (ICH)

Una prueba citogenética adecuada para determinar el daño provocado por los agentes químicos al ADN, es el intercambio de cromátidas hermanas (ICH), Tiene ventajas sobre otras técnicas citogenéticas, ya que ha sido descrita como una prueba rápida y sensible para determinar mutágenos químicos. Permite detectar el efecto de compuestos a concentraciones hasta diez veces menores que las requeridas para inducir AC. Mediante esta prueba se pueden realizar ensayos *in vivo* e *in vitro* para evidenciar tanto mutágenos como promutágenos;

esta técnica se puede utilizar en poblaciones humanas y existen pocos falsos positivos. Es posible emplear diversos organismos incluyendo plantas y animales, que pueden ser usados como monitores ambientales de agentes genotóxicos (Perry y Evans 1975, Latt *et al.* 1981, Gómez-Arroyo *et al.* 1987, López-Cruz 1997).

Es importante mencionar que no se conoce el significado biológico de los ICH, pero el hecho de que se hayan observado en las células de todos los organismos estudiados, sugiere que son un fenómeno común y fundamental en las células. Por otro lado, es posible que el ICH sea la consecuencia de un proceso que permite a las células dividirse, aún en presencia de lesiones en su ADN, de ser así puede existir alguna correlación entre la formación de ICH y la mutación, dado que las lesiones persisten aumentando la probabilidad de mutaciones en el ADN (Flores-Maya 2000).

Los ICH son cambios recíprocos de doble cadena de ADN entre las cromátidas. Se ha indicado que la frecuencia normal es de 6 a 12 ICH por célula (Carrano y More 1982).

Desde el punto de vista molecular, el ICH es un fenómeno que implica transposiciones simétricas de ADN de doble cadena equivalentes entre las dos cromátidas de un mismo cromosoma. Algunos estudios han evidenciado que el proceso de ICH requiere que la célula pase por la etapa de síntesis (S) del ADN (Wolff 1974). Resultados experimentales apoyan el hecho de que es durante la fase S el momento en el que se lleva a cabo el ICH, parece haber diversas causas que desencadenan el proceso, es decir, que el ICH puede ser inducido por circunstancias múltiples como daño al ADN (Abe y Sasaki 1977, Nakanishi y Schneider 1979), inhibición de la síntesis de ADN (Rainaldi y Mariani 1982), supresión de las enzimas involucradas en dicho proceso, inhibición de enzimas relacionadas con la reparación o por un agente promotor de cáncer no implicado en la producción de lesiones sobre el ADN (Morgan y Cleaver 1982, Kinsella y Radman 1978, Calderón-Segura 1993).

Existen varios modelos propuestos para la formación de los ICH dentro de los cuales destaca el de replicación de Painter (1980), que es el más aceptado ya

que está apoyado en fundamentos teóricos y datos experimentales con agentes que inhiben la síntesis de ADN y bloquean la elongación de la cadena. Se basa en el rompimiento de la doble hebra de ADN que ocurre en grupos de replicones adyacentes durante la duplicación. El rompimiento de las dos hebras progenitoras ocurre con frecuencia en las conjunciones de grupos de replicones totalmente duplicados adyacentes a replicones no duplicados y al provocarse una lesión en los sitios de unión, se genera un ICH. El modelo sugiere que los rompimientos de la molécula de ADN de doble banda en estas conexiones, son formados y reunidos de manera espontánea y el sellado quizás es llevado a cabo por una topoisomerasa II, que se localiza en diferentes eucariontes. En algunos casos la reunión y el sellado de las hebras no se da de manera normal y el rompimiento se sella por la unión entre hebras hijas del replicón duplicado con hebras progenitoras del replicón no duplicado y de la misma polaridad generando ICH cuando terminan de duplicarse (Painter 1980).

El ICH puede ser observado en células en metafase mediante el método de fluorescencia más Giemsa (FPG), el cual consiste en cultivar a las células durante dos ciclos de replicación en presencia de 5-bromodesoxiuridina un análogo de la timina, posteriormente se tiñen con colorante Hoechst y Giemsa (Perry y Wolff 1974). Como resultado se obtiene una tinción diferencial entre las cromátidas hermanas de los cromosomas en metafase, de tal manera que presentan cromátidas sustituidas unifilarmente, las cuales poseen una tinción fuerte mientras que las cromátidas sustituidas bifilarmente tiñen ligeramente (Fig. 3).

Con lo anterior y tomando en cuenta que la prueba de ICH es un método fácil y no tan costoso para detectar cambios citogenéticos causados por agentes químicos como los plaguicidas, fue el seleccionado para este estudio.

NORMAL

CON INTERCAMBIOS

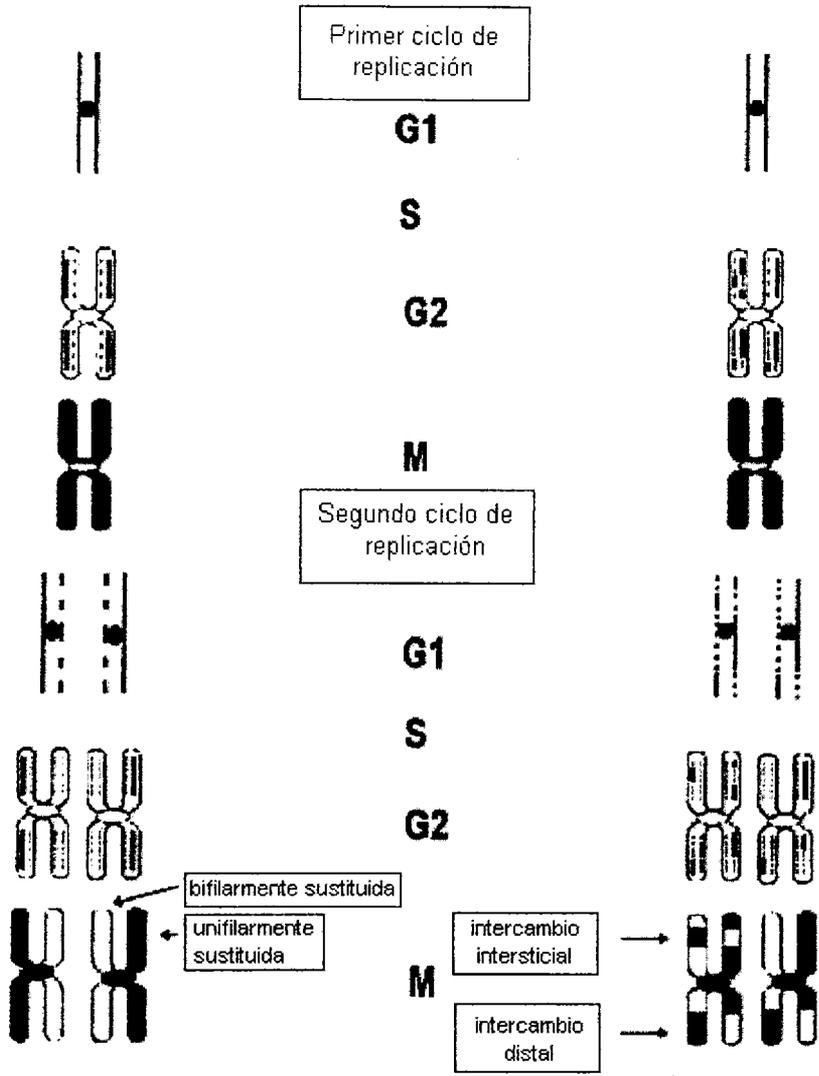


Figura 3. Esquema de intercambio de cromátidas hermanas en células con dos ciclos de replicación consecutivos en presencia de 5-BrdU.

### **Cinética de proliferación**

La cinética de proliferación celular (CPC) es un parámetro que puede analizarse con la misma técnica de intercambio de cromátidas hermanas (ICH).

El índice de replicación (IR) permite valorar a los agentes citotóxicos que afectan el ciclo de división celular y puede ser detectado por la alteración de la frecuencia de metafases de primera, segunda y/ o terceras divisiones (Hadnagy *et al.* 1986). El índice mitótico (IM) permite evaluar la citotoxicidad de agentes químicos (Rojas *et al.* 1992).

### **Mitomicina C y Ciclofosfamida**

La mitomicina C (MMC) es un agente alquilante que no requiere activación metabólica para manifestar su efecto (Shiraishi y Sandberg 1982, Katzung 1994). Su mecanismo de acción consiste en formar enlaces cruzados con el ADN actuando principalmente en la guanina y en menor grado en la citosina y adenina, este fenómeno ocurre de manera importante durante las fases S y G<sub>2</sub> del ciclo celular, también a dosis altas inhibe la síntesis de ARN y de las proteínas. Numerosos estudios han reportado que la MMC es efectivo inductor de ICH en células tratadas tanto *in vivo* como *in vitro* (Katzung 1994).

Se ha comprobado que la ciclofosfamida (CP) puede ser transformada por la fracción enzimática S9 de hígado de rata para generar metabolitos activos, los cuales pueden reaccionar con el ADN (Ren *et al.* 2002), formando monoadductos o entrecruzamientos. En células somáticas este compuesto induce mutaciones génicas, AC e ICH en una variedad de cultivos celulares, incluyendo linfocitos en presencia de activación metabólica (Wolff 1982, Ren *et al.* 2002). Este compuesto es un medicamento usado ampliamente en los tratamientos contra cáncer. Se ha descrito que el sistema de oxidación de función mixta dependientes del citocromo P-450 de los microsomas hepáticos, es el que transforma la ciclofosfamida a 4 hidroxíciclofosfamida y aldofosfamida que son sus metabolitos activos (Katzung 1994, Ren *et al.* 2002).

## 2. OBJETIVOS

- Estimar y comparar el efecto directo provocado por los plaguicidas endosulfán, metamidofos, azadiractina y zeta-cipermetrina a nivel cromosómico mediante el registro de intercambio de cromátidas hermanas en cultivo de linfocitos de sangre periférica humana.
- Evaluar la capacidad del metabolismo *in vitro* de la fracción enzimática S9 de hígado de rata para transformar a los plaguicidas y verificar el efecto de sus productos metabólicos a través del intercambio de cromátidas hermanas en cultivo de linfocitos humanos.
- Analizar la influencia de los plaguicidas sobre la cinética de proliferación celular con y sin activación metabólica, mediante los índices de replicación y mitótico.

### 3. HIPÓTESIS

Si los plaguicidas endosulfán, metamidofos, azadiractina y zeta-cipermetrina aplicados de forma directa resultan genotóxicos, el efecto se reflejará en un incremento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas o en la alteración de la cinética de proliferación IR e IM. De no ser así, es posible que un sistema metabólico como la fracción enzimática S9 de hígado de rata podría inducir un aumento en la frecuencia de los parámetros mencionados.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Tratamientos directos y mediante activación con la mezcla S9 de hígado de rata con los plaguicidas.**

Se prepararon soluciones patrón de los plaguicidas adquiridos de forma comercial, considerando su grado de pureza con agua destilada estéril. Las concentraciones usadas fueron establecidas con base en estudios preliminares: 90, 180, 360 y 450 mg/L, para endosulfán (Thiodan 35 CE), zeta-cipermetrina (Furia 100 CE), azadiractina (Trilogy) y metamidofos (Tamarón 600). Tanto la MMC (Sigma) como la CP (Sanfer) fueron también disueltos en agua destilada estéril.

### **Cultivo de linfocitos humanos**

#### **Tratamientos directos**

A tubos de cultivo que contenían 4.5 mL de medio RPMI 1640 (Gibco) complementado con 0.18 mL de fitohemaglutinina (Gibco), previamente esterilizado por filtración usando membranas "Milipore" de 0.45  $\mu\text{m}$ , se les agregó 500  $\mu\text{L}$  de sangre heparinizada de un donador sano. Se incubaron a 37 °C y a las 24 h se les adicionó 100  $\mu\text{L}$  5-bromodesoxiuridina (5-BrdU, Sigma) y se aplicaron las diversas concentraciones antes mencionadas de los cuatro plaguicidas y MMC (Sigma) como testigo positivo (0.033 mg/L), que se ha comprobado que es mutágeno directo.

#### **Cosecha y tinción diferencial**

A las 71 h de iniciado el cultivo se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de colchicina al 0.05% (Sigma) a cada tubo por una hora. Al transcurrir las 72 horas los cultivos se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante e inmediatamente se resuspendió el botón celular con 10 mL de una solución hipotónica de KCL (0.075 M, Merck) a 37 °C y se dejó durante 20

minutos en la incubadora. Nuevamente se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió rápidamente con 10 mL de fijador (frío) metanol-ácido acético 3:1. Los tubos se centrifugaron 3 veces con fijador a 1500 rpm por 10 minutos. Se mantuvieron los tubos en refrigeración hasta elaborar las laminillas.

Para cada tubo de cultivo se elaboraron 3 laminillas por goteo y se dejaron secar al aire. Posteriormente las preparaciones con metafases fueron etiquetadas para teñirlas.

Para la tinción se utilizó el método de fluorescencia más Giemsa (Perry y Wolff 1974). Las preparaciones se sumergieron en el colorante fluorocromado Hoechst (33258, Sigma) y agua destilada (1:9) y se mantuvieron en oscuridad por 20 minutos en cajas de Koplín. Después se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire en posición vertical. Las laminillas se irradiaron con luz ultravioleta durante 60 minutos con citrato de sodio salino (CCS, 0.07 M), se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar. Después se colocaron en cajas de Koplín con CSS en baño de agua a 60 °C durante 60 minutos. Posteriormente, se tiñeron con el colorante Giemsa (eosina-azul de metileno, Merck) diluido en una solución amortiguadora Sorensen (1:10), durante 2 minutos.

## **Tratamientos con activación metabólica**

### **Extracto S9**

La adición de enzimas involucradas en la actividad metabólica de mamíferos, acoplada al ensayo de cultivo de linfocitos, complementa las pruebas para la evaluación mutagénica de compuestos (Takehisa y Kanaya 1983). Se empleó la fracción microsómica S9 (sobrenadante de 9000g) de hígado de rata Wistar, inducido con fenobarbital y  $\beta$ -naftoflavona, con una concentración de proteínas de 50.9 mg/mL. La fracción microsómica S9 con las anteriores características fue adquirida de forma comercial en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

### Mezcla S9

La mezcla S9 fue preparada de acuerdo con Ames *et al.* (1975): para 10 mL de mezcla S9, el contenido fue de 1 mL de extracto S9, junto con un sistema generador de NADPH el cual consistió en cofactores estériles: 0.2 mL de  $MgCl_2$  (0.4 M, Baker), 0.4 mL de NADP (0.1 M, Sigma), 0.05 mL de glucosa-6-fosfato (1M, Sigma) y 3.35 mL agua destilada. Además se adicionaron 5 mL de amortiguador de fosfatos de sodio dibásico (Baker) y monobásico (Baker) ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  y  $Na_2 HPO_4 \cdot H_2O$ , respectivamente) a una concentración de 0.2 M con un pH de 7.4 recién preparados (Takehisa y Kanaya 1983, Takehisa *et al.* 1988, Melchor-Castro 1998).

### Cultivo de linfocitos humanos

Al igual que para los tratamientos directos, a los cultivos de 24 h de incubación se les agregó 100  $\mu L$  de 5-BrdU (Sigma). A las 48 h se les aplicó 500  $\mu L$  (5.09mg/L) de la mezcla S9 y se adicionaron las concentraciones antes mencionadas de los plaguicidas usadas en el tratamiento directo. Se añadieron 50  $\mu L$  (12 mg/L) de CP (Sanfer), que se usó como testigo positivo. Los cultivos con los tratamientos se mantuvieron por 2 h en la incubadora a 37 °C (1 h en reposo y 1 h en agitación constante). Al término de este tiempo se centrifugaron los tubos de cultivo a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con 10 mL de suero fisiológico de NaCl (0.9%, Abbott), nuevamente se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 10 minutos. Se repitió el paso anterior dos veces. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 5 mL de medio RPMI 1640 (Gibco) complementado con 0.18 mL de fitohemaglutinina (Gibco) y 100  $\mu L$  de 5-BrdU (Sigma). A las 71 horas de iniciado el cultivo se añadieron 100  $\mu L$  de colchicina al 0.05% tanto al testigo como a los tratamientos. Posteriormente se realizó la cosecha y la tinción diferencial siguiendo el método mencionado anteriormente.

### **Análisis estadístico**

Para el registro de ICH se analizaron 25 metafases de segunda división. Los ICH intersticiales se cuantificaron como dos eventos y los terminales como uno. Con el fin de evitar prejuicios en las observaciones las laminillas se reetiquetaron con clave desconocida para el lector. En todos los casos se realizaron dos experimentos, cuyos valores se compararon entre sí con la prueba de t de Student, al no encontrar diferencias significativas entre ellos se promediaron, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Neuman-Keuls ( $p < 0.001$ ) mediante el paquete estadístico INSTAT. La prueba de  $X^2$  fue aplicada para determinar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), para IR e IM.

### **Evaluación de la cinética de proliferación celular, índices de replicación y mitótico.**

Con el objeto de estimar el posible efecto de los plaguicidas en los linfocitos humanos en cultivo, se analizaron la cinética de proliferación celular a través del índice de replicación y el índice mitótico en cada experimento.

El IR se determinó examinando 100 metafases consecutivas, las cuales se clasificaron de acuerdo con su patrón de tinción, con la fórmula de Lamberti *et al.* (1983):

$$IR = M1 + 2 (M2) + 3 (M3) / 100$$

Donde M1, M2 y M3 representan los porcentajes de metafases de primera, segunda y tercera divisiones celulares (Fig. 4). Se consideran M1 aquellas células cuyo ADN se replica una vez después de la adición del análogo de timina 5-BrdU, M2 a las células cuyo ADN se duplica dos veces en presencia de la 5-BrdU y M3 aquellas que poseen un mayor número de cromátidas bifilarmente sustituidas, ya que estuvieron presentes durante tres ciclos con la 5-BrdU (Lazutka 1991).

Para el índice mitótico se cuantificó el número de metafases en 1,000 células estimuladas en cada experimento, de la siguiente manera:

$$\text{Índice mitótico (IM)} = (\text{número de metafases} / 1000 \text{ células estimuladas}) \times 100$$

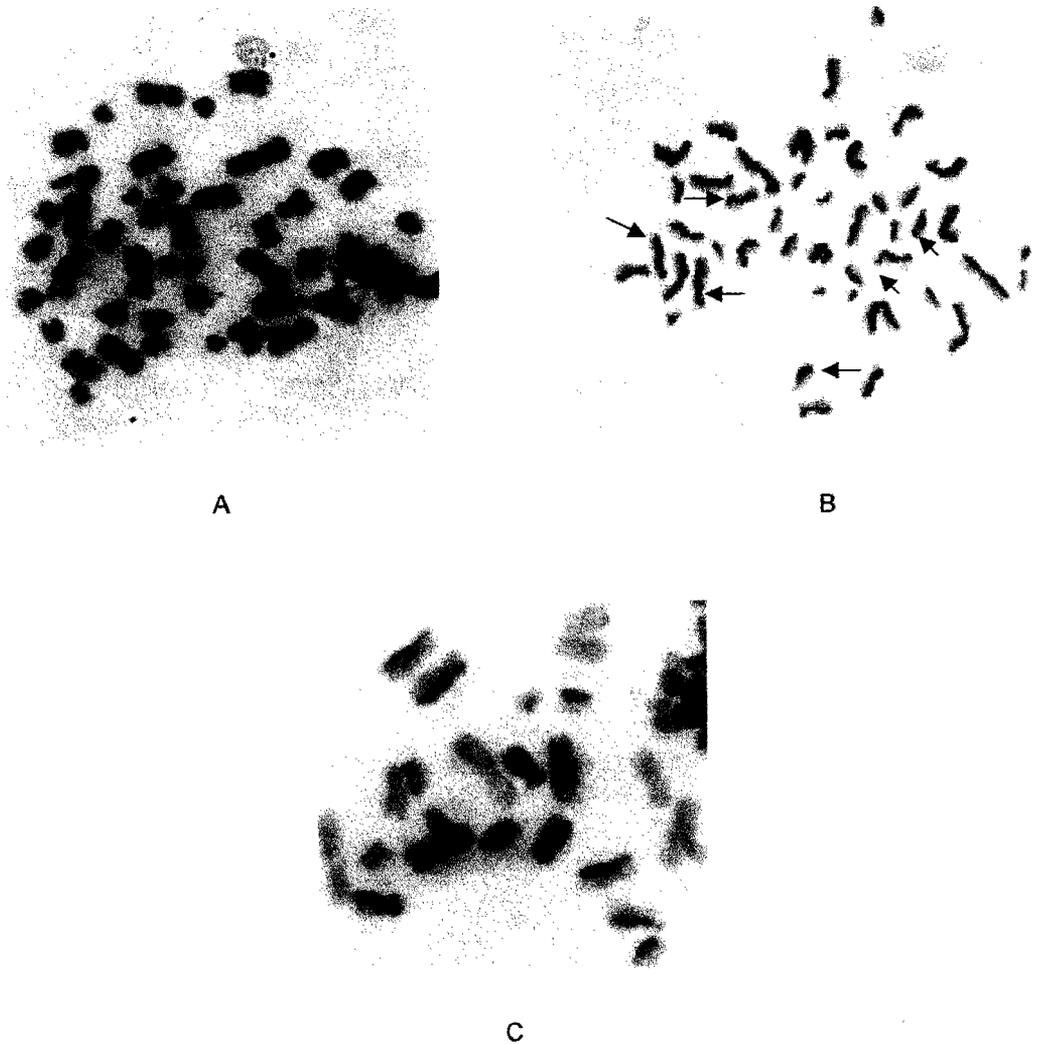


Figura 4. Cinética de proliferación celular: A) metafases de primera B) metafases de segunda, las flechas indican los intercambios de cromátidas hermanas y C) metafases de tercera divisiones de linfocitos humanos, observadas a 1,000 aumentos.

## 5. RESULTADOS

Los datos que se presentan en los cuadros II, III, IV y V corresponden a un experimento y su replica tanto del testigo como de los tratamientos con los diversos plaguicidas en cultivos de linfocitos humanos sin y con activación metabólica, respectivamente; los cuales se promediaron al determinar mediante la prueba de *t* de Student que no hubo diferencias significativas entre ellos.

### Tratamientos sin activación

En los tratamientos sin activación metabólica (Cuadro II), se observó que en las concentraciones de 90, 180, 360 y 450 mg/L para los plaguicidas endosulfán, metamidofos, azadiractina y zeta-cipermetrina aplicados de forma directa a cultivos de linfocitos humanos *in vitro* no presentaron diferencias significativas en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) con respecto al testigo mediante un análisis de varianza (ANOVA).

En el tratamiento con el plaguicida zeta-cipermetrina en las concentraciones 360 y 450 mg/L no se completaron las metafases de segunda división para el análisis de ICH en ninguno de los ensayos realizados.

En el tratamiento con 0.033 mg/L de MMC (testigo positivo), se presentó diferencia significativa con respecto al testigo mediante el ANOVA ( $p < 0.001$ ), manifestando un incremento en la frecuencia de ICH ( $18.12 \pm 0.74$ ).

El cuadro III corresponde a la cinética de proliferación celular (CPC), incluye el índice de replicación (IR) y el índice mitótico (IM).

En lo que se refiere al IR, con la prueba estadística de  $X^2$  ( $p < 0.05$ ) se observó diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor de IR del testigo con 450 mg/L de endosulfán, 180 a 450 mg/L de metamidofos y azadiractina, así como con 90 y 180 mg/L de zeta-cipermetrina. En cuanto a las concentraciones de 360 y 450 mg/L con zeta-cipermetrina no se completaron las metafases para realizar el análisis del IR. Los cultivos tratados con MMC, también presentaron diferencia significativa con respecto al testigo en cuanto al IR. Asimismo, se pudo observar que conforme aumentó la concentración de los cuatro

plaguicidas, incrementó el número de metafases de primera división (1M) y disminuyeron las metafases de segunda y tercera divisiones (Cuadro III).

Con respecto al IM se encontraron diferencias significativas después del tratamiento con endosulfán en las concentraciones de 360 y 450 mg/L, con azadiractina la diferencia sólo se encontró en la concentración más alta (450 mg/L). El plaguicida zeta-cipermetrina en las últimas concentraciones (360 y 450 mg/L), también presentó diferencia significativa con relación al testigo mediante la prueba estadística de  $X^2$ . El IM en los cultivos con MMC no fue afectado.

El IM de los tratamientos con endosulfán, azadiractina y zeta-cipermetrina, presentaron correlación inversa. Para el caso de endosulfán el valor de  $r = -0.83$ ,  $p < 0.05$  (Fig. 5), azadiractina  $r = -0.94$ ,  $p < 0.05$  (Fig. 6) y zeta-cipermetrina  $r = -0.95$ ,  $p < 0.05$  (Fig. 7), excepto para metamidofos  $r = -0.6938$ ,  $p > 0.05$  (Fig. 8). Es decir que conforme aumenta la concentración de plaguicidas disminuye la cantidad de metafases encontradas, lo cual se refleja en decremento del valor de IM.

### **Tratamientos con activación metabólica**

La exposición de los cultivos de linfocitos humanos a endosulfán, metamidofos, azadiractina y zeta-cipermetrina con activación metabólica (mezcla enzimática S9) en las concentraciones 90, 180, 360 y 450 mg/L, no revelaron diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de ICH, mediante el análisis de varianza (Cuadro IV).

Los cultivos con activación metabólica a los que se les aplicó CP a concentración de 12 mg/L (testigo positivo), mostraron diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto al testigo, incrementando la frecuencia de ICH de  $(38.42 \pm 1.72)$ , lo que demostró que el sistema de activación que se utilizó fue efectivo (Cuadro IV).

Los cultivos de linfocitos humanos después de ser tratados con la mezcla S9 y los plaguicidas así como aquellos con CP, no evidenciaron ninguna alteración en la CPC ni en el IR e IM, excepto el plaguicida zeta-cipermetrina con la

concentración más alta (450 mg/L), en la cual no se completaron las metafases para el análisis del IR. Con la prueba de  $\chi^2$  se observó diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el IM con respecto al valor del testigo (Cuadro V).

---

## 6. DISCUSIÓN

### Tratamientos directos con plaguicidas

Debido a que los plaguicidas se han convertido en una de las herramientas principales en el desarrollo de la agricultura y son empleados indiscriminadamente en los cultivos, es importante estimar el riesgo genotóxico derivado de la exposición a estos agentes químicos mediante diversos sistemas de prueba (Bolognesi 2003).

Los efectos de gran cantidad de compuestos incluyendo los plaguicidas, han sido estimados mediante la prueba de ICH, así como la de CPC, de IR y de IM. El incremento en la frecuencia de ICH es considerado como un criterio de evaluación genotóxica en células de mamífero en cultivo (Takehisa 1982), así como en animales experimentales (Schneider y Kram 1982).

Los resultados de este estudio reflejaron que los plaguicidas endosulfán, metamidofos, azadiractina y zeta-cipermetrina no incrementaron la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo, aún en presencia de activación metabólica (Cuadros II y IV).

En los trabajos que se han realizado sobre la genotoxicidad de los plaguicidas endosulfán, metamidofos, azadiractina y zeta-cipermetrina se encuentran algunas discrepancias.

La presente investigación coincidió con algunos estudios previamente realizados en los que se aplicó de forma directa el plaguicida metamidofos: en la línea celular V79 de criceto chino en concentraciones de 10 a 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no provocó incremento en la frecuencia de ICH después de 27 h de tratamiento, sin embargo causó retraso en el ciclo celular que fue dependiente de la dosis aplicada (Chen *et al.* 1982), este resultado coincidió con el comportamiento encontrado en 450 mg/L en este trabajo (Cuadro II). En contraste, Amer y Sayed (1986) reportaron que metamidofos es un débil inductor de ICH en cultivos de bazo de ratón en concentraciones más bajas (0.25, 0.50, 1 y 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que las utilizadas en este trabajo. Sin embargo, sus resultados positivos fueron obtenidos después de tratar sus cultivos con metamidofos sólo durante las últimas 4 h antes de

cosechar. Estos datos pueden ser debido en parte a la rápida degradación de los compuestos organofosforados en condiciones *in vitro* (Wild 1975).

En el caso del endosulfán (Lu *et al.* 2000), al probar sus isómeros por separado, se evidenció que el  $\beta$ -endosulfán en  $10^{-7}$  y  $10^{-5}$  M causó aumento significativo en la frecuencia de ICH, mientras que el  $\alpha$ -endosulfán no provocó efecto en la línea celular de humano HepG2. En el mismo estudio la adición de  $\alpha$  y  $\beta$ -endosulfán a bajas concentraciones no alteró la cinética del ciclo celular en la misma línea celular.

Sobti *et al.* (1983) en la línea celular de humano LAZ-007, describió aumento en la frecuencia de ICH, después de ser expuestos a endosulfán a concentraciones de  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  M. Los resultados de los estudios antes mencionados no coincidieron con lo observado en este trabajo, ya que estos autores utilizaron líneas celulares conformadas por células que se dividen indefinidamente a las cuales corresponden HepG2 y LAZ-007, aunque parecen normales en muchos aspectos, su continua división refleja la presencia de una o más mutaciones que han alterado sus propiedades de proliferación. A pesar de que dichas líneas tienen ligeras anomalías, se usan habitualmente porque aportan una fuente ilimitada de células estandarizadas y genéticamente homogéneas (Alberts *et al.* 1994). Sin embargo, es posible que estas alteraciones les confieren mayor sensibilidad a diferencia de células normales de mamífero.

Puig *et al.* (1989) probaron la cipermetrina (isómero de zeta-cipermetrina) en cultivos de linfocitos humanos expuestos a altas concentraciones (mayores de 10  $\mu\text{g/mL}$ ) en los que no observaron efectos en cuanto a la frecuencia de ICH, pero el ciclo celular fue afectado causando un retraso en la velocidad de proliferación

En este estudio el hecho de no encontrar efecto en la frecuencia de ICH en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo expuestos de manera directa a los plaguicidas endosulfán, metamidofos, azadiractina y zeta-cipermetrina en condiciones *in vitro*, no significa la ausencia de daño al material genético, puesto que en otros sistemas de prueba, que se han utilizado los resultados son contradictorios.

Los plaguicidas metamidofos, endosulfán han provocado incremento en la frecuencia de ICH en otros tipos celulares apoyando la idea de que pueden producir daño al ADN. Con respecto a los plaguicidas zeta-cipermetrina y azadiractina la información es escasa (Chen *et al.* 1982, Amer y Sayed 1986, Lu *et al.* 2000, Sobti *et al.* 1993, Puig *et al.* 1989). Sin embargo, los cuatro plaguicidas han resultado genotóxicos al evaluarlos con otras pruebas citogenéticas como micronúcleos y aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea (Usha *et al.* 1980, Awasthy *et al.* 1995, 1999), hematopoyéticas y de bazo de ratón, así como en linfocitos de oveja, en células humanas HepG2 y meristemas de *Allium cepa* (Velazquez *et al.* 1984, Amer y Sayed 1986, Roa *et al.* 1988, Rojanapo y Tepsuwam 1992, Lu *et al.* 2000, Pistl *et al.* 2001).

Sin embargo, en este trabajo el daño producido por los plaguicidas en los linfocitos humanos en cultivo sólo se manifestó en la cinética de proliferación celular alterando la distribución de las metafases de primera (1M), de segunda (2M) y de tercera (3M) divisiones, causando un retraso del ciclo celular evidenciado al encontrar un porcentaje mayor de células en metafase de primera división conforme fue aumentando la concentración de los plaguicidas. Dichas observaciones se reflejaron en el índice de replicación que se redujo conforme aumentó la concentración de cada plaguicida (Cuadro III). El retraso causado por los plaguicidas sugiere interferencia en la regulación del ciclo celular (Calderón-Segura *et al.* 2004).

A su vez los plaguicidas endosulfán, azadiractina y zeta-cipermetrina revelaron una correlación negativa entre las concentraciones aplicadas para cada tratamiento con respecto al índice mitótico de los linfocitos en cultivo (Fig. 5, 6 y 7) observando inhibición de la mitosis por parte de los compuestos.

Una posible explicación de los efectos de los plaguicidas relacionados con el análisis de la proliferación, es la probabilidad de que estos compuestos redujeron la respuesta al mitógeno. Esto representaría fisiológicamente una disminución en la velocidad de blastogénesis, debido a que las células no responden o lo hacen débilmente a la señal del mitógeno (Lucivero *et al.* 1988).

Banerjee y Hussain (1986, 1987) evaluaron el efecto de dosis crónicas y subcrónicas de endosulfán en ratas albinas y observaron disminución en las respuestas inmune celular y humoral la cual fue dependiente de la dosis y del tiempo de exposición. Posteriormente, un estudio realizado aplicando de forma directa endosulfán a cultivos de leucocitos y linfocitos de sangre periférica de ovejas, provocó la disminución y/ o la inhibición del estímulo por el mitógeno fitohemaglutinina en los linfocitos (Pistl *et al.* 2003). El método empleado por estos autores para evaluar la inmunotóxicidad sugiere una posible acción directa por parte del endosulfán sobre los receptores de membrana en células del sistema inmune.

Es posible que el retraso observado en la cinética de proliferación celular en los linfocitos sea provocado por los plaguicidas como resultado de la interrupción en cualquier fase del ciclo celular, lo que depende de la interacción que puedan tener estos productos con los componentes celulares.

El ciclo celular se divide tradicionalmente en cuatro fases principales, de las cuales la mitosis, que implica la segregación de los cromosomas culmina con la división celular (Alberts *et al.* 1994). Por otra parte, antes de llegar a mitosis la célula tiene que salir de interfase, periodo que comprende las fases G1, S, G2. La fase G2 proporciona un lapso, que permite a la célula asegurar que la replicación del ADN (fase S) se ha completado antes de pasar a mitosis. Es durante la fase G2 que se forma y acumula el factor promotor de la maduración (MPF), el cual está constituido por la unión de una ciclina con una cinasa dependiente de ciclina; lo cual promueve la entrada de la célula a mitosis. A su vez la degradación de la ciclina está acoplada a la inactivación del MPF y la salida de la célula de mitosis. Así que el bloqueo de la síntesis de proteínas durante la interfase evitara la progresión de la célula a la mitosis (Alberts *et al.* 1994).

El ensayo *in vitro* realizado por Hadnagy y colaboradores (1999) con distintos piretroides usando células de pulmón de criceto chino de la línea V79 mostró que estos compuestos detienen a las células en la transición G2/M e inhiben la progresión del ciclo celular. En el caso de la zeta-cipermetrina que forma parte de la familia de los piretroides, el mecanismo explicado anteriormente

podría ser el causante del retraso de linfocitos observado con concentraciones de 90 y 180 mg/L en este estudio. Mientras que las concentraciones de 360 y 450 mg/L disminuyeron significativamente la presencia de células estimuladas y metafásicas.

El plaguicida azadiractina provocó retraso en la cinética de proliferación celular de los linfocitos en este estudio. Algunos autores observaron que otros tipos celulares de mamífero y de insecto (glía y Sf9, respectivamente) expuestos a este plaguicida disminuyen su proliferación en cultivo, sugiriendo que azadiractina puede inhibir la mitosis por medio de la interferencia con la polimerización de tubulina la cual se da en el periodo G2, mostrando una elevada cantidad de células detenidas en la transición G2/M (Akudugu *et al.* 2001, Salehzadeh *et al.* 2002, 2003).

### Tratamientos con mezcla S9

Se ha demostrado que la genotoxicidad de los plaguicidas puede ser potenciada por la activación metabólica de mamíferos, utilizando como modelo *in vitro* la fracción enzimática S9 de hígado de rata (Gentile *et al.* 1982) por ejemplo, el metil paratión (organofosforado) es transformado a metil paraoxón por medio de la enzima citocromo P450 que constituye un componente de la fracción S9 (Albores *et al.* 2001).

Para el caso de metamidofos en algunos trabajos se ha reportado que la exposición a este compuesto está relacionada con un incremento en el porcentaje de micronúcleos en células hematopoyéticas, así como un débil aumento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en células de médula ósea de ratón en ensayos *in vivo* (Amer y Sayed 1986), sugiriendo que es mediante la transformación metabólica, que este compuesto ejerce su actividad genotóxica. Sin embargo, en este estudio el metamidofos no manifestó aumento en la frecuencia de ICH y la cinética de proliferación celular no fue afectada al agregarse la mezcla S9.

Como se observó en este estudio el endosulfán tampoco incrementó la frecuencia de ICH ni alteró la cinética de proliferación celular después de ser

expuesto a la fracción S9, sin embargo en *Salmonella typhimurium* en las cepas TA97 y TA102, la aplicación de S9 incrementó débilmente la toxicidad de este plaguicida (Pandey *et al.* 1990). En los estudios de Amer y Sayed (1986) y Pandey *et al.* (1990) el aumento en la frecuencia de ICH que se manifestó fue muy débil.

El tratamiento con azadiractina y S9, aplicado en este estudio no mostró alteración en los linfocitos de sangre periférica en cultivo, pero en ensayos *in vivo* con extractos de hojas del árbol del neem indujeron aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea de ratón (Awasthy *et al.* 1995, 1999).

La zeta-cipermetrina probada en este trabajo no alteró la frecuencia de ICH ni la cinética de proliferación en presencia de S9. En el tratamiento directo con este plaguicida a concentraciones altas (360 y 450 mg/L) no se completaron las metafases para determinar la frecuencia de ICH y el índice de replicación (Cuadros II y III). A diferencia del tratamiento directo, la exposición al plaguicida en presencia de S9 permitió obtener mayor cantidad de metafases para determinar la frecuencia de ICH y del índice de replicación en las tres primeras concentraciones (90-360 mg/L), sin embargo en la concentración más alta (450 mg/L) no se completaron las metafases necesarias (Cuadros IV y V), suponiendo un efecto de desintoxicación por parte del sistema enzimático S9 con 360 mg/L de este plaguicida.

Se observó que en los linfocitos humanos en cultivo tratados con los plaguicidas en presencia de la fracción enzimática S9 de hígado de rata no presentaron diferencias significativas en la frecuencia de ICH y en la cinética de proliferación celular, IR e IM al compararlos con el testigo, en contraste con los tratamientos sin S9.

Es posible que las enzimas que integran la mezcla S9 de hígado de rata hayan provocado la transformación de los plaguicidas en metabolitos que no interactúan con el ADN para la inducción de ICH y reducen los efectos en la cinética de proliferación celular el IR e IM (Cuadros IV y V).

Estudios realizados por Ribas *et al.* (1998) y Moretti *et al.* (2002) evidenciaron que la fracción enzimática S9 es capaz de disminuir la genotoxicidad

de dos herbicidas metribuzina y ametrina, asimismo, Csukás *et al.* (1979) reportaron que el uretano y el hidroxietano, en linfocitos humanos en cultivo en presencia de la mezcla S9 disminuyo la capacidad de estos compuestos para inducir ICH. El efecto de desactivación por parte de la fracción enzimática S9 también se manifestó en linfocitos expuestos a 1-cloro-2,3-epoxipropano conocido como epiclorhidrina (White 1980). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en este trabajo en cuanto a la cinética de proliferación celular.

## 7. CONCLUSIONES

Los plaguicidas evaluados en este estudio aplicados de forma directa no provocaron incremento en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas. Sin embargo, indujeron alteración en la cinética de proliferación celular, IR e IM, manifestando un retraso del ciclo celular en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo.

Con base en diversos estudios se sugiere que cada uno de los plaguicidas podría tener un mecanismo distinto por el cual provocan retraso del ciclo celular.

Aplicando la mezcla enzimática S9 de hígado de rata como sistema metabólico, no se observó incremento en la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas ni alteración en la cinética de proliferación celular, IR e IM, lo que indicó que los metabolitos derivados de la transformación de los plaguicidas en estas concentraciones al parecer no afectaron a los linfocitos, lo que implica un proceso de desintoxicación por parte del sistema enzimático.

---

## 8. REFERENCIAS

- Abe S. y Sasaki M. (1977). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 1635-1641.
- Agarwal D.K., Chauhan L.K.S., Gupta S.K. y Sundararaman V. (1994). Cytogenetic effects of deltamethrin on rat bone marrow. *Mutat. Res.* 311: 133-138.
- Akudugu J., Gade G. y Bohm L. (2001). Cytotoxicity of azadirachtin A in human glioblastoma cell lines. *Life Sci.* 68: 1153-60.
- Aladakatti R.H., Nazeer Ahamed R., Ahmed M. y Ghosesawar M.G. (2001). Sperm parameters changes induced by *Azadirachta indica* in albino rats. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 12: 69-76.
- Albert L., Aranda E., Rincón V.F. J. y Loera R. (1985). Situación de los plaguicidas en México y sus efectos en la salud y el medio ambiente. *CIDICAP Problema de Contaminación en México*. México, Vol. I, pp. 10-15.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson D.J. (1994). *Biología Molecular de la Célula*. Omega, Barcelona, 1387 p.
- Albores A., Ortega M.G., Sierra S.A., Cebrian M.E., Muñoz S.J.L., Calderón S.J.V. y Manno M. (2001). Cytochrome P450 2B (CYP2B)-mediated activation of methyl-parathion in rat brain extracts. *Toxicol. Lett.* 124: 1-10.
- Al-Saleh I.A. (1994). Pesticides: a review article. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 13: 151-61.
- Ambrosini M.B. y Witt R.R. (2000). Pesticide poisoning in rural areas and the nurse's work. *Rev. Gaucha Enfem.* 21: 5-21.
- Amer S.M, Aboul-Ela E.I. (1985). Cytogenetic effects of pesticide: induction of micronuclei in mouse bone marrow by the insecticides cypermethrin and rotenone. *Mutat. Res.* 155: 135-142.

- Amer S.M. y Sayed M.A. (1986). Cytogenetic effects of the insecticide methamidophos in mouse bone marrow and cultures mouse spleen cells. *Z. Naturforsch.* 42c: 21-30.
- Ames B. N., McCann J. y Yamasaki E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364.
- AMIPFAC (1985). Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes.
- Andrade-Morales L.S. (2001). Evaluación del efecto genotóxico del insecticida organofosforado metil azinfos (gusatión) en cultivo de linfocitos a través del metabolismo de *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Ashby J., Anwar W., Au W.W., Massoud A. y Gentile J.M. (1993). Genetic toxicology in developing countries: comments and recommendations. *Environ. Health Perspect.* 101: 335-338.
- Awasthy K.S., Chaurasia O.P. y Sinha S.P. (1995). Genotoxic effects of crude extract of neem (*Azadirachta indica*) in bone marrow cells of mice. *Cytologia* 60: 189-195.
- Awasthy K.S., Chaurasia O.P. y Sinha S.P. (1999). Prolonged murine genotoxic effects of crude extracted from neem. *Phytotherapy Res.* 11: 81-83.
- Banerjee B.D. y Hussain Q.Z. (1986). Effect of sub-chronic endosulfan exposure on human humoral and cell-mediated immune responses in albino rats. *Arch. Toxicol.* 59: 279-284.
- Banerjee B.D. y Hussain Q.Z. (1987). Effect of endosulfan on human humoral and cell mediated immune responses in rats. *Environ. Contam. Toxicol.* 38: 435-441.

- Barrueco C., Herrera A., Caballo C. y De la Peña E. (1994). The induction of structural chromosome aberrations in human lymphocyte cultures and CHO cells by permethrin. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 14: 31-38.
- Batiste A. M., Xamena N., Velazquez A., Creus A. y Marcos R. (1986). Mutagenicity testing of pyrethroid insecticide cypermethrin in *Drosophila*. *Mutagenesis* 1: 343-346.
- Behera B.C. y Bhunya S.P. (1989). Studies on the genotoxicity of asataf (acephate), an organophosphate insecticide, in a mammalian *in vivo* system. *Mutat. Res.* 223: 287-293.
- Bellés X. (1988). *Insecticidas Biorracionales. Nuevas Tendencias*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España, 405 p.
- Benhumea-Partida M. (2001). Elaboración de un extracto de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) para el manejo de picudo de chile (*Anthonomus eugenii* Cano) en cultivo de chile ancho San Luis (*Capsicum annum* L.), en B.C.S., México. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de los Mochis. Los Mochis Sinaloa, México.
- Bhunya S.P. y Pati P.C. (1988). Genotoxic effects of a synthetic pyrethroid insecticide cypermethrin in mice *in vivo*. *Toxicol. Lett.* 41: 223-230.
- Bhunya S.P. y Pati P.C. (1990). Effects of deltamethrin, a synthetic pyrethroid, on the induction of chromosome aberrations, micronuclei and sperm abnormalities in mice. *Mutagenesis* 5: 229-232.
- Biswas K., Chattopadhyay T., Banerjee R.K. y Bandyopadhyay U. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current. Sci.* 82: 1336-1345.
- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543: 251-272.

- Brahmachari G. (2004). Neem-An Omnipotent Plant: A Retrospection. Chem. Bio. Chem. 5: 408-421.
- Buratti M.F., Volpe M.T., Meneguz A., Vittozzi L. y Testai E. (2002). CYP-specific bioactivation of four organophosphothioate pesticides by human liver microsomes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 186: 143-154.
- Burrueco V.R., Raabe O.G., Overstreet J.W., Wilson B.W. y Wiley L.M. (2000). Paternal effects methamidophos administration in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 165: 148-157.
- Caballo G.C., Herrera A., Burrueco C., Santamaria A., Sanz F. y De la Peña E. (1992). Analysis of cytogenetic damage induced in CHO cells by pyrethroid insecticide fenvalerate. Teratog. Carcinog. Mutag. 12: 243-249.
- Calderón-Segura M. E. (1993). ICH inducido por propoxur en cultivos de linfocitos humanos previa activación metabólica por *Vicia faba*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Calderón-Segura M.E., Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Butterworth F.M y Amador-Muñoz O. (2004). The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. Mutat. Res. 558: 7-17.
- Carrano A.V. y Moore D.H. (1982). The rationale and methodology for quantifying sister chromatid exchanges in human. En: Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology. (J.A. Heddle, Ed.). Academic Press, Nueva York, pp. 304-627.
- Carrano A.V. y Natarajan A.T. (1988). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. International commissions for protection against environmental mutagens and carcinogens. Mutat. Res. 204: 379-406.

- Chatterjee K.K., Talukdar G. y Sharma A. (1982). Effects of synthetic pyrethroids in mammalian chromosomes. I. Sumicidin. *Mutat. Res.* 105: 101-106.
- Chauhan L.K.S., Dikshith T.S.S. y Sundararaman V. (1986). Effects of deltamethrin on plants cells. I. Cytological effects on root meristem of *Allium cepa*. *Mutat. Res.* 171: 25-30.
- Chen H.H., Hsueh J.L., Sirianni S.R. y Huang C.C. (1981). Induction of sister-chromatid exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cells treated with eight organophosphorus pesticides. *Mutat. Res.* 88: 307-16.
- Chen H.H., Sirianni S.R. y Huang C.C. (1982). Sister-chromatid exchanges and cell-cycle delay in Chinese hamster V79 cells treated with 9 organophosphorus compounds (8 pesticides and 1 defoliant). *Mutat. Res.* 103: 307-313.
- CICOPLAFEST (1996). Catálogo Oficial de Plaguicidas Comisión Intersecretarial para el Control y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. México, 519 p.
- Colborn T., Vom Saal F.S. y Soto A.M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101: 378-384.
- Cole D.C., Carpio F., Julian J. y Leon N. (1998). Assessment of peripheral nerve function in an Ecuadorian rural population exposed to pesticides, *J. Toxicol. Environ. Health* 55: 77-91.
- Cooper I.P. (1991). Effects of pesticides on wild life. En: *Handbook of pesticides toxicology*. (W.J. Hayes, J.R. Laws y E.R. Jr. Laws, Eds.). Academic Press, Nueva York, pp. 1347-1402.
- COP (1998). Código Oficial de Plaguicidas. Ciclopafest. México.

- Coughtrie M.W., Sharp S., Maxwell K. e Innes N.P. (1998). Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem. Biol. Interact.* 109: 3-27.
- Csukás I., Gungl E., Fedorcsáck I., Vida G., Antoni F., Turtóczy I. y Solymosy F. (1979). Urethane and hydroxyurethane induce sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* 67: 315-319.
- De Liñan V.C. (1997). *Farmacología vegetal*. Ediciones Aerotécnicas, México, pp 221-224.
- EPA (1997). Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for the Zeta-cypermethrin; *Pesticide Tolerance.* 62: 228.
- EPA (2001). Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for the Registration Eligibility Decision on Endosulfan, 163 p.
- Ferrer A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *ANALES Sis San Navarra.* 26: 155-171.
- Fest C. y Schmidt K.J. (1973) *The chemistry of organophosphorus pesticides*. Springer-Verlag, Berlin.
- Flores-Maya S. (2000). ICH inducidos por herbicidas del grupo triazina en cultivo de linfocitos humanos previa activación metabólica por un biomonitor vegetal. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.
- 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.
- Gichner T., Stavreva D.A. y Van Breusegem F. (2001). o-Phenylenediamine-induced DNA damage and mutagenicity in tobacco seedlings is light-dependent. *Mutat. Res.* 495: 117-125.

- Gómez-Arroyo S., Noriega-Aldana N., Juárez-Rodríguez D. y Villalobos-Pietrini R. (1987). Sister chromatid exchanges induced by the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, phoxim and methyl azinfos in cultures human lymphocytes. *Contam. Ambient.* 3: 63-70.
- González F.J. y Gelboin H.V. (1993). Role of human cytochrome P-450s in risk assessment and susceptibility to environmentally based disease. *J. Toxicol. Environ. Health* 40: 289-308.
- González F.J. (1998). The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity *in vivo* using targeted gene disruption. *Toxicol. Lett.* 102-103: 16-26.
- Hadnagy W., Seemayer N.H. y Tomingas R. (1986). Cytogenetic effects of airborne particulate matter in human lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 175: 95-101.
- Hadnagy W., Seemayer N.H., Kuhn K.H., Leng G. e Idel H. (1999). Induction of mitotic cell division disturbances and mitotic arrest by pyrethroids in V79 cell cultures. *Toxicol. Lett.* 107: 81-87.
- Hall F.R. y Menn J.J. (1999). *Biopesticides. Use and Delivery*. Human Press, USA, 626 p.
- Hamman I. (1970). Tamaron, a new insecticide and acaricide. *P flanzenschutz-Nachr. Bayer* 23: 133-143.
- Hayes W.J. (1991). Chlorinated hydrocarbons insecticides. En: *Pesticides Studied in Man*. (W.J. Hayes y E.R. Lawes, Eds.). Academic Press, San Diego, pp. 731-868.
- He F. (1994). Synthetic pyrethroids. *Toxicology* 91: 43-9.
- Herrera A. y Laborda E. (1988). Mutagenic activity in synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis* 3: 509-514.

- Hiremath M.B. y Kaliwal B.B. (2002). Effect of endosulfan on ovarian compensatory hypertrophy in hemicastrated albino mice. *Reprod. Toxicol.* 16: 783-790.
- Ishaaya I. (1998). *Insecticides with novel modes of action. Mechanism and application*. Springer-Verlag, Nueva York, 289 p.
- Isman M.B., Koul O., Luczynski A. y Kaminski J. (1990). Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oil and their relationship to azadirachtin content. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1406-1411.
- Jayashree I. V., Vijayalaxmi K.K. y Rahmin M.A. (1994). The genotoxicity of Hinosan, and organophosphorus pesticides in the *in vivo* mouse. *Mutat. Res.* 322: 77-85.
- Jongen W.M y Koeman J.H. (1983). Mutagenicity testing of two tropical plant materials with pesticidal potential in *Salmonella typhimurium*: *Phytolacca dodecandra* berries and oil from seeds of *Azadirachta indica*. *Environ. Mutagen.* 5: 687-694.
- Julli M. y Krasso R. (1995). Acute and chronic toxicity of the thiocarbamate herbicide, molinate to the Cladoceran *Moina australiensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54: 690-694.
- Kaloyanova F.P. y El Batawi M.A. (1991). *Human Toxicology of Pesticides*. CRC Press, USA, 196 p.
- Kamel F., Boyes W.K., Gladen B.C., Rowland A.S., Alavanja M.C., Blair A. y Sandler D.P. (2000). Retinal degeneration in licenced pesticide applicators. *Am. Ind. Med.* 37: 618-628.
- Kamrin M.A. (1997). *Pesticides Profiles Toxicity. Environmental Impact and Fate*. Lewis Publishers, USA, 676 p.

- Karalliedde L., Feldman S., Henry J. y Marrs T. (2001). *Organophosphates and Health*. Imperial College Press, 485 p.
- Katzung B.G. (1994). *Farmacología básica y clínica*. El manual moderno, México, D.F. 1260 p.
- Kaufer M. (1984). Como suelen contaminarse los alimentos. Cuadernos de nutrición. En: Terrones S., Llamas V., Jaramillo J., Espino L. y León B. (2000). DDT y plaguicidas relacionados presentes en la leche materna y otros tejidos de mujeres sanas con embarazo de término. *Ginecol. Obstret. Mex.* 68: 97-104.
- Khan P.K. y Awasthy K.S. (2003). Cytogenetic toxicity of neem. *Food Chem. Toxicol.* 41: 1325-1328.
- Khasawinah A.M.A., March R.B. y Fukutu F.R. (1979). Insecticide properties, anticholinesterase activities and metabolism of methamidophos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 9: 211-221.
- Khillare B. y Shrivastav T.G. (2003). Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract. *Contraception* 68: 225-229.
- Kinsella A.R. y Radman M. (1980). Inhibition of carcinogen-induced chromosomal aberrations by an anticarcinogenic protease inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 3544-3547.
- Klopman G., Contreras R., Rosenkranz M.S. y Waters M.D. (1985). Structure genotoxic activity relationships of pesticides: a comparison of the results of several short-term assay. *Mutat. Res.* 147: 343-356.
- Kocken J., y Van Roozendaal G. (1997). The Neem Tree Debate. *Biotechnol. and Develop. Monitor* 30: 811.
- Krieger R. (2001). *Handbook of Pesticide Toxicology. (Agents)*. Academic Press, Vol. 1 y 2.

- Lamberti L., Bigatti P.P. y Ardito G. (1983). Cell kinetics and sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 120: 193-199.
- Latt S.A., Allen J., Bloom S.E., Carrano A., Falke E., Kram D., Schneider E., Schreck R., Tice R., Whitfield B. y Wolff S. (1981). Sister chromatid exchanges: a report of the gene-tox program. *Mutat. Res.* 87: 17-62.
- Lazutka J.R. (1991). Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environ. Mol. Mutagen.* 17: 188-195.
- López-Cruz S. (1997). Intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de individuos expuestos a la contaminación producida durante la refinación del petróleo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, Mexico.
- Lu F.C. (1992). *Toxicología básica. Riesgos por exposición a sustancias tóxicas.* Harla, México, 269 p.
- Lu Y., Morimoto K., Takeshita T., Takeuchi T. y Saito T. (2000). Genotoxic effects of alpha-endosulfan and beta-endosulfan on human HepG2 cells. *Environ. Health Perspect.* 108: 559-561.
- Lucivero G., Surico G., Mazzini G., Dell'Osso A. y Bonomo, L. (1988). Age-related changes in the proliferative kinetics of phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. Analysis by uptake of tritiated precursors of DNA, RNA and proteins, by flow cytometry. *Mech. Ageing Dev.* 43: 259-67.
- Marco M.P., Pascual N., Bellés X. y Messeguer A. (1990). Ecdysteroid depletion by azadirachtin in *Tenebrio monitor* pupae. *Pestic. Biochem. Physiol.* 38: 60-65.
- Mathew G.K.K., Vijayalaxmi K.K. y Rahmin M.A. (1992). Methyl parathion-induced sperm shape abnormalities in mouse. *Mutat. Res.* 280: 169-173.

- Melchor-Castro S. (1998). Estudio de genotoxicidad de tres compuestos análogos al metronidazol en cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica con y sin activación metabólica. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Menn J.J. (1978). Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. *Environ. Health Perspect.* 27: 113-24.
- Moretti M., Marcarelli M., Villarni M., Fatigoni C., Scasselati G. y Pasquini R. (2002). In vitro testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: cytogenetic and primary DNA damage. *Toxicol. in Vitro* 16: 81-88.
- Morgan W.F. y Cleaver J.E. (1982). 3-Aminobenzamid3e synergistically increases sister-chromatid exchanges in cells exposed to methyl methanesulfonate but not to ultraviolet light. *Mutat. Res.* 104: 361-366.
- Nakanishi Y. y Schneider E.L. (1979). In vivo sister-chromatid exchange: a sensitive measure of DNA damage. *Mutat. Res.* 60: 329-337.
- Narahashi T. (1992). Nerve membrane Na<sup>+</sup> channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 236-241.
- Narahashi T., Frey J.M., Ginsburg K.S. y Roy M.L. (1992). Sodium and GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. *Toxicol. Lett.* 64-65: 429-436.
- Narahashi T. (1996). Neural ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol.* 79: 1-14.
- Nebert D.W., McKinnon R.A. y Puga A. (1996). Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol.* 15: 273-80.
- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C.

- y Nebert D.W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42.
- O'Brien R.D. (1969). *Insecticides*. Academic Press, Nueva York.
- Oesch-Bartlomowicz B. y Oesch F. (2004). Modulation of mutagenicity by phosphorylation of mutagen metabolizing enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 423: 31-36.
- Ortega C.J., Espinos T. F. y López C.L. (1994). El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: retos ante el tratado de libre comercio. *Salud Pública Mex.* 36: 624-632.
- Padungtod C., Hassold T.J., Ryan L.M., Savitz D.A., Christiana D.C. y Xu X. (1999). Sperm aneuploidy among Chinese pesticide factory workers: scoring by the FISH method. *Am. J. Ind. Med.* 36: 230-238.
- Painter R.B. (1980). A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* 70: 337-341.
- Pandey N., Gundevia F., Prem A.S. y Ray P.K. (1990). Studies on the genotoxicity of endosulfan, an organochlorine insecticide, in mammalian germ cells. *Mutat. Res.* 242: 1-7.
- Pandey N., Gundevia F. y Ray P.K. (1990). Evaluation of the mutagenic potential of endosulfan using the Salmonella/mammalian microsome assay. *Mutat. Res.* 242: 121-125.
- Pati P.C. y Bhunya S.P. (1989). Cytogenetic effects of fenvalerate in mammalian *in vivo* test system. *Mutat. Res.* 222: 149-154.
- Perry A.S., Yamamoto T., Ishaaya I. y Perry R.Y. (1998). *Applied Agriculture. Insecticides in Agriculture and Environment. Retrospects and Prospects.* Springer-Verlag, Nueva York, 261 p.

- Perry P. y Wolff S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251: 156-158.
- Perry P. y Evans H.J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258: 156-158.
- Pimental D. y Levitan L. (1986). Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Biosciences* 36: 86-91.
- Pistl J., Kovalkovicova N., Kacmár P., Kusová I., Mikula I. y Sutiakova I. (2001). Effect of endosulfan on peripheral sheep leukocytes *in vivo*. *Vet. Human Toxicol.* 43: 78-82.
- Pistl J., Kovalkovicova N., Holovska V., Legath J. y Mikula I. (2003). Determination of the immunotoxic potential of pesticides on functional activity of sheep leukocytes *in vitro*. *Toxicology* 188: 73-81.
- Plewa M.J. y Gentile J.M. (1982). The activation of chemicals into mutagens by green plant. En: *Chemicals Mutagens: Principles and Methods for their Detection*. (A. Hollander, Ed.). Plenum Press, Nueva York, Vol. 7, pp. 401-420.
- Plewa M.J. y Wagner E.D. (1993). Activation of promutagen by green plants. *Annu. Rev. Genet.* 27: 93-113.
- Prieto A., Molero D., González G., Buscema I., Ettiene G. y Medina D. (2002). Persistent of methamidophos, diazinon and malathion in tomatoes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69: 479-485.
- Puig M., Carbonell E., Xamena N., Creus A. y Marcos R. (1989). Analysis of cytogenetic damage induced in cultured human lymphocytes by the pyrethroid insecticides cypermethrin and fenvalerate. *Mutagenesis* 4: 72-74.

- Rainaldi R. y Mariani T. (1982). The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool for identifying agents directly interacting with DNA. *Mutat. Res.* 103: 333-337.
- Rao B.V., Rao B.G.S. y Sharma C.B.S.R. (1988). Cytological effects of herbicides and insecticides on *Allium cepa* root meristems. *Cytologia* 53: 255-262.
- Rehcgil J. (1999). Biological and biotechnological control of insect pests. (J.E. Reichcgil. y N.A. Reichcgil, Eds.) Lewis Publishers, USA, pp. 111-133.
- Ren Z., Ma E. y Guo Y. (2002). Chromosome aberration assays for the study of cyclophosphamide and *Bacillus thuringiensis* in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae). *Mutat. Res.* 520: 141-50.
- Restrepo I. (1992). *Los plaguicidas en México*. Comisión Nacional de Derechos Humanos, 2 ed., Editorial Amanuense, México D.F. 296 p.
- Ribas G., Sullarés 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.
- Rivero O., Rizo P. y Ponciano G. (2001). *Daños a la salud por plaguicidas*. El Manual Moderno, México, 488 p.
- Rojanapo W. y Tepsuwan A. (1992). Mutagenic and antimutagenic activities of some vegetables (in Thai). *Bull. Depart. Med. Ser.17*: 461-469.
- Rojas E., Montero R., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt M.E., Rodriguez R. y Ostrosky-Wegman P. (1992). Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing?. *Mutat. Res.* 282: 283-6.
- Ruberson J.R. (1999). *Handbook of Pest Management*. Marcel Dekker, Inc., USA, 842 p.

- Saiyed H., Dewan A., Bhatnagar V., Shenoy U.R., Rajmohan H., Patel K., Kashyap R., Kulkarni P., Rajan B. y Lakkad B. (2003). Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environ. Health Perspect.* 111: 1958-1962.
- Salehzadeh A., Jabbar A., Jennens L., Ley S.V., Annadurai R.S., Adams R. y Strang R.H. (2002). The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells. *Pest. Manag. Sci.* 58: 268-76.
- Salehzadeh A., Akhkha A., Cushley W., Adams R.L., Kusel J.R. y Strang R.H. (2003). The antimutagenic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 33: 681-689.
- Sánchez P.L.C., Reyes B.E., López C.L., Recio R., Morán M.J., Cebrián M.E. y Quintanilla V.B. (2004). Organophosphorus pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196: 108-113.
- Sandberg A.A. (1982). *Sister Chromatid Exchange*. Alan R. Liss, Inc., Nueva York, 706 p.
- Sandermann H. (1982). Metabolism of environmental chemicals: a comparison of plant and liver enzyme systems, En: *Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology*. (E.J. Klekoski, Ed.). Prager, Nueva York, Vol.1, pp. 1-32.
- Sandermann H. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.* 197: 183-194.
- Schmutterer H. (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 217-297.
- Schneider E.L. y Kram D. (1982). *In vivo* methods for detecting sister chromatid exchanges. En: *Sister chromatid exchanged*. (S. Wolff, Ed.). Wiley, Nueva York, pp. 229-242.

- SEMARNAP (1997). Estadística del Medio Ambiente. México, Capítulo 3: 268-272, 312-319.
- Shiraishi Y. y Sandberg A.A. (1982). Effects of cell fusion on mitomycin C induced SCE levels. *Cytobios* 33: 197-202.
- Sierra T.C.H., Cajas S.N., Hoyos L.S., Zuleta M., Whorton E.B. y Au W.W. (1998). *In vitro* and *in vivo* genotoxic activity of miral, an organophosphorus insecticide used in Colombia. *Mutat. Res.* 415: 59-67.
- Singh R.N., Karnan P., Kulshrestha V. y Shinha S.S. (1993). Neem to control pests of tasar. *Indian Silk* 32: 42-44.
- Sinha N., Adahikari N. y Saxena D.K. (2001). Effect of endosulfan during fetal gonadal differentiation on spermatogenesis in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10: 29-32.
- Snell K. y Mullock B. (1987). *Biochemical toxicology*. IRL Press, Washington D.C., 286 p.
- Sobti R.C., Krishan A. y Pfaffenberger C.D. (1982). Cytokinetic and cytogenetic effect of some agricultural chemicals on human lymphoid cells *in vitro*: organophosphates. *Mutat. Res.* 102: 89-102.
- Sobti R.C., Krishan A. y Davies J. (1983). Cytokinetic and cytogenetic effect of agricultural chemicals on human lymphoid cells *in vitro*. II. Organochlorine pesticides. *Arch. Toxicol.* 52: 221-31.
- Soderlund M.D., Clark J.M., Sheets L.P., Mullin L.S., Piccirillo V.J., Sargent D., Stevens J.T. y Weiner M.L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171: 3-59.
- Sogorb M.A. y Vilanova E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticidas through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128: 215-228.

- Song X., Seidler F., Saleh J., Zhang S., Padilla S. y Slotkin T. (1997). Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145: 158-174.
- Sterling T.M. (1994). Mechanism of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells. *Weed Sci.* 42: 263-276.
- Stumpf P.K. y Conn E.E. (1980). *The Biochemistry of plants. A comprehensive treatise.* (D.D. Davies, Ed.). Academic Press, Nueva York, Vol. 2, pp. 317-343.
- Sultatos L.G. (1994). Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health* 43: 271-289.
- Takehisa S. y Kanaya N. (1983). A comparison of *Vicia faba* root S10 and rat liver S9 activation of ethanol, maleic hydrazide and cyclophosphamide as measured by sister-chromatid exchange induction in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 124: 145-151.
- Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. (1988). Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on the induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 197: 195-205.
- Teschke K., Kelly S.J. y Wiens M. (1993). Concentration de organochlorine pesticides in the adipose tissue of British Columbia residents. *Rev. Canadian Sante Public.* 84: 192-196.
- Timbrell J.A. (1991). *Principles of Biochemical Toxicology.* 2<sup>a</sup> ed., Taylor y Francis, USA, 167 p.
- Timbrell J.A. (1995). *Introduction to Toxicology.* 2<sup>a</sup> ed., Taylor y Francis, USA, 167 p.

- Toft G., Hagmar L., Giwercman A. y Bonde J.P. (2004). Epidemiological evidence on reproductive effects of persistent organochlorines in humans. *Reproductive Toxicol.* 19: 5-26.
- Tomlin C. (1994). *The Pesticide Manual*, 10 th ed., British Crop Protection Council. Surrey UK. The Royal Society of Chemistry, Cambridge UK.
- Topham J.C. (1983). Chemical induced changes in sperm in animal and human. *Chem. Mutagen.* 8: 201-234.
- Tordoir W.F. y Van Sittert N.J. (1994). Organochlorines. *Toxicology* 91: 51-57.
- Usha R., Reddy O.S. y Reddy P.P. (1980). Mutagenicity studies involving aldrin, endosulfan, dimethoate, phosphamidon, carbaryl and ceresin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 277-282.
- Van Eerd L.L., Hoagland R.E. y Hall J.C. (2003). Pesticide metabolism in plant and microorganisms. *Weed Sci.* 51: 472-495.
- Velazquez A., Creus A., Yamena N. y Marcos R. (1984). Mutagenicity of the insecticida endosulfan in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 136: 115-118.
- Ware W.G. (1978). *The Pesticide Book*. W.H. Freeman and Company USA, 197 p.
- Warthen J.D., Stokes J.B., Jacobson M. y Kozempel M.P. (1984). Estimation of azadirachtin content in neem extract and formulations. *J. Liquid. Chromatog.* 7: 591-98.
- White A.D. (1980). In vitro induction of SCE in human lymphocytes by epichlorohydrin with and without metabolic activation. *Mutat. Res.* 78: 171-176.
- WHO (1993). *Methamidophos Health and Safety Guide N. 79*. World Health Organization, Ginebra.

- Wild D. (1975). Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutat. Res.* 32: 133-150.
- Williams M.T. (1992). Cytochrome P450. Mechanisms of action and clinical implications. *J. Fla. Med. Assoc.* 79: 405-8.
- Wolff S. (1974). Sister chromatid exchanges: the most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic, carcinogenic. *Expert. Conferece Oslo, Noruega*, pp. 11-13.
- Wolff S. (1982). *Sister chromatid exchange*. John Wiley and Sons, USA, 306 p.
- Wooder M.F. y Wright A.S. (1981). Alkylolation of DNA by organophosphorus pesticides. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 48: 51-55.
- Wyrobek A.J. y Bruce W.R. (1975). Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 4425-4429.
- Wyrobek A.J., Gordon L.A., Burkhart J.G., Francis M.W., Kapp R.W. Jr., Letz G., Malling H.V., Topham J.C. y Whorton M.D. (1983). An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 115: 1-72.
- Xia Y., Bian Q., Xu L., Cheng S., Song L., Liu J., Wu W., Wang S. y Wang X. (2004). Genotoxic effects on human spermatozoa among pesticide factory workers exposed to fenvalerate. *Toxicology* 203: 49-60.
- Zayed S.M.A.D., Fakhr I.M.I. y El-Magraby S. (1984). Some toxicological aspects of methamidophos exposure in mice. *J. Environ. Sci. Health B.* 19: 467-478.

## 9. CUADROS

CUADRO II. FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON PLAGUICIDAS<sup>a</sup>.

Tratamiento	$\bar{X}^b$	ICH	
		±	E.E.
Testigo	4.54	±	0.23
<b>MMC</b> mg/L			
0.033	18.12*	±	0.74
<b>Endosulfán</b> mg/L			
90	3.98	±	0.21
180	4.02	±	0.28
360	4.20	±	0.27
450	4.50	±	0.25
<b>Metamidofos</b> mg/L			
90	4.30	±	0.30
180	4.54	±	0.30
360	4.48	±	0.29
450	4.36	±	0.31
<b>Azadiractina</b> mg/L			
90	3.70	±	0.24
180	4.20		0.28
360	4.08	±	0.24
450	4.12	±	0.23
<b>Zeta-cipermetrina</b> mg/L			
90	3.80	±	0.22
180	3.92	±	0.20
360		NM	
450		NM	

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

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

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y cada concentración o tratamiento por análisis de varianza (ANOVA) F = 297.63, el valor de p < 0.001.

NM = No se completaron las 50 metafases

CUADRO III. CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR E ÍNDICES DE REPLICACIÓN (IR) Y MITÓTICO (IM) EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON PLAGUICIDAS<sup>a</sup>.

Tratamiento	Metafases			IR <sup>b</sup>	IM <sup>c</sup>
	1M	2M	3M		
Testigo	32	46	22	1.90	4.2
<b>MMC</b>					
mg/L					
0.033	56*	27*	17	1.61*	3.4
<b>Endosulfan</b>					
mg/L					
90	29	40	31	2.02	3.5
180	38	39	23	1.85	3.7
360	41	36	23	1.82	2.5*
450	59*	23*	18	1.59*	2.0*
<b>Metamidofos</b>					
mg/L					
90	41	36	23	1.82	5.4
180	51	32	17	1.66*	5.4
360	46	32	22	1.76*	4.8
450	66*	24*	10	1.44*	3.1
<b>Azadiractina</b>					
mg/L					
90	39	38	23	1.84	5.2
180	55	27	18	1.63*	4.3
360	58*	29*	13	1.55*	3.5
450	67*	19*	14	1.47*	1.6*
<b>Zeta-cipermetrina</b>					
mg/L					
90	42	32	26	1.84*	5.3
180	57*	25*	18	1.61*	4.0
360		NM			0.8*
450		NM			0.3*

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

<sup>b</sup> IR, n = 200 metafases consecutivas

<sup>c</sup> IM, n = 2000 células

\* Diferencias significativas entre el testigo y cada concentración con la prueba de  $\chi^2$  y  $p < 0.05$ .

NM = No se completaron las 200 metafases

CUADRO IV. FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH) EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON PLAGUICIDAS Y S9<sup>a</sup>.

Tratamiento	$\bar{X}^b$	ICH	
		±	E.E.
Testigo	4.80	±	0.31
CP	5.10	±	0.38
S9	4.28	±	0.28
CP+S9	38.42*	±	1.72
<b>Endosulfán</b>			
mg/L			
90	4.68	±	0.26
180	5.16	±	0.34
360	5.36	±	0.40
450	4.68	±	0.32
<b>Metamidofos</b>			
mg/L			
90	4.26	±	0.28
180	5.30	±	0.40
360	4.88	±	0.34
450	4.78	±	0.36
<b>Azadiractina</b>			
mg/L			
90	6.22	±	0.46
180	5.62	±	0.38
360	4.90	±	0.25
450	6.12	±	0.37
<b>Zeta-cipermetrina</b>			
mg/L			
90	4.32	±	0.23
180	4.72	±	0.25
360	4.00	±	0.19
450		NM	

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

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

\*Se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y cada concentración por análisis de varianza (ANOVA) F = 357.57, el valor de p < 0.001.

NM = No se completaron las 50 metafases

**CUADRO V. CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR E ÍNDICES DE REPLICACIÓN (IR) Y MITÓTICO (IM) EN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON PLAGUICIDAS Y S9<sup>a</sup>.**

Tratamiento	Metafases			IR <sup>b</sup>	IM <sup>c</sup>
	1M	2M	3M		
Testigo	19	45	36	2.17	2.6
CP	21	47	32	2.11	2.6
S9	20	43	37	2.17	2.3
CP+S9	24	48	28	2.04	2.0
<b>Endosulfán</b>					
mg/L					
90	18	47	35	2.17	2.7
180	23	44	33	2.10	3.0
360	31	34	35	2.04	1.9
450	31	38	31	2.00	2.5
<b>Metamidofos</b>					
mg/L					
90	20	48	32	2.12	2.2
180	25	43	32	2.07	2.1
360	24	42	34	2.10	2.6
450	22	53	25	2.03	2.4
<b>Azadiractina</b>					
mg/L					
90	23	49	28	2.05	2.0
180	15	53	32	2.17	2.8
360	16	53	31	2.15	3.5
450	21	49	30	2.09	2.7
<b>Zeta-cipermetrina</b>					
mg/L					
90	23	37	40	2.17	2.4
180	20	40	40	2.20	3.5
360	23	38	39	2.16	2.5
450			NM		0.5*

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

<sup>b</sup> IR, n = 200 metafases consecutivas

<sup>c</sup> IM, n = 2000 células

\* Diferencias significativas entre el testigo y cada concentración con la prueba de X<sup>2</sup> y p<0.05.

NM = No se completaron 200 las metafases

## 10. FIGURAS

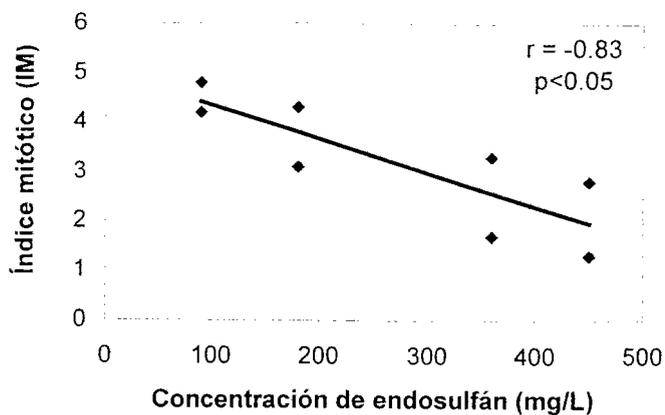


Fig. 5. Coeficiente de correlación ( $r$ ) significativo, del índice mitótico en linfocitos humanos expuestos al tratamiento con endosulfan por 48 horas.

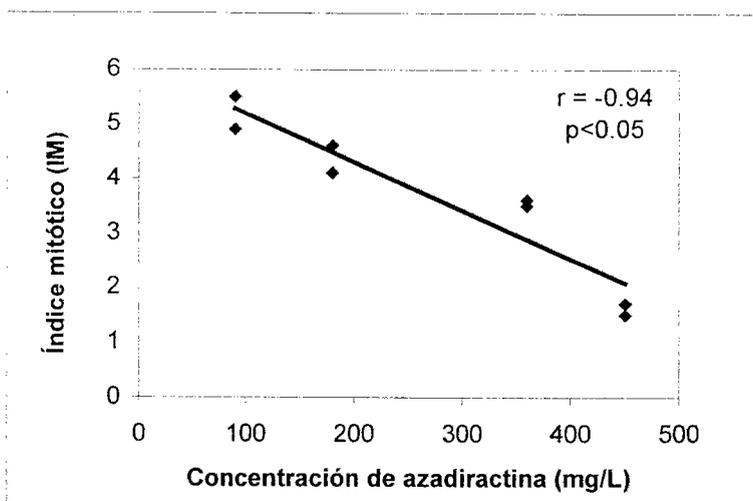


Fig. 6. Coeficiente de correlación ( $r$ ) significativo, del índice mitótico en linfocitos humanos expuestos al tratamiento con azadiractina por 48 horas.

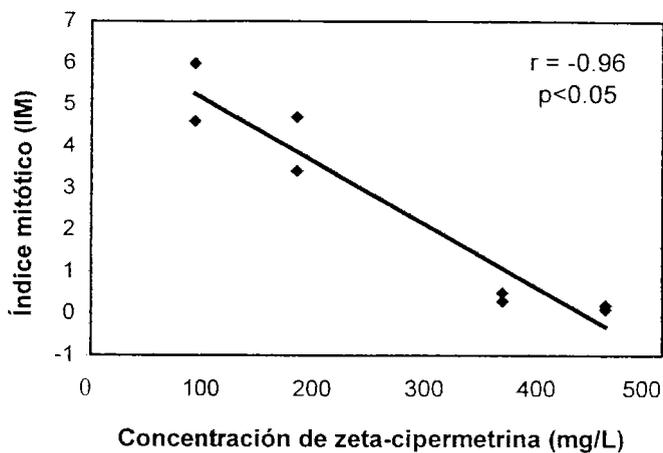


Fig. 7. Coeficiente de correlación ( $r$ ) significativo, del índice mitótico en linfocitos humanos expuestos al tratamiento con zeta-cipermetrina por 48 horas.

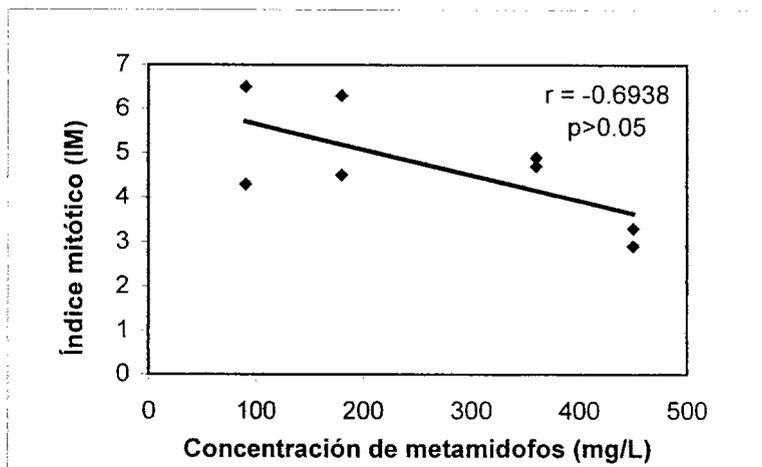


Fig. 8. Coeficiente de correlación ( $r$ ) no significativo, del índice mitótico en linfocitos humanos expuestos al tratamiento con metamidofos por 48 horas.