



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Genotoxicidad de los plaguicidas neem, endosulfan y la 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP) en linfocitos humanos *in vitro* por medio del ensayo cometa.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O
P R E S E N T A :
ANA VIANEY RIVERA SANTAMARÍA

TUTOR

DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA



MÉXICO, D.F.

2009



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Elena Calderón Segura, por su asesoría teórica, técnica y el tiempo dedicado para concluir este trabajo.

Agradezco a mis sinodales por sus valiosas correcciones y comentarios:

Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

M. en C. Ma. Isabel Rodríguez Romero

M. en C. Ignacio Fernández Méndez por su amistad, sus enseñanzas y valiosos comentarios para la realización de este trabajo.

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera

A la Facultad de Ciencias

DEDICATORIAS

A mis padres por creer en mí y permitir concluir una parte importante de mí vida. *¡Gracias!*

Con cariño a mis hermanas Jacqueline y Edith y a mi sobrino Zaid.

A mis abuelos Vicente y Marina por su amor y paciencia.

A mis amig@s: Christian, Ivone, Jorge, Julissa, Haydeé, Leidy, Lizeth, Paulina, Thelma y Vicky por su invaluable amistad y cariño.

Luisa por el apoyo técnico para la realización de este trabajo.

Para todas las personas que de alguna manea estuvieron involucradas para lograr una meta más en mí vida.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Genotoxicidad de los plaguicidas neem, endosulfan y la 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP) en linfocitos humanos in vitro por medio del ensayo cometa.

realizado por Rivera Santamaría Ana Vianey con número de cuenta 0-9725830-8 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Rafael Villalobos Pietrini

Propietario Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Propietario Dra. María Elena Calderón Segura
Tutora

Suplente M. en C. José Ignacio Fernández Méndez

Suplente M. en C. María Isabel Rodríguez Romero

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, D. F., a 20 de noviembre de 2008

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

ÍNDICE

RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	5
1. Clasificación de Plaguicidas	7
1.1. Organofosforados	7
1.2. Carbamatos	7
1.3. Piretroides	8
1.4. Triazinas	8
1.5. Plaguicidas de origen biológico	8
1.5.1. Neem	9
1.5.2. Toxicidad del Neem	10
1.6. Organoclorados	10
1.6.1. Endosulfan	12
1.6.2. Toxicidad del Endosulfan	12
1.7. Aminas Aromáticas	15
1.7.1. 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP)	17
1.7.2. Toxicidad de la NOP	17
1.7.3. Metabolismo de las aminas aromáticas	18
III. SISTEMAS DE EVALUACIÓN GENOTOXICA	18
1.1. ENSAYO COMETA	19
IV. JUSTIFICACIÓN	21
V. OBJETIVOS	22
VI. HIPÓTESIS	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	23
VIII. RESULTADOS	27
IX. DISCUSIÓN	29
X. CONCLUSIONES	34
XI. REFERENCIAS	35
XII. TABLAS	48
XIII. FIGURAS	51
XIV. ANEXO	60

Palabras clave: genotoxicidad, ensayo cometa, plaguicidas, neem, endosulfan, 4-nitro-o-fenilendiamina.

RESUMEN

Las pérdidas durante el desarrollo de los cultivos, precosecha y poscosecha son enormes problemas para los países desarrollados y subdesarrollados, incluyendo México. La producción y el uso de plaguicidas se ha incrementado en años recientes, los cuales están diseñados para controlar y erradicar patógenos del hombre, de los animales y de los cultivos agrícolas; su aplicación ha beneficiado a la agricultura; pero son fuente potencial de contaminación ambiental y su exposición puede tener consecuencias negativas en la salud humana.

En el presente estudio se investigaron los efectos genotóxicos de los insecticidas biológico neem y del organoclorado endosulfan, así como, la amina aromática 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NOP), en los linfocitos periféricos humanos *in vitro*, mediante el ensayo cometa alcalino. Los resultados demostraron que los dos insecticidas y la amina aromática son agentes genotóxicos en los linfocitos humanos *in vitro*, al aumentar significativamente la frecuencia de células con cometa y la longitud de la cauda del cometa. A concentraciones elevadas los tres compuestos químicos ocasionan severo daño al genoma. El análisis de la regresión lineal y no-lineal de los valores promedios de la longitud de la cauda del cometa y de la frecuencia de células con cometa de los dos insecticidas y de la NOP muestra una relación de concentración-efecto.

Al comparar el efecto genotóxico de la amina aromática y los dos plaguicidas, se observa que la NOP, induce mayor daño sobre el ADN que el neem y el endosulfan. Paralelamente, se analizó la viabilidad de los linfocitos antes y después del tratamiento con los dos insecticidas y la amina aromática. Los resultados demuestran que la viabilidad de los linfocitos expuestos a las diferentes concentraciones de los tres compuestos químicos no fue alterada con relación al testigo.

I. INTRODUCCIÓN

La incidencia de los insectos sobre la actividad humana es muy importante y desde este punto de vista se acostumbra a clasificar a los insectos en benéficos y perjudiciales, los primeros contribuyen al mantenimiento de los ecosistemas ecológicos, el segundo grupo provoca efectos negativos sobre el crecimiento y la producción de los cultivos agrícolas, en la salud humana y animal (Bellés 1988).

La Segunda Guerra Mundial marcó el inicio de la producción de los plaguicidas sintéticos. A partir de entonces, la combinación de sus principios activos, ha dado origen a miles de formulaciones que se venden en el mercado para combatir insectos (Rivero et al. 2001).

Los plaguicidas son sustancias muy utilizadas en los campos agrícolas como herbicidas, nematocidas, fungicidas e insecticidas, entre otros. Los insecticidas se aplican en animales y seres humanos para controlar y erradicar vectores de enfermedades, sin embargo, han tenido efectos negativos derivados del uso inadecuado y excesivo, ya que afectan a los ecosistemas debido a su persistencia en el ambiente, aumentando la mortalidad de la flora y la fauna, contaminando suelos, aguas (continentales, mantos freáticos) y creando resistencia en los organismos plaga (Bolognesi 2003).

El consumo de los plaguicidas en los países desarrollados se ha hecho tan extenso que esta íntimamente ligado a la calidad de vida y bienestar de la sociedad, igualmente se han empleado como armas químicas en las guerras, como aditivos del petróleo, de disolventes, en la industria de colorantes, barnices, aislantes eléctricos, entre otros (Cortés-Eslava 2002).

Aproximadamente 4000 formulaciones de plaguicidas son aplicadas en todo el mundo en la agricultura y en la medicina humana y veterinaria (Tardiff 1992, He 1999), los plaguicidas son generados en cantidades masivas, se ha estimado que entre 1943 y 1974 la producción mundial de DDT alcanzó 2.8×10^9 kg (Stenersen 2004). En 1996, las ventas fueron de 2600 millones de dólares en América Latina, que representa 9 % del total de los agroquímicos en el mundo, se prevé que el mercado de plaguicidas sintéticos se cuadruplicará para el siguiente siglo. A nivel mundial el uso de herbicidas es 47.5 %, insecticidas es 29.5 %, fungicidas 17.5 % y otros es 5.5 % (Gupta 2004).

Centroamérica tiene los niveles más altos de las importaciones de insecticidas *per capita* en el mundo (Bejarano 2003).

En México, como en muchos países en desarrollo, aún prevalece la práctica indiscriminada y no controlada de estos compuestos, es importante resaltar que la introducción de estos agentes químicos en nuestro país se dio originalmente en un contexto caracterizado por la falta de una legislación adecuada para vigilar los problemas que pudieran surgir y por ignorancia generalizada de las autoridades y sociedad sobre las posibles consecuencias indeseables en la salud y en el ambiente (Rivero et al. 2001).

En 1986 se vendieron en México 60 mil toneladas de plaguicidas, los más comercializados fueron los organofosforados (67 % de las ventas) y los organoclorados (15 %). El mercado con mayor incremento son los insecticidas con más de un tercio del volumen de importación al país (Rivero et al. 2001).

En México no hay estadísticas confiables sobre el total de intoxicaciones que se producen por los insecticidas, debido a que no se reportan y cuando se registran no se exige que se identifique el tipo de plaguicida causante de la intoxicación (Bejarano 2003). De los 12 plaguicidas de mayor consumo en México no hay uno sólo que esté libre de sospecha de causar efectos crónicos graves en la salud o alteraciones en los sistemas nervioso, inmunológico y hormonal (Bejarano 2003).

Los plaguicidas, están constituidos de uno o más ingredientes activos y otros componentes químicos con diversas presentaciones como disolventes, emulsificantes y amortiguadores, entre otros (Tardiff 1992, Bolognesi 2003, Cox y Surgan 2006); son por definición “sustancias tóxicas” diseñadas para afectar procesos biológicos y causar la muerte de los organismos blanco y no blanco incluyendo a los seres humanos (Bejarano 2003), pero tienen efectos benéficos como en la producción de alimentos y fibras, asegurando la producción agrícola entre otros (Stenersen 2004).

II. ANTECEDENTES

La población en general está expuesta a plaguicidas, a través de la piel, los ojos, la nariz y boca ya sea por exposición ocupacional, a los residuos y a productos de degradación física y biológica que se encuentran en el aire, agua y alimentos (Bejarano 2003, Bolognesi 2003, Grover et al. 2003, Bhalli et al. 2006, Jurewicz et al. 2006).

Muchos plaguicidas son tóxicos, pero el grado de daño depende de su estructura química, de la dosis, del tiempo de exposición y de la etapa de la vida de la persona; son responsables de envenenamientos agudos, en ciertos casos causan ceguera y algunos están asociados con la manifestación de diversas enfermedades (Rupa et al. 1991), en la inducción de malformaciones congénitas, de alteraciones cromosómicas o daño al ADN (Zeljezic y Garaj 2002, Grover et al. 2003), son disruptores endócrinos y están relacionados con desórdenes reproductores (Chalubinski y Kowalski 2006) y en el desarrollo de cáncer (Gupta 2004, Maroni et al. 2006).

La exposición a los plaguicidas en etapas iniciales de la vida, particularmente durante periodos fetal e infancia, pueden tener severos efectos en la salud de los niños y los adolescentes, ocasionando gran riesgo en la manifestación de malformaciones congénitas, enfermedades en los órganos, alteraciones inmunológicas, endócrinas, neuronales y cáncer (Garry 2004, Jurewicz et al. 2006).

El riesgo al cáncer en los agricultores depende de muchos factores tales como: el tiempo de exposición, al espacio del cultivo agrícola, la falta de conocimientos de los efectos nocivos y de las medidas de seguridad a los agroquímicos empleados (Fucci et al. 1997). Datos epidemiológicos muestran asociación entre la exposición a los plaguicidas y el incremento del cáncer de páncreas, hígado, pulmón (Hartge et al. 2005).

Estudios realizados en agricultores mexicanos y en sus hijos que laboran en las zonas agrícolas de California han evidenciado gran incidencia de leucemias, cáncer pulmonar e inmunosupresión. Otro estudio realizado en jóvenes que aplican plaguicidas organofosforados y carbamatos en los cultivos de tabaco en Sinaloa, observan la disminución de los niveles de la enzima acetilcolinesterasa, lo cual sugiere gran riesgo para el funcionamiento normal del sistema nervioso (Gamlin et al., 2007).

Los plaguicidas son agentes químicos, biológicamente activos que pueden interactuar con moléculas celulares como lípidos, proteínas y el genoma. El daño sobre la estructura del ADN puede ser crítico para ejercer efectos mutagénicos y/o carcinogénicos (Kornuta et al. 1996). Pero otros agroquímicos no son activos por sí mismos, ya que requieren de la activación metabólica animal o vegetal para inducir daño al ADN por medio de una gran variedad de enzimas del metabolismo que incluyen a los citocromos P450 (CYP450), las peroxidas y las glutathion-S-transferasas (Oesch y Oesch 2004, Calderón-Segura et al. 2007). Los plaguicidas han sido objeto de amplia investigación con el fin de evaluar el daño que inducen en los sistemas biológicos para tener mayores medidas de seguridad en su uso y/o aplicación en los campos agrícolas y en los animales (Bolognesi 2003).

Actualmente la gran aplicación de los plaguicidas, está siendo causa de preocupación debido a su impacto sobre la salud humana, animal y a los ecosistemas. Este interés se está dando principalmente en los países industrializados, en donde se desarrollan diversas pruebas toxicológicas en seres humanos, animales, plantas, en células *in vitro* y realizan un biomonitorio ambiental para determinar los riesgos de estas sustancias, pero desafortunadamente en América Latina estos estudios son limitados (Rivero et al. 2001). Gómez-Arroyo et al. (2000), reportan la inducción de intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos periféricos en cultivo de floricultores del estado de Morelos; Márquez et al. (2005) informan asociación entre la exposición a los organoclorados y aumento de enfermedades pulmonares y de piel, siendo las más frecuentes el asma y la dermatitis en los niños e incrementos significativos de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica de agricultoras y agricultores expuestos a mezclas de plaguicidas.

1. Clasificación de los plaguicidas

Se utilizan diferentes tipos de clasificaciones para los plaguicidas, debido a la amplia cantidad de sustancias y combinaciones de los compuestos. Con frecuencia, estos productos se catalogan según su uso en insecticidas, acaricidas, herbicidas, nematocidas, fungicidas, molusquicidas y rodenticidas (Rivero et al. 2001).

Sin embargo, la manera más frecuente de clasificarlos es con base en su estructura química, por lo que de acuerdo a la Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes (AMIPFAC 1985) se agrupan en:

1.1. Organofosforados

Son muy tóxicos por el hecho de inhibir a la enzima acetilcolinesterasa, que modula la cantidad o los niveles del neurotransmisor acetilcolina, interrumpiendo el impulso nervioso a nivel de la sinapsis de vertebrados e insectos (Narahashi 1996, Sogorb y Vilanova 2002). 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, Sogorb y Vilanova 2002, Pimentel et al. 2006).

Estos compuestos son los más utilizados en la agricultura mexicana ya que son menos persistentes en el ambiente y en los alimentos que los organoclorados, la mayoría son insecticidas y también acaricidas, en general actúan por contacto y por ingestión (Díaz 2004).

1.2. Carbamatos

El grupo químico de éstos corresponde a ésteres derivados de los ácidos N-metil o dimetil carbámico y comprende más de 25 compuestos que se emplean como insecticidas y algunos como fungicidas, herbicidas o nematocidas. Son menos persistentes que los organofosforados y de igual manera que éstos inhiben a la acetilcolinesterasa (Sogorb y Vilanova 2002, Pimentel et al. 2006).

1.3. Piretroides

Tienen su origen en el hallazgo de los insecticidas naturales derivados del extracto de piretro (obtenido de las flores de crisantemo), conocidos como piretrinas (Pascual-Villalobos 1996), con un anillo dimetilciclopropano con un radical variable que corresponde al ácido crisantémico y a veces a un grupo ciano, posteriormente se obtuvieron en forma sintética (Sogorb y Vilanova 2002).

1.4. Triazinas

El término “triazinas” es tradicionalmente usado por la EPA-USA, para referirse principalmente a un grupo de tres plaguicidas: atrazina, simazina y cianazina, aunque otros plaguicidas o metabolitos de plaguicidas que contienen un grupo s-triazina se incluyen dentro de esta categoría (EPA 2002). Destacan entre los herbicidas más empleados en Estados Unidos de América y en México (Bayer 1994, CIBA-GEIGY Mexicana 1996, Flores-Maya 2000, Pimentel et al. 2006), son poderosos inhibidores de la fotosíntesis y corresponden a sustancias que poseen anillos de seis miembros que contienen tres nitrógenos heterocíclicos (Flores-Maya 2000).

1.5. Plaguicidas de origen biológico

Los insecticidas biológicos, se obtienen de diversas plantas, ofrecen una alternativa segura para controlar a los insectos plaga, tienden a desplazar a los plaguicidas sintéticos por sus efectos negativos en la salud (Scott et al. 2005). Los humanos han usado estos productos naturales por milenios en la medicina (Schaaf et al. 2000) y en la industria como por ejemplo el neem (Bellés 1988, Schaaf et al. 2000). Existe gran diversidad en las interacciones insecto-planta que regulan la resistencia o la susceptibilidad, se ha comprobado que los metabolitos secundarios son mucho más importantes para conferir resistencia, al afectar el comportamiento y la fisiología de estos organismos (Bellés 1988).

1.5.1. Neem

Es un plaguicida de origen biológico, obtenido del árbol del Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) de la familia Meliaceae, es originario de la India, es uno de los más ricos en metabolitos secundarios, más de 300 productos naturales han sido aislados de diferentes partes del árbol, de estos compuestos los limonoides son los más abundantes (Schaaf et al. 2000). Todas las partes del árbol tienen diferentes usos en la medicina, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, respiratorias, urinarias, hepáticas, neurales, reproductoras y cáncer (Brahmachari 2004).

Entre los compuestos activos del neem se encuentra la azadiractina (Fig. 1), que es un tetranortriterpeno del tipo limonoide que se ha aislado de las semillas, aunque se encuentra en pequeñas concentraciones en todo el árbol, este compuesto inhibe la ecdisis de insectos (Bellés 1988, Pascual-Villalobos 1996), es uno de los inhibidores más potentes de la alimentación de insectos y altera la metamorfosis de varias especies (Schaaf et al. 2000), su efecto es proporcional a la dosis aplicada, actúa alterando la producción de los ecdiesteroides, mediante una interferencia neuroendocrina (Bellés 1988).

Gran variedad de insecticidas derivados de las semillas del Neem son comercialmente disponibles cuyas concentraciones de azadiractina y triterpenoides pueden variar (Schaaf et al. 2000).

En México comercialmente se pueden encontrar productos a base de Neem (Neem Oil®) con amplia eficiencia para el combate de varias plagas que eventualmente son usados como agentes agroecológicos. Desde hace más de 3 años se introdujo el extracto acuoso del árbol del Neem (*A. indica*) en Apatzingan, Michoacán; sus usos son artesanal y como insecticida (Bejarano 2003).

1.5.2. Toxicidad del Neem

Se ha sugerido que la estructura química de la azadiractina puede tener actividad genotóxica y carcinogéna, por lo que debe ser comprobado experimentalmente (Rosenkranz y Klopman 1995), el extracto de la flor muestra actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium* cepa TA98 (Rojanapo y Tepsuwan 1992), el extracto etanólico de la hoja induce alteraciones en la mitosis y aberraciones cromosómicas en células de medula ósea de ratón suizo albino (Awasthy et al. 1999), ocasiona cambios cromosómicos estructurales y numéricas en espermatoцитos de ratón (Awasthy 2001, Khan y Awasthy 2003) y el extracto acuoso del neem tiene actividad de espermicida en seres humanos, *in vitro* (Khillare y Shirivastav 2003).

La azadiractina de la semilla produce daño en el ADN de células Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (Rembold y Annadari 1993). El aceite de las semillas del neem inhibe la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa y las ATPasa de Na(+)-K+, Mg²⁺ y Ca²⁺ en cerebro de ratas (Rahman et al. 1999), es tóxica para invertebrados acuáticos así como en peces (Goktepe et al. 2004, Kreutzweiser et al. 2004), es citotóxica e induce micronúcleos en líneas celulares de glioblastoma humano (Akudugu et al. 2001), es un anticonceptivo masculino de gran efectividad, causa cambios histológicos y bioquímicos en testículo, con malformaciones espermáticas y actividad de espermicida, así como aberraciones estructurales y numéricas en cromosomas de espermatoцитos de rata (Khillare y Shivastav 2003); es citotóxica y genotóxica en las células Kc167 de *Drosophila* (Robertson et al. 2007).

1.6. Organoclorados

En 1940 inicia con gran éxito su producción, empleo y aplicación tanto por su efectividad como por el bajo costo de su elaboración. No obstante de 1960 a la fecha su uso se ha restringido debido a que son muy estables y persistentes en el ambiente, tienden a acumularse en el tejido adiposo, la exposición es principalmente por contacto o ingestión (Lauwerys y Hoet 2001, Waliszewski et al. 2004). Se caracterizan por tener

uno o más átomos de cloro unidos covalentemente a uno o dos anillos de hidrocarburos (Kamrin 1997).

En seres humanos el órgano blanco de estas sustancias o de sus metabolitos lo constituye el sistema nervioso central, alteran las propiedades electrofisiológicas y enzimáticas de las membranas de las neuronas, primordialmente a nivel del axón, causando alteración en la cinética del flujo de Na⁺ y K⁺ a través de la membrana de la célula nerviosa (Narahashi et al. 1992), dando como resultado la propagación de múltiples potenciales de acción para cada estímulo (Kamrin 1997, Ferrer 2003), provocando entre otros síntomas convulsiones. Cuando ocurren intoxicaciones agudas se produce la muerte por paro respiratorio (Tordoir y Van Sittert 1994, Pimentel et al. 2006). También inhiben la actividad de la ATPasa-Ca²⁺ en membranas de eritrocitos humanos *in vitro* (Janik y Wolf 1992).

Los insecticidas organoclorados tienen pesos moleculares en el rango de 300-550 Da (Karatat et al. 2006), son empleados tradicionalmente en la lucha contra insectos de interés agrícola, forestal o médico veterinario, agrupan a compuestos sintéticos liposolubles que son rápidamente absorbidos por rutas distintas; tienen gran estabilidad físico-química; tienden a acumularse en los organismos y en el cuerpo humano por mucho tiempo. Los residuos y/o sus metabolitos se pueden determinar en orina, suero y/o plasma, en tejidos de animales, en frutas y vegetales comestibles (Lauwerys y Hoet 2001). Debido a su persistencia en el ambiente y en el agua son de gran riesgo para la salud, algunos insecticidas han sido prohibidos y restringidos por ejemplo: endrin, aldrin, dieldrin, clordano, DDT, etc.) pero en países de América Latina continúan utilizándose para el control de vectores de enfermedades endémicas (Rivero et al. 2001).

Se ha demostrado que ciertos organoclorados son genotóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos en animales (Chaudhuri et al. 1999). La exposición a los organoclorados es un factor de riesgo en la incidencia de linfomas de Non-Hodgkin (Hartge et al. 2005) y cáncer de mama (Charlier y Dejardin 2007).

1.6.1. Endosulfan

El endosulfan (Thiodan 35 CE), (fig. 2), es un insecticida organoclorado que pertenece al grupo de los ciclodianos (Lu et al. 2000, Pandey et al. 1990b), (6-7-8-9-10-10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepín-3-óxido).

El endosulfan comercial es una mezcla de dos isómeros el 80 % de α -endosulfan y 20 % β -endosulfan (Lauwerys y Hoet 2001). Es muy estable en el suelo y en el cuerpo de los organismos, tiene vida media larga que implica gran peligro para la salud (Pandey et al. 1990b), el endosulfan se clasifica en la categoría IB (muy peligroso) y II, moderadamente peligroso (Usha y Harikrishnan 2005).

1.6.2. Toxicidad del Endosulfan

El endosulfan fue introducido en el ambiente en 1956 como insecticida para los cultivos de té, frutas, vegetales comestibles y granos, en la actualidad es uno de los plaguicidas más asperjados en todo el mundo (Lu et al. 2000), la EPA, lo clasifica como un contaminante de prioridad, es usado para el control de un amplio espectro de insectos patógenos (Rivero et al. 2001, Neuparth et al. 2006), en México, se aplica principalmente en los cultivos de maíz, sorgo, café, cocoa, algodón, lechuga, tomate, arroz, entre otros (COP 1998, Bejarano 2003); es usado para erradicar ectoparásitos de animales, de cosechas comestibles y no comestibles y de maderas (Lu et al. 2000).

Cuando es aplicado en los campos agrícolas; es transportado por aire y agua, puede viajar largas distancias y depositarse en diferentes ecosistemas y en animales (Bejarano 2003); al unirse a las partículas del suelo aumenta su bioacumulación; es muy tóxico para el fito y zooplancton, peces, anfibios y moderadamente tóxico para aves, mamíferos incluyendo al ser humano (Chaudhuri et al. 1999); disminuye la reproducción y crecimiento de peces y crustáceos e induce severas lesiones en células del epitelio respiratorio (Navqui y Vaishnavi 1993, Wan et al. 2005, Neuparth et al. 2006); en mamíferos es un potente disruptor endócrino (Saiyed et al. 2003, Scippo et al. 2004); es neurotóxico y produce toxicidad en riñón (Singh y Pandey et al. 1989b,

Chaudhuri et al. 1999). Su uso inadecuado e incontrolado ha tenido como consecuencias varias intoxicaciones, envenenamientos y muertes de personas y de animales, con la producción de cambios histopatológicos en hígado, riñón y cerebro; los síntomas de toxicidad son: dolores renales, de cabeza y abdominales, náuseas, vómito, taquicardia, convulsiones, temblor, confusión mental y diarrea (Blanco-Coronado et al. 1992, Navqui y Vaishnavi 1993, Chugh et al. 1998, Karatas et al. 2006). En intoxicaciones agudas ocasiona edema pulmonar y cerebral, insuficiencia respiratoria y cardiaca (Eyer et al. 2004).

Singh y Pandey et al. (1989b), evidencian en riñón de ratas machos con administración intraperitoneal de 7.5 y 10 mg/kg de peso corporal de endosulfan durante 15 y 30 días, inhibición de la actividad de las oxidasas microsómicas y peroxidación de los lípidos de membrana. Singh y Pandey et al. (1989a) reporta alteración hormonal en las gónadas masculinas de rata con exposición crónica al endosulfan. Pandey et al. (1990a), Dalsenter et al. (1999) y Sinha et al. (2001), observan bloqueo de la espermatogénesis, con disminución en la producción de espermatozoides en testículo de rata expuestas al endosulfan. Fransson-Steen et al. (1992), muestra en ratas tratadas con endosulfan la formación de tumores hepáticos.

Blanco-Coronado et al. (1992), evidencian en individuos ocupacionalmente expuestos al endosulfan incremento de las enzimas microsómicas hepáticas, con cambios histopatológicos en hígado y disminución de plaquetas. Chugh et al. (1998), observan aumento de micronúcleos en leucocitos humanos expuestos al endosulfan *in vitro*. Dalsenter et al. (2003), muestran con 3.0 mg/kg de endosulfan administrado intraperitonealmente a ratas Wistar machos, alteraciones en el ciclo del epitelio seminífero con reducción en la cantidad y la viabilidad de espermatozoides. Broomhall (2003), reporta efectos tóxicos en renacuajos de *Litora freycineti* expuestos en aguas contaminadas con endosulfan (Broomhall 2003).

La actividad genotóxica del endosulfan fue controvertida durante décadas, pero actualmente está comprobado que es mutagénico en *Salmonella typhimurium* con y sin activación metabólica animal (Chaudhuri et al. 1999, Antherieu et al. 2007) y en *Escherichia coli*, en las levaduras *Saccharomyses cerevisae* (Yadav et al. 1982) y en mamíferos (Antherieu et al. 2007, Pandey et al. 1990a). El endosulfan ocasiona daño al ADN en linfocitos humanos *in vitro* (Sobti et al. 1983, Jamil et al. 2004), los isómeros

alfa y beta endosulfan producen aumento de intercambios de cromátidas hermanas, micronúcleos y fragmentación del ADN en células HepG2 humanas (Lu et al. 2000), es mutagénico y clastogénico en células de mamíferos e inmunosupresor (Abadin et al. 2007), induce alteraciones en la cinética de proliferación de células nerviosas (Kang et al. 2001), causa aberraciones cromosómicas en células germinales de ratón (Pandey et al. 1990a), provoca mutaciones ligadas al sexo en *Drosophila* (Velázquez et al. 1984), mutaciones letales dominantes en ratas y es carcinogénico en hígado de ratones hembras (Reuber 1981). Causa daño al ADN de hepatocitos y células de riñón en peces teleósteos (Pandey et al. 2006; Sharma et al. 2007); en ratas de ambos sexos produce neoplasmas malignos e induce linfomas y en ratas hembras neoplasmas en el aparato reproductor. Es sospechoso de producir cáncer en seres humanos en exposiciones crónicas ya que varios estudios han evidenciado estimulación en la proliferación de células MCF7 de cáncer de mama (Suzuki et al. 2001).

Neuparth et al. (2006), demostró que concentraciones de 1.0 a 0.5 µg/L de endosulfan son genotóxicas en el pez teleósteo *Sparus aurata*. Recientemente se ha corroborado el efecto mutagénico del endosulfan, sus isómeros y sus metabolitos (sulfato, lactona, éter e hidroxietér), con el ensayo de Ames e inducción del daño al ADN en linfocitos humanos y en células CHO *in vitro* (Bajpayee et al. 2006), activa la apoptosis en células de neuroblastoma SH-SY5Y *in vitro* (Jia y Misra 2007); es teratogénico en ratas Wistar (Singh et al. 2007).

Mecanismo de acción

La exposición al endosulfan ocurre principalmente al ingerir alimentos contaminados (Bejarano 2003), es absorbido por inhalación y a través del tracto gastrointestinal, penetra por la piel y se elimina rápidamente del cuerpo vía excreción fecal y urinaria, provocando incremento en la respiración y en la temperatura corporal. El endosulfan en insectos y mamíferos es metabolizado rápidamente a los productos sulfato-endosulfan, diol-endosulfan, éter-endosulfan, hidroxietér, lactona-endosulfan y acetona (Dubey et al. 1984, Lauwerys y Hoet 2001), estos intermediarios metabólicos interactúan con los lípidos de membrana de las mitocondrias desacoplando la

fosforilación oxidante e inhibiendo la cadena de transporte de electrones, pero el sulfato-endosulfan es el más tóxico (Dubey et al. 1984).

Posiblemente el endosulfan, por ser lipofílico como otros organoclorados interactúe con proteínas extracelulares produciendo cambios en su permeabilidad (Dubey et al. 1984), con modificación en la concentración de las enzimas acetilcolinesterasa, fosfatasas y glutatión S-transferasas (Neuparth et al. 2006).

1.7. Aminas aromáticas

Las aminas aromáticas representan una clase de agentes químicos muy importantes en la economía industrial como aditivos de los tintes, que data desde hace 4000 años; se encontraron residuos del pigmento sobre el cabello teñido de las momias egipcias, así como en la época del Imperio Romano. Actualmente millones de personas en todo el mundo utilizan los tintes del cabello, los cuales tienen un importante papel en la calidad de vida (Nohynek et al. 2004).

Los ingredientes o productos químicos que componen los tintes del cabello son los pigmentos, los preservadores, los oxidantes, los metales pesados y otros. Las sustancias de los tintes del cabello se han clasificado en tres categorías: para-fenilendiaminas, para-toluenodiaminas y los resocinoles, todos son peligrosos para la salud humana ya que producen toxicidad reproductora (Categoría III), son potentes agentes mutagénicos, carcinógenos y hemotóxicos (Vineis y Pirastu 1997, Benigni 2004, Nohynek et al. 2004).

Las para-fenilendiaminas son compuestos amino aromáticos policíclicos y monocíclicos, han tenido una mala imagen, desde que Rehn en 1985, las describió como inductoras de cáncer de vejiga en trabajadores de una fábrica del tinte en Suiza (Programa Nacional de Toxicología 1979, Hatch y Colvin 1997, Nohynek et al. 2004). La exposición a estos compuestos ocurre en diferentes actividades industriales y agrícolas así como al fumar tabaco (Benigni 2004), en ciertos tipos de cocción de alimentos ricos en proteínas (Hatch et al. 1991, Nieva et al. 2005, Saito et al. 2006), son usadas como componentes de los plaguicidas, de plásticos (Weisburger 1988) y son productos de degradación de muchos agroquímicos (Lamoreux y Frear 1979).

Las principales rutas de exposición a las aminas aromáticas son cutánea y pulmonar. La exposición dérmica de la anilina, nitroanilina, 4,4'-metilenedianilina, toluidina, 4,4'-metileno-bis (2-cloroanilina) ó MOCA, fenilendiamina, benzidina, (di)nitrobenceno, etc., son de gran riesgo al desarrollo del cáncer, debido a que son rápidamente absorbidas y metabolizadas por la piel (Hatch y Colvin 1997, Vineis y Pirastu 1997, Lauwerys y Hoet 2001).

La Agencia Internacional de Pruebas de Control de Sustancias Tóxicas (APTCS por sus siglas en inglés) recomienda analizar sus efectos toxicológicos por el gran uso en la población humana (Hatch y Colvin 1997).

Los principales efectos adversos de las exposiciones a dosis agudas de las fenilendiaminas en el hombre y animales son edema angioneurótico guiando a estrés agudo respiratorio; necrosis del músculo esquelético y como consecuencia de fallo renal agudo (Saito et al. 1990), atrofia del nervio óptico resultando pérdida parcial de la visión (Yagi et al. 1996).

Estudios epidemiológicos indican asociación entre la exposición a las aminas aromáticas y el incremento de cáncer de vejiga (Nohynek et al. 2004) y de ovario (Hatch y Colvin 1997), son mutagénicas en *Salmonella typhimurium* con el ensayo de Ames (Ames et al. 1975). Durante más de tres décadas Ames y colaboradores han demostrado el efecto mutagénico de más 33 aminas aromáticas y 16 de ellas son carcinogénicas en rata y ratón (Sabih y Tenant 1991, Nohynek et al. 2004), producen translocaciones cromosómicas y mutaciones letales dominantes en ratas (Burnett et al. 1981), incrementan la incidencia de micronúcleos en médula ósea y en esplenocitos de ratón (Adler et al. 1996, Benning et al. 1994), las aminas aromáticas como la benzidina, 4-aminobifenil y la 4,4'-metileno-bis (2-cloroanilina), forman aductos de ADN en células uroteliales de vejiga humana (Vineis y Pirastu 1997, Murata et al. 2001); son positivas en los ensayos de linfoma (TK+/-) de ratón y de transformación celular (Burnett y Corbett 1987, Nohynek et al. 2004).

1.7.1. 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP)

La 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP, figura 3), es una amina aromática monocíclica derivada de la anilina; es descrita como no carcinogénica por el Instituto Nacional de Cáncer de EUA y por el Programa Nacional 1979; pertenece al grupo de las fenilendiaminas. La NOP, es el aditivo más abundante de los tintes para la piel y el cabello. Se emplea como modelo en los estudios de activación metabólica de anilinas por sistemas enzimáticos de plantas y animales (Soler-Niedziela et al. 1991, Gichner et al. 2001, Cortés-Eslava et al. 2001, 2002, 2004).

1.7.2. Toxicidad de la NOP

Estudios realizados en ratas Fischer 344 y ratones B6C3F1, expuestos a la NOP, muestran asociación entre la incidencia de tumores (Soler-Niedziela et al. 1991). La NOP es mutagénica en *Salmonella typhimurium* cepas TA100, TA98, TA104, TA1538, TA4001 y TA406 (Chen et al. 1997, Nohynek et al. 2004, Nieva et al. 2005) y en células de *Nicotiana tabacum* (Gichner et al. 2001, Cortés-Eslava et al. 2002, 2004).

La NOP, es teratógena en ratones (Marks et al. 1981), produce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila* (Lee et al. 1983, Natarajan y Obe 1986, Batiste-Alentorn et al. 1995), induce recombinación mitótica en levaduras (Natarajan y Obe 1986), provoca aberraciones cromosómicas en cultivo de células de mamífero (Shelby y Stasiewicz 1984), incrementa el desarrollo de linfomas en ratón (Nohynek et al. 2004), esta asociada con el aumento de cáncer en glándula mamaria y de vejiga, mieloma múltiple y hematopoyético y linfoma de Non-Hodgkin's en trabajadores ocupacionalmente expuestos a esta clase de amina (Thun et al. 1994).

1.7.3. Metabolismo de las aminas aromáticas

Las aminas aromáticas requieren de la activación enzimática animal o vegetal para incrementar su acción genotóxica, sus metabolitos son muy reactivos con los ácidos nucleicos (Hatch et al. 1991), esta actividad es principalmente por los metabolitos electrofílicos que se unen a los sitios nucleofílicos del ADN y de proteínas (Hatch et al. 1991, Lauwerys y Hoet 2001). En el metabolismo de las aminas aromáticas las principales reacciones de biotransformación, son N-acetilación y oxidación de los anillos de carbono por las proteínas citocromo P-450 (CYP450), formando fenólicos, o-glucuronidos y o-sulfatos que son excretados en la bilis y orina, estos intermediarios metabólicos son mas tóxicos que la molécula original y están implicados en el proceso de iniciación del cáncer (Lauwerys y Hoet 2001).

III. SISTEMAS DE EVALUACION GENOTOXICA

Con el fin de detectar los efectos genotóxicos provocados por una gran variedad de mutágenos ambientales se han desarrollado diversos sistemas de evaluación del daño genético como las aberraciones cromosómicas, los intercambios de cromátidas hermanas, los micronúcleos y recientemente el ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina (Speit y Hartmann 1999, Tice et al. 2000).

El mantenimiento de la integridad del ADN es vital para la protección de la diversidad genética en poblaciones naturales (Neuparth et al. 2006), por lo que el daño al ADN es considerado como uno de los principales eventos de iniciación de enfermedades como cáncer y este efecto puede ser debido a factores químicos, físicos y biológicos; estas modificaciones en la estructura del ADN pueden ser cambios en un sitio de una base o pérdida de éstas (sitiosapurínicos y apirimídicos), entrecruzamiento de cadenas de ADN, cruzamientos de proteínas y ADN ó bien rompimientos de una o dos hebras (Stenersen 2004).

El biomonitoreo humano es un sistema de detección temprano que identifica el potencial a enfermedades genéticas y cáncer en poblaciones expuestas, también puede usarse para identificar factores de riesgo en un tiempo cuando las medidas de control pueden aun ser implementadas. La electroforesis unicelular alcalina o ensayo

cometa es una de las técnicas genéticas más aplicadas, la cual permite analizar el daño sobre el ADN en células, tejidos y órganos de personas, animales y plantas expuestos a diversos contaminantes ambientales (Lauwerys y Hoet 2001, Bhalli et al. 2006).

1.1. ENSAYO COMETA

El ensayo cometa se emplea en estudios ocupacionales y tiene gran eficacia para evaluar los efectos genotóxicos de plaguicidas, en poblaciones humanas, en plantas y en animales (Bolognesi et al. 2003, Grover et al. 2003, Bhalli et al. 2006). Las modificaciones de ésta técnica, han permitido la detección de diferentes rompimientos en una o doble cadena del ADN, en los sitios lábiles al álcali y en procesos de reparación del ADN o muerte celular programada (Singh et al. 1988, Tice et al. 2000).

El ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina, es un procedimiento apropiado como marcador de efecto para el monitoreo de sujetos expuestos a cualquier agente químico y físico (Mussali 2001), ha resultado ser una herramienta útil para determinar las rupturas sencillas, en los sitios lábiles en el ADN de células eucariontes. Singh et al. (1988), optimizaron la desnaturalización del ADN y la migración de los fragmentos, aumentando la sensibilidad de detección del daño del material genético.

En este ensayo se utilizan suspensiones celulares mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión para formar un gel que tenga soporte sobre el portaobjetos con una capa de agarosa de fusión normal, que se lisan en una solución con alta concentración de sales y detergentes para eliminar la membrana celular, el citosol y el citoesqueleto (Tice et al. 2000).

El ensayo cometa es una prueba rápida, sencilla, de bajo costo, se invierte poco tiempo y es reproducible.

Los linfocitos del tejido sanguíneo son las células más usadas en los ensayos de genotoxicidad *in vivo* e *in vitro*, ya que se adquieren fácilmente, se requiere poca cantidad de muestra para obtener una adecuada concentración celular para llevar a acabo los ensayos, no se requieren células en mitosis; están involucrados en la repuesta inmune; se encuentran en G₀ del ciclo celular e interactúan con agentes

inmunotóxicos, clastogénicos o citotóxicos (Moller et al. 2006, Calderón-Segura et al. 2007).

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la población humana está expuesta a diversas fuentes de contaminación física, biológica y química, la exposición a agentes químicos genotóxicos, puede ser por los productos industriales como los tintes y los alimentos enlatados como la leche, carne y por consumo de vegetales comestibles como los granos, verduras y frutas, contaminados con residuos de plaguicidas y/o sus metabolitos, los cuales constituyen un riesgo potencial para la salud humana, ya que muchos de estos compuestos químicos, han mostrado dañar el ADN tanto *in vivo* como *in vitro*. Si este daño no es reparado, se altera la integridad del genoma, lo cual es vital para la homeostasis y el funcionamiento celular (Neuparth et al. 2006). El daño al ADN es considerado como uno de los principales eventos de iniciación de enfermedades como el cáncer. Las modificaciones en la estructura del ADN pueden ser cambios en una base o pérdida de éstas (sitios apurínicos y apirimídicos), entrecruzamiento de cadenas de ADN, cruzamientos de proteínas y ADN, y/o rompimientos de una o dos hebras del genoma (Stenersen 2004). Por tales antecedentes en el presente trabajo se evaluó el daño sobre el ADN en linfocitos periféricos humanos expuestos a los plaguicidas neem y endosulfan y a la amina aromática NOP *in vitro* usando el ensayo cometa alcalino y sus posibles efectos sobre la viabilidad celular.

V. OBJETIVOS

a) Evaluar los efectos genotóxico y citotóxico de los plaguicidas, neem y endosulfan, así como de la amina aromática 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP), en linfocitos de sangre periférica humana *in vitro* mediante el ensayo cometa.

b) Determinar la viabilidad celular de los linfocitos humanos antes y después de los tratamientos directos con diferentes concentraciones de neem, endosulfan y NOP mediante la técnica de tinción con azul tripano.

c) Comparar el efecto genotóxico de los dos plaguicidas y la amina aromática.

d) Establecer una relación de concentración-respuesta del efecto genotóxico y citotóxico con los tres compuestos químicos en los linfocitos humanos *in vitro*.

VI. HIPÓTESIS

Si los insecticidas endosulfan, neem y la 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP), se coincuban con los linfocitos periféricos humanos, entonces el efecto genotóxico se evidenciará con el incremento en la frecuencia de células con cometa (con daño al ADN) y en el tamaño de sus caudas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Se prepararon soluciones patrón de los plaguicidas neem, endosulfan y de la amina aromática NOP, con agua desionizada estéril, de la cual se realizaron diluciones para obtener concentraciones finales de 50, 75, 150, 350, 700 y 1400 µg/ml para el neem; 50, 75, 150, 350 y 700 µg/ml de endosulfan y 25, 50, 75, 150 y 200 µg/ml de NOP, para llevar a cabo los tratamientos directos con los linfocitos interfásicos *in vitro*.

7.1. Aislamiento de linfocitos de sangre periférica humana

Se extrajo 20 ml de sangre por punción con una jeringa con 0.1 ml de heparina, de donadores jóvenes y sanos. La sangre heparinizada fue centrifugada a 2500 rpm 25 min a temperatura ambiente. Los linfocitos fueron aislados en un gradiente de Ficol (Gibco) por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente fueron lavados dos veces con medio RPMI 1640 (Gibco) por centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue eliminado y se les agregó 5 ml de medio RPMI 1640 (Gibco) más antibiótico ampicilina-estreptomicina (1%), inmediatamente se determinó la viabilidad celular con la técnica de exclusión de azul tripano (0.4 %, Sigma) y el número de células/ml de medio en la cámara de Neubauer (Romero-Martínez 2003).

7.2. Viabilidad celular

La viabilidad de los linfocitos fue determinada antes y después del tratamiento con los insecticidas y la amina aromática, así como el testigo, mediante la tinción con azul tripano (0.4 %, Sigma), el principio básico de la técnica es que el colorante penetra a través de la membrana de las células muertas, tiñendo el núcleo, las cuales se observan de color azul, mientras que las células vivas no se tiñen (Speit y Hartmann 1999, Tice et al. 2000).

Se realizó una mezcla con 10 µl de la suspensión celular más 10 µl del colorante después de 3 min, se determinó el % de viabilidad de los linfocitos, cuantificando en 100 células consecutivas, las muertas, en el microscopio fotónico a 40X por duplicado

(Romero-Martínez 2003) para concentración de los dos insecticidas y de la NOP, así como el testigo.

Cuantificación de linfocitos

El número de linfocitos/ml de medio RPMI1640, fue realizado con 10 μ l del botón celular en la cámara de Neubauer para obtener el volumen con una concentración de 25×10^4 células (Singh et al. 1988) para los tratamientos directos con los plaguicidas, la NOP y el testigo. Con la siguiente fórmula:

$$\text{No. de linfocitos /ml} = \frac{(\text{No. de linfocitos de los 4 cuadrantes}) (2) (10,000)}{4}$$

= /ml total del medio RPMI 1640 (se necesitan 250,000 células por microtubo)

7.3. Tratamientos directos del neem, el endosulfan y la NOP en los linfocitos humanos in vitro.

Se coincubaron 25×10^4 linfocitos con una viabilidad $\geq 90\%$, con 50, 75, 150, 350, 700 y 1400 μ g/ml de neem; 50, 75, 150, 175, 350 y 700 μ g/ml de endosulfan y 25, 50, 75, 100, 150 y 200 μ g/ml de NOP, el testigo fue el medio RPMI1640 más los linfocitos, a un volumen final de 500 μ l, por 2 horas a 37°C.

Después del tratamiento todos los lotes experimentales se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, para eliminar los residuos de los plaguicidas y se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 para realizar el ensayo cometa alcalino y determinar la viabilidad de los linfocitos humanos con la técnica de tinción azul tripano.

7.4. Ensayo cometa alcalino

Se efectuó una mezcla de 5×10^6 linfocitos más 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (0.5 % LMPA, Gibco) y se transfirió a un portaobjetos esmerilado con una monocapa de agarosa normal (NMA 1% Gibco), se le puso un cubreobjetos y se

mantuvo a 4°C por 5 minutos, posteriormente se le quitó el cubreobjetos y se le agregó otra capa de LMPA a 4°C por 5 minutos. Se hicieron dos geles por cada concentración de los plaguicidas y de la NOP, así como el testigo.

Los geles con las muestras celulares fueron sumergidos en una solución de lisis final 2.5 M NaCl (Sigma), 100 mM EDTA (Sigma), 10 mM Trisma-base (pH 10.0) (Sigma), 10 % DMSO (Sigma), 1 % Lauril sarcosinato de sodio, 1 % Tritón X-100 (Sigma), aforada a 100 ml con 1 % Tritón-X y 10 % DMSO 10 % en vasos koplín a 4°C (Speit y Hartmann 1999, Tice et al. 2000, Calderón-Segura et al. 2007).

Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis y se cubrieron con amortiguador alcalino frío de NaOH 300 mM (Sigma) + 1 mM EDTA (pH 13.0) en luz amarilla, a temperatura ambiente por 20 minutos para desenrollar el ADN, la electroforesis se realizó a 300 mA y 25 Volts constante por 20 minutos. Después los geles se lavaron 3 veces con amortiguador neutralizante Tris (0.4 M pH= 7.5) por 5 minutos en luz amarilla (Tice et al. 2000).

Posteriormente los geles se fijaron con metanol absoluto por 10 minutos en luz amarilla a temperatura ambiente y se guardaron en una caja negra hasta su análisis.

7.5. Análisis del daño sobre el ADN en linfocitos periféricos humanos

Para el estudio del daño sobre el ADN, los geles de todos los grupos experimentales, así como, del testigo, se reetiquetaron con clave desconocida para el observador, posteriormente las laminillas fueron teñidas en oscuridad, con 50 µl de bromuro de etidio (20 µg/ml), por 3 minutos para teñir el ADN. Se analizaron tres parámetros indicadores del daño al ADN: a) las células con y sin daño al ADN (núcleos con y sin cometas) (Tabla 1); b) la longitud de la cauda (fragmentación del ADN) y c) la frecuencia de células con diferente grado de daño al ADN, categorizado en cuatro niveles con base en la longitud de la cauda del cometa. Estos parámetros fueron determinados en 50 núcleos consecutivos usando un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss modelo Axiostar Plus H-BO-100, con un objetivo micrométrico de 40X con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se realizaron tres experimentos consecutivos cuyos valores fueron promediados.

7.6. Análisis estadístico

Los valores promedio de la frecuencia de células con cometa y de la longitud de la cauda del cometa se compararon entre sí, mediante las pruebas de análisis de varianza (ANOVA), de comparación múltiple de Newman-Keuls a $p < 0.05$. Se realizaron análisis de regresión lineal y no lineal a los valores promedio de la frecuencia de linfocitos con y sin daño al ADN y de la longitud de la cauda del cometa para determinar la respuesta genotóxica de los dos insecticidas y de la amina aromática y una comparación de pendientes para demostrar el comportamiento genotóxico de cada compuesto químico.

VIII. RESULTADOS

Se realizaron experimentos preliminares para determinar las concentraciones adecuadas de los insecticidas neem y endosulfan, y de la amina aromática 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP), para inducir daño al ADN de los linfocitos humanos *in vitro*. La Tabla I, muestra los promedios de la frecuencia de células con cometa (con daño al ADN) y la longitud de la cauda del cometa (fragmentación del ADN) producidos por los dos insecticidas y la NOP. A 50 µg/ml de neem no se incrementa significativamente la frecuencia de células con cometa y la longitud de la cauda con relación al testigo, pero a partir de 75 µg/ml a 1400 µg/ml crece significativamente la frecuencia de células con cometa y la longitud de sus caudas (Figs. 4 y 5).

En el caso del endosulfan, a concentraciones de 50 µg/ml a 700 µg/ml aumenta significativamente la frecuencia de células con cometa y la longitud de la cauda al compararse con el testigo (Tabla I).

Con la NOP, a partir de 25 µg/ml hasta 200 µg/ml ocasiona ascenso significativo en la frecuencia de células con cometa y en la longitud de la cauda con relación al testigo (Tabla I).

Con los tres compuestos químicos, el grado de daño al ADN, fue categorizado en los niveles de daño 1-4 (Tabla I y Fig. 6).

A concentraciones elevadas de neem, endosulfan y NOP producen severo daño al ADN, con mayor frecuencia de linfocitos con cometa y grandes caudas con relación al testigo (Tabla I).

El análisis de las regresiones lineales (Fig. 7 y Fig. 8) de los valores promedio de la frecuencia de células con daño y la longitud de la cauda producidos por la amina aromática muestran una correlación positiva y significativa, evidenciando una relación de concentración-efecto.

El modelo de regresión no-lineal explica adecuadamente los incrementos significativos de la frecuencia de células con cometa y la longitud de sus caudas inducidos por cada insecticida (Fig. 9, Fig. 10 y Tabla II).

La viabilidad de los linfocitos después del tratamiento con los dos insecticidas y la amina aromática no fue afectada en ninguna concentración con relación al valor del testigo (Tabla I).

Al comprar los valores de las pendientes de los plaguicidas y la NOP (Fig. 11 y Tabla III), se obtiene que tienen similar respuesta genotóxica, pero diferente a la NOP.

IX. DISCUSIÓN

La población de México esta expuesta a diversos agentes tóxicos dentro de los cuales se encuentran el ozono, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las aminas aromáticas y los plaguicidas. Los plaguicidas son asperjados en los campos agrícolas, aplicados en la medicina humana y veterinaria, para el control de organismos plaga de las plantas, de los animales y del ser humano. Sin embargo el uso indiscriminado ha incrementado los contaminantes en el ambiente, en el agua y en los vegetales comestibles como: verduras, frutos y cereales. Adicionalmente a los plaguicidas, las aminas aromáticas provenientes de las pinturas y/o tintes representan gran riesgo adicional para la salud humana ya que muchos de estos compuestos han mostrado inducir efectos mutagénicos, genotóxicos y/o carcinogénicos en diferentes organismos (Cortés-Eslava 2002).

Los cambios en el material genético son la base del proceso de iniciación y desarrollo del cáncer y se ha mostrado una relación entre la exposición a genotóxicos ambientales y daño al ADN con la incidencia de cáncer. Por tales antecedentes, el presente estudio evaluó el efecto genotóxico de los insecticidas biológico neem y organoclorado endosulfan, así como la amina aromática, 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP) en los linfocitos humanos de sangre periférica *in vitro*, usando la técnica de electroforesis unicelular alcalina o también conocido como ensayo cometa alcalino, la cual es una prueba muy sensible, rápida y reproducible para detectar rompimientos en la cadena ADN, inducidos por agentes químicos, físicos y/o biológicos (Speit y Harmann 1999, Tice et al. 2000, Calderón-Segura et al. 2007). El ensayo cometa comparado con otras pruebas citogenéticas como las aberraciones cromosómicas, los micronúcleos y los intercambios de cromátidas hermanas, es un procedimiento adecuado para detectar daño directo al ADN, tanto *in vivo* como *in vitro*, es de bajo costo, requiere de bajas concentraciones de productos químicos y de número menor de células para inducir daño al ADN y en corto tiempo se obtienen resultados.

Diversos estudios muestran que los extractos del árbol del neem ejercen diversas propiedades benéficas para la salud, todas sus partes contienen el principio activo, la azadiractina. El extracto de la hoja se usa para el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo el cáncer y el aceite del neem el cual es un bioinsecticida que podría sustituir

a los insecticidas sintéticos debido a que no ejerce efectos nocivos en los organismos incluyendo al ser humano, sin embargo, investigaciones recientes evidencian que la azadiractina produce efectos adversos indeseables tanto *in vivo* como *in vitro*. Los resultados de los tratamientos directos con el bioinsecticida neem en los linfocitos humanos *in vitro*, muestran que es un agente genotóxico, evidenciado por el daño al ADN. Esta respuesta genotóxica positiva está de acuerdo con los datos obtenidos por Rojanapo y Tepsuwan (1992), quienes reportan actividad mutagénica del extracto de la flor del neem en *Salmonella typhimurium* cepa TA98 por medio del ensayo de Ames. Awasthy et al. (1999) y Awasthy (2001), encuentran producción de aberraciones cromosómicas en células de medula ósea de ratón albino suizo expuesto al extracto de la hoja del neem. Akudugu et al. (2001) describen inhibición de la proliferación y viabilidad celular, así como, aumento significativo de micronúcleos en líneas celulares de glioblastoma humana coincubada con la azadiractina. Salehzadeh et al. (2002), publican inhibición de la polimerización de la β -tubulina en *Drosophila* expuesta a la azadiractina *in vitro*; Khillare y Shivastav (2003) y Khan y Awasthy (2003) muestran en testículo de rata expuesta al neem inducción significativa de aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas en espermatozoides. Chandra y Khuda-Bukhsh (2004) obtienen frecuencia elevada de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en diferentes órganos del pez teleosteo *Oreochromis mossambicus*. Robertson et al. (2007), demuestran inhibición de la proliferación celular y daño nuclear de las células Kc167 en cultivo de *Drosophila* coincubadas con azadiractina del neem. Anuradha et al. (2007) publican inducción de apoptosis con disrupción de la actina y la β -tubulina del citoesqueleto de los discos imaginales en fenotipos mutantes de *Drosophila melanogaster* expuestas a la azadiractina del neem.

Rosenkranz y Klopman (1995) propusieron que la estructura de la azadiractina del neem, puede ser una molécula genotóxica y/o carcinogénica; la electronegatividad de la molécula de la azadiractina, apoya que esta molécula puede interactuar con el ADN, conduciendo a los rompimientos de la cadena del ADN y ocasionado otras alteraciones sobre el genoma como disrupción del huso mitótico y segregación cromosómica anormal (Rosenkranz y Klopman 1995), todas las características antes mencionadas apoyan los resultados encontrados en este trabajo y corroboran que el neem es un agente genotóxico para los linfocitos humanos *in vitro*.

En la última década la EPA de EUA, declara al endosulfan como un plaguicida de gran peligro para la salud humana, debido a su amplia persistencia en el ambiente, su acumulación en los tejidos animales y por el daño que ocasiona en la salud de los organismos. Actualmente su uso ha sido restringido, sin embargo, en todo el mundo su venta y aplicación continúa.

Los análisis de los parámetros indicadores de daño al ADN en los linfocitos expuestos a diferentes concentraciones de endosulfan, muestran que este insecticida organoclorado ocasiona daño al ADN, la acción genotóxica positiva del endosulfan coincide con lo publicado por Velázquez et al. (1984), quienes obtienen efecto mutagénico en *Drosophila melanogaster*. Dzwonkowska y Hübner (1986) y Naqvi y Vaishnavi (1993), reportan incremento de aberraciones cromosómicas en células germinales de ratón y criceto dorado expuestos al endosulfan. Sobti et al. (1983) y Jamil et al. (2004), describen aumento de intercambios cromátidas hermanas (ICH) y rompimientos en el ADN de linfocitos humanos tratados con endosulfan *in vitro* e *in vivo*. Chaudhuri et al. (1999) describen efecto mutagénico del endosulfan en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Pandey et al. 1990b). Yadav et al. (1982), confirman este efecto en *Saccharomyces cerevisiae*. Lu et al. (2000) observan mayor rompimiento del ADN con la molécula original que su isómero α -endosulfan en células HepG2 *in vitro*, e inducción significativa de ICH, micronúcleos y fragmentación del ADN en la misma línea celular expuestas al endosulfan y a sus isómeros α - y β -endosulfan. Neuparth et al. (2006), Pandey et al. (2006) y Sharma et al. (2007) notan genotoxicidad significativa en agallas, riñón y eritrocitos de peces teleósteos *Spaurus aurata*, *Channa punctatus* y *Mystus vittatus* expuestos al endosulfan. Bajpayee et al. (2006) corroboran la acción mutagénica del endosulfan, sus isómeros y sus metabolitos (sulfato, lactona, éter e hidroxietar) en el ensayo de Ames e inducción del daño al ADN en linfocitos humanos y en células CHO *in vitro*. Jia y Misra (2007) y Zhenquan et al. (2007) descubren activación de la apoptosis en células-T de leucemia humana; apoptosis y necrosis en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano expuestas al endosulfan *in vitro*. Abadín et al. (2007), señalan acciones mutagénicas y clastogénicas e inmunosupresión en células de mamíferos coincubadas con endosulfan.

Los resultados de esta investigación corroboran que el endosulfan es un agente genotóxico en los linfocitos humanos *in vitro*, probablemente la fragmentación del ADN

sea causado por la interacción de la molécula original, sus metabolitos y/o los radicales, como lo ha mostrado Baypayee et al. (2006) en los linfocitos periféricos humanos y en células CHO expuestas al endosulfan con y sin activación metabólica animal *in vitro*.

Por varias décadas, diversos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado los efectos mutagénicos de las aminas aromáticas en especial las fenilendiaminas, los aditivos más abundantes de los tintes del cabello (Hatch et al. 1991, Murata et al. 2001). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones han sido enfocadas en bacterias (prueba de Ames) con y sin el metabolismo animal o vegetal (Saito et al. 1990, Gichner et al. 2001, Cortés-Eslava et al. 2002, Cortés-Eslava et al. 2004, Nohynek et al. 2004) y no hay estudios en los linfocitos de sangre periférica. Los resultados de esta investigación muestran que la 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP), es un agente inductor de daño al ADN de las células humanas *in vitro*, detectado por el ensayo cometa alcalino. La respuesta genotóxica positiva coincide con lo publicado por Shelby y Stasiewicz (1984), reportan que las fenilendiaminas ocasionan incremento significativo de aberraciones cromosómicas en cultivo de células de mamífero. Benning et al. (1994), evidencian con algunas fenilendiaminas producción significativa de micronúcleos en esplenocitos de ratón. Chen et al. (1997) y Sasaki et al. (1999), demuestran inducción de daño en el ADN, en diferentes órganos de ratón expuestas a 20 aminas aromáticas entre las cuales se encuentra la NOP, mediante el ensayo cometa alcalino. Murata et al. (2001), publican inducción de daño sobre el ADN de timo de ternera coincubada con la amina aromática 4-aminobifenil, con aumento significativo de los niveles del 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) vía radicales libres.

En este estudio la NOP posiblemente interactúe covalentemente con el genoma de los linfocitos humanos mostrado con el aumento en la frecuencia de células con daño al ADN y en la longitud de su cauda, ya que varios estudios han demostrado que la NOP, directamente ocasiona daño al ADN y su efecto genotóxico aumenta en presencia del metabolismo animal y vegetal (Gichner et al. 2001, Cortés-Eslava et al. 2004, Nohynek et al. 2004).

El análisis de la regresión lineal de los valores promedio de la longitud de la cauda del cometa ocasionado por la amina aromática evidencia una correlación positiva entre la concentración de la NOP y el aumento de la fragmentación del ADN obteniendo una relación lineal de concentración-efecto. De acuerdo a los valores de Durbin-Watson

(Tabla II), la regresión lineal no es la adecuada para explicar el comportamiento genotóxico de los dos plaguicidas por lo que se aplicó el modelo no-lineal, Monomolecular. El modelo Monomolecular (Tabla II), que muestra el daño al ADN es directamente proporcional a bajas concentraciones de neem y endosulfan y asintota a mayores concentraciones de ambos compuestos, esto implica que probablemente los dos insecticidas inducen el daño al genoma por mecanismos similares (Landis 2004).

Al comparar el efecto genotóxico sobre el genoma de los linfocitos expuestos a los dos plaguicidas, neem y endosulfan y con la amina aromática, se observó que la NOP es más genotóxica ya que a concentraciones menores ocasiona mayor daño al ADN, que el bioplaguicida neem y el endosulfan. Sin embargo, el neem a concentraciones elevadas produce mayor fragmentación del ADN que el endosulfan y la NOP.

Los resultados de esta investigación demuestran que los tres compuestos químicos producen daño significativo al ADN de las células humanas expuestas a bajas concentraciones, lo que corrobora que son un peligro potencial para los organismos ya que estos compuestos se aplican en cultivos a concentraciones más elevadas que las ensayadas en condiciones *in vitro*.

En nuestro país la extensa aplicación de diversos plaguicidas en los campos agrícolas y forestales representan gran riesgo para la salud. Paralelamente, los tintes del cabello y las pinturas contienen diferentes aminas aromáticas como la NOP, las cuales se ha comprobado que son mutagénicas. La exposición tanto a los tintes como a los plaguicidas directa e indirectamente puede conducir a alteraciones en el ADN y otras moléculas que pueden ser un evento inicial para el desarrollo de enfermedades incluyendo el cáncer.

IX. CONCLUSIONES

- Los insecticidas neem y endosulfan y la amina aromática NOP tienen efectos genotóxicos a las concentraciones evaluadas sobre los linfocitos humanos de sangre periférica *in vitro*, evidenciado por el aumento significativo de células con cometa y en la longitud de la cauda del cometa.

- La amina aromática NOP, es más genotóxica a bajas concentraciones que el endosulfan y el neem para los linfocitos humanos al producir daño al ADN.

- La frecuencia de células con daño al ADN (con cometa) y la longitud de sus caudas aumentan significativamente a bajas concentraciones y asintota a altas concentraciones para cada plaguicida, el comportamiento de la amina aromática es directamente proporcional a la concentración aplicada. La respuesta genotóxica es de concentración-efecto.

- Los resultados del estudio corroboran que el ensayo cometa alcalino es una prueba muy sensible para detectar el daño directo al ADN en células humanas inducido por diferentes agentes químicos *in vitro*.

X. REFERENCIAS

- Abadin H.G., Chou C.H. y Lladós F.T. (2007) Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: immunological effects. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47: 249-256.
- Adler I.D., Anderson D., Benigni R., Ehling U.H., Laehdetie J., Pacchierotti F., Russo A. y Tates A.D. (1996) Synthesis report of the step project detection of germ cell mutagens. *Mutat. Res.* 353:65-84.
- Akudugu J., Gäde G. y Böhm L. (2001) Cytotoxicity of azadirachtin A in human glioblastoma cell lines. *Life Sci.* 68: 1153-1160.
- Antherieu S., Ledirac N., Luzy A.P., Lenormand P., Caron J.C. y Rahmani R. (2007) Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK $\frac{1}{2}$ mechanism. *J. Cell Physiol.* 213: 177-186.
- Anuradha A., Annadurai R.S. y Shashidhara L.S. (2007) Actin cytoskeleton as a putative target of the limonoid azadirachtin A. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 37: 627-634.
- Ames B. N., McCann J. y Yamasaki E. (1975) Methods for the detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-363.
- AMIPFAC (1985) Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes.
- 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. (1999) Prolonged murine genotoxic effects of crude extracted from neem. *Phytother. Res.* 13: 81-83.
- Awasthy K.S. (2001) Genotoxicity of a crude leaf extract of neem in male germ cells of mice. *Cytobios* 106:151-164.
- Bajpayee, M., Pandey K.A., Zoidi S., Musarrat J., Parmar D., Mathur N., Kishore S.P. y Dhawan A. (2006) DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. *Environ. Mol. Mutagen.* 47: 682-692.
- Batiste-Alentorn M., Xamena N., Creus A., Marcos R. (1995) Genotoxicity testing of five compounds in three *Drosophila* short-term somatic assays. *Mutat. Res.* 341: 161-167.

- Bayer A.G. (1994) Tratamiento en la inducción por plaguicidas Guía para médicos. Sector Agrochemical Crop. Protection Business Group.
- Bejarano F. (2003) Impactos de libre comercio, plaguicidas y transgénicos en la agricultura de América Latina. (RAPAM, RAP-AL, Universidad Autónoma de Chapingo, SUMAS). Grupo Editorial Sagitario, México, 348 p.
- Bellés X. (1988) Insecticidas biorracionales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Colección Nuevas Tendencias No. 9). Madrid, 405 p.
- Benigni R. (2004) Chemical structure of mutagens and carcinogens and the relationship with biological activity. J. Exp. Clin. Cancer Res. 23: 5-8.
- Benning V., Brault D., Duvinage C., Thybaud V. y Melcion C. (1994) Validation of the *in vivo* CD1 mouse splenocyte micronucleus test. Mutagenesis 9: 199-204.
- Bhalli J.A., Khan Q.M., Nasim A. (2006) DNA damage in Pakistani pesticide-manufacturing workers assayed using the comet assay. Environ. Mol. Mutagen. 47: 587-593.
- Blanco-Coronado J.L., Repetto M., Ginestal R.J., Vicente J.R., Yelarmos F. y Lardelli A. (1992) Acute intoxication by endosulfan. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 30: 575-583.
- Bolker B.M. (2008) Ecological models and data in R. Princeton University Press. 508 p.
- 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.
- Broomhall S. (2003) Effects of the insecticide endosulfan and presence of congeneric tadpoles on Australian treefrog (*Litoria freycineti*) tadpoles. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45: 221-226.
- Burnett C., Loehr R. y Corbett J. (1981) Heritable translocation study on two hair dye formulations. Fundam. Appl. Toxicol. 4: 325-328.
- Burnett C.M. y Corbett J.F. (1987) Failure of short-term *in vitro* mutagenicity test to predict the animal carcinogenicity of hair dyes. Food Chem. Toxicol. 25: 703-707.
- Calderón-Segura M.E., Gómez-Arroyo S., Molina-Alvarez B., Villalobos-Pietrini R., Calderón-Ezquerro C., Cortés-Eslava J., Valencia-Quintana P.R., López-González L., Zúñiga-Reyes R. y Sánchez-Rincón J. (2007) Metabolic activation of herbicide products by *Vicia faba* detected in human peripheral lymphocytes using alkaline single cell gel electrophoresis. Toxicol. In Vitro 21: 1143-1154.

- Chandra P. y Khuda-Bukhsh A.R. (2004) Genotoxic effects of cadmium chloride and azadirachtin treated singly and in combination in fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58: 194-201.
- Chalubinski M. y Kowalski M.L. (2006) Endocrine disrupters-potential modulators of the immune system and allergic response. *Allergy* 61: 1326-1335.
- Charlier C. J. y Dejardin M. T. (2007) Increased risk of relapse after breast cancer with exposure to organochlorine pollutants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 78: 1-4.
- Chaudhuri K., Selvaraj S. y Pal A.K. (1999) Studies on the genotoxicity of endosulfan in bacterial systems. *Mutat. Res.* 439: 63-67.
- Chen S.C., Wong T.Y. y Chung K.T. (1997) Base-pair Mutation caused by four nitro-group containing aromatic amines in *Salmonella typhimurium* TA100, TA104, TA4001 and TA4006. *Mutat. Res.* 395: 223-227.
- Chugh S.N., Dhawan R., Agrawal N. y Mahajan S.K. (1998) Endosulfan poisoning in Northern India: a report of 18 cases. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 36: 474-477.
- CIBA-GEIGY MEXICANA (1996) Manual de Protección de cultivos 3ª. Ed., CIBA-GEIGY, México, 334 p.
- COP (1998) Código Oficial de Plaguicidas. CICLOPLAFEST. México.
- Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Aguirre J.J. (2001) Metabolic activation of three arylamines and two organophosphorus insecticides by coriander (*Coriandrum sativum*) a common edible vegetable. *Toxicol. Lett.* 125: 39-49.
- Cortés-Eslava J. (2002) Regulación de la activación vegetal de insecticidas organofosforados y aminas aromáticas en presencia de extractos vegetales. Relación entre mutagenicidad y antimutagenicidad. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 105 p.
- Cortés-Eslava J., Gomez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Aguirre J.J. (2004) Antimutagenicity of coriander (*Coriandrum sativum*) juice on the mutagenesis produced by plant metabolites of aromatic amines. *Toxicol. Lett.* 153: 283-292.
- Cox C. y Surgan M. (2006) Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ. Health Perspect.* 114: 1803-1806.

- Dalsenter P.R., Dallegrave E., Mello J.R., Langeloh A., Oliveira R.T. y Fagi A.S. (1999) Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Hum. Exp. Toxicol.* 18: 583-589.
- Dalsenter P.R., L de Araújo S., da Silva de Assis H.C., Andrade A J.M. y Dallegrave E. (2003) Pre and postnatal exposure to endosulfan in Wistar rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 22: 171-175.
- Díaz-Hernández, M. E. (2004) Evaluación de la capacidad metabólica del cilantro en la mutagenicidad de insecticidas organofosforados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 64 p.
- Dubey R.K., Beg M.U. y Singh, J. (1984) Effects of endosulfan and its metabolites on rat liver mitochondrial respiration and enzyme activities *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 333: 3405-3410.
- Dzwonkowska A. y Hübner H. (1986) Induction of chromosomal aberrations in the Syrian hamster by insecticides *in vivo*. *Arch. Toxicol.* 58: 152-156.
- EPA (2002) The Grouping of a Series of Triazine Pesticides Based on a Common Mechanism of Toxicity. U.S. EPA Office of Pesticide Programs Health Effects Division. March.
- Eyer F., Felgenhauer N., Jetzinger E., Pfab R. y Zilker T.R. (2004) Acute endosulfan poisoning with cerebral edema and cardiac failure. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42: 927-932.
- Ferrer A. (2003) Intoxicación por plaguicidas. *ANALES Sis. San Navarra.* 26: 155-171.
- Flores-Maya S. (2000) Intercambio de crómatidas hermanas inducido por dos herbicidas del grupo químico triazina en cultivo de linfocitos humanos previa activación metabólica por un biomonitor vegetal (*Vicia faba*). Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 85 p.
- Fransson-Steen R., Flodstrom S. y Warngard L. (1992) The insecticide endosulfan and its two stereoisomers promote the growth of altered hepatic foci in rats. *Carcinogenesis* 13: 2299-2303.
- Fucci P., Anselmi E., Bracci C., Mauriello S., Settini L. y Comba P. (1997) Safety assurance for occupational tumors in agriculture. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.* 19: 6-9.
- Gamlin J., Díaz-Romo P., Hesketh T. (2007) Exposure of young working on Mexican tobacco plantations to organophosphorous and carbamic pesticides, indicated by cholinesterase depression. *Child Care Health Dev.* 33: 246-248.

- Garry V.F. (2004) Pesticides and children. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198: 152-63.
- Gichner T., Stavreva P.A. y Breusegen F.V. (2001) O-phenylenediamine-induced DNA damage and mutagenicity in tobacco seedlings is light-dependent. *Mutat. Res.* 495: 117-125.
- Gilbert M.E. (1992 a) A characterization of chemical kindling with the pesticide endosulfan. *Neurotoxicol. Teratol.* 14: 151-158.
- Gilbert M.E. (1992 b) Proconvulsant activity of endosulfan in amygdale kindling. *Neurotoxicol. Teratol.* 14: 143-149.
- Goktepe I., Portier R. y Ahmedna M. (2004) Ecological risk assessment of neem-based pesticides. *J. Environ. Sci Health B.* 39: 311-320.
- Gómez-Arroyo S., Díaz-Sánchez Y., Meneses-Pérez M.A., Villalobos-Pietrini R. y De León-Rodríguez J. (2000) Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 466: 117-124.
- Grover P., Danadev K. y Mahbob M. (2003) Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the comet assay. *Mutagenesis* 18: 201-205.
- Gupta P.K. (2004) Pesticide exposure-Indian scene. *Toxicology* 198: 83-90.
- Hatch F.T., Knize M.G. y Felton J.S. (1991) Quantitative structure-activity relationships of heterocyclic amine mutagens formed during the cooking of food. *Environ. Mol. Mutagen.* 17: 4-19.
- Hatch F.T. y Colvin M.E. (1997) Quantitative structure-activity (QSAR) relationships of mutagenic aromatic and heterocyclic amines. *Mutat. Res.* 376: 87-96.
- Hartge P., Colt J.S., Severson R.K., Cerhan J.R. Cozen W., Camann D., Zahm S.H. y Davis S. (2005) Residential herbicide use and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 934-937.
- He F. (1999) Biological monitoring of exposure to pesticides: current issues. *Toxicol. Lett.* 108: 277-283.
- Hilborn R. y Mangel M. (1997) The ecological detective: confronting models with data. monographs in population biology. 28. New Jersey. University Press. 315 p.
- Janik F. y Wolf H.U. (1992) The Ca²⁺-transport-ATPase of human erythrocytes as *in vitro* toxicity test system-acute effects of some chlorinated compounds. *L. Appl. Toxicol.* 12: 351-358.

- Jamil K., Shaik A.P., Mahboob M. y Krishna D. (2004) Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chlorpyriphos, dimethoate, and endosulfan) on human lymphocytes *in vitro*. Drug Chem. Toxicol. 27: 133-144.
- Jia Z. y Misra H.P. (2007) Exposure to mixtures of endosulfan and zineb induces apoptotic and necrotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells, *in vitro*. J. Appl. Toxicol. 27: 434-446.
- Jurewicz J. Hanke W., Johansson C., Lundqvist C., Ceccatelli S., Van Den Hazel P. Saunders M. y Zetterstrom R. (2006) Adverse health effects of children's exposure to pesticides: what do we really know and what can be done about it. Acta Paediatr. Suppl. 95: 71-80.
- Kamrin M.A. (1997) Pesticides profiles toxicity. Environmental impact and fate. Lewis Publishers is an imprint of LRS. Press. USA, 676 p.
- Kang K. S., Park J. E., Ryu D. Y. y Lee Y. S. (2001) Effects and neuro-toxic mechanisms of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl and endosulfan in neuronal stem cells. J. Vet. Med. Sci. 63: 1183-1190.
- Karatas A. D., Aygun D. y Baydin A. (2006) Characteristics of endosulfan poisoning: a study of 23 cases. Singapore Med. J. 47: 1030-1032.
- Khan P.K. y Awasthy K.S. (2003) Cytogenetic toxicity of neem. Food Chem. Toxicol. 41: 1325-1328.
- Khillare B. y Shrivastav T.G., (2003). Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract. Contraception 68: 225-229.
- Kornuta N., Bagley E. y Nedopitanskaya N. (1996) Genotoxicity effects of pesticides. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 15: 75-78.
- Kreutzweiser D. P., Back R. C., Sutton T. M., Pangle K. L. y Thompson D.G. (2004) Aquatic mesocosm assessments of a neem (azadirachtin) insecticide at environmentally realistic concentrations--2: zooplankton community responses and recovery. Ecotoxicol. Environ. Saf. 59: 194-204.
- Lamoreux G., Frear D. (1979) Pesticide metabolism in higher plants: *in vitro* enzymes studies. En: Xenobiotic Metabolism: *in vitro* methods. American Chemical Society, Washington D.C., 77-128 pp.

- Landis W. G. y Yu M. H. (2004) Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems. 3rd Ed. Lewis Publishers. New York. 484 p.
- Lauwerys R. y Hoet P. (2001) Industrial chemical exposure: guidelines for biological monitoring. 3rd. Ed. Lewis. California, 325 p.
- Lee W.R., Abrahamson, S., Valencia, R., Von Halle, E.S., Wurgler, F.E. y Zimmering, S. (1983) The sex-linked recessive lethal for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res. 123: 183-279.
- 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.
- Marks T.A., Gumptra B.N., Ledoux T.A. y Staples R.E. (1981) Teratogenic evaluation of 2-nitro-o-phenylenediamine and 2,5-toluenediaminesulfate in the mouse. Teratology 24: 253-256.
- Maroni M., Fanetti A.C. y Metruccio F. (2006) Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. Med. Lav. 97: 430-437.
- Márquez C., Villalobos C., Pobrete S., Villalobos E., de Los Angeles García M. y Duk S. (2005) Cytogenetic damage in female Chilean agricultural workers exposed to mixtures of pesticides. Environ. Mol. Mutagen. 45: 1-7.
- Mead R., Curnow R. y Hasted A.M. (1993) Statistical methods in agriculture and experimental biology. 2nd Ed. Chapman and Hall. Londres. 415 p.
- Moller P. (2006) The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 98: 336-345.
- Murata M., Tamura A., Tada M. y Kawanishi S. (2001) Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic 4-aminobiphenyl. Free Radic. Biol. Med. 30: 765-773.
- Mussali P. (2001). ¿Es la técnica de electroforesis unicelular (ensayo cometa) capaz de predecir el efecto de fármacos antineoplásicos? : estudio inicial sobre la inducción de daño al ADN de sustancias antineoplásicas con mecanismos de acción conocidos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, 113 p.
- Natarajan A.T. y Obe G. (1986) How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* assays in their ability to detect mutagens. Mutat. Res. 167: 189-201.

- 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. Spec.* 36: 64-65.
- Narahashi T. (1996) Neural ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol.* 79: 1-14.
- Navqui S.M. y Vaishnavi C. (1993) Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 105: 347-361.
- Neuparth T., Bickham J. W., Theodorakis C. W., Costa F. O. y Costa M. H. (2006) Endosulfan-induced genotoxicity detected in the gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by means of flow cytometry and micronuclei assays. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76: 242-248.
- Nieva M. I., Zampini I.C., Ordóñez R.M., Jaime G.S., Vattuone M.A. y Isla M.I. (2005) Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8957-8962.
- Nohynek G., Fautz R., Benech-Kieffer F. y Toutain H. (2004) Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food Chem. Toxicol.* 42: 517-543.
- Oesch B. y Oesch F. (2004) Modulation of mutagenicity by phosphorylation of mutagen-metabolizing enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 423: 31-36.
- Pandey N., Gundevia F., Prem A.S. y Ray, P.K. (1990 a) 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 b) Evaluation of the mutagenic potential of endosulfan using the *Salmonella*/mammalian-microsome assay. *Mutat. Res.* 242: 121-125.
- Pandey S., Nagpure N.S., Kumar R., Sharma S., Srivastava S.K. y Verma M.S. (2006) Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65: 56-61.
- Pascual-Villalobos M.J. (1996) Plaguicidas naturales de origen vegetal: estado actual de la investigación. *Consejería de Medio Ambiente Agricultura y Agua. México.* 35 p.

- Perry A.S., Yamamoto T., Ishaaya I. y Perry R.Y. (1998) Insecticides in agriculture and environment. Retrospects and prospects (applied agriculture). Springer Verlag, Nueva York, 261 p.
- Pimentel E., Ortíz A.R. y De Breña M. (2006) Tópicos de Genética. Sociedad Mexicana de Genética y Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 395 p.
- Posada S., Zoot M.S. y Rosero-Noguera R. (2007) Comparación de modelos matemáticos: una aplicación de la evaluación de alimentos para animales. Rev. Col. Cienc. Pec. 20: 141-148.
- Programa Nacional de Toxicología. (1979) Bioassay of 4-nitro-o-phenylenediamine for possible carcinogenicity (CAS No. 99-56-9). Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser. 180: 1-103.
- Rahman M.F., Siddiqui M.K. y Jamil K. (1999) Sub-chronic effect of neem based pesticide (Vepacide) on acetylcholinesterase and ATPases in rat. J. Environ. Sci. Health B. 34: 873-884.
- Rembold H. y Annadurai R. S. (1993) Azadirachtin inhibits proliferation of Sf9 cells in monolayer culture. Z Naturforsch. 48: 495-499.
- Reuber M.D. (1981) The role of toxicity in the carcinogenicity of endosulfan. Sci. Total Environ. 20: 23-47.
- Rivero O., Rizo P., Ponciano G., Oláiz G. y Vásquez I. (2001) Daños a la salud por plaguicidas. Ed. Manual Moderno. México. 488 p.
- Robertson S.L., Ni W., Dhadialla T.S., Nisbet A.J., McCusker C., Ley S.V., Morgue W. y Morgue, A.J. (2007) Identification of a putative azadirachtin-binding complex from *Drosophila* Kc167 cells. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 64: 200-208.
- Rojanapo W. y Tepsuwan A. (1992) Mutagenic and antimutagenic activities of some vegetables (in Thai). Bull. Depart. Med. Ser. 17: 461-469.
- Romero-Martínez I. (2003) Evaluación del daño al ADN en linfocitos humanos a través del ensayo de electroforesis unicelular alcalina asulam activado metabólicamente por *Vicia faba*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, 60 p.
- Rosenkranz H.S. y Klopman G. (1995) An examination of the potential "genotoxic" carcinogenicity of a biopesticide derived from the neem tree. Environ. Mol. Mutagen. 26: 255-260.

- Rupa D.S., Reddy P.P., Screemannarayana, K. y Reddi, O.S. (1991) Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. *Environ. Mol. Mutagen.* 18: 136-138.
- Saito k., Mutai T., Yabe K., Hara M., Watanabe H. y Hurukawa T. (1990) Rhabdomyolysis due to paraphenylenediamine (hair dye)— report of an autopsy case. *Nihon Hoigaku Zasshi* 44: 469-474.
- Saito J., Sakai Y. y Nagase H. (2006) *In vitro* anti-mutagenic effect of magnolol against direct and indirect mutagens. *Mutat. Res.* 609: 68-73.
- Saiyed H., Dewan A., Bhatnagar V., Shenoy U., Shenoy 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: 268-276.
- Sasaki Y.F., Kujiikawa K., Ishida K., Kawamura N., Nishikawa Y., Ohta S., Satoh M., Madarame H., Ueno S., Susa N., Matsusaka N. y Tsuda S. (1999) The alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organ: results with 30 aromatic amines evaluated by the IARC and U.S. NTP. *Mutat. Res.* 15: 1-18.
- Schaaf O., Jarvis A., Van der Esch A., Giagnacovo G. y Oldham N. (2000) Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 886: 89-97.
- Scott I.M., Gagnon N., Lesage L., Philogene B.J. y Arnason J.T. (2005) Efficacy of botanical insecticides from *Piper* species (Piperaceae) extracts for control of European chafer (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Econ. Entomol.* 98: 845-855.
- Scippo M.L., Argiris C., Van Der Weerd C., Muller M., Willemsen P., Martial J. y Maghuin-Rodister G. (2004) Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 664-669.
- Sharma S., Nagpure N.S., Kumar R., Pandey S., Srivastava S.K., Singh P.J. y Mathur P.K. (2007) Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 617-623.

- Shelby M.D. y Stasiewicz S. (1984) Chemicals showing no evidence of carcinogenicity in long-term, two-species rodent studies: the need for short-term test data. *Environ. Mutagen.* 6: 871-878.
- Sinha N., Adhikari N. y K. Saxena D. (2001) Effect of endosulfan during fetal gonadal differentiation on spermatogenesis in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10: 29-32.
- Singh N.P., Mc Coy M.T., Tice R.R. y Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Singh S.K. y Pandey R.S. (1989 a) Gonadal toxicity of short term chronic endosulfan exposure to male rats. *Indian J. Exp. Biol.* 4: 341-346.
- Singh S.K. y Pandey R.S. (1989 b) Toxicity of endosulfan on kidney of male rats in relation to drug metabolizing enzymes and microsomal lipid peroxidation. *Indian J. Exp. Biol.* 27: 725-728.
- Singh N.D., Sharma A.K., Dwevedi P., Patil R.D. y Kumar M. (2007) Citrinin and endosulfan induced teratogenic effects in Wistar rats. *J. Appl. Toxicol.* 27: 143-151.
- 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: 221-231.
- Sogorb M. y Vilanova E. (2002) Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128: 215-228.
- Soler-Niedziela L., Shi X., Nath J. y Ong T. (1991) Studies on three structurally related phenylenediamines with the mouse micronucleus assay system. *Mutat. Res.* 259: 43-48.
- Speit G. y Hartmann A. (1999) The comet assay (single-cell-gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. En D.S, Henderson (Ed), *Methods Mol. Biol., DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems*, Humana Press, Totowa, N.J. 203-212 pp.
- Stenersen J. (2004) *Chemical Pesticides. Mode of action and toxicology*. CRC Press. Florida, 276 p.
- Suzuki T., Ide K., Ishida M. (2001) Response of MCF-7 human breast cancer cells to some binary mixtures of oestrogenic compounds *in vitro*. *J. Pharm Pharmacol.* 53:1549-1554.

- Tardiff R. (1992) Methods to assess adverse effects of pesticides on non-target organism. SCOPE 49. Wiley. New York, 270 p.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.E. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35: 206-221.
- Tordoir W. F. y Van Sittert N.J. (1994) Organochlorines. Toxicology 91: 51-57.
- Thun M.J., Altekruse, S.F., Namboodiri M.M., Calle E.E. , Myers D.G. y Heath C.W.R. (1994) Hair dye use and risk of fatal cancers in U.S. women. J. Nat. Cancer Instit. 86: 210-215.
- Usha S. y Harikrishnan U.R. (2005) Endosulfan fact sheet and answers to common questions. En: IPEN Pesticide Working Group Project 2004 y Thanal. (Ed.) Arsha. Thiruvananthapuram, 26 p.
- Vineis P. y Pirastu R. (1996) Aromatic amines and cancer. Cancer Causes Control. 8: 346-355.
- Velázquez A., Creus A., Xamena N. y Marcos R. (1984) Mutagenicity of the insecticide endosulfan in *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 136: 115-118.
- Wan M.T., Kuo J., Pasternak J. (2005) Residues of endosulfan and other selected organochlorine pesticides in farm areas of the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. J. Environ. Qual. 34: 1186-1193.
- Waliszewski S.M., Gomez-Arroyo S., Infanzon R.M., Carvajal O., Villalobos-Pietrini R., Trujillo P. y Maxwell M. (2004) Persistent organochlorine pesticide levels in bovine fat from Mexico. Food Addit. Contam. 21: 774-780.
- Weisburger J.H. (1988) Past, present and future role of carcinogenesis and mutagenic N-substitutionary compounds in human cancer causation. Carcinogenic and Mutagenic Responses to Aromatic Amines and Nitroarene. Romano, C.M. y Scuetzle, L.J. Elsevier, New York, 3-19 pp.
- Yadav A.S., Vashishta R.S., Kakar S.N. (1982) Testing of endosulfan and fenitrothion for genotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res. 105: 403-407.
- Yagi H., el Hendi A.M., Diab A., Elshikh A.A. (1996) Paraphenylenediamine induced optic atrophy following hair dye poisoning. Hum. Exp. Toxicol. 15: 617-618.
- Zar, J.H. (1999) Bioestatistical analysis. 4th Ed. Prentice Hall, New Jersey. 960 p.

Zeljezic D. y Garaj-Vrhovac., V. (2002) Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Chemosphere* 46: 295-303.

XI. TABLAS

Tabla I. Evaluación del daño sobre el ADN de los linfocitos de sangre periférica humana expuestos a diferentes compuestos químicos *in vitro*.^a

	Promedio de células con daño		Promedio de Cauda (μm)			Promedio de células con daño al ADN ^b					% Viabilidad celular	
	\bar{X}	\pm EE	\bar{X}	\pm	EE	0	1	2	3	4	\bar{X}	\pm EE
Testigo	3	\pm 0.88	28.93	\pm	1.84	48	2	0	0	0	96	\pm 2.4
Neem												
($\mu\text{g/ml}$)												
50	8	\pm 1.2	34.1	\pm	5.2	42	0	4	4	0	94	\pm 2.4
75	12 *	\pm 1.4	44.9 **	\pm	4.1	38	1	9	2	0	96	\pm 1.8
150	16 *	\pm 2.1	76.1 **	\pm	3.3	30	3	12	5	0	94	\pm 2.5
350	20 *	\pm 1.2	126.8 **	\pm	6.5	31	5	10	4	0	98	\pm 1.2
700	32 *	\pm 2.8	135.9 **	\pm	5.7	18	4	12	16	0	96	\pm 2.0
1400	36 *	\pm 1.4	136.0 **	\pm	6.0	15	0	12	16	6	96	\pm 1.3
Testigo positivo												
Endosulfan												
($\mu\text{g/ml}$)												
50	9 *	\pm 2.0	54.3 **	\pm	4.2	41	1	5	3	0	92	\pm 2.4
75	9 *	\pm 1.2	57.8 **	\pm	3.0	41	1	3	5	0	92	\pm 1.8
150	12 *	\pm 1.7	86.5 **	\pm	2.8	38	2	6	4	0	92	\pm 2.5
175	15 *	\pm 2.4	100.8 **	\pm	7.9	35	7	2	6	0	94	\pm 3.2
350	20 *	\pm 1.2	103.8 **	\pm	5.6	30	4	11	4	0	96	\pm 2.1
700	25 *	\pm 1.7	110.5 **	\pm	4.3	25	3	9	11	2	98	\pm 2.4
NOP												
($\mu\text{g/ml}$)												
25	11 *	\pm 0.7	36.2 **	\pm	2.3	39	5	4	1	0	92	\pm 1.6
50	20 *	\pm 1.3	38.8 **	\pm	3.1	30	8	10	2	0	98	\pm 3.4
75	24 *	\pm 2.0	52.1 **	\pm	2.0	26	6	14	4	0	98	\pm 2.1
100	29 *	\pm 1.9	73.0 **	\pm	4.5	21	5	19	5	0	94	\pm 1.3
150	32 *	\pm 1.8	88.2 **	\pm	3.6	18	2	22	8	0	94	\pm 1.5
200	42 *	\pm 3.0	105.1 **	\pm	5.7	8	10	22	10	0	94	\pm 2.5

^a Promedio de 3 experimentos n= 150 células

^b Grados de daño al ADN definidos de acuerdo al tamaño de cauda del cometa: Nivel 0 = sin daño al ADN; Nivel 1= 1-60 μm , Nivel 2= 61-120 μm ; Nivel 3= 121-180 μm ; Nivel 4 = 181-241 μm (máximo daño).

* Diferencias significativas entre los grupos experimentales y el testigo, $F_{\text{neem}} = 52.30$, $p < 0.00001$ $F_{\text{endosulfan}} = 20.02$, $p < 0.0004$ $F_{\text{NOP}} = 53.03$, $p < 0.00001$

** Diferencias significativas entre los grupos experimentales y el testigo, $F_{\text{neem}} = 297.15$, $p < 0.0001$ $F_{\text{endosulfan}} = 297.15$, $p < 0.0001$ $F_{\text{NOP}} = 297.15$, $p < 0.0001$

Tabla II. Comparación de los modelos regresión lineal simple (RLS) y no-lineal (Monomolecular) para evaluar la respuesta genotóxica a los insecticidas (neem y endosulfan) y la NOP.

		neem		endosulfan		NOP	
		Regresión Lineal Simple	Modelo no-Lineal (Monomolecular)	Regresión Lineal Simple	Modelo no-Lineal (Monomolecular)	Regresión Lineal Simple	Modelo no-Lineal (Monomolecular)
Frecuencia de células con daño	Hongzhi	5.488	3.83	4.2262	2.4281	4.717	3.7863
	R ²	0.8709	0.978	0.9262	0.9853	0.9481	0.9818
	R	0.9332	0.9889	0.9624	0.9926	0.9737	0.9909
	p	0.006	0.0004	0.002	0.00021	0.001	0.00032
	DW	1.7780		1.4700		1.8770	
Longitud de cauda (µm)	Hongzhi	9.103	6.8916	8.5089	5.9712	5.4334	5.7285
	R ²	0.6049	0.9708	0.5998	0.9707	0.9713	0.9741
	R	0.7777	0.9853	0.7744	0.9852	0.9855	0.9870
	p	0.068	0.00084	0.07055	0.00085	0.0003	0.00067
	DW	1.0920		1.0170		2.0820	

DW: prueba de Durbin-Watson.

Tabla III. Comparación de pendientes la respuesta genotóxica a los insecticidas (neem y endosulfan) y la NOP.

		T	p		Hipótesis aceptada
Frecuencia de células con daño	Neem-endosulfan	0.6024963	0.56353	bc 1y2 = 0.03465	Ho= b1=b2
	Endosulfan-NOP	12.871412	0.00000	Intersecto XI = -5.1290 µg ŶI= 8.2879 frecuencia	Ha= b2≠ b3
	Neem-NOP	10.536544	0.00001	Intersecto XI = 3.3147 µg ŶI= 11.8487 frecuencia	Ha= b1≠ b3
Longitud de cauda	Neem-endosulfan	1.1172717	0.29631	bc 1y2 = 0.1519	Ho= b1=b2
	Endosulfan-NOP	2.3894945	0.04389	Intersecto XI = 116.4 µg ŶI= 92.61 longitud	Ha= b2≠ b3
	Neem-NOP	2.8191116	0.02252	Intersecto XI = 80.93 µg ŶI= 71.52 longitud	Ha= b1≠ b3

bc coeficiente de regresión común.

p es el valor de la significancia.

T es el valor del estadístico de prueba.

XII. FIGURAS

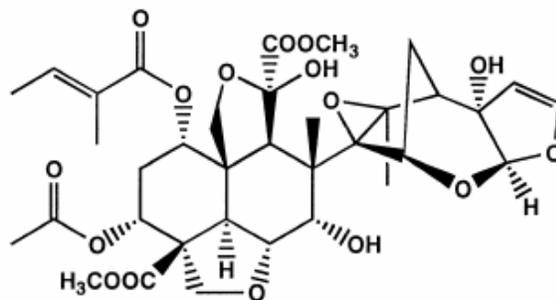


Fig. 1. Estructura química de la azadiractina.

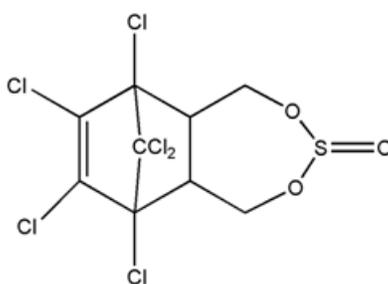


Fig. 2. Estructura química del endosulfan.

Fórmula química: C₉H₆Cl₆O₃S

CAS número de registro: 115-29-7

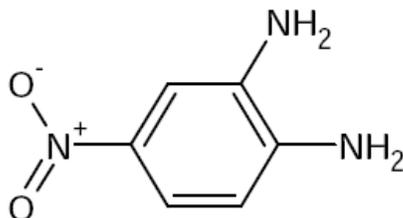


Fig. 3. Estructura química de la 4-nitro-o-fenilendiamina (NOP).

Formula: C₆H₇N₃O₂

CAS número de registro: 99-56-9

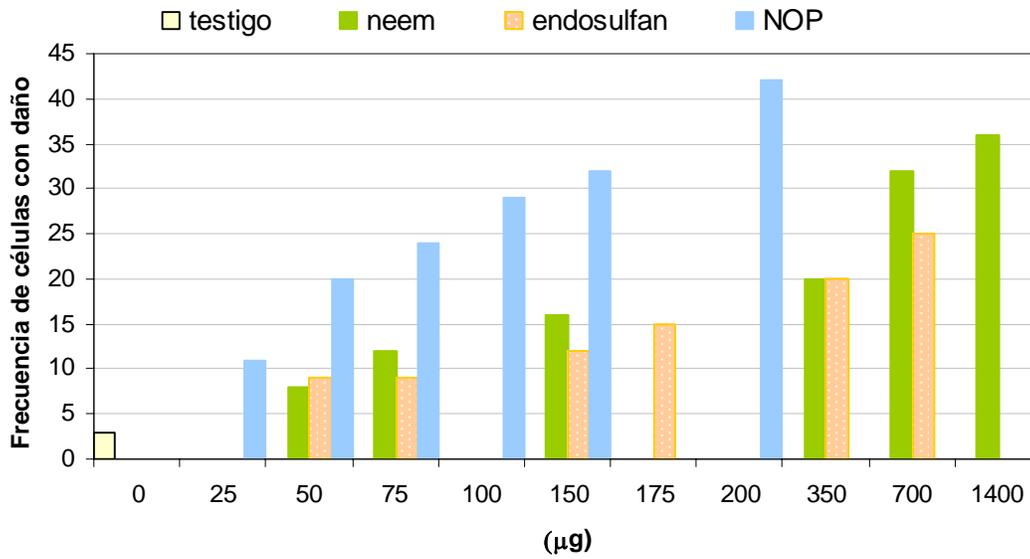


Fig. 4. Promedios de la frecuencia de células con daño al ADN (con cometa) en los linfocitos periféricos humanos expuestos y no expuestos al neem, endosulfan y NOP, *in vitro*.

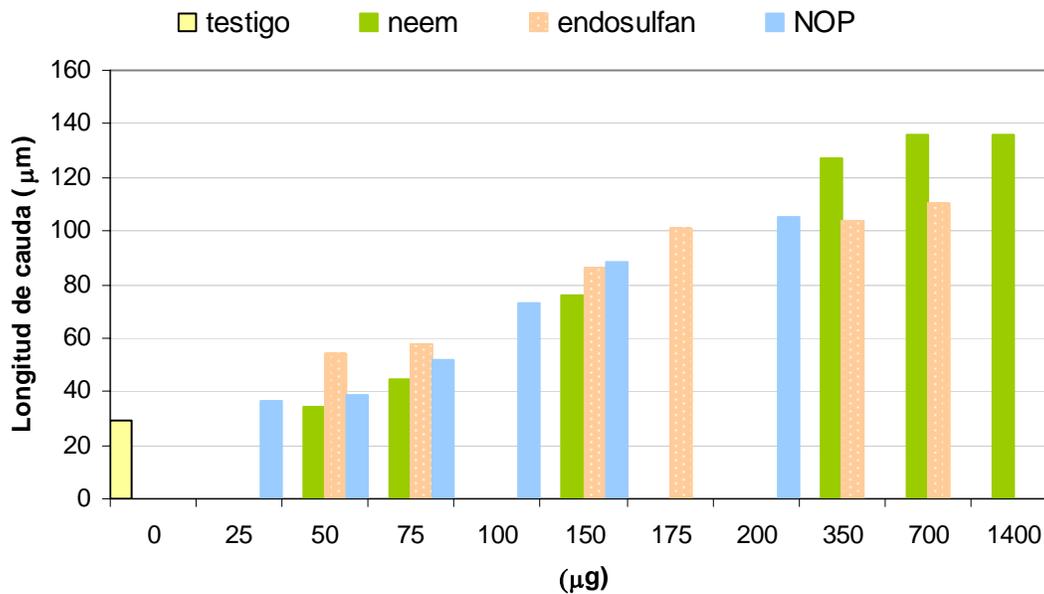


Fig. 5. Promedios de la longitud de cauda del cometa de los linfocitos periféricos humanos expuestos y no expuestos al neem, endosulfan y NOP, *in vitro*.

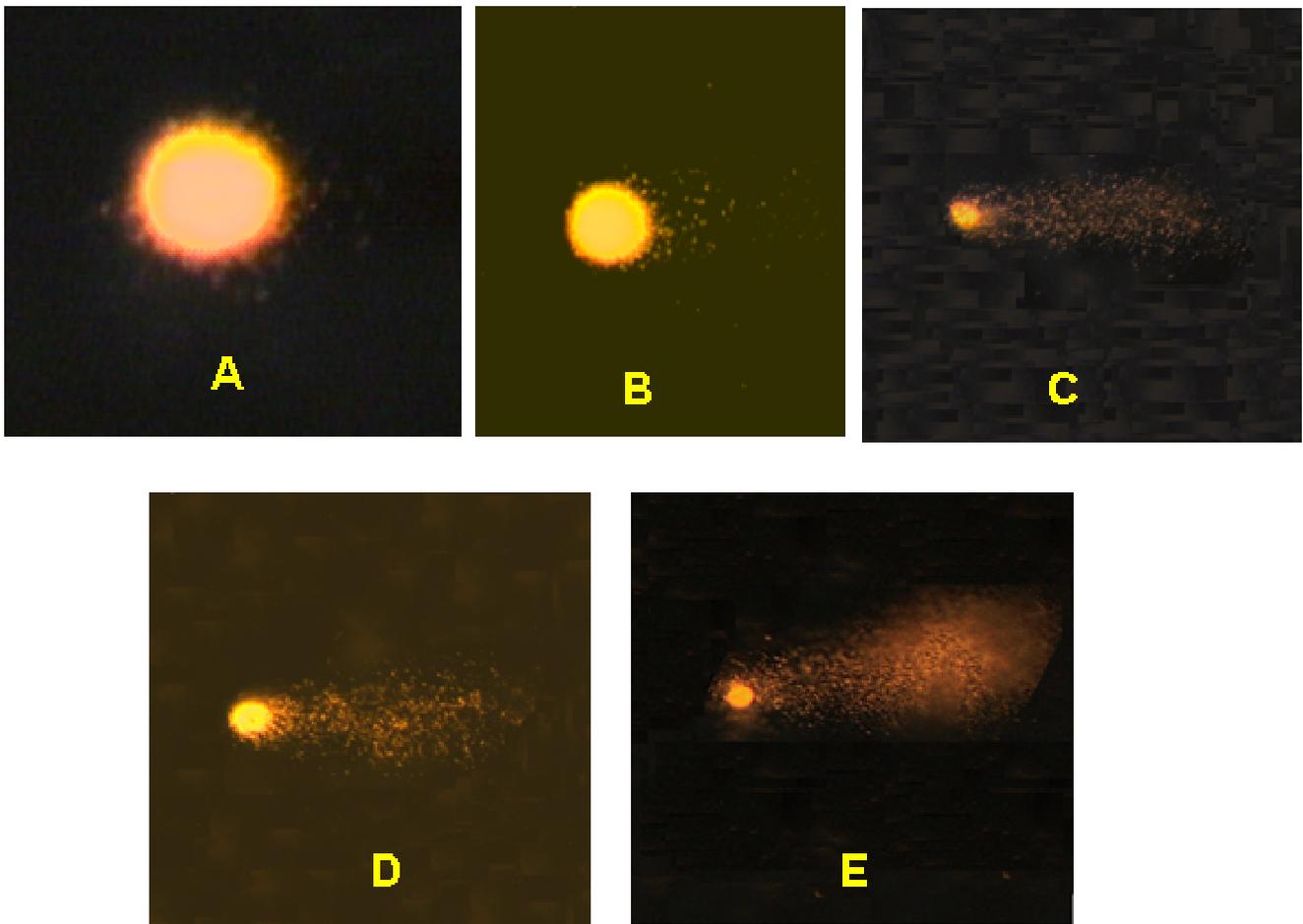


Fig. 6. Imágenes representativas de núcleos con y sin cometa (con y sin daño al ADN) de los linfocitos periféricos humanos expuestos a los insecticidas neem y endosulfan y a la amina aromática NOP, *in vitro*. **(A)** Nivel 0: sin daño al ADN; **(B)** Nivel 1: 1, 4-50 μm . **(C)** Nivel 2: 51-100 μm . **(D)** Nivel 3: 101-150 μm . **(E)** Nivel 4, 151-200 μm .

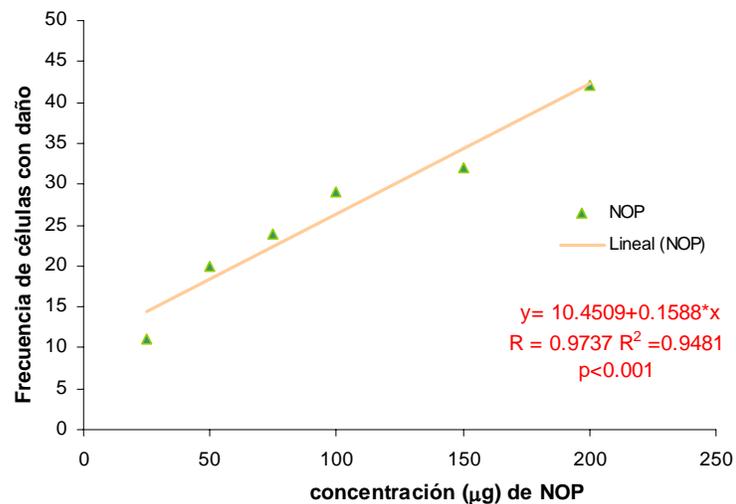
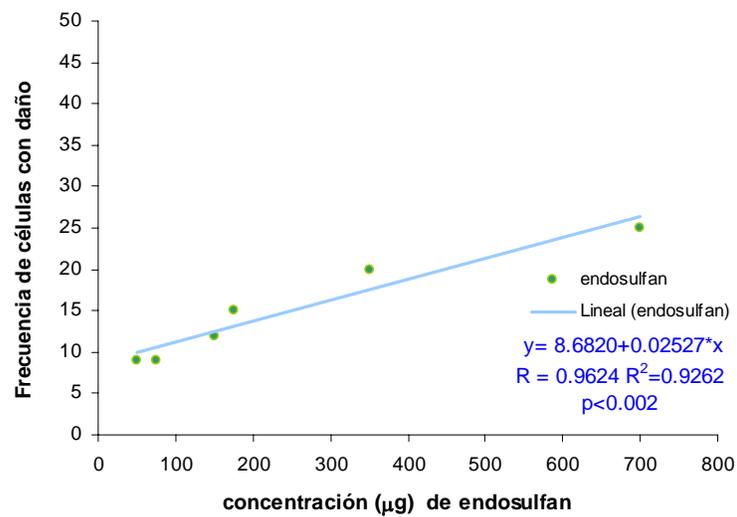
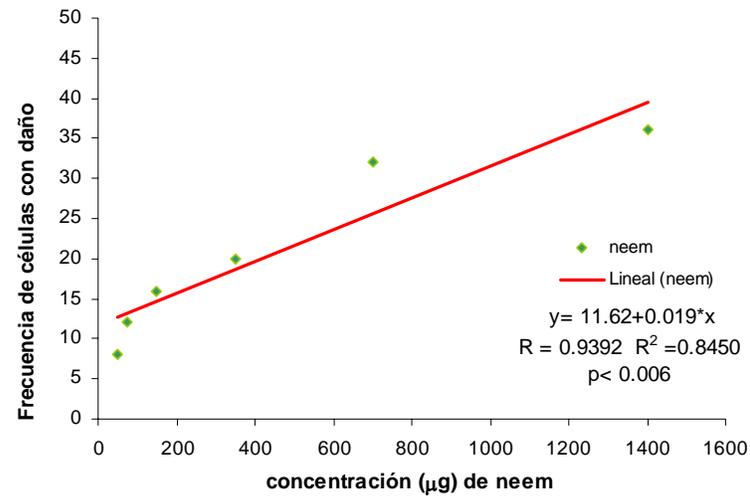


Fig. 7. Regresiones lineales de los valores promedio de la frecuencia de células con daño al ADN (con cometa) en los linfocitos periféricos humanos expuestos y no expuestos al neem, endosulfan y NOP, *in vitro*.

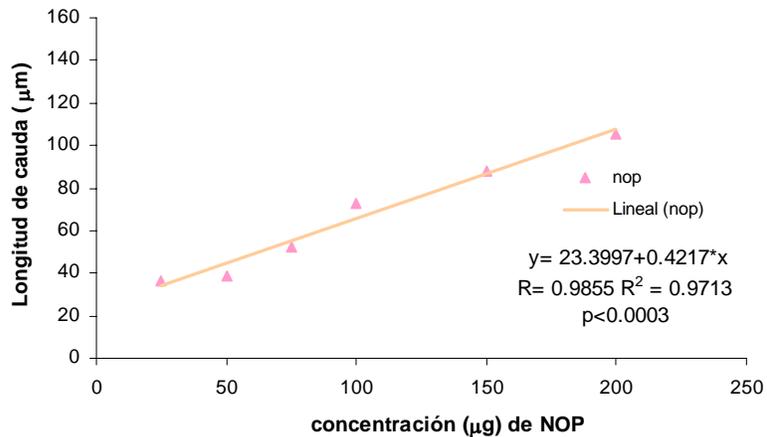
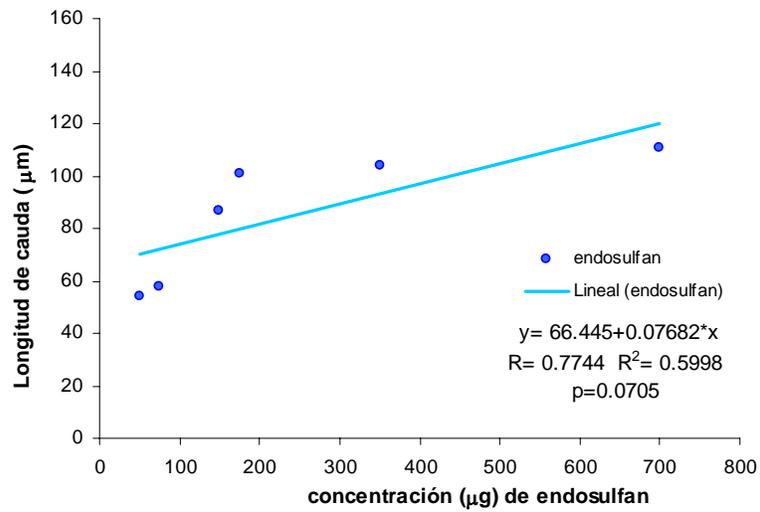
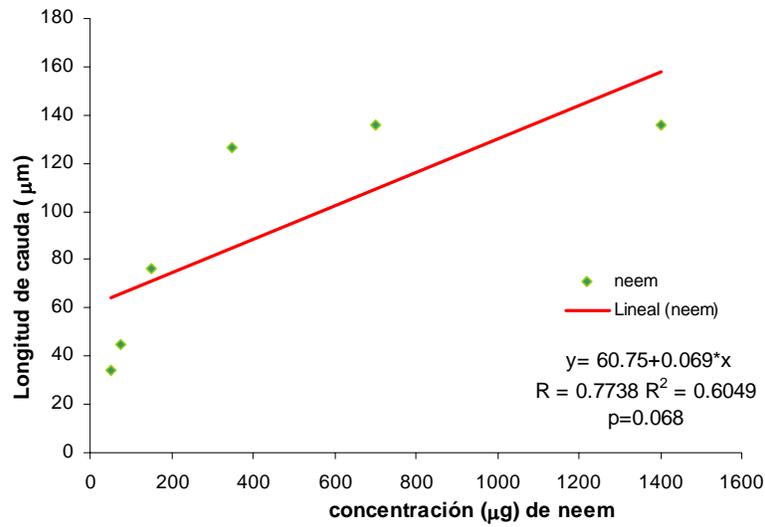


Fig. 8. Regresiones lineales de los valores promedio de la longitud de la cauda del cometa de los linfocitos periféricos humanos expuestos y no expuestos al neem, endosulfan y NOP, *in vitro*.

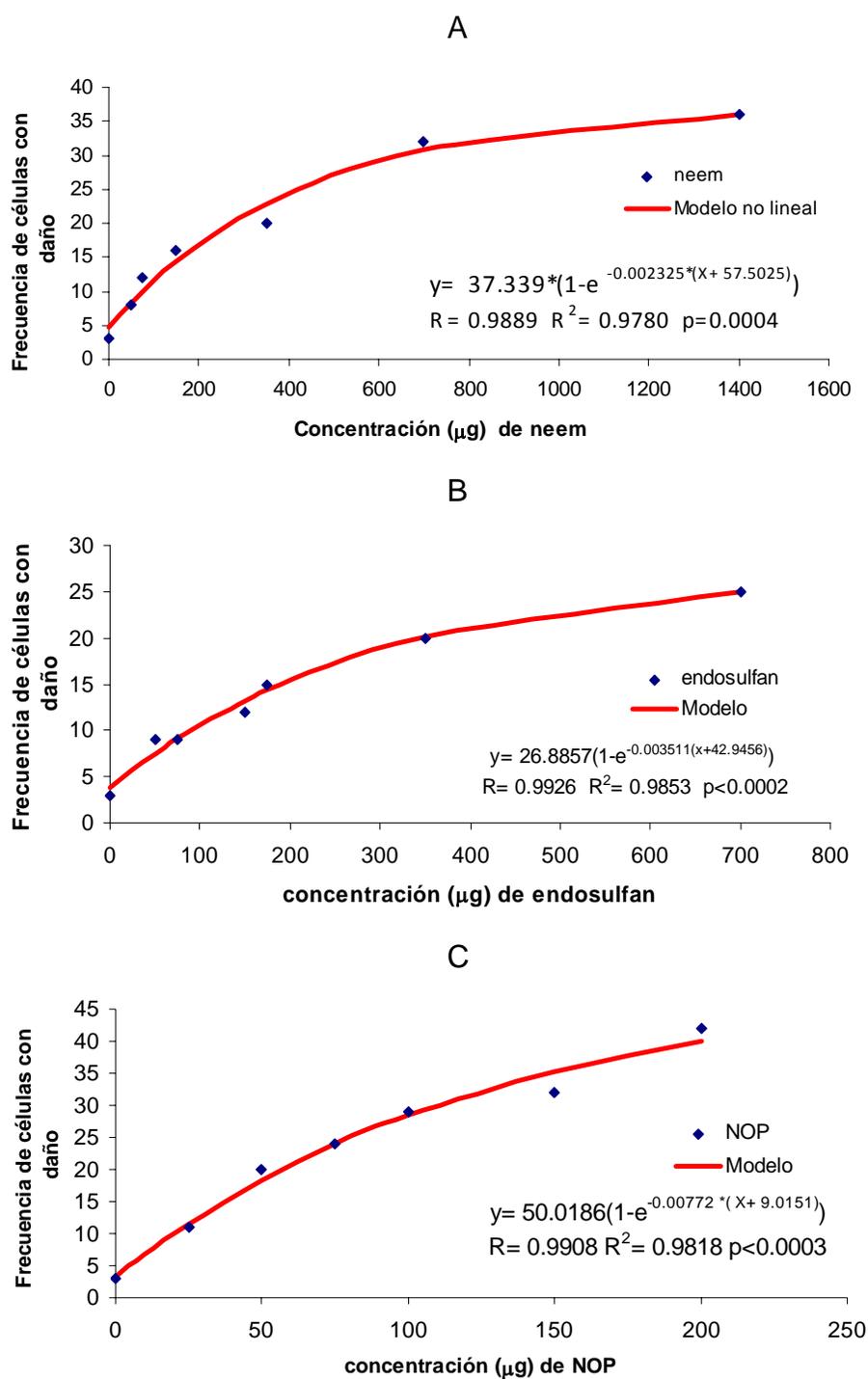


Fig. 9. Modelos no-lineales (monomolecular) de los valores promedio de la frecuencia de células con daño al ADN (con cometa) en los linfocitos periféricos humanos expuestos y no expuestos al neem, endosulfan y NOP, *in vitro*.

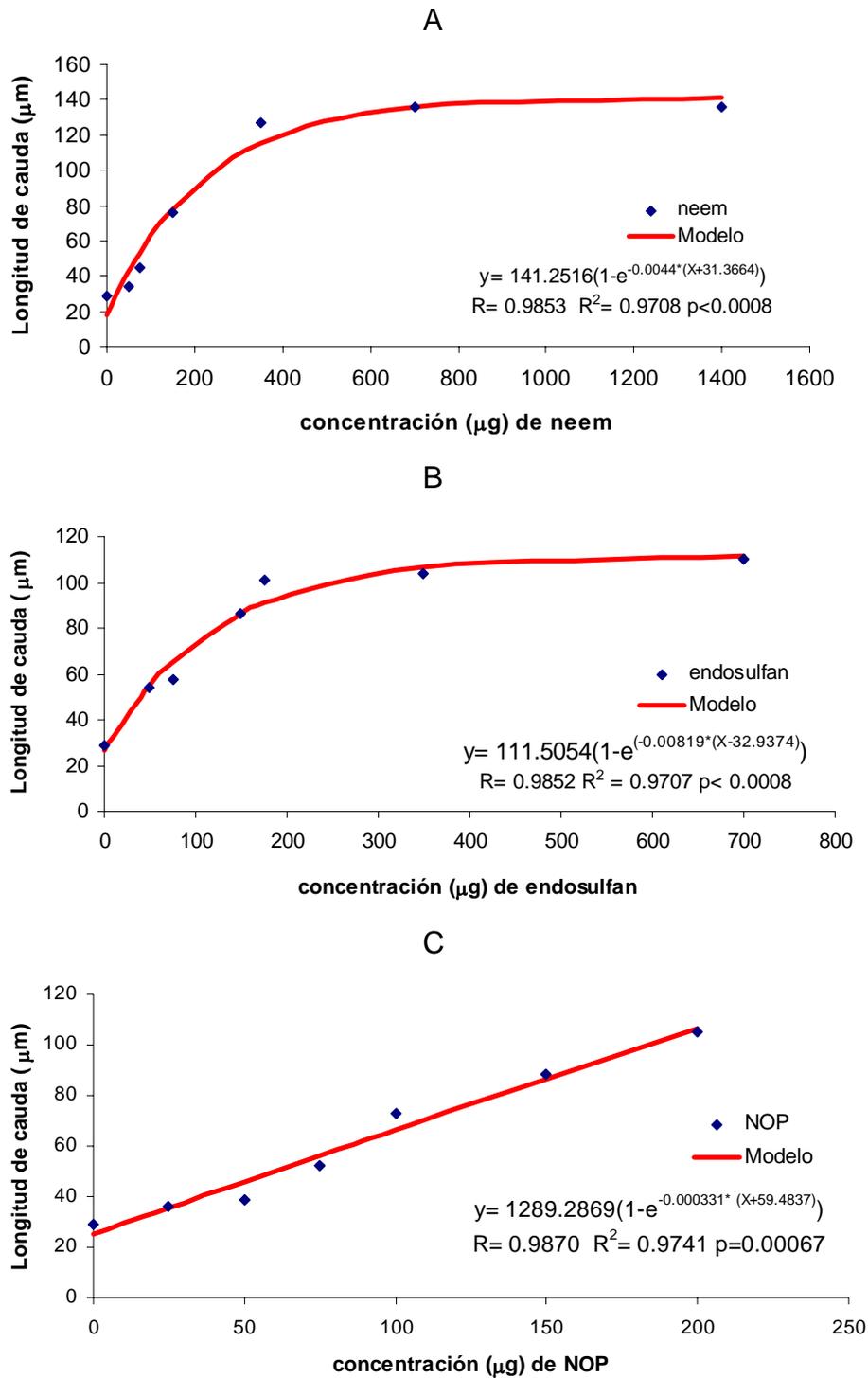


Fig. 10. Modelos no-lineales (monomolecular) de los valores promedio de la longitud de la cauda del cometa de los linfocitos periféricos humanos expuestos y no expuestos al neem, endosulfan y NOP, *in vitro*.

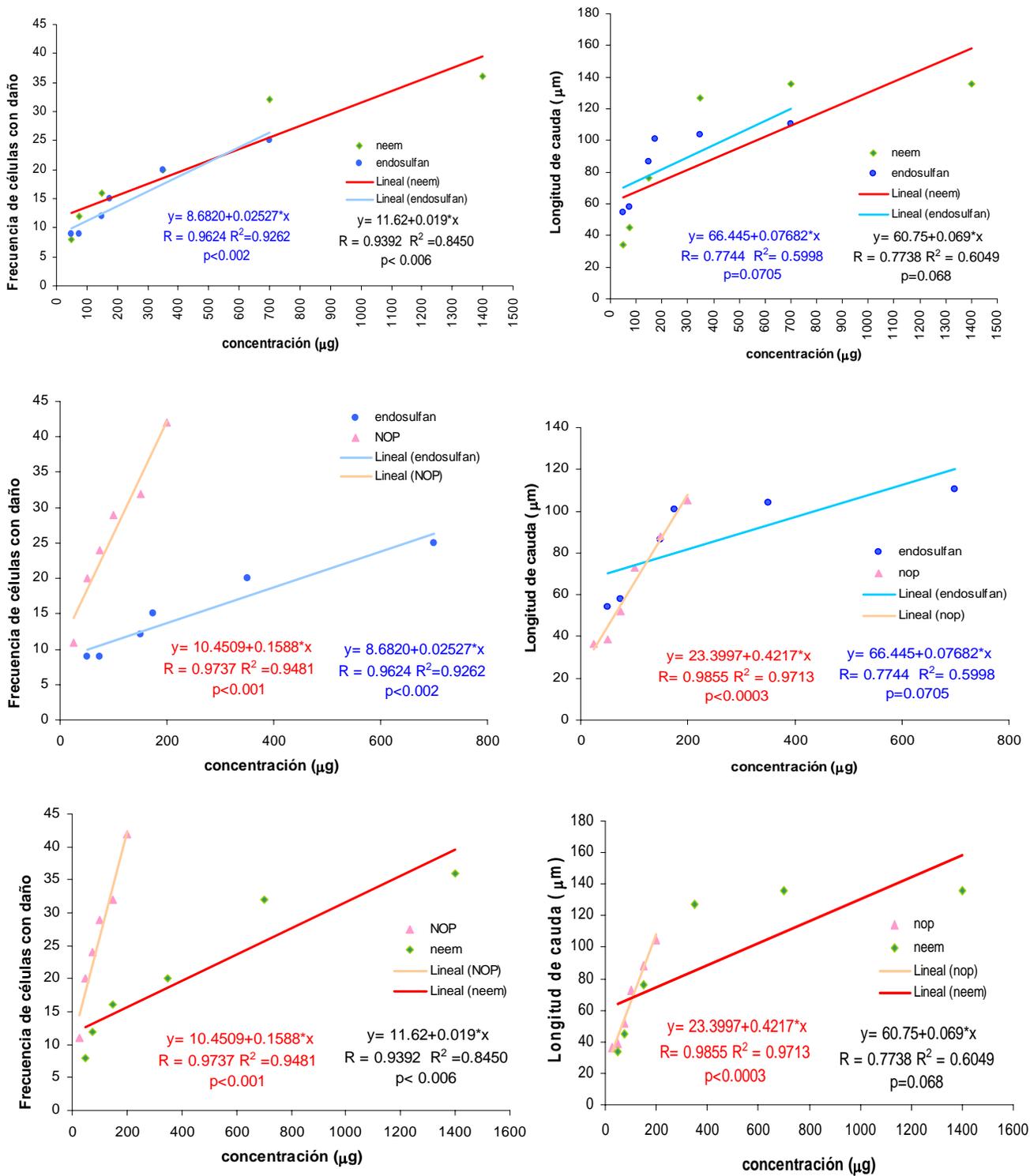


Fig. 11. Comparación de pendientes de las regresiones lineales de los valores promedio de la frecuencia de células con daño al ADN y longitud de la cauda del cometa de los linfocitos periféricos humanos expuestos y no expuestos al neem, endosulfan y NOP, *in vitro*.

ANEXO

Durbin-Watson (DW).

Este demuestra la existencia de autocorrelación serial de primer orden entre los residuales, caso en el cual el modelo aproxima los datos con errores sistemáticos (Posada 2007).

Durbin-Watson se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$DW = \frac{\sum_{t=2}^n (e_t - e_{t-1})^2}{\sum_{t=1}^n e_t^2}$$

Donde e_t = residual al tiempo t , y e_{t-1} = residual al tiempo $t-1$.

Los modelos con menor autocorrelación ofrecen residuales más pequeños y no tendenciosos. Este coeficiente evalúa el valor crítico (d_L y d_U).

Si $DW > d_U$, se concluye que no hay correlación serial de primer orden entre los residuales.

Si $DW < d_L$, se concluye que hay correlación serial de primer orden entre los residuales.

Si $d_L \leq DW \leq d_U$, no hay autocorrelación y por tanto es adecuado utilizar un modelo lineal (Posada 2007).

Para los datos analizados en este trabajo los resultados deben estar dentro del rango $d_L (1.23) \leq DW \leq d_U (2.77)$ para aplicar un modelo lineal.

Modelos

Los modelos lineales han dominado los métodos estadísticos relacionados con la investigación, ya que la teoría para probar estos modelos es muy simple (los cálculos de los parámetros estimados en estos modelos requieren sólo de la solución de un

grupo de ecuaciones de manera simultanea), aunque no siempre son los más adecuados para situaciones biológicas (Mead y Curnow 1993).

Muchos modelos no-lineales se emplean comúnmente para buscar formas realistas sobre el comportamiento biológico (Mead y Curnow 2003).

Los mejores modelos son aquellos que presentan el balance entre la capacidad de ajuste de los datos y la coherencia biológica, siendo necesaria su evaluación en las más variadas condiciones experimentales, a fin de escoger el mejor para cada situación. Los modelos con un mayor número de parámetros tienden a ajustar mejor una base de datos (Mead et al. 1993, Posada et al. 2007).

La función monomolecular $a(1-e^{-bx})$, “llamada así”, por que representa el incremento sobre el tiempo de un producto de una reacción de una molécula simple (Bolker 2008).

Esta función tiene dos parámetros (Bolker 2008), que en nuestro caso representan: el multiplicador a , que representa el daño final y la tasa exponencial de b que determina la velocidad de aumento de “ y (frecuencia de células con daño al ADN y longitud de su cauda)” al aumentar la concentración.

Para este trabajo se hizo una modificación al modelo:

$$y = a(1-e^{-b(x-x_0)})$$

Donde X_0 que es la concentración teórica a la que no habría ningún daño (pero que no tiene significado biológico pero se utilizó para que el modelo cruce el eje de las y al nivel de daño basal). Mientras b indica el aumento de daño con respecto a la concentración.

Comúnmente, los modelos que no tienen el mismo número de parámetros, en comparación con los que cuentan con varios parámetros, tiene una desventaja en la capacidad de ajustar los datos (Hilborn y Mangel 1993).

Criterio de Hongzhi.

Propuesto como un análogo del criterio de información de Akaike (AIC) para usar con suma de cuadrados.

$$\text{Criterio de Hongzhi} = \log (SSQ_k) + 2k / n$$

donde SSQ_k es la suma de cuadrados de los residuales para el modelo con k parámetros y n es el numero de puntos (Hilborn y Mangel 1997).

Se busca el valor menor y así seleccionamos el modelo que mejor se ajuste a los datos.