

## EFFECTO DE BUTILATE Y DE MOLINATE SOBRE LA DIVISION DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO CON Y SIN ACTIVACION METABOLICA *in vivo* e *in vitro* POR *Vicia faba*

Ma. Elena CALDERÓN-SEGURA y Malinali ESPINOSA-RAMÍREZ

Laboratorio de Citogenética Ambiental, Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, D.F., México.

(Recibido noviembre 1997, aceptado mayo 1998)

Palabras clave: herbicidas tiocarbámicos, cinética de proliferación celular, índice mitótico, índice de replicación, activación vegetal

### RESUMEN

Para evaluar los efectos de los herbicidas tiocarbámicos, butilate y molinate, con y sin activación metabólica por la raíz de *Vicia faba in vivo* e *in vitro* fueron determinados los índices mitótico (IM) y de replicación (IR) y la cinética de proliferación celular (CPC) en los cultivos de linfocitos humanos (CLH). Ambos herbicidas aplicados directamente por 4 h a los CLH estimularon la CPC, incrementaron la frecuencia de células M3 e inhibieron la mitosis a concentraciones elevadas. Con los dos plaguicidas IM e IR no fueron modificados por el butilate mientras que el IM disminuyó con el molinate. En presencia del sistema de activación metabólica *in vitro* ambos tiocarbámicos tuvieron el mismo efecto sobre CPC e IR, excepto que 75 ppm de molinate directo aumentaron el IM y 300 ppm no tuvieron acción sobre el ciclo celular. En los tratamientos directos por 48 h a los CLH, el butilate y el molinate retardaron la CPC y a concentraciones elevadas suprimieron la mitosis. IR e IM disminuyeron con relación a su respuesta con la concentración a niveles testigos. Cuando se agregaron los extractos de las raíces de *Vicia faba* tratadas con el butilate (sistema de activación *in vivo*) a los CLH por 48 h, al comparar con el testigo se notó que la CPC fue estimulada y el IR no fue afectado pero el IM descendió hasta bloquear la mitosis. El efecto fue inverso sobre la CPC con el molinate, IM e IR disminuyeron y a partir de 400 ppm no mostró efecto sobre éstos parámetros. Por otra parte, el etanol aplicado sin y con activación metabólica *in vivo* e *in vitro* a los CLH por 4 h no tuvo efecto sobre los tres criterios de evaluación, excepto que estimuló la CPC y aumentó la frecuencia de células M3 en el ensayo *in vitro*. La fracción enzimática y la mezcla S10 utilizadas en los sistemas de activación metabólica *in vivo* e *in vitro* no mostraron efecto sobre la CPC, el IM y el IR. Estos resultados sugirieron que CPK, IR e IM son parámetros útiles para la evaluación de la actividad citotóxica y citostática de plaguicidas.

### ABSTRACT

The mitotic (MI) and replication (RI) indexes and cell proliferation kinetics (CPK) of human lymphocyte cultures (HLC) were employed to evaluate the effects of thiocarbamic herbicides butylate and molinate with and without metabolic activation by *Vicia faba in vivo* and *in vitro*. Both herbicides directly applied to HLC for 4 hours stimulated CPK, increased M3 cells frequency and inhibited mitosis at higher concentrations. RI was not affected by the pesticides but molinate diminished MI to control values. The two herbicides with *in vitro* activation showed similar effects for CPK, MI and RI indexes, except for 75 ppm molinate that, when applied directly, increased M3. 300 ppm had no action on the cell cycle. Direct treatment with butylate and molinate on HLC for 48 hours delayed CPK and increased M1 cells frequency, higher concentrations inhibited mitosis. MI and RI decreased to control values in a concentration related manner. When the extracts of the roots (*in vivo* activation) treated with butylate were added to HLC for 48 h, CPK was stimulated and RI was not modified, while MI decreased to control values. Molinate showed an opposite effect on CPK, MI and RI decreased and 400 ppm had no effect on three parameters. On the other hand, RI and MI were not affected by ethanol with and without metabolic activation *in vivo* and *in vitro*, but had a positive response in *in vitro* assays, stimulating CPK and increasing M3 cells frequency. The *Vicia faba* extracts alone and S10 mixture had no effect on CPK, RI and MI. Thiocarbamic herbicides butylate and molinate with and without plant activation *in vivo* and *in vitro* by *Vicia faba* roots showed altered CPK, MI, and RI. These results suggest that CPK, RI and MI measurements are useful to screen potential cytotoxic and cytostatic activities of pesticides.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los campos agrícolas están expuestos a diversos compuestos, como fertilizantes, inhibidores del crecimiento, pesticidas etc., que han incrementado la cantidad de contaminantes en el aire, el agua y el suelo (Pimentel *et al.* 1991). En numerosos estudios se ha corroborado que algunos agentes químicos inducen directamente modificaciones en el DNA, en tanto que otros requieren del metabolismo realizado por la fracción microsómica S9 de las células hepáticas de mamíferos para activarse y así provocar daño. Durante décadas pasó inadvertido que los vegetales poseen dicho metabolismo o sistemas enzimáticos, sin embargo, recientemente se ha demostrado la activación de compuestos químicos y pesticidas por las plantas, los cuales evidencian su actividad mutagénica en diversos organismos que se consideran sensores o indicadores del daño genético. A los agentes químicos que por sí mismos no son mutagénicos y que requieren de la activación metabólica para ejercer dicho efecto se les denomina "promutágenos" o "mutágenos indirectos" (Plewa 1978). El término activación vegetal denota el proceso mediante el cual un agente químico no mutagénico es transformado por la acción enzimática de una planta en mutágeno (Plewa 1978, Gentile *et al.* 1982, 1986, Plewa y Gentile 1982, Plewa *et al.* 1984).

Los experimentos de activación vegetal se pueden realizar *in vivo* o *in vitro*, en la primera situación, el agente químico que se prueba es aplicado a una planta viva intacta que semeja las condiciones de los campos agrícolas y cuyos extractos son agregados a un cultivo celular y en la segunda, el agente es coincubado con un homogeneizado vegetal o en un cultivo de células del tejido de la planta (Plewa y Gentile 1982, Plewa *et al.* 1984). En ambos métodos la acción del metabolismo vegetal sobre un mutágeno potencial se prueba en un microorganismo indicador como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Aspergillus nidulans*, etc. o en células en cultivo de mamífero tales como linfocitos humanos periféricos, células de ovario de criceto dorado, etc., analizando la inducción de mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas, para evaluar así las propiedades genotóxicas de los agentes químicos y/o sus metabolitos (Plewa 1978, Plewa y Gentile 1982, Takehisa *et al.* 1982, Plewa *et al.* 1984, Velemínský y Gichner 1988, Plewa y Wagner 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995). Los ICH son una prueba citogenética rápida y sensible, puesto que son producidos a concentraciones menores que las requeridas para provocar aberraciones cromosómicas y ofrecen un método adecuado para detectar mutágenos y/o carcinógenos ambientales (Latt 1974, Perry y Evans 1975, Kato 1977). Adicionalmente a estas investigaciones, la cinética de proliferación linfocitaria y los índices mitótico y de replicación, estimulados por un mitógeno como la fitohemaglutinina, permiten establecer criterios biológicos que se consideran importantes en la genética toxicológica. Este tipo de análisis es particularmente usado para determinar los efectos inmediatos de las drogas citotóxicas o de los tratamientos con las citocinas en poblaciones de células tumorales.

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

Las proteínas reguladoras del ciclo celular incluyen a una familia especial conocida como ciclinas (se hallan cinco en las células humanas, A-E) y a sus proteínas asociadas, las cinasas y las fosfatasa. Las concentraciones de las ciclinas difieren en las distintas fases del ciclo, por ejemplo A y B se acumulan en la interfase y disparan la transición entre  $G_2$  y M, estas concentraciones son relativa y rápidamente degradadas con la inducción de las células a la mitosis. La inhibición de su síntesis detiene el ciclo celular en interfase. Algunas de estas proteínas también muestran diversos grados de fosforilación en las fases del ciclo celular. Otras proteínas conocidas como cinasas, dependientes de las ciclinas (CDKs), se unen a estas proteínas para activar a otras que fosforilan a otras proteínas intracelulares, la *cdc2*, que ha mostrado ser la mejor reguladora del ciclo celular. En todos los eucariotes la entrada a la fase M depende críticamente de la activación del complejo *cdc2*/ciclina B. La destrucción rápida de las ciclinas (vía ubiquitina) guía a la pérdida de actividad de los componentes de la cinasa, diversas proteínas reguladas por un mitógeno (MRP) son de función desconocida y sintetizadas después de la estimulación de las células por factores de crecimiento mitogénicos. Los cambios transcripcionales y el incremento temporal en los RNAm corresponden a varios

oncogenes (por ejemplo, el producto del gen del retinoblastoma y la proteína p53), factores de transcripción y citocinas y son observadas durante todas las fases del ciclo celular. Las células que regularmente no se dividen (quiescentes) son usualmente denominadas células  $G_0$ , que normalmente son detenidas en la fase  $G_1$  antes de iniciar S. Algunos factores de crecimiento mitogénicos, como las citocinas actúan sobre las células  $G_0$  para el reinicio del ciclo celular, con la transición de la fase  $G_0$  a  $G_1$ , proceso muy complejo que involucra la inducción selecta y coordinada de la expresión de cientos de genes diferentes y probablemente la represión de otros. Después de la estimulación celular, las células tienen un limitado número de receptores para los factores de crecimiento y otros ligandos, estos últimos se unen a sus respectivos receptores (fase de iniciación) y las células llegan a ser "competentes" y responden a otros factores, la unión de nuevos ligandos a sus receptores median la señal para el transcurso del ciclo celular (fase de progresión), que son conocidos como factores de progresión (Pagano *et al.* 1992a, b, 1993).

Investigaciones recientes relativas al control molecular del ciclo celular han conducido al desarrollo de nuevos métodos para inducir la proliferación celular que son usados como terapia de lesiones en órganos y tejidos incluyendo la reparación de neuronas maduras que no pueden dividirse. Por otra parte, estos hallazgos podrían ayudar a reducir la reproducción desenfrenada de las células cancerígenas. La regulación de su actividad y/o la alteración de ciertas proteínas involucradas en el ciclo o en la proliferación celular, como el factor que promueve a la maduración (PMF) y la cdc2, ayudarían a impedir que se altere la fisiología de algún órgano o que las células entren a mitosis, con la consecuente prevención de la producción de la metástasis y del cáncer. El conocimiento del proceso de regulación y/o control del ciclo celular ha llevado al empleo de un tipo de terapia tumoral conocida como terapia del ciclo celular que se basa esencialmente en el tratamiento de las células  $G_0$  con citocinas para inducir las a entrar a la fase S, haciéndolas vulnerables a la acción de las drogas específicas de la fase S. Además ha servido para diseñar tratamientos de protección a las células tronco-no cíclicas.

Estudios de exposición ocupacional a diferentes plaguicidas han mostrado retraso en el ciclo de proliferación celular y disminución en el índice mitótico (Rupa *et al.* 1991). Este mismo comportamiento se ha observado *in vitro* donde se muestra que los insecticidas organofosforados metilparatión, malatión y metilazinfos son capaces de inducir efectos similares sobre estos parámetros (Sobti *et al.* 1982).

En México, los herbicidas tiocarbámicos butilate y molinate son asperjados en grandes cantidades sobre diversos cultivos agrícolas, principalmente arroz y maíz para el control de plántulas preemergentes de las malas hierbas y *Echinochloia* spp, respectivamente (WHO 1988). Estos herbicidas son volátiles y estables en condiciones ácidas, tienen un vida media muy corta en los suelos debido a su rápida fotodegradación, volatilización y metabolización por la flora microbiana (WHO 1988). La mayoría de los tiocarbámicos inhiben la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos *in vivo* e *in vitro* de diversas especies vegetales

(Deal *et al.* 1980). El molinate es más tóxico en los peces (*Cyprinus carpio*,  $LC_{50}$  = 0.21 mg/L 28 días) que en los mamíferos (ratas,  $LS_{50}$  = 720 mg/kg) (Hubell y Casida 1977, Finlayson y Faggella 1986). Son pocos los estudios genéticos llevados a cabo, sin embargo, se ha mostrado que el molinate no es mutagénico en procariotos (Carere y Morpurgo 1981), pero es positivo para la inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón (Pintér *et al.* 1990) y provoca aberraciones cromosómicas en células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* (Gómez-Arroyo *et al.* 1992). El butilate induce mutaciones recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster* (Murnik 1976).

El hecho de considerar a los vegetales como alimentos totalmente sanos e inoocuos debe revisarse, ya que en ellos están contenidos tanto los residuos de los plaguicidas como sus metabolitos almacenados en diversas estructuras, por lo que resultan un riesgo potencial ya que al ser ingeridos por los animales o por el hombre pueden causarles efectos en su salud. Por estas razones en la presente investigación se verificaron las alteraciones que provocan dichos agentes químicos y/o sus metabolitos formados por *Vicia faba* en tratamientos tanto *in vivo* como *in vitro* sobre la cinética de proliferación celular y los índices mitótico y de replicación de linfocitos humanos en cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tratamientos directos con butilate y molinate en linfocitos humanos en cultivo

Se prepararon soluciones madre de molinate y butilate (72%, Química Lucava, México) que fueron disueltas en agua destilada e inmediatamente aplicadas a los cultivos de linfocitos humanos de la siguiente forma:

A los frascos de cultivo se les agregó 3 ml de medio Gibco (RPMI 1620) complementado con 0.02 ml de fitohemaglutinina (Gibco) más 8 gotas de sangre heparinizada de un donador sano, 24 h después del cultivo se adicionaron las siguientes concentraciones en ppm y (molares) 6.25 ( $3 \times 10^{-5}$ ), 12.50 ( $5.8 \times 10^{-5}$ ), 50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ) y 200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ ) y 300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ ) de butilate, y 25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $4 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $1 \times 10^{-3}$ ) y 300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ ) de molinate y 3600 ( $1 \times 10^{-1}$ ) de etanol más 100  $\mu$ l de bromodesoxiuridina (5-BrdU) y al testigo sólo la 5-BrdU. A las 70 h se les aplicaron 100  $\mu$ l de colchicina y a las 72 h se colocaron en 0.075 M de KCl a 37 °C por 20 min y después se fijaron en metanol-ácido acético 3:1. Las laminillas se realizaron por goteo y se reetiquetaron con clave desconocida, se sumergieron en Hoechst 33258 en la oscuridad por 20 min, se irradiaron con luz UV por 30 min, se pusieron en citrato de sodio salino en baño María a 60 °C y se tiñeron por el método de fluorescencia más Giemsa al 10% (Perry y Wolff 1974).

### Activación metabólica *in vivo*

*Aplicación de los extractos de las raíces de Vicia faba tratadas con butilate y molinate al cultivo linfocitos humanos*

Se pusieron a germinar semillas de *Vicia faba* entre dos capas de algodón humedecido hasta que las raíces principales alcanza-

ron de 4 a 6 cm de longitud, se sumergieron en las siguientes concentraciones en ppm (y molares): 100 ( $4.6 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $9.2 \times 10^{-4}$ ), 300 ( $1.4 \times 10^{-3}$ ), 400 ( $1.8 \times 10^{-3}$ ), 500 ( $2.3 \times 10^{-3}$ ), 750 ( $3.5 \times 10^{-3}$ ), 1000 ( $4.6 \times 10^{-3}$ ), 1500 ( $6.9 \times 10^{-3}$ ) y 2000 ( $9.2 \times 10^{-3}$ ) de butilate, y 100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $1 \times 10^{-3}$ ), 300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ ), 400 ( $2.1 \times 10^{-3}$ ), 500 ( $2.7 \times 10^{-3}$ ), 750 ( $4 \times 10^{-3}$ ), 1000 ( $5.3 \times 10^{-3}$ ), 1500 ( $8 \times 10^{-3}$ ) y 2000 ( $1 \times 10^{-2}$ ) de molinate durante 4 h en la obscuridad y a temperatura ambiente. Para tener la certeza de la capacidad metabólica de *Vicia faba* se empleó como testigo positivo al etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$  M), que ha demostrado ser un promutágeno de esta planta e incrementar la frecuencia de ICH en células de criceto dorado y en linfocitos humanos periféricos tanto *in vitro* como *in vivo* (Takehisa *et al.* 1988, Calderón-Segura 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995) y el testigo negativo fue solo agua destilada estéril. Ambos testigos estuvieron bajo las mismas condiciones experimentales. Transcurrido este lapso, se cortaron 2 cm de la raíz principal, se maceraron y homogeneizaron en amortiguador de fosfatos de sodio pH 7.4 a temperatura entre 0-4 °C, la relación fue 1:1 peso de las raíces/volumen de amortiguador, se homogeneizaron a 1500 rpm y finalmente se ultracentrifugaron a 11500 rpm a 4 °C. Los extractos de las raíces tratadas con los herbicidas y de las testigos se esterilizaron por filtración miliporo ( $0.45 \mu\text{m}$ ) y se aplicaron 100  $\mu\text{l}$  de los extractos de las raíces tratadas con las diferentes concentraciones de molinate, butilate y de los testigos negativos y positivos a los linfocitos humanos a las 24 h del cultivo junto con 5-BrUd y se continuó con la técnica mencionada para todos los casos.

El contenido de proteínas fue determinado por el método de BioRad (Bradford 1976), para lo cual se realizó una curva patrón usando albúmina sérica de bovino. Las concentraciones utilizadas en todos los extractos y en la mezcla S10 fueron constantes.

### Activación metabólica *in vitro*

#### Obtención de la fracción enzimática

Se utilizaron 2 g de raíces de *Vicia faba* de 4 cm de longitud, las cuales se maceraron con amortiguador de fosfato de sodio pH 7.4 en relación 1:10 + manitol 1mM (Baker), EDTA (Sigma) 1mM y polivinilpirrolidona (Sigma) 0.6 % a 4 °C, se homogeneizaron a 1500 rpm y finalmente el homogeneizado se ultracentrifugó a 11500 rpm a 4 °C para obtener la fracción microsómica S10 (Takehisa *et al.* 1982, 1988). El contenido de proteínas fue determinado de la misma manera que en el sistema *in vivo*.

#### Mezcla S10

A un volumen de 1:9 (peso/volumen) de la fracción microsómica S10 se le adicionaron  $8 \times 10^{-3}$  M  $\text{MgCl}_2$  (Baker),  $3.3 \times 10^{-3}$  M  $\text{MKCl}$  (Baker),  $5 \times 10^{-3}$  M Glucosa-6 fosfato (Sigma),  $4 \times 10^{-3}$  M  $\text{NAD}$  (Sigma),  $4 \times 10^{-3}$  M  $\text{NADP}$  (Sigma) y  $10^{-1}$  M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  (Baker) (pH 7.4) (Takehisa *et al.* 1988) e inmediatamente se utilizó para los tratamientos siguientes: a cada cultivo de linfocitos humanos de 48 h de incubación se le aplicó 500  $\mu\text{l}$  de la mezcla S10 más las siguientes concentraciones en ppm (y molares): 25 ( $1.3 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.7 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $4 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $5.3 \times 10^{-4}$ ), 200 ( $1 \times 10^{-3}$ ) y 300 ( $1.6 \times 10^{-3}$ ) de molinate y 25 ( $1.1 \times 10^{-4}$ ), 50 ( $2.3 \times 10^{-4}$ ), 75 ( $3.5 \times 10^{-4}$ ), 100 ( $9.2 \times 10^{-4}$ ) y 200 ( $1.4 \times 10^{-3}$ ) de butilate. Los testi-

gos negativos fueron (1) el cultivo de sangre periférica + 5-BrdU y (2) el cultivo de sangre periférica + 5-BrdU + 500  $\mu\text{l}$  de la mezcla S10, y el testigo positivo el cultivo de sangre periférica + 5-BrdU + 500 ml de la mezcla S10 + etanol 3600 ( $1 \times 10^{-1}$  M). Todos estuvieron en agitación constante por 4 h a 37 °C y transcurrido este tiempo los cultivos se lavaron dos veces con solución isotónica de NaCl y se les adicionó el medio Gibco RPMI 1640 más la 5-BrdU y se continuó con la técnica mencionada. La fracción S10 y las soluciones madre del butilate, del molinate y del etanol se esterilizaron por filtración miliporo ( $0.45 \mu\text{m}$ ).

### Cinética de proliferación, índices de replicación y mitótico de los linfocitos periféricos en cultivo

#### Índice de replicación

La incorporación de la 5-BrdU en los linfocitos en cultivo fue utilizada para analizar la cinética de proliferación celular y la citotoxicidad producidas por los dos herbicidas. La cinética de proliferación linfocitaria fue evaluada mediante la determinación de la frecuencia de células metafásicas de primera (M1), segunda (M2) y tercera (M3) divisiones en 100 metafases consecutivas y calculada para el índice de replicación con la fórmula siguiente:

$$\text{IR} = \text{M1} + 2\text{M2} + 3\text{M3}/100$$

Donde: M1 son aquellas células cuyo DNA se replicó una vez en presencia de la 5-BrdU y sus cromátidas están unifilarmente sustituidas; M2, células con DNA dividido dos veces en presencia del análogo de base y con cromátidas uni y bifilarmente sustituidas por este análogo y M3 células que estuvieron en tres ciclos de división (Lamberti *et al.* 1983).

#### Índice mitótico

El índice mitótico se estableció cuantificando la cantidad de metafases en 1000 células estimuladas por experimento.

$$\text{IM} = (\text{cantidad de metafases}/1000) \times 100 = \% \text{IM}$$

En todos los casos se llevaron a cabo dos experimentos. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la  $X^2$ .

## RESULTADOS

Al aplicar los tratamientos directos (4 h) con 25 y 50 ppm de butilate a los cultivos de linfocitos humanos (CLH), no hubo diferencias significativas en la CPC, el IM y el IR con respecto al testigo, pero con 75 y 100 ppm se estimuló la CPC y aumentó la frecuencia de células de tercer ciclo (M3) y con 200 ppm se inhibió la mitosis (Tabla I). Los efectos fueron similares en el caso del molinate, con el mismo esquema de tratamiento, notándose que con 50, 75 y 200 ppm disminuyeron los valores del IM y con 300 ppm se bloqueó la mitosis (Tabla I).

Cuando se coincubaron los dos herbicidas con la mezcla S10 más los CLH (sistema de activación metabólica *in vitro*), con 25, 50, 75 y 100 ppm de butilate no se mostraron efectos sobre los

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

	Tratamiento directo					Activación <i>in vitro</i>				
	M1	M2	M3	%RI <sup>b</sup>	%MI <sup>c</sup>	M1	M2	M3	%RI	%MI <sup>c</sup>
Control	35.5	30.5	34.0	2.0	3.2	35.0	30.5	34.5	2.0	3.2
Molinate (ppm)										
25	28.0	43.5	28.5	2.0	2.3	18.9	31.5	50.5	2.3	4.1
50	20.5	29.0	50.5	2.3	1.8*	21.0	37.5	41.5	2.2	3.3
75	19.0	33.0	48.0	2.3	1.9*	19.5	34.5	46.0	2.3	5.5*
100	17.0*	30.5*	52.5*	2.4	2.1	26.5	31.0	42.5	2.2	3.9
200	15.0*	25.5*	59.5*	2.5	1.9*	19.0	32.5	48.0	2.3	3.8
300	Inhibición de la mitosis <sup>d</sup>			19.0*	28.5*	52.5*	2.3	3.0		
Butilate (ppm)										
25	28.0	27.5	44.5	2.0	3.1	26.0	30.0	44.0	2.2	3.0
50	25.0	26.0	49.0	2.4	2.3	24.0	43.0	33.0	2.1	3.1
75	14.0*	34.0*	52.0*	2.4	3.2	20.0	33.5	46.5	2.3	2.6
100	10.0*	30.0*	60.0*	2.5	3.1	19.5	23.0	46.5	2.3	3.0
200	Inhibición de la mitosis <sup>d</sup>			11.5*	15.5*	73.0*	2.7	2.5		
300						Inhibición de la mitosis <sup>d</sup>				
Mezcla S10						16.0	49.0	16.0	2.3	3.1
Etanol (3600 ppm) <sup>f</sup>	21.0*	17.0*	62.0*	2.4	3.1	15.5*	20.0*	64.5*	2.5	2.6

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos; <sup>b</sup> Índice de replicación; <sup>c</sup> Índice mitótico, n= 2000 células; <sup>d</sup> No se observaron células estimuladas

<sup>f</sup> Corresponden a 1X10<sup>-1</sup> M

\* Las diferencias significativas entre los controles y cada grupo tratado se obtuvieron con la prueba de X<sup>2</sup>, en ambos casos P< 0.05

50, 75 y 100 ppm de butilate no se mostraron efectos sobre los tres parámetros, pero con 200 ppm se estimuló la CPC e incrementaron las células M3 con relación al testigo y con 300 ppm se detuvo la mitosis (Tabla I). Este comportamiento fue semejante con 25, 50, 100 y 200 ppm de molinate, excepto a 75 ppm en que aumentó el IM y con 300 ppm se aceleró la CPC, aumentaron las células M3 y no tuvo efecto sobre la mitosis (Tabla II).

En los tratamientos directos con 6.25 y 12.50 ppm de butilate por 48 h a los CLH, no modificó la CPC, el IM y el IR, pero a partir de 50 ppm se retardó la CPC y ascendió la frecuencia de células de primera división celular (M1). Los valores de IR e IM descendieron hasta que se bloqueó la mitosis (Tabla II). En el caso del molinate el efecto fue parecido con 25 y 50 ppm sobre los tres parámetros, pero a partir de 75 ppm se retardó la CPC e incre-

**TABLA II.** FRECUENCIAS DE CÉLULAS EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES E ÍNDICES DE REPLICACIÓN Y MITÓTICO DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO TRATADOS CON MOLINATE Y BUTILATE SIN Y CON LA ACTIVACIÓN METABÓLICA DE *Vicia faba in vivo*

	Tratamiento directo					Activación <i>In vivo</i>				
	M1	M2	M3	%RI <sup>b</sup>	%MI <sup>c</sup>	M1	M2	M3	%RI <sup>b</sup>	%MI <sup>c</sup>
Control	38.5	30.0	32.5	2.0	4.7	35.5	30.0	34.5	2.0	4.7
Molinate (ppm)										
25	31.1	38.5	30.4	2.0	4.0					
50	30.5	32.5	37.0	2.1	2.8					
75	47.5*	32.5*	20.0*	1.7*	2.0*					
100	65.5*	25.0*	9.5*	1.4*	1.0*	35.5	34.5	30.0	2.0	2.9
200	72.5*	25.0*	3.0*	1.2*	0.8*	51.1*	35.0*	14.0*	1.0*	2.6*
300	Inhibición de la mitosis <sup>d</sup>					68.0*	25.0*	7.0*	0.9*	1.9*
400						30.0	32.5	37.5	2.0	3.4
Butilate (ppm)										
6.25	30.0	32.5	37.5	2.0	3.4					
12.50	32.0	34.0	34.0	2.0	3.0					
50	41.0*	40.0*	19.0*	1.8*	2.4*					
75	46.0*	38.0*	16.0*	1.3*	1.3*					
100	77.5*	11.5*	9.0*	1.1*	0.3*	42.5	34.5	23.0	1.8	3.1
200	Inhibición de la mitosis <sup>d</sup>					24.0	32.5	43.5	2.2	2.8
300						18.0*	25.0*	57.0*	2.4	1.4*
400						12.0*	31.0*	57.0*	2.5	1.2*
500						Inhibición de la mitosis <sup>d</sup>				
Fracción S10						35.0	35.0	30.0	2.0	4.6
Ethanol (3600 ppm) <sup>f</sup>	33.0	36.0	31.0	2.0	3.2	33.0	30.0	37.0	2.1	4.0

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos; <sup>b</sup> Índice de replicación; <sup>c</sup> Índice mitótico, n= 2000 células; <sup>d</sup> No se observaron células estimuladas

<sup>f</sup> Corresponden a 1X10<sup>-1</sup> M

\* Las diferencias significativas entre los controles y cada grupo tratado se obtuvieron con la prueba de X<sup>2</sup>, en ambos casos P< 0.05

yó el IR y el IM, hasta que se detuvo la mitosis (**Tabla II**).

En el sistema de activación metabólica *in vivo*, al aplicar los extractos de las raíces tratadas con 100 y 200 ppm de butilate a los CLH por 48 h, no se alteró la CPC, el IR y el IM, pero con 300 y 400 ppm el IM disminuyó, se estimuló la CPC y aumentó la frecuencia de células M3 mientras que 500 ppm suprimió la mitosis (**Tabla II**). Cuando se agregó el extracto de las raíces tratadas con 100 ppm de molinate a los CLH no se modificaron los tres parámetros pero con los extractos de las raíces tratadas con 200 y 300 ppm, el efecto fue inverso sobre la CPC ya que se incrementó la M1 y disminuyó la M3. El IR y el IM también se redujeron (**Tabla II**). A partir de 400 ppm de molinate, estos parámetros fueron semejantes al testigo en los linfocitos ya que previamente hubo acción tóxica en las raíces del haba y 500 ppm de butilate fueron tóxicos para los linfocitos (**Tablas I y II**).

Por otra parte, los tratamientos con etanol sin y con activación metabólica *in vivo e in vitro* no tuvieron acción sobre la CPC y los IM e IR con respecto al testigo (CLH más 5-BrdU) (**Tablas I y II**). Sin embargo, este compuesto con y sin activación *in vitro* estimuló la frecuencia de células M3 (**Tablas I y II**).

La fracción enzimática y la mezcla S10 de las raíces de *Vicia faba* utilizadas en los dos sistemas de activación metabólica *in vivo e in vitro*, no interfirieron sobre los tres criterios evaluados al ser comparados con el testigo (**Tablas I y II**).

## DISCUSIÓN

La exposición a los plaguicidas y/o a sus metabolitos, representa un riesgo potencial para la salud animal y humana, ya que éstos pueden provocar daño al material genético, alteraciones en el funcionamiento de los órganos, activar protooncogenes y modificar el ciclo celular, posiblemente con la manifestación de cáncer y/o de metástasis.

En esta investigación se evidencia que los tratamientos directos de butilate y de molinate (4 h) a los CLH y con activación metabólica *in vitro*, aceleran el ciclo celular mostrado por la mayor frecuencia de células metafásicas de tercera división lo que indica que la molécula original de cada pesticida y sus productos metabólicos inducen a los linfocitos a dividirse a una tasa más rápida lo que se expresa en un alto porcentaje de metafases de tercer ciclo que implica claramente la activación del ciclo celular de las células humanas que se hace más corto y una fracción mayor de células cíclicas de una determinada población (**Tabla I**). El efecto sobre la cinética de proliferación celular (CPC) probablemente se deba a que tanto el butilate como el molinate, así como sus metabolitos, interfirieron con la disponibilidad de nutrientes, la estimulación de la fitohemaglutinina y otros factores que afectaron a las células humanas a proseguir con su ciclo celular normal y la supresión de la mitosis (**Tabla I**). Esta situación también fue observada en los linfocitos tratados con el butilate activado *in vivo* a concentraciones mayores (**Tabla II**). Sin embargo, la aplicación directa del butilate y del molinate así como cuando se activaron *in vivo* (tratamientos por 48 h), retardó el ciclo celular, es decir, las células humanas proliferaron a

una tasa muy prolongada, manifestándose el incremento de las poblaciones celulares M1 (**Tabla II**). Las células cultivadas detienen o bloquean su ciclo cuando son colocadas a concentraciones limitadas de nutrientes, de factores de crecimiento o si se les añade algún inhibidor de la síntesis de proteínas (Giulotto *et al.* 1980). Kuroda *et al.* (1992) observan disminución del índice mitótico (IM) y de las mitosis de segunda división en células de la línea V79 de criceto dorado *in vitro* dependientes de las diversas concentraciones entre 10 y 100 ppm de molinate aplicadas, este comportamiento coincide cuando el butilate y el molinate son agregados directamente (tratamiento por 48 h) o activados por *Vicia faba in vivo* (**Tablas I y II**). Varias investigaciones realizadas con malation, metilazinfos, nemacur, monitor, bolstar y paratión han mostrado que retardan el ciclo celular y disminuyen el ciclo mitótico de las células V79 del criceto dorado y otras líneas celulares humanas, observando una relación concentración-respuesta (Chen *et al.* 1981, 1982, Sobti *et al.* 1982, Salvadori *et al.* 1988).

Los herbicidas tiocarbámicos butilate y molinate son fácil y rápidamente translocados y metabolizados en las hojas, en los coleóptilos y en las raíces de varias especies vegetales y transportados a tallos, hojas y frutos. Los pasos iniciales de su biotransformación en plantas y en mamíferos ocurren por sulfoxidación y N-desalquilación (reacciones de la Fase I), catalizadas principalmente por el grupo monooxigenasas dependientes del sistema citocromo P-450 conocidas como oxidasas de función mixta (OFM) para formar sulfóxidos de molinate y butilate, N-alquilados y de sulfonas, los productos oxidados son conjugados con el glutatión (GSH) por el sistema enzimático GSH-S-T transferasas o sin la intervención de enzimas (reacciones de Fase II) (Casida *et al.* 1975, Debaun *et al.* 1978a, b). En los animales, los conjugados son eliminados en la orina en forma de ácidos mercaptúricos y en las plantas almacenados y/o incorporados en diversos componentes de la célula vegetal (reacciones de Fase III) (Sandermann 1992).

Varios estudios han indicado que las formas activas de los herbicidas son los sulfóxidos tiocarbámicos que tienen acción alquilante (Fuerts 1987), posiblemente los sulfóxidos de molinate y butilate estén implicados en las alteraciones de la CPC, del IM y del IR de las células humanas. Quistad *et al.* (1994) demuestran que los agentes tiocarbámicos tiobencarb, pebulate, vernolate, trialate, cicloate, EPTC y molinate así como sus metabolitos sulfóxidos son potentes inhibidores de la enzima aldehído deshidrogenasa en la sangre y en el cerebro de ratón y esto sucede pero en menor grado con el butilate. Posiblemente en ambos sistemas de activación metabólica vegetal (*in vivo e in vitro*) se forman algunos tipos de metabolitos similares que ocasionan la activación de la proliferación de los linfocitos humanos.

Al comparar los tratamientos directos del butilate y del molinate con los sistemas de activación metabólica por las raíces de *Vicia faba in vivo e in vitro* se observó una clara respuesta concentración-efecto sobre la CPC, el IR y el IM con las aplicaciones directas y con los extractos de las raíces tratadas con ambos herbicidas a los CLH por 48 h (**Tablas I y II**). Las diferen-

cias de los resultados sobre la CPC, IR e IM en los dos sistemas de activación metabólica *in vivo* e *in vitro*, con respecto al testigo, quizá se deban al tiempo de tratamiento, al tipo de metabolitos y a la sensibilidad de las poblaciones celulares con DNA sustituido por la 5-BrdU, expuestas a los dos herbicidas y sus productos metabólicos ya que en el sistema *in vivo* se aplicaron tratamientos por 48 h en células con 24 h de cultivo cuyo DNA se duplica en ausencia de la 5-BrdU, mientras en el ensayo *in vitro* por 4 h en células con 48 h de cultivo y con cromátidas unifilarmente incorporadas por éste análogo de base, probablemente presentan mayor sensibilidad a los metabolitos y a la molécula original y éste sea el origen de las diferencias encontradas (Tablas I y II).

Con la fracción S10 y el etanol activado *in vivo* no se observa efecto sobre la CPC, el IM y el IR de los CLH, datos que corroboran a los obtenidos por Calderón-Segura (1993) y Gómez-Arroyo *et al.* (1995), con el mismo sistema de activación vegetal (Tablas I y II). No obstante al contrastar estadísticamente los valores de la CPC de los tratamientos con el etanol directo y activado *in vitro* con el testigo (cultivo sólo), así como la fracción microsómica usada como sistema de activación *in vitro* se evidencia la aceleración del ciclo celular ya que se cuantificaron más metafases de tercer ciclo y se observó el mismo comportamiento con concentraciones elevadas de ambos tiocarbámicos (Tablas I y II).

El testigo comprueba la eficiencia de las condiciones experimentales en la manipulación de los cultivos durante el tratamiento, al no modificar su CPL, IM e IR (Tablas I y II). El etanol es metabolizado a acetaldehído por la acción de la enzima citosólica alcohol deshidrogenasa (ADH), que requiere al dinucleótido nicotinamida adenina (NAD) como cofactor, reacción que ocurre principalmente en las mitocondrias y en el citoplasma. El acetaldehído es el principal inductor de daño al DNA en linfocitos humanos *in vitro* en presencia de la enzima ADH y del cofactor NAD (Obe y Ristow 1970, Obe *et al.* 1979, 1986). Es probable que las concentraciones aplicadas de etanol, plaguicidas y sus metabolitos aumenten la respuesta mitogénica a la fitohemaglutinina y/o activen a proteínas u otros factores que induzcan el proceso de división celular (Tablas I y II).

### CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran claramente que los herbicidas butilate y molinate y/o sus metabolitos afectan drásticamente la cinética de proliferación celular y los índices mitótico y de replicación hasta inhibir la mitosis. La disminución de la respuesta inmunológica se correlaciona con menor eficacia del individuo en cualquier circunstancia de exposición a productos tóxicos o enfermedades, caso contrario de cuando se tiene efecto estimulante que significaría un tasa de proliferación muy rápida e incontrolada que reflejaría activación y/o manifestación del cáncer o metástasis o daño en cualquier órgano.

En las plantas, el destino de los agentes químicos con propiedades de plaguicidas tienen diferentes vías metabólicas,

de las cuales se pueden originar metabolitos primarios, secundarios y terciarios que posiblemente entran a la cadena alimenticia de los animales incluyendo al hombre e inducen efectos citotóxicos, fisiológicos, mutagénicos y/o carcinogénicos. En México, el 75% de los plaguicidas son de aplicación agrícola y el hecho de que las plantas los activen y ejerzan acción sobre el ciclo celular o sobre la respuesta inmunológica, se debe considerar e investigar ya que el mismo pesticida (residuos) y/o sus metabolitos almacenados, pueden representar un peligro potencial para la salud humana y animal. Sin embargo, cabe mencionar que la manifestación o no del daño y el nivel de la alteración dependen de factores múltiples como la variabilidad inter e intra individual, la etapa del desarrollo a la cual se expone el individuo, el grado de sensibilidad a los agentes tóxicos, la edad, la nutrición, el metabolismo, la salud, el sexo, la predisposición genética, etcétera.

### AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Estudios del Posgrado (PADEP-003353) por su apoyo para la realización de este proyecto de investigación, a la M. en C. Martha Patricia Cerón por las determinaciones de proteínas.

### REFERENCIAS

- Bradford M. N. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Calderón-Segura M. E. (1993). Intercambio de cromátidas hermanas inducidos por propoxur previa activación metabólica por *Vicia faba*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F.
- Carere A. y Morpurgo G. (1981). Comparison of the mutagenic activity of pesticides *in vitro* in various short term assays. *Progr. Mutat. Res.* 2, 87-104.
- Casida J. E., Kimmel E. C. y Ohkawa R. (1975). Sulfoxidation of thiocarbamate herbicide and metabolism of thiocarbamate in living mice and liver enzyme system. *Sci. Pestic. Biochem. Physiol.* 7, 122-141.
- Chen H. H., Hsueh J. L. y Sirianni S. R. (1981). Induction of sister chromatid-exchanges and cell-cycle delay in cultured mammalian cells treated with eighth organophosphorus pesticides. *Mutat. Res.* 88, 307-316.
- Chen H. H., Sirianni S. R. y Huang C. C. (1982). Sister chromatid-exchanges and cell-cycle delay in Chinese hamster V-79 cells treated with 9 organophosphorus compounds (8 pesticides and 1 defoliant). *Mutat. Res.* 103, 307-313.
- Deal L. M., Reeves J. T., Larkins B. A. y Hess F. D. (1980). Use of an *in vitro* protein synthesizing system to test the mode of action of chloroacetamides. *Weed Sci.* 28, 334-360.
- De Baun J. R., Bova D. L., Finley K. A. y Menn J. J. (1978a). Metabolism of [ring<sup>14</sup>C] ordram (molinate) in the rat. I. Bal-

- ance and tissue residue study. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1096-1098.
- De Baun J. R., Bova D. L., Tseng C. K. y Menn J. J. (1978b). Metabolism of [ring-<sup>14</sup>C] ordram (molinate) in the rat. 2. Urinary metabolite identification. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1098-1104.
- Finlayson B. J. y Faggella G. A. (1986). Comparison of laboratory and field observations of fish exposed to the herbicides molinate and thiobencard. *Trans. Amer. Fish Soc.* 324, 124-132.
- Fuerts P. E. (1987). Understanding the mode of action of the chloroacetamide and thiocarbamate herbicides. *Weed Technol.* 1, 270-277.
- Gentile J. M., Gentile G. J., Bultman J., Schriest R., Wagner E. D. y Plewa M. J. (1982). An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* 101, 19-29.
- Gentile J. M., Gentile G. J. y Plewa M. J. (1986). *In vitro* activation of chemicals by plants: a comparison of techniques. *Mutat. Res.* 164, 53-58.
- Gómez-Arroyo S., Rodríguez M. L. y Villalobos-Pietrini R. (1992). Chromosomal alterations induced by the thiocarbamate herbicide molinate (ordram) in *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 8, 77-80.
- Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M. E. y Villalobos-Pietrini R. (1995). Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 324-330.
- Guiulotto E., Mottura A., Giorgi R., De Carli L. y Nuzzo F. (1980). Frequencies of sister-chromatid exchanges in relation to cell kinetics in lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 70, 343-350.
- Hubell J. P. y Casida J. E. (1977). Metabolic fate of the N, N-dialkylcarbamoyl moiety of thiocarbamate herbicides in rats and corn. *J. Agric. Food Chem.* 25, 404-413.
- Kato H. (1977). Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BrdU-labelling method. *Nature* 251, 70-72.
- Kuroda K., Yamaguchi Y. y Endo G. (1992). Mitotic toxicity, sister chromatid exchange and rec assay of pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 13-18.
- Lamberti L., Bigatti P. P. y Ardito G. (1983). Cell kinetics and sister-chromatid-exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 120, 193-199.
- Latt S. A. (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3162-3166.
- Murnik M. R. (1976). Mutagenicity of widely-used herbicides. *Genetics* 83, 554 (Abstract).
- Obe G. y Ristow H. (1970). Acetaldehyde but not ethanol, induces chromatids exchange in Chinese hamster cells *in vitro*. *Mutat. Res.* 56, 211-213.
- Obe G., Natajara A. T., Meyers A. y Den Herlog A. (1979). Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood *in vitro* and of SCEs in bone-marrow cells of mice *in vivo* by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutat. Res.* 68, 291-294.
- Obe G., Jonas R. y Schmith S. (1986). Metabolism of ethanol *in vitro* produces a compound which induces sister-chromatid exchange in human peripheral lymphocytes *in vitro*: acetaldehyde but not ethanol is mutagenic. *Mutat. Res.* 174, 47-51.
- Pagano M., Draetta G. y Jansen-Durr P. (1992a). Association of cdk2 kinase with the transcription factor E2F during S phase. *Science* 255, 1144-1147.
- Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W. y Draetta P. (1992b). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO. J.* 11, 961-971.
- Pagano M., Pepperkok R., Lukas J., Baldin V., Ansorge W., Bartek J. y Draetta P. (1993). Regulation of the cell cdk2 protein kinase in culture human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 121, 101-111.
- Perry P. y Evans H. J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature (London)* 258, 121-125.
- Perry P. y Wolff S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature (London)* 251, 156-158.
- Pintér A., Csík M., Török G., Surján A., Kelecsényi Zs. y Kocsis Zs. (1990). Cytogenetic effect of the thiocarbamate herbicides butylate, molinate and vernolate in the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutat. Res.* 242, 279-283.
- Pimentel D., McLaughlin L., Zepp A., Lakitan B., Kraus T., Kleinman P., Vancini F., Roach W. J. Graap E., Keeton W. S. y Selig G. (1991). Environmental and economic effects of reducing pesticide use. *Bio. Sci.* 41, 402-409.
- Plewa M. J. (1978). Activation of chemical into mutagen by green plants. A preliminary discussion. *Environ. Health Perspect.* 27, 45-50.
- Plewa M. J. y Gentile J. M. (1982). The activation of chemicals into mutagens by green plants. En: *Chemical mutagens: principles and methods for their detection* (A. Hollaender, Ed.). Plenum Press, Nueva York, Vol 7, pp. 401-420.
- Plewa M. J., Wagner E. D., Gentile G. J. y Gentile J. M. (1984). An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* 136, 233-245.
- Plewa M. J. y Wagner E. D. (1993). Activation of promutagens by green plants. *Annu. Rev. Genet.* 27, 93-113.
- Quistad G. B., Sparks S. E. y Casida J. E. (1994). Aldehyde dehydrogenase of mice inhibited by thiocarbamate herbicides. *Life Sci.* 55, 1527-1544.
- Rupa D. S., Reddy P. P., Sreemannarayana K. y Reddi O. S. (1991). Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. *Environ. Mol. mutagen.* 18, 136-138.
- Sandermann H. Jr. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* 17, 82-84.
- Salvadori D. M. F., Ribeiro L. R., Pereira C. A. B. y Becak W. (1988). Cytogenetic effects of malathion insecticide on somatic and germ cells of mice. *Mutat. Res.* 204, 283-287.
- Sobti R. C., Krishna A. y Pfaffenberger C. D. (1982). Cytokinetic

- and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells *in vitro*: organophosphates. *Mutat. Res.* 102, 89-102.
- Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. (1982). Induction of SCEs in CHO cells by extracts from *Vicia faba* roots exposed to ethanol. *Mutat. Res.* 105, 169-174.
- Takehisa S., Kanaya N. y Rieger R. (1988). Promutagen activation by *Vicia faba*: an assay based on the induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 197, 195-205.
- Velemínský J. y Gichner T. (1988). Mutagenic activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. *Mutat. Res.* 197, 221-242.
- WHO (World Health Organization ). (1988). Thiocarbamate pesticides. A general introduction. *Environ. Health Criteria* Vol. 76. Ginebra.