

## EFFECTO DEL INSECTICIDA GUSATIÓN EN *Salmonella typhimurium* CEPAS TA98 Y TA100 TRANSFORMADO POR EL METABOLISMO VEGETAL Y ANIMAL

Josefina CORTÉS-ESLAVA<sup>1</sup>, Sandra GÓMEZ-ARROYO<sup>1\*</sup>, Héctor Silvestre TELOXA MENESES<sup>2</sup>, Brenda Mariana GÓMEZ RAMÍREZ<sup>3</sup> y Rafael VILLALOBOS-PIETRINI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Ambientales, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F.

<sup>2</sup> Escuela Nacional Preparatoria, Plantel Erasmo Castellanos Quinto, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Río Churubusco s/n, Col. Zapata Vela, Iztacalco 08040, México D.F.

<sup>3</sup> Escuela Nacional Preparatoria, Plantel Pedro de Alba, Universidad Nacional Autónoma de México, Insurgentes Norte 1698, Col. Lindavista, Gustavo A. Madero 07300, México, D.F.

\*Autor para correspondencia: slga@atmosfera.unam.mx

Palabras clave: fracción enzimática S9, insecticidas organofosforados, mutación reversa, fracción S10 de *Vicia faba*

### RESUMEN

Se analizó la participación de los metabolismos vegetal y animal en la transformación del insecticida organofosforado azinfos metílico (gusatió) mediante el método de microsuspensión, empleando como sistemas activadores la fracción S10 de haba (*Vicia faba*) y la fracción S9 de hígado de rata y como organismo indicador del efecto genético a las cepas TA98 y TA100 de la bacteria *Salmonella typhimurium*. Se utilizó la metodología de microsuspensión aforando a 1 mL, se probaron concentraciones crecientes del insecticida (10, 20, 40, 80 y 100 µg/µL). Se colocaron en agitación rotatoria en oscuridad por 2 h. Posteriormente, se siguió el procedimiento convencional de incorporación en placa. Los resultados mostraron mayor capacidad del metabolismo vegetal para producir mutagenicidad por corrimiento del marco de lectura que se evidenció preferentemente en la cepa TA98 mientras que el metabolismo animal produjo mutágenos por sustitución de pares de bases manifestados en la cepa TA100. Ambos metabolismos fueron capaces de disminuir la toxicidad del insecticida organofosforado y expresar mutagenicidad en *S. typhimurium*. Las fracciones enzimáticas no tuvieron efectos adversos sobre la viabilidad de las células bacterianas.

Key words: S9 enzymatic fraction, organophosphorus insecticides, reverse mutation, S10 *Vicia faba* fraction

### ABSTRACT

It was analyzed the plant and animal metabolism role in the transformation of azinfos methyl organophosphorus insecticide (gusathion) through the microsuspension assay, using as activating systems the S10 *Vicia faba* fraction and the S9 enzymatic fraction of rat liver, and as street sign of genetic effect to the TA98 and TA100 strains of the bacteria *Salmonella typhimurium*. It was used the microsuspension assay, the incubation mix was of 1 mL, there were added crescent concentrations of the insecticide (10, 20, 40, 80 and 100 µg/µL), there were placed in a rotatory shaker in darkness during 2 h. Subsequently, it was performed the conventional procedure of plate incorporation. The results showed a greater capacity of the plant metabolism to produce mutagenicity by

frameshift evident in the TA98 strain while the animal metabolism produced mutagens by base-pair substitutions manifested in the TA100 strain. Both metabolisms were able to reduce the organophosphorus insecticide toxicity and to express mutagenicity in *S. typhimurium*. The enzymatic fractions were not harmful to the bacterial cells viability.

## INTRODUCCIÓN

La gran cantidad y la enorme variedad de sustancias dispersas en el planeta como consecuencia de la actividad del ser humano depositándose en agua, suelo y aire afectan críticamente al ambiente. En la búsqueda de mejorar la calidad de vida con el descubrimiento y la cura de enfermedades, al proporcionar un mayor confort, al incrementar la productividad, al mejorar la alimentación, la educación o la organización social o política, muchos avances de la ciencia y de la tecnología generan diversos productos químicos sintéticos que pasan al ambiente y pueden representar un riesgo potencial para la salud humana (Litterst y Lichtenstein 1971).

Ames (1983, 1989) señala la importancia de evaluar el riesgo que pueden constituir los cambios en el estilo de vida y la contaminación en ciudades industrializadas en la aparición de cáncer.

Por otra parte, se ha demostrado la capacidad de las plantas para metabolizar agentes químicos extraños, como los plaguicidas (Plewa y Gentile 1976). Desde entonces, este aspecto ha constituido un motivo de interés y de preocupación para numerosos investigadores, lo que es comprensible si se considera el amplio espectro de agentes químicos y la magnitud de su uso en la agricultura moderna, ya que las plantas pueden absorberlos y modificarlos metabólicamente, dando lugar a productos mutagénicos. Si estos compuestos son estables, pueden incorporarse a la dieta humana e implicar un riesgo de daño genético (Gichner *et al.* 1993).

Mientras que en animales los sistemas del citocromo P-450 son de importancia central en el metabolismo y en la activación mutagénica de xenobióticos, las modalidades vegetales del citocromo P-450 parecen actuar sólo en casos excepcionales como el de algunos herbicidas ureicos (N, N-dimetil fenil urea; Sandermann 1988). Las plantas metabolizan los compuestos extraños por diversos mecanismos incluyendo oxidación, hidrólisis, conjugación y ocasionalmente reducción. Las especies conjugadas primariamente, facilitan su excreción en los animales y su inmovilización en las plantas (Higashi 1988).

El uso combinado de pruebas para explorar la mutagenicidad de sustancias químicas, empleando

tanto el metabolismo animal como vegetal, resulta especialmente importante en el caso de los agroquímicos debido a que ellos están en contacto directo con las plantas superiores (Higashi 1988).

Puesto que las vías metabólicas de los vegetales son muy diferentes a las de los animales, pueden también cambiar los productos modificados (Menn 1978). En animales el fungicida tioalbendazol, es convertido a 5-hidroxitioalbendazol, mientras que en las plantas lo es a benzimidazol o benzimidazol-2-carboxamida (Sandermann 1988). El paratión, se transforma en paraoxón en presencia del citocromo P-450 de hígado de rata o de conejo. Sin embargo, cuando se aplica a raíces de haba, se encuentran cantidades de paraoxón menores al 1 % de los niveles de paratión (Higashi 1988). Las peroxidasas son ubicuas en el reino vegetal, pueden catalizar reacciones de N-ó C-hidroxilación, N-sulfoxidación, N-acetilación, halogenación, deshalogenación o descarboxilación (Sandermann 1988).

La activación de promutágenos por el metabolismo vegetal (Plewa *et al.* 1984) y animal (Maron y Ames 1983) constituye un aspecto relevante en la mutagénesis ambiental.

El daño producido al material genético mediante la inducción de mutaciones, tiene un riesgo toxicológico que repercute en la salud de los individuos afectados. En virtud de que es importante conocer el comportamiento de este tipo de compuestos y debido a que, por razones éticas no es posible realizar la experimentación directa con el hombre y en vista de que los ensayos con mamíferos para demostrar genotoxicidad son sumamente caros (deKergommeaux *et al.* 1983), la posibilidad de detectar compuestos mutagénicos en el ambiente se ha facilitado por el establecimiento de sistemas de prueba rápidos como el bioensayo desarrollado por Ames *et al.* (1975). Con el propósito de semejar la biotransformación que ocurre en animales cuando ingieren esos agentes químicos, se incorpora un sistema *in vitro* de activación metabólica animal (S9; Maron y Ames 1983) o vegetal (S10; Plewa *et al.* 1984).

El ensayo de Ames utiliza un conjunto de cepas de bacterias con requerimiento de histidina, que contienen otras mutaciones que incrementan su sensibilidad para detectar mutágenos. La mutación rfa

altera la barrera de lipopolisacáridos de la superficie bacteriana y aumenta su permeabilidad a moléculas grandes que no penetran la pared normal de una célula (Ames *et al.* 1973). La mutación *uvrB*, es la delección de un gen involucrado en la reparación del ADN por escisión, resultando en una mayor sensibilidad para identificar gran cantidad de mutágenos (Ames 1971, Ames *et al.* 1973).

La cepa TA98, utilizada en este trabajo contiene el plásmido, pKM101 con el factor-R que le confiere resistencia a la ampicilina y los genes *muc* que aumentan la frecuencia de mutación tanto espontánea como inducida al afectar el sistema de reparación “propenso al error” que está presente normalmente en estos organismos. Esta cepa detecta diversos mutágenos que producen corrimiento del mensaje que implica la inserción o la pérdida de pares de bases. La otra cepa empleada, la TA100 detecta mutágenos que causan sustitución de pares de bases (Maron y Ames 1983).

La reversión espontánea de las cepas se expresa como la cantidad de colonias revertantes por caja de medio mínimo. Las colonias revertantes que han recuperado la síntesis son claramente visibles sobre un fondo uniforme de bacterias auxotróficas. Cada cepa revierte espontáneamente con una frecuencia característica, Maron y Ames (1983) describen valores que van de 30 a 50 revertantes por caja para la cepa TA98 y de 120 a 200 para la TA100.

Los procedimientos empleados para estudiar los efectos de los metabolismos vegetal y animal sobre la mutagenicidad han variado considerablemente. Tales métodos dependen de que el agente químico penetre en la célula vegetal o animal, de que sea metabolizado y de que los metabolitos regresen al medio donde actuarán sobre las bacterias. Una opción se lleva a cabo con extractos vegetales o animales liberados de las células para proveer las enzimas metabólicas (Wildeman y Nazar 1982).

A pesar de que gran cantidad de agentes son activados tanto por plantas como por animales, algunos parecen serlo sólo por plantas. El desarrollo de protocolos usando activación tanto vegetal como animal puede proveer una amplia base de datos sobre la transformación biológica de promutágenos y una forma ideal para hacer dicha comparación con un ensayo *in vitro*.

El ensayo de microsuspensión utilizado por primera vez por Kado *et al.* (1983) y empleado por diversos autores (George *et al.* 2001, Onuki *et al.* 2002, Kummrow *et al.* 2006, Umbezeiro *et al.* 2006), es un método que aumenta significativamente la sensibilidad de la prueba de Ames y permite utilizar concentraciones muy bajas de los mutágenos. Esta modificación consiste en agregar concentraciones incrementadas

de células bacterianas (aproximadamente  $10^9$ ) en suspensión a la mezcla de activación en un volumen muy pequeño (0.2 a 1.0 mL). Después de al menos 90 minutos de incubación a 37 °C, la mezcla se procesa de acuerdo al protocolo de rutina del ensayo de Ames. Este procedimiento es hasta 20 veces más sensible que la prueba estándar de incorporación en placa y hasta 13 veces más sensible que el protocolo de incubación líquida descrito previamente. La reversión espontánea no se incrementa bajo estas condiciones en comparación con la incorporación en placa, utiliza hasta 10 veces menos mezcla enzimática y hasta 5 veces menos cofactores por placa (Kado 1983).

Los insecticidas organofosforados son los de mayor uso en la agricultura en México, derivados del ácido fosfórico, con pocas excepciones son muy tóxicos y todos inhiben a la colinesterasa interrumpiendo el impulso nervioso a nivel de sinapsis nerviosas de vertebrados (Fukuto 1971).

Los efectos sobre el sistema nervioso van desde patrones de habla ininteligible y pérdida de los reflejos hasta convulsiones y estados de coma, puede también haber parálisis, siendo los músculos del sistema respiratorio los más afectados. Todos los insecticidas organofosforados se degradan por hidrólisis en el hígado y en otros tejidos. Presentan propiedades alquilantes (Preussman *et al.* 1969), su estructura fundamental es -P-O-C-. La presencia del fósforo y del carbono como sitios electrofílicos los hace susceptibles de reaccionar con nucleófilos. El ADN de cualquier célula posee muchos y muy diferentes sitios nucleofílicos susceptibles a ese tipo de reacción (Wild 1975). Por lo tanto, es importante evaluar el riesgo que puede representar el uso de tales sustancias en el material genético ya que numerosas enfermedades crónicas y con períodos de latencia largos, como el cáncer, están entre los principales motivos de preocupación de la salud humana con relación a los plaguicidas (Moutschen-Dahmen *et al.* 1984).

Para evaluar la influencia del metabolismo sobre la mutagenicidad y la toxicidad de los pesticidas, Wildeman y Nazar (1982) utilizan la fracción S9 del hígado de mamífero y homogeneizados enzimáticos vegetales como sistemas activadores en el bioensayo de *Salmonella*. Sus resultados sugieren que, a pesar de que tanto los homogeneizados vegetales como el sobrenadante S9 de hígado activan un compuesto, los mutágenos formados en los sistemas vegetal y animal resultan diferentes. Rasquinha *et al.* (1988) observan que el metabolismo vegetal puede alterar la mutagenicidad de diversos plaguicidas. Cortés-Eslava *et al.* (2013) encuentran resultados interesantes

analizando el papel del metabolismo vegetal en la mutagenicidad y citotoxicidad de cuatro insecticidas organofosforados en *Salmonella typhimurium* y en células humanas en cultivo. Utilizan el método de incorporación en placa (Ames 1983) y describen que el gusatión incrementó su mutagenicidad principalmente sobre la cepa TA98 al ser metabolizado por la fracción vegetal de *Coriandrum sativum* lo cual coincide con el presente trabajo.

En *S. typhimurium*, Gómez-Arroyo *et al.* (2007) muestran una respuesta mutagénica distinta de dos insecticidas organofosforados (foxim y azinfos metílico) activados metabólicamente por *Nicotiana tabacum* (línea TX1). El primero, disminuye considerablemente su mutagenicidad hasta valores semejantes al testigo cuando se cocultiva con las células TX1, mientras que al aplicarlo directamente se eleva significativamente la frecuencia de reversión. El segundo aparentemente disminuye su toxicidad ya que al aplicarlo directamente resulta completamente tóxico, al grado de anular el crecimiento de bacterias, mientras que al incubarlo en presencia de células TX1 de tabaco a las mismas concentraciones no solo permite el crecimiento de las bacterias sino que eleva considerablemente su mutagenicidad.

Al aplicar diferentes concentraciones del insecticida carbámico propoxur al cultivo de linfocitos humanos, Gómez-Arroyo *et al.* (1995) no observan elevación en la frecuencia de ICH, mientras que este mismo compuesto previamente activado con la fracción S10 de *V. faba* la incrementa significativamente, lo mismo ocurre con los herbicidas tiocarbámicos molinate y butilate (Calderón-Segura *et al.* 1999).

Con los antecedentes planteados, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto mutagénico del insecticida gusatión en *S. typhimurium* cepas TA98 y TA100, transformado por los metabolismos vegetal y animal

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para obtener la fracción S10 de *Vicia faba*, se germinó, maceró, homogeneizó, centrifugó y filtró la raíz en amortiguador de fosfatos de sodio 100 mM, pH = 7. La S9 utilizada fue la forma comercial marca MOLTOX. Las bacterias se sembraron en medio nutritivo, incubando en agitación rotatoria en oscuridad a 37 °C durante 16 h. Se centrifugó a 4000 × g 5 min a 4 °C, resuspendiendo el botón en amortiguador de fosfatos y manteniendo en hielo hasta iniciar el ensayo de mutagenicidad. En frascos estériles se aplicaron concentraciones crecientes del insecticida (10, 20, 40, 80 y 100 mg/mL), 500 mL

de fracción S9 ó S10 y 100 mL de suspensión concentrada de bacterias de la cepa respectiva aforando a 1000 mL con amortiguador de fosfatos de potasio. Se incubó dos horas en agitación rotadora en oscuridad y posteriormente en 2 mL de agar de superficie se añadieron 250 mL del contenido de cada uno de los frascos de incubación, se homogeneizaron con vórtex, se sembró por triplicado en medio mínimo y se incubó 48 h a 37 °C en oscuridad. Finalmente, transcurrido el tiempo de incubación se registró la reversión inducida.

La exploración estadística se realizó mediante el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls.

## RESULTADOS

Los cuadros I y II muestran una capacidad diferencial de los metabolismos vegetal y animal para inducir mutagenicidad con el compuesto organofosforado. La fracción enzimática vegetal disminuyó la toxicidad del insecticida y produjo mutaciones por corrimiento del marco de lectura evidenciadas principalmente en la cepa TA98 de la bacteria *S. typhimurium* (Cuadro I), mientras que el metabolismo animal produjo compuestos que causaron mutaciones por sustitución de pares de bases, es decir que su efecto se observó preponderantemente en la cepa TA100 (Cuadro II). Ambas fracciones enzimáticas vegetal y animal no tuvieron efectos adversos sobre la viabilidad de las células bacterianas y fueron capaces de disminuir la toxicidad producida por el gusatión permitiendo que se expresara la mutagenicidad de sus metabolitos. El gusatión aplicado directamente en ambas cepas fue tóxico por lo que no hubo crecimiento del fondo de bacterias auxotróficas. Los cuadros I y II muestran que al agregar las fracciones metabólicas tanto vegetal como animal, disminuyó la toxicidad y pudo observarse el efecto mutagénico de manera diferencial para cada cepa según el metabolismo que participó. La NOP y el 2-AF utilizados como testigos positivos para las cepas TA98 y TA100, respectivamente, mostraron claramente la eficiencia metabólica de ambas fracciones. La reversión espontánea coincidió con la descrita para ambas cepas.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una gran cantidad de constituyentes de la dieta humana son tratados con insecticidas y el papel que juega el metabolismo de plantas y animales en la

**CUADRO I.** MUTAGENICIDAD INDUCIDA POR EL INSECTICIDA GUSATION METABOLIZADO POR S10 DE *Vicia faba* Y S9 DE HIGADO DE RATA EN *Salmonella typhimurium* cepa TA98 EN EL ENSAYO DE MICROSUSPENSIÓN

	-S10 y -S9	<sup>a</sup> Revertantes/caja +S10	+S9
Testigo negativo			
Amortiguador de fosfatos	27.3 ± 0.30	23.5 ± 0.3	29.2 ± 0.5
<b>Testigo positivo</b>			
<sup>b</sup> NOP	265 ± 3.2 *	1620 ± 4.20 *	
<b>Gusación</b>			
µg/µL			
10	21.0 ± 0.7 N.S.	29.0 ± 1.1 N.S.	49.0 ± 3.5 *
20	21.6 ± 0.6 N.S.	82.6 ± 0.9 N.S.	51.2 ± 2.6 *
40	20.6 ± 0.8 N.S.	285.9 ± 1.0 *	50.0 ± 2.3 *
80	16.0 ± 0.3 *	595.0 ± 8.3 *	55.0 ± 3.1 *
100	†	270.2 ± 6.3	25.0 ± 2.2 *

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos ± E.E.

<sup>b</sup> NOP 4, nitro-*o*-fenilendiamina 100 µg/mL.

N.S. No se obtuvo diferencia significativa por análisis de varianza entre el testigo negativo y los grupos tratados

\* Se obtuvieron diferencias significativas por análisis de varianza, sin metabolismo  $F_{\text{NOP}} = 43.23$ ,  $F_{\text{gusación}} = 857.20$ . Con metabolismo:  $F_{\text{NOP}} = 598.10$ ,  $F_{\text{gusación}} = 591.70$  y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls.

† Toxicidad, no hay bacterias y desaparece el crecimiento de fondo de bacterias auxotróficas ("background").

**CUADRO II.** MUTAGENICIDAD INDUCIDA POR EL INSECTICIDA GUSATION METABOLIZADO POR S10 DE *Vicia faba* Y S9 DE HIGADO DE RATA EN *Salmonella typhimurium* CEPA TA100 EN EL ENSAYO DE MICROSUSPENSIÓN

	-S10 y -S9	<sup>a</sup> Revertantes/caja +S10	+S9
Testigos negativos			
Amortiguador de fosfatos	112.0 ± 1.2	116.0 ± 1.0	119.0 ± 1.4
<b>Testigo positivo</b>			
<sup>c</sup> 2-AF	102.0 ± 1.3 *		992.3 ± 23.1 *
<b>Gusación</b>			
µg/µL			
10	122.3 ± 1.1 N.S.	136.0 ± 1.2 N.S.	120.3 ± 3.1
20	93.6 ± 1.0 N.S.	142.4 ± 2.0 N.S.	109.3 ± 2.2
40	88.0 ± 1.2 N.S.	208.0 ± 1.2 *	294.2 ± 3.4 *
80	38.1 ± 1.3 *	276.2 ± 1.1 *	654.9 ± 2.0 *
100	†	289.8 ± 6.2 *	29.3 ± 4.2 *

<sup>a</sup> Promedio de dos experimentos ± E.E.

<sup>c</sup> 2AF, 2 amino-fluoreno 4 µg/µL.

N.S. No se obtuvo diferencia significativa por análisis de varianza entre el testigo negativo y los grupos tratados

\* Se obtuvieron diferencias significativas por análisis de varianza, sin metabolismo:  $F_{2\text{AF}} = 5.75$ ,  $F_{\text{gusación}} = 78.42$ , con metabolismo:  $F_{2\text{AF}} = 793.30$ ,  $F_{\text{gusación}} = 286.81$ , y por lo tanto se aplicó la prueba de comparación múltiple de Newman Keuls

† Toxicidad, no hay bacterias y desaparece el crecimiento de fondo de bacterias auxotróficas ("background")

transformación de estos compuestos es de gran importancia ya que se pueden originar productos con mayor grado de toxicidad o constituirse mutágenos potenciales de trascendencia.

El uso de nuevas opciones de activación metabólica en ensayos de mutagenicidad a corto plazo, ha sido validado y recomendado con el propósito de reducir el uso de animales de laboratorio en pruebas toxicológicas (Rueff *et al.* 1996).

En este trabajo, se empleó el método de micro-suspensión (Kado *et al.* 1983), desarrollado para incrementar la sensibilidad de la prueba de Ames, para ello se utilizaron fracciones enzimáticas vegetal y animal como sistema activador y a la bacteria *S. typhimurium* cepas TA98 y TA100 como indicador del daño genético. El éxito de este método depende de que el agente químico sea metabolizado por las fracciones enzimáticas y que los metabolitos vertidos al medio, actúen sobre las bacterias, todo esto en una mezcla de activación de volúmenes muy pequeños que van desde 0.2 hasta 1.0 mL.

Los resultados mostraron la mayor capacidad de la fracción vegetal (S10) que la de la animal (S9) para metabolizar al insecticida gusatión (azinfos metílico) y transformarlo en compuestos cuyo mecanismo de mutagenicidad es por corrimiento del mensaje y se evidenciaron principalmente en la cepa TA98 (**Cuadro I**), mientras que la fracción animal generó mutágenos por sustitución de pares de bases y se detectó significativamente en la cepa TA100 (**Cuadro II**), esto comprueba vías metabólicas diferentes. Wildeman y Nazar (1982) utilizando la fracción S9 del hígado de mamífero y homogeneizados enzimáticos vegetales como sistemas activadores en el ensayo de *Salmonella* encuentran que ambos metabolismos activan un compuesto, pero los mutágenos formados en los sistemas vegetal y animal son diferentes. Rasquinha *et al.* (1988) observan que el metabolismo vegetal puede alterar la mutagenicidad de diversos plaguicidas y producir metabolitos distintos a los que se forman en las células animales.

Cuando se analizó el efecto mutagénico directo del insecticida organofosforado gusatión en el sistema de micro-suspensión, se obtuvieron resultados negativos y se observó acción tóxica que inhibió el crecimiento bacteriano en las concentraciones más altas. De acuerdo con de Flora *et al.* (1992), la desaparición del fondo de bacterias (“background”), es un índice de toxicidad. Por otro lado, cuando el insecticida fue incubado además de las bacterias, en presencia de los metabolismos vegetal y animal, disminuye la toxicidad, permitiendo el crecimiento de colonias y se observa un incremento de la mutageni-

cidad con relación a la concentración, lo que muestra un comportamiento promutagénico. Gómez-Arroyo *et al.* (2007) encuentran un comportamiento similar en la prueba de incorporación en placa, después de co-incubar células vegetales con la bacteria *S. typhimurium* con el mismo compuesto organofosforado. Cortés-Eslava *et al.* (2013) detectan un comportamiento semejante del paratión metílico, del ometoato, del metamidofos y del azinfos metílico (gusatión), éste último estudiado en el presente trabajo, al ser metabolizado por cilantro (*Coriandrum sativum*) en el método de cocultivo.

En las concentraciones más altas el efecto mutagénico no aparece, debido posiblemente a la inhibición de la actividad peroxidasa en la fracción vegetal y del citocromo P-450 en la fracción animal. Bianchi *et al.* (1994) describen la genotoxicidad del folimat en *Sacharomyces cerevisiae* aplicado directamente y al agregar la fracción S9 de hígado se disminuye la actividad del compuesto solo y mezclado con diazinón y azinfos metílico (gusatión). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, ya que al aplicar directamente el gusatión, la concentración mayor provocó toxicidad para ambas cepas y de manera similar, el metabolismo, disminuyó la toxicidad del compuesto directo y permitió evidenciar el efecto mutagénico.

Esta investigación aporta datos del riesgo potencial que representa el insecticida que no eleva la frecuencia de reversión al aplicarlo directamente, sin embargo su efecto se modifica mediante la activación vegetal. Por esto, además de evaluar la presencia de insecticidas en productos alimenticios para su control de calidad y normas para el consumo humano, es necesario monitorear la presencia de metabolitos que, como en este estudio, pueden resultar mutagénicos mientras que el compuesto por sí mismo no lo es.

Los resultados de esta investigación permiten concluir la sensibilidad del método de micro-suspensión, para detectar fácilmente el efecto de mutágenos en bajas concentraciones, aspecto muy importante ya que por razones de seguridad resulta más conveniente trabajar con las menores concentraciones posibles para no aumentar la contaminación atmosférica con los residuos desechados, así como por el cuidado de la salud de los investigadores; no obstante esta gran ventaja, son muy pocos los trabajos realizados con esta metodología evaluando agroquímicos y los que existen han sido llevados a cabo en células humanas en cultivo (Goto *et al.* 2004), en ratones (George *et al.* 1991) o en suelos contaminados con municiones (George *et al.* 2001), pero ninguno con plantas.

Asimismo, la fracción enzimática de *Vicia faba* (S10) es capaz de transformar eficientemente al insecticida organofosforado gusatió en compuestos mutagénicos para *S. typhimurium* cepa TA98 y la fracción enzimática de hígado de rata (S9) fue capaz de transformar eficientemente al mismo insecticida en compuestos mutagénicos principalmente para la cepa TA100, por lo que se puede inferir que son diferentes los productos generados por cada uno de los metabolismos (vegetal y animal), dado que producen mutaciones por distinto mecanismo. El metabolismo de ambas fracciones metabólicas S10 y S9 disminuyó la toxicidad del insecticida y permitió el crecimiento de colonias revertantes. El insecticida probado requiere de activación metabólica para inducir los efectos mutagénicos, es decir que se comporta como promutágeno.

## REFERENCIAS

- Ames B.N. (1971). The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. En: Chemical mutagens: principles and methods for their detection. (A. Hollaender, Ed.). Plenum Press, Nueva York, EUA, Vol. 1, pp. 267-282.
- Ames B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 221, 1256-1264.
- Ames B.N. (1989). Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. *Environ. Molec. Mutagen.* 14, 66-77.
- Ames B.N., Lee F.D. y Durston W.E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 70, 782-786.
- Ames B.N., McCann J. y Yamasaki E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364.
- Bianchi L., Zannoli A., Pizzala R., Stivala L.A. y Chiesara E. (1994). Genotoxicity assay of five pesticides and their mixtures in *Saccharomyces cerevisiae* D7. *Mutat. Res.* 321, 203-211.
- Calderón-Segura M.E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Ramírez M. (1999). In vivo and in vitro promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicidas molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 438, 81-88.
- Cortés-Eslava J., Gómez-Arroyo S., Arenas-Huerta F., Flores-Maya S., Díaz-Hernández M.E., Calderón-Segura M.E., Valencia-Quintana R., Espinosa-Aguirre J.J. y Villalobos-Pietrini R. (2013). The role of plant metabolism in the mutagenic and cytotoxic effects of four organophosphorus insecticides in *Salmonella typhimurium* and in human cell lines. *Chemosphere* 92, 1117-1125.
- de Flora S., Camoirano A., D'Agostini F. y Balansky R. (1992). Modulation of the mutagenic response in prokaryotes. *Mutat. Res.* 267, 183-192.
- deKergommeaux D.J., Grant W.F. y Sandhu S.S. (1983). Clastogenic and physiological response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba* in vivo root tip assay system. *Mutat. Res.* 124, 69-84.
- Fukuto T.R. (1971). Relationship between the structure of organophosphorus compounds and their activity as acetylcholinesterase inhibitors. *Bull WHO* 44, 31.
- George S.E., Chadwick R.W., Creason J.P., Kohan M.J. y Dekker J.P. (1991). Effect of pentachlorophenol on the activation of 2,6-dinitrotoluene to genotoxic urinary metabolites in CD-1 mice: a comparison of GI enzyme activities and urine mutagenicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 18, 92-101.
- George S.E., Huggins-Clak G. y Brooks L.R. (2001). Use of a *Salmonella* microsuspension bioassay to detect the mutagenicity of munitions compounds at low concentrations. *Mutat. Res.* 490, 45-56.
- Gichner T., Wagner E.D. y Plewa M.J. (1993). Differential responses of N-nitrosamines and aromatic amines in the plant cell-microbe coinoculation assay. *Biol. Plant.* 35, 401-406.
- Gómez-Arroyo S., Calderón-Segura M.E. y Villalobos-Pietrini R. (1995). Sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures induced by propoxur through metabolic plant-activation by *Vicia faba*. *Environ. Molec. Mutagen.* 26, 324-330.
- Gómez-Arroyo S., Cortés-Eslava J., Villalobos-Pietrini R., Calderón-Segura M.E., Flores-Márquez A.R. y Espinosa-Aguirre J.J. (2007). Differential mutagenic response of *Salmonella typhimurium* to the plant-metabolized organophosphorus insecticides, phoxim and azinphos methyl. *Toxicol. in Vitro* 21, 950-955.
- Goto S., Asada, S. Fushiwaki Y., Tanaka N., Umeda M., Nakajima D. y Takeda K. (2004). Tumor-promoting activity and mutagenicity of termiticide compounds. *J. UOEH* 26, 423-430.
- Higashi K. (1988). Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* 197, 273-288.
- Kado N-Y., Langley D. y Eisenstadt E. (1983). A simple liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.* 121, 25-32.
- Kummrow F., Rech C.M., Coimbra C.A. y Umbezeiro G.A. (2006). Blue rayon-anchored technique/*Salmonella* microsome microsuspension assay as a tool to

- monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary. *Mutat. Res.* 609, 60-67.
- Litterst Ch.L. y Lichtenstein E.P. (1971). Effects and interactions of environmental chemicals on human cells in tissue culture. *Arch. Environ. Health* 22, 454-459.
- Maron D.M. y Ames B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.
- Menn J.J. (1978). American Chemical Society, Washington D.C., Vol. 229, pp. 62-107.
- Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen M. y Degraeve N. (1984). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of insecticides. En: *Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of industrial pollutants*. (M. Kirsch-Volders, Ed.). Plenum Press, Nueva York, EUA, pp. 127-203.
- Onuki J., Rech C.M., Medeiros M.H., de A. Umbezeiro G. y Di Mascio P. (2002). Genotoxicity of 5-aminolevulinic and 4,5-dioxovaleric acids in the *Salmonella*/microsuspension mutagenicity assay and SOS chromotest. *Environ. Mol. Mutagen.* 40, 63-70.
- Plewa M.J. y Gentile J.M. (1976). Mutagenicity of atrazine: a maize microbe bioassay. *Mutat. Res.* 38, 287-292.
- 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.
- Preussman R., Schneider H. y Epple F. (1969). Untersuchungen sur wachweis alkylierender agentien. *Arzneimittel Forschung* 19, 1059-1073.
- Rasquinha I.A., Wildeman A.G. y Nazar R.N. (1988). Studies on the use of plant extracts in assessing the effects of plant metabolism on the mutagenicity and toxicity of pesticides. *Mutat. Res.* 147, 51-57.
- Rueff J., Chiapella C., Chipman J.K., Darrondi F., Silva I.D., Duverger.van Bogaert M., Fonti E., Glatt H.R., Isern P., Laires A., Leonard A., Llagostera M., Mossesso P., Natarajan A.T., Palitti F., Rodríguez A.S., Schinoppi A., Turchi G. y Werle-Schneider G. (1996). Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays. *Mutat. Res.* 353, 151-175.
- Sandermann H. Jr. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.* 197, 183-194.
- Umbezeiro G. de A., Warren S.H. y Claxton L.D. (2006). The mutation spectra of chlorinated drinking water samples using the base-specific TA7000 strains of *Salmonella* in the microsuspension assay. *Mutat. Res.* 609, 26-33.
- Wild D. (1975). Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutat. Res.* 32, 133-150.
- Wildeman A.G. y Nazar R.N. (1982). Significance of plant metabolism in the mutagenicity and toxicity of pesticides. *Can. J. Genet. Cytol.* 24, 437-449.