

EFFECTOS DE LOS HERBICIDAS METRIBUZINA Y AMETRINA (TRIAZINAS) SIN Y CON ACTIVACIÓN METABÓLICA VEGETAL *in vivo* SOBRE LA CINÉTICA DEL CICLO CELULAR Y EL ÍNDICE MITÓTICO EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

Saúl FLORES-MAYA

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090, Estado de México y Laboratorio de Citogenética Ambiental, Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, D.F., México

(Recibido noviembre 1999, aceptado julio 2000)

Palabras clave: sencor, gesapax, cinética de proliferación linfocitaria, metabolismo vegetal, *Vicia faba*

RESUMEN

Metribuzina y ametrina son herbicidas comunes y ampliamente utilizados en la agricultura mexicana. Sin embargo, hay poca información sobre su toxicidad y mutagenicidad en humanos y en animales. Por lo tanto, se evaluaron los efectos citotóxicos de estos herbicidas en forma directa e indirecta (activación vegetal *in vivo*) sobre el cultivo de linfocitos humanos. La cinética de proliferación linfocitaria (CPL) y los índices de replicación (IR) y mitótico (IM) fueron usados como pruebas para evaluar dicho efecto. A partir de los resultados, se concluye que estas triazinas fueron capaces de provocar efectos citotóxicos cuando hubo exposición directa a las células. La metribuzina en exposición directa a bajas concentraciones es más citotóxica que la ametrina, notándose la disminución de células de tercera división y del IM al aumentar la concentración. En la activación de estos herbicidas por *Vicia faba* se sugiere la participación de la homoglutationa y el compuesto 2-hidroxiametrina sobre la CPL, el IR y el IM de los cultivos. Se observó que las diferentes concentraciones de los herbicidas expuestos a la activación *in vivo* provocaron la disminución de células de primera división y el aumento de células de tercera división, además de una descenso del IM en los linfocitos cultivados.

Keywords: sencor, gesapax lymphocyte proliferation kinetics, plant metabolism, *Vicia faba*

ABSTRACT

Metribuzin and ametrine are herbicides of broad and common use in mexican agriculture. However, there is scarce information on their toxicity and mutagenicity in human and animals. Therefore, the effects caused by these herbicides were evaluated with and without metabolic activation (*in vivo* plant activation) using human peripheral blood lymphocytes culture. The lymphocyte proliferation kinetics (LPK), the replication (RI) and mitotic (MI) indexes were also endpoints to evaluate the cellular effects of these herbicides with and without plant activation (*Vicia faba*). The results suggest that these triazines were able to cause cytotoxic effects but in higher level when these herbicides were applied directly to human lymphocytes. Low concentrations of metribuzin in direct treatments were more cytotoxic than ametrine, because the cells of third division and the MI decreased when concentrations increased. The metabolic activation (*in vivo* plant activation) of these herbicides suggested the participation of the homoglutatione and the compound 2- hydroxyametrine on the LPK, RI and MI. It was observed that several of the herbicides concentrations with plant activation

caused the decrease of cells of first division and the increase of the frequency of cells of third division, besides the decrease of the MI in the human peripheral blood lymphocytes culture.

INTRODUCCIÓN

Los herbicidas son comercialmente exitosos por poseer una actividad biológica potente contra un espectro amplio de malezas y al mismo tiempo por no provocar toxicidad en los cultivos comerciales, en los mamíferos y en los invertebrados; sus residuos en suelo son pocos y su transformación es rápida (Brian 1979). Sin embargo, el uso de los herbicidas en la práctica agrícola ha sido contraproducente, porque se han ido incrementando los niveles de los compuestos xenobióticos en suelo, agua y aire, lo que representa problemas serios para la salud humana y el ambiente de las plantas (Higashi 1988, Tu 1992, Junnila *et al.* 1993, Davies *et al.* 1994).

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

El grupo de las triazinas destaca entre los herbicidas más empleados por los agricultores de los Estados Unidos de América y México. Estos herbicidas se emplean en pre y pos emergencia de cultivos de caña de azúcar, maíz, piña, plátano, naranjo, avena, cebada, espárrago, lenteja, papa, sorgo, zanahoria, chícharo, tomate y trigo. Tanto la ametrina como la metribuzina combaten la maleza anual de hoja ancha y los zacates. Actúan en la reacción de Hill inhibiendo la fotosíntesis de este tipo de vegetación (Bayer 1994, CIBA-GEIGY 1996).

Actualmente se conoce que algunos compuestos químicos de uso agrícola provocan directamente efectos sobre el DNA y que otros, para causar este daño, requieren ser activados metabólicamente por sistemas enzimáticos que poseen los animales y las plantas. A estos agentes químicos se les conoce como «promutágenos» o «mutágenos indirectos» (Plewa 1978, Gentile *et al.* 1982, 1986, Plewa y Gentile 1982, Plewa *et al.* 1984, Gómez-Arroyo *et al.* 1995).

Para evaluar las características genotóxicas de los agentes químicos y sus metabolitos se utilizan diferentes sistemas biológicos, que se ponen en contacto directo con el plaguicida o son sometidos a extractos vegetales conteniendo el agente químico (*in vivo*) o también en co-incubación con un homogeneizado vegetal o en un

cultivo de células del tejido de la planta (*in vitro*) (Plewa y Gentile 1982, Takehisa *et al.* 1982, Plewa y Wagner 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995).

En relación con la genotoxicidad se han establecido pruebas citogenéticas rápidas y sensibles para detectar la inducción de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) así como alteraciones en la cinética de proliferación linfocitaria (CPL) y en los índices mitóticos (IM) y de replicación (IR) (Latt 1973, 1974, Perry y Evans 1975, Kato 1977, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura y Espinosa-Ramírez 1998).

El proceso de la actividad celular, donde la expresión o la represión de los genes estimulan su activación y progresión, se ha tomado como un criterio importante en la evaluación genotóxica de los agentes químicos (Sandermann 1988, Pagano *et al.* 1992). Los resultados sobre el efecto de algunos plaguicidas en estudios *in vitro* y en personas expuestas han demostrado que provocaron el retraso en el ciclo de proliferación celular y la disminución en el índice mitótico (Sobti *et al.* 1982, Rupa *et al.* 1991).

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

Son pocos los estudios genotóxicos llevados a cabo con algunos herbicidas pertenecientes al grupo de las triazinas, donde se observan los efectos directos y usando su activación metabólica por plantas o animales *in vitro* (Roloff *et al.* 1992, Ribas *et al.* 1998). Con respecto a metribuzina y ametrina en este rubro de la investigación *in vivo* no se encuentra información en la literatura científica.

El grupo de las triazinas, especialmente las que interesan en este estudio, son clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como las menos tóxicas y se considera que en condiciones generales de uso aparentemente no implican un riesgo para los humanos (Ribas *et al.* 1998). Sin embargo, al acumularse los compuestos xenobióticos de este grupo en los tejidos de los

vegetales representan un riesgo para la salud del hombre (Plewa 1978, Higashi 1988, Tu 1992, Junnila *et al.* 1993, Davies *et al.* 1994). Se ha asociado el empleo de las triazinas con la formación de diferentes tipos de cáncer (Sathiakumar y Delzell 1997).

Por lo anterior, se justifica la investigación sistemática de estos agentes químicos sobre la formación y el almacenamiento de mutágenos y promutágenos en el metabolismo de las plantas para utilizarlas como monitor y determinar el daño genético en los linfocitos humanos; de este modo, en un futuro los resultados de estos estudios contribuirán en sugerir el control o regular su empleo en las prácticas agrícolas.

Por estas razones, en esta investigación se evalúa la capacidad de los herbicidas metribuzina (Sencor) y ametrina (Gesapax) con y sin la activación metabólica de *Vicia faba* *in vivo* para provocar alteraciones en la cinética de proliferación celular y en los índices mitótico y de replicación de linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las soluciones de las triazinas para los tratamientos directos y para la activación metabólica *in vivo*

Se prepararon concentraciones de 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 4, 5, 50, 750, 1000, 2500, 5000, 6000, 7000, 8000, 15 000, 20000, y 480000 mg/L de la solución de metribuzina (Sencor 48 % proporcionada por Bayer de México) y 1.5, 2, 2.5, 5, 6.5, 12.5, 20, 30, 50, 750, 2500, 6000, 8000, 30 000, 50000 y 490000 mg/L de la solución de ametrina (Gesapax 49 % donada por CIBA-GEIGY Mexicana), con agua desionizada estéril que fueron aplicadas a cada cultivo de los tratamientos directos y con activación metabólica con *Vicia faba*.

Cultivo de linfocitos humanos y tratamientos directos

A los frascos de cultivo se les agregaron 3 ml de medio Gibco (RPMI 1640) complementado con 0.12 ml de fitohemaglutinina al 4 % (Gibco) más 0.5 ml de sangre heparinizada de 4 donadores sanos, 24 horas después del cultivo se adicionaron las siguientes concentraciones en 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 4, 5, 50, 750 y 1000 mg/L de metribuzina y 1.5, 2, 2.5, 5, 6.5, 12.5, 20, 30, 50, 750 y 1000 mg/L de ametrina y 3600 de etanol más 100 µL de bromodesoxiuridina (5-BrdU, 20 µg/ml, *Sigma*) y al testigo negativo sólo la 5-BrdU. A las 70 horas se les aplicaron 100 µL de colchicina al 0.05 % (Merck) y a las 72 horas se colocaron en 0.075 M de KCL (Merck) a 37 °C por 20 minutos y después se fijaron en metanol-ácido acético 3:1. Las laminillas se prepararon por goteo 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 metribuzina y ametrina al cultivo de linfocitos humanos.

Las semillas de *Vicia faba* (var. minor) se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave, cuando las raíces alcanzaron longitudes entre 4 y 6 cm se sumergieron durante 4 horas (tiempo necesario para que los agentes químicos puedan ser absorbidos y biotransformados por las raíces de acuerdo con Frear *et al.* 1983, Gawronski 1983, Milburn *et al.* 1991 y Shaw y Hydrick 1993) a temperatura ambiente y en obscuridad en las siguientes concentraciones en mg/L: 750, 1000, 2500, 5000, 6000, 7000, 8000, 15000, 20000 y 480000 de metribuzina y 750, 2500, 6000, 8000, 30000, 50000 y 490000 de ametrina. Las raíces del testigo positivo se introdujeron en etanol al 98 % de pureza (*Sigma*) a 3600 mg/L durante 6 horas a temperatura ambiente; se ha comprobado que este compuesto es promutágeno para esta planta e incrementa la frecuencia de ICH en linfocitos humanos *in vivo* (Takehisa *et al.* 1982, 1988, Calderón-Segura 1993, Gómez-Arroyo *et al.* 1995, Calderón-Segura *et al.* 1999).

El testigo negativo estuvo bajo las mismas condiciones experimentales pero en agua desionizada estéril (fracción S10) y el otro testigo negativo fue el cultivo de linfocitos sólo con 100 µL de 5-BrdU (20 µg/ml) que se aplicó a las 24 horas de haberlos puesto a 37 °C de incubación.

Después de los tratamientos, las raíces se lavaron con agua desionizada estéril y se cortaron aproximadamente 2 cm de la raíz principal, se homogeneizaron por separado en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4 y a temperatura entre 0-4 °C en un homogeneizador de tejidos vegetales de 3 a 5 minutos. La relación de volumen de la solución amortiguadora (ml) a peso fresco de los cortes de la raíz (g) fue de 1:1. El homogeneizado fue ultracentrifugado por 15 minutos a 11500 rpm a 4 °C. El sobrenadante en el que se encontraron los metabolitos de la transformación de los herbicidas aplicados a diversas concentraciones, así como del etanol, fue esterilizado con filtros miliporo (0.45 µm). A estos extractos se les determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (1976), detectando 14.6 mg/ml constante en todas las concentraciones de los herbicidas por lo cual inmediatamente se agregaron 100 µL de extracto de las raíces tratadas con las diferentes concentraciones de metribuzina y ametrina más 100 µL de 5-Bromodesoxiuridina (20 µg/ml) a los linfocitos cultivados a las 24 horas y se continuó con la técnica mencionada para todos los casos.

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

La incorporación de la 5-BrdU en los linfocitos en cultivo fue utilizada para analizar la cinética de proliferación celular y el índice de replicación en presencia de los dos herbicidas.

El índice de replicación (IR) se obtuvo de acuerdo con la fórmula propuesta por Krishna *et al.* (1985), $IR = 1M_1 + 2M_2 + 3M_3 / 100$ donde se examinaron 100 metafases de buena calidad con una apropiada tinción diferencial de las cromátidas hermanas, que se clasificaron en primera, segunda y tercera divisiones.

El índice mitótico (IM) se determinó por medio del análisis de 1000 células estimuladas (células en interfase con grandes núcleos que tiñeron claramente ya que en las no estimuladas los núcleos son muy pequeños y presentan coloración azul muy intensa al observarlas al microscopio óptico) consecutivas considerando la cantidad que se encontraba en mitosis (Husgafvel-Pursiainen 1987, Ioannidou *et al.* 1989, Rupa *et al.* 1989, Gonsebatt *et al.* 1995, Vijayalaxmi *et al.* 1996, Madrigal-Bujaidar *et al.* 1997, Sujatha y Hegde 1998). La fórmula para obtener el porcentaje del IM utilizada en este estudio fue $IM = \text{No. de metafases} / 1000$ y $\% IM = IM \times 100$.

Todos los tratamientos se hicieron por duplicado y se aplicó la prueba de *t* de Student para comparar las medias del experimento y su réplica y el nivel de significación cuando $p < 0.05$. Al no encontrarse diferencias significativas entre ellos se promediaron los valores y a los resultados se les aplicó la prueba de X^2 . La relación concentración efecto fue analizada por el coeficiente de regresión usando la prueba *t* (dos colas). El nivel de probabilidad de 0.05 fue usado como un criterio de significación (Chakrabarti *et al.* 1997).

Con el objeto de lograr objetividad en las observaciones, las laminillas se reetiquetaron de tal manera que no se tuvo conocimiento del grupo al cual pertenecieron hasta que finalizó el experimento y se descifró la clave.

RESULTADOS

En las **tablas I y II** se presentan los promedios de los datos obtenidos en los tratamientos y sus réplicas, que de acuerdo con la prueba de *t* de Student los efectos fueron similares.

El ciclo de proliferación linfocitaria (CPL) de algunos de los cultivos tratados directamente con metribuzina mostró diferencias significativas con la cinética del cultivo del testigo negativo (**Tabla I**).

A partir de 0.3 a 1 mg/L se registró incremento en la frecuencia de células metafásicas de tercera división al compararlo con el testigo negativo (**Fig. 1**). Por otro lado, no se encontraron células en metafase ni en otra fase de la división de los linfocitos sino sólo células no estimuladas a partir de 1.5 mg/L, habiendo un bloqueo drástico de la mitosis.

El índice mitótico (IM) de los cultivos de linfocitos tratados con metribuzina presentó diferencias significativas con respecto al testigo negativo, estos valores tienen

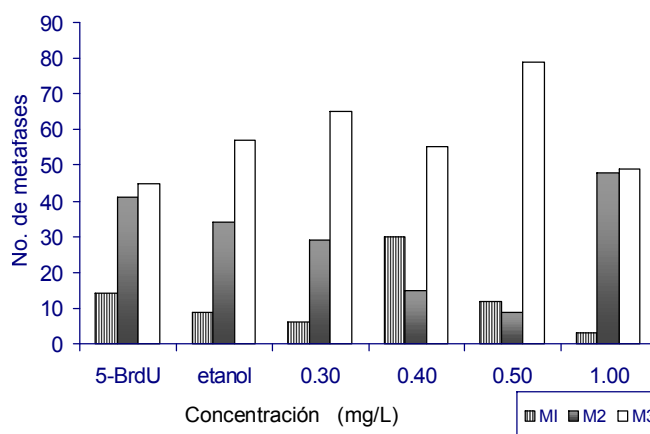


Fig. 1. Cinética de proliferación de linfocitos humanos expuestos a concentraciones directas de metribuzina

un comportamiento asintótico. Los datos del índice de replicación (IR) de los tratamientos de 0.3, 0.5 y 1 mg/L de metribuzina no evidenciaron diferencias significativas con relación al testigo negativo.

En el caso de la ametrina, la cinética de proliferación también fue afectada en algunos cultivos y estadísticamente hubo diferencias significativas con el testigo negativo (**Tabla I**). A partir de la concentración de 1.5 mg/L, el número de metafases de primera división disminuyó al aumentar la concentración hasta 5 mg/L. Sin embargo, en el tratamiento de 2 mg/L el resultado no tuvo diferencias significativas con el testigo negativo (**Tabla I y Fig. 2**).

Los datos obtenidos para las células metafásicas de segunda división tuvieron un comportamiento similar a los tratamientos de metribuzina. Los cultivos tratados con concentraciones de 1.5 hasta 5 mg/L de ametrina presentaron aumento en las células de tercera división.

El IR de los tratamientos con ametrina no tuvo diferencias significativas con el testigo negativo. Los datos del IM mostraron diferencias significativas con relación al testigo negativo, ya que hubo cierta correspondencia de las concentraciones altas con la disminución del valor del IM. Desde la concentración de 6.5 mg/L de ametrina el proceso celular no tuvo continuidad (**Tabla I**).

En el sistema de activación metabólica *in vivo* (**Tabla II**), la concentración de 750 mg/L para ambos herbicidas fue considerada inicial. A partir de ésta se observó un estímulo sobre la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en los cromosomas de los linfocitos (datos no publicados) provocado por los extractos de raíces.

La CPL de algunos de los cultivos de linfocitos humanos tratados con los extractos de las raíces, sometidas a las distintas concentraciones de metribuzina tuvo diferencias significativas con respecto a los testigos (5-BrdU y fracción S10).

La activación metabólica de este herbicida también

TABLA I. FRECUENCIAS DE CÉLULAS EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES E ÍNDICES DE REPLICACIÓN (IR) Y MITÓTICO (IM) DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVOS TRATADOS CON METRIBUZINA Y AMETRINA SIN LA ACTIVACIÓN METABÓLICA DE *Vicia faba*

	Tratamientos directos ^A			% IR ^B	% IM ^C
	M1	M2	M3		
Testigo negativo	14 ± 0.7	41 ± 0.7	45 ± 4.2	2.3 ± 0.1	4.2 ± 0.4
Testigo positivo					
Etolanol 3600 mg/L ^D	9 ± 1.4	34 ± 3.0	57 ± 5.0	2.4 ± 0.2	3.2 ± 0.07
Metribuzina (mg/L)					
0.3	6 ± 2.1	29 ± 0.0	65 ± 6.0 *	2.6 ± 0.1	6.4 ± 0.07*
0.4	30 ± 5.0 *	15 ± 4.2*	55 ± 4.0	2.2 ± 0.03	6.0 ± 0.1*
0.5	12 ± 4.0	9 ± 1.4*	79 ± 0.7*	2.7 ± 0.01	6.0 ± 0.3*
1.0	3 ± 1.4 *	48 ± 3.0	49 ± 1.4	2.5 ± 0.1	6.3 ± 0.2*
1.5		No se observaron células estimuladas ^B			
2.5		“			
4.0		“			
5.0		“			
50.0 a 1000					
Testigo negativo	13 ± 0.0	39 ± 1.4	48 ± 3.0	2.3 ± 0.1	3.8 ± 0.5
Testigo positivo					
Etolanol 3600 mg/L ^D	13 ± 3.0	57 ± 1.4*	30 ± 1.4*	2.17± 0.05	3.4 ± 0.07
Ametrina (mg/L)					
1.5	3 ± 0.0*	46 ± 0.7	51 ± 4.2	2.4 ± 0.1	6.6 ± 0.2*
2.0	8 ± 1.4	29 ± 1.4	63 ± 7.0*	2.5 ± 0.2	4.2 ± 0.07
2.5	2 ± 0.0*	21 ± 2.1*	77 ± 2.1*	2.7 ± 0.1	2.1 ± 0.07*
5.0	0 ± 0.0*	37 ± 1.4	63 ± 1.4*	2.6 ± 0.07	1.6 ± 0.4*
6.5		No se observaron células estimuladas ^E			
12.5		“			
20.0		“			
30.0		“			
50.0 a 1000					

^A Promedios de dos experimentos ± D.S.; ^B Índice de Replicación = 1M1+2M2+3M3/100; ^C Índice Mitótico, n = 2000 células; ^D Corresponde a 1X10⁵ l¹M; ^E No se encontró ningún tipo de célula mitótica.

*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo experimental aplicando la prueba de X², en ambos casos p < 0.05.

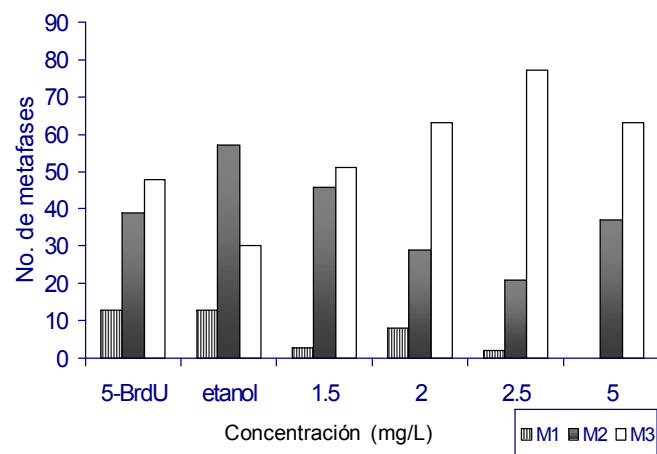


Fig. 2. Cinética de proliferación de linfocitos humanos expuestos a concentraciones directas de ametrina

presentó irregularidades en la asociación de la concentración del herbicida con la frecuencia de células metafásicas de primera, segunda y tercera divisiones, sin embargo, se nota que desde la concentración de 750 hasta 480000 mg/L las células metafásicas de tercera división elevaron sus frecuencias y en la mayoría se observaron diferencias significativas con respecto a los testigos negativos (Fig. 3).

Existe una correlación negativa ($r = -0.5358$) entre las concentraciones de metribuzina aplicadas a las raíces y el valor del IM de los linfocitos en cultivo. Es decir, conforme se incrementa la concentración va disminuyendo el valor del IM; no obstante, en 750 hasta 7000 mg/L no hay diferencias de significancia del IM con relación al testigo y a partir de 8000 hasta 480000 mg/L sí presenta disminución en los valores del IM.

Los cultivos de linfocitos humanos sometidos a la aplicación de los extractos con las diferentes concentraciones de ametrina también mostraron diferencias significa-

TABLA II. FRECUENCIAS DE CÉLULAS EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA DIVISIONES E ÍNDICES DE REPLICACIÓN (IR) Y MITÓTICO (IM) DE LOS LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVOS TRATADOS CON METRIBUZINA Y AMETRINA CON LA ACTIVACIÓN METABÓLICA DE *Vicia faba*

	Tratamientos con la activación metabólica de <i>Vicia faba in vivo</i> ^A				
	M1	M2	M3	% IR ^B	% IM ^C
Etanol 3600 mg/L ^D	26 ± 4.9	37 ± 0.0	37 ± 5.4	2.1 ± 0.09	3.0 ± 0.2
Testigo positivo					
Etanol 3600 mg/L ^D					
Más la fracción S10	18 ± 0.0*	38 ± 7.7	44 ± 2.8*	2.3 ± 0.1	4.3 ± 0.6
Testigo negativo					
Fracción S10	31 ± 3.5	34 ± 3.5	35 ± 0.0	2.0 ± 0.03	4.9 ± 0.4
Testigo negativo	23 ± 0	36 ± 4.2	41 ± 4.2	2.1 ± 0.1	4.3 ± 0.4
Metribuzina (mg/L)					
750	24 ± 2.8	35 ± 3.5	41 ± 0.7	2.1 ± 0.02	4.9 ± 0.3
1000	20 ± 1.4*	32 ± 1.4	48 ± 2.8*	2.2 ± 0.04	4.9 ± 0.5
2500	16 ± 0.0*	33 ± 4.2	51 ± 3.5*	2.3 ± 0.1	4.7 ± 0.2
5000	15 ± 4.2*	24 ± 3.5*	61 ± 0.7*	2.4 ± 0.05	4.1 ± 0.1
6000	13 ± 2.1*	24 ± 2.1*	63 ± 0.0*	2.5 ± 0.02	3.7 ± 0.3
7000	10 ± 2.8*	36 ± 4.2	54 ± 7.0*	2.4 ± 0.09	3.5 ± 0.3
8000	14 ± 4.2*	20 ± 0.0	66 ± 6.3*	2.5 ± 0.02	3.0 ± 0.3*
15000	13 ± 3.5*	25 ± 1.4*	62 ± 5.0*	2.5 ± 0.08	2.3 ± 0.4*
20000	12 ± 3.5*	21 ± 0.0*	67 ± 0.0*	2.7 ± 0.1	2.0 ± 0.07*
480000	6 ± 2.1*	20 ± 2.8*	74 ± 5.0*	2.6 ± 0.07	1.7 ± 0.6*
Ametrina (mg/L)					
750	9 ± 1.4*	33 ± 0.7*	58 ± 2.1*	2.5 ± 0.04	3.7 ± 0.6
2500	27 ± 0.7	29 ± 0.0*	44 ± 7.7	2.1 ± 0.07	3.9 ± 0.6
6000	25 ± 5.6*	19 ± 0.0*	56 ± 5.6*	2.3 ± 0.11	3.7 ± 0.3
8000	20 ± 4.2*	33 ± 2.1	47 ± 6.3*	2.2 ± 0.1	3.0 ± 0.1*
30000	12 ± 3.5*	23 ± 0.0*	65 ± 5.6*	2.5 ± 0.02	3.1 ± 0.2*
50000	17 ± 0.0*	25 ± 1.4*	58 ± 8.4*	2.4 ± 0.2	3.1 ± 0.07*
490000	19 ± 3.5*	26 ± 7.7*	55 ± 4.2*	2.3 ± 0.007	2.4 ± 1.0*

^A Promedios de dos experimentos ± D.S.; ^B Índice de Replicación = $(M1+2M2+3M3)/100$; ^C Índice Mitótico, n = 2000 células; ^D Corresponde a 1×10^{-4} M.

*Se obtuvieron diferencias significativas entre los testigos y cada grupo experimental aplicando la prueba de X^2 , en ambos casos $p < 0.05$

tivas con relación a los testigos negativos (Tabla II).

Al igual que los cultivos tratados con los extractos sometidos a las diversas concentraciones de metribuzina, los de ametrina también tuvieron un comportamiento irregular en la frecuencia de las células metafásicas de primera, segunda y tercera divisiones. Existen diferencias significativas entre las células metafásicas de tercera división con las de los testigos negativos, debido al aumento de células de este tipo en todas las concentraciones (Fig. 4).

Los valores del IM tuvieron correlación negativa ($r = -0.2323$) con la concentración aplicada, mostrando además una diferencia significativa con los testigos negativos. Es importante señalar que estos valores de los tratamientos fueron bajos con relación a los testigos en una tendencia a formar una asíntota y disminuyendo en la concentración de 490000 mg/L. Los valores del IR de los tratamientos con activación vegetal no mostraron diferencia significativa con respecto a los testigos negativos (Tabla II).

Por otro lado, la relación de los testigos positivos con

los negativos del presente trabajo fue la siguiente: se observó en los tratamientos directos con etanol un efecto ligero sobre las metafases de segunda y tercera divisiones en comparación con los tratamientos de metribuzina (Fig. 4).

El IR con respecto al testigo (cultivo de linfocitos humanos más 5-BrdU) así como el valor del IM del testigo positivo no tuvieron diferencias significativas con el testigo negativo y fue menor al IM de los tratamientos (Tabla I).

Para los tratamientos directos con ametrina, el testigo positivo registró un efecto de aumento en las segundas divisiones y una disminución en las terceras divisiones, dando una diferencia significativa en estos niveles con los del testigo negativo (Fig. 2).

Los valores del IM e IR del etanol no tuvieron diferencias significativas con relación al testigo (Tabla I). Sin embargo, el etanol más la fracción S10 (testigo positivo de la activación *in vivo*) sí tuvo efecto al disminuir los valores de las células metafásicas de primera división y estimular la frecuencia de células de tercera división,

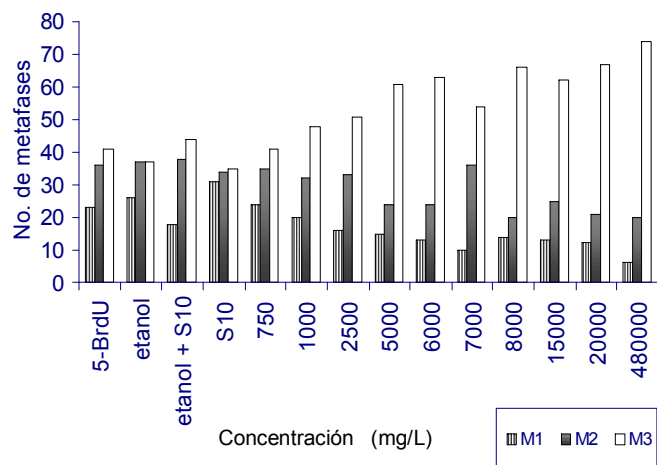


Fig. 3. Cinética de proliferación de linfocitos humanos expuestos a distintas concentraciones de metribuzina con activación metabólica de *Vicia faba* (*in vivo*)

presentando así una diferencia significativa con los testigos negativos (Figs. 3 y 4). En cambio los registros de los IR e IM no tuvieron diferencias significativas con estos últimos (Tabla II).

El testigo negativo (extractos de las raíces de *Vicia faba* colocadas sólo en agua destilada) utilizado para la activación metabólica *in vivo* de los dos herbicidas, no presentó diferencias significativas sobre los tres criterios evaluados al ser cotejados con el testigo negativo (cultivo de linfocitos + 5-BrdU) (Tabla II).

DISCUSIÓN

En la actualidad existen estudios donde otras triazinas son probadas para determinar su genotoxicidad *in vivo* e

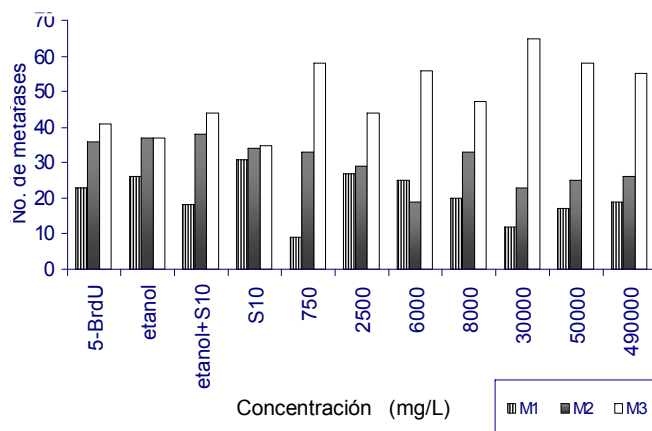


Fig. 4. Cinética de proliferación de linfocitos humanos expuestos a distintas concentraciones de ametrina con activación metabólica de *Vicia faba* (*in vivo*)

in vitro en animales y en microorganismos y no se les ha encontrado ningún tipo de efecto genotóxico o alguna característica mutagénica (Brusick 1994, Ribas *et al.* 1998).

Diversos autores han descrito una relación de la exposición de algunos tipos y mezclas de triazinas que pueden producir neoplasias. Sin embargo, estos estudios no aportan evidencias claras de que la atrazina u otras triazinas sean carcinogénicas (Sathiakumar y Delzell 1997).

Se ha descrito que la exposición a los plaguicidas y a sus metabolitos, es un riesgo para la salud humana, puesto que promueven cambios en el material genético, la activación de proto-oncogenes y las alteraciones en el ciclo celular que pueden ser causas posibles de la formación de cáncer y de metástasis (Calderón-Segura y Espinosa-Ramírez 1998).

En el análisis de la cinética de proliferación celular, tanto en los tratamientos directos como con activación metabólica de metribuzina y ametrina por *Vicia faba in vivo*, se nota un aumento en las metafases de tercera división del ciclo celular (Tablas I y II). Este incremento sugiere que los herbicidas están provocando un estímulo, posiblemente debido a las propiedades químicas de su forma activa y por la transformación metabólica de su molécula por *Vicia faba*.

Este aumento de la frecuencia de metafases se pudo favorecer por la interferencia en una acción conjunta con la fitohemaglutinina o en la activación de enzimas u otros factores que aceleraron el proceso de la división de los linfocitos humanos.

En los tratamientos directos con metribuzina se observa el aumento del IM que se mantiene en forma asintótica hasta la concentración de 1 mg/L, después de esta concentración ya no se encontraron núcleos estimulados.

Para la ametrina aplicada de manera directa a los cultivos de los linfocitos, los valores del IM disminuyen y en la concentración de 6.5 mg/L ya no se observan núcleos estimulados, demostrándose así que la metribuzina es más citotóxica, ya que en la concentración de 1.5 mg/L ó sea a menor concentración que la ametrina, no se presentan células estimuladas ni células en división. Esto implica que la forma activa de los herbicidas interviene en la disponibilidad de nutrientes y en la supresión de algunas enzimas relacionadas con la síntesis del DNA que afectan la continuación del ciclo celular normal y a la supresión de la mitosis de los linfocitos (Tabla I).

Los resultados obtenidos en los tratamientos con los extractos de *Vicia faba in vivo* tienen el mismo efecto de estímulo que cuando los dos herbicidas son agregados en forma directa, es decir, los metabolitos de los dos herbicidas aumentan la cantidad de células de tercera división en todos los tratamientos y se observa una disminución en la frecuencia de las células de primeras divisiones (Tabla II).

En la apreciación de las metafases de tercera división y de los IM de los tratamientos directos y con activación metabólica, se observa que los metabolitos tienen un grado de citotoxicidad ligera con relación al compuesto activo de los dos herbicidas que a la concentración de 1.5 mg/L de metribuzina y a 6.5 mg/L de ametrina ya no se encuentran células estimuladas, en cambio los tratamientos experimentales de los dos herbicidas activados metabólicamente por *Vicia faba* llegan a ejercer todavía un incremento en la frecuencia de células de tercera división y una tendencia a la disminución del IM a concentraciones de 480000 mg/L de metribuzina y 490000 mg/L de ametrina. Además, los valores uniformes y muy similares del IR en los tratamientos directos y con la activación *in vivo* reafirman lo antes mencionado sobre el aumento de la CPL. Estos valores no presentan diferencias significativas con los testigos negativos, además se observa la falta de correlación positiva entre la concentración de los herbicidas y el IR.

La biotransformación de metribuzina y ametrina ha sido estudiada en microorganismos, plantas y animales. Sin embargo un espectro general de los metabolitos y de sus efectos biológicos aún no se han descrito (Aizawa 1979, Frear *et al.* 1983, Gawronski 1983, Hatzios 1988, Means *et al.* 1988, Ducruet *et al.* 1993).

Este estudio sugiere que *Vicia faba* podría establecer rutas de biotransformación como las propuestas por Fedtke (citado por Hatzios 1988) y Naylor (1979) quienes comentan que la ruta de biotransformación de metribuzina y ametrina por plantas depende de la concentración que se les aplique, cuando la concentración es elevada la conjugación del sulfóxido de metribuzina a homoglutationa parece ser la reacción predominante para desactivar a este herbicida; así mismo, y de acuerdo con Hatzios (1988), la ametrina es biotransformada por una reacción de *N*-desalquilación, que es una reacción oxidante, por lo que posiblemente los metabolitos que intervienen en algún momento para estimular la aceleración de la mitosis podrían ser homoglutationa para metribuzina y compuestos 2-hidroxi para ametrina.

Se corrobora la eficiencia de la activación metabólica de compuestos químicos por *Vicia faba in vivo* por el método empleado por Calderón-Segura (1993), Gómez-Arroyo *et al.* (1995) y Calderón-Segura *et al.* (1999). Este trabajo coincide con el de los autores antes mencionados en el hecho de que la fracción S10 no causa efecto sobre la CPL, el IM y el IR de los cultivos de linfocitos humanos con relación al testigo negativo (cultivo de linfocitos + 5-BrdUrd), ya que no presentan diferencias significativas, en cambio sí se observa un daño adicional por el etanol activado *in vivo* por las raíces de *Vicia faba* en las células de primera y tercera divisiones comparado con el testigo negativo (cultivo de linfocitos + extracto de *Vicia faba* sin tratamiento) (Tablas I y II).

CONCLUSIONES

Los compuestos químicos de los herbicidas en exposición directa a los linfocitos en cultivo, son más citotóxicos que sus metabolitos contenidos en el extracto de *Vicia faba*.

En exposición directa la metribuzina es más citotóxica a bajas concentraciones que la ametrina. La metribuzina estimula la división de los linfocitos, observándose el aumento tanto en la frecuencia de células de tercera división como del IM con respecto al testigo negativo, pero cuando se incrementa la concentración estos valores disminuyen.

Los linfocitos humanos expuestos en forma directa a la ametrina presentan aumento de células de tercera división, siendo más notable en concentraciones de 2.5 mg/L y a concentraciones altas sufren la disminución del IM.

La metribuzina y ametrina son transformadas por el metabolismo de *Vicia faba* pues provocaron un efecto citotóxico.

Se sugiere, de acuerdo con Fedtke (citado en Hatzios 1988) y Naylor (1979), que las fases de transformación de metribuzina y ametrina llevadas a cabo por *Vicia faba* y que provocaron el daño son la conjugación y el proceso de *N*-desalquilación, respectivamente.

Como conclusión general se considera que los herbicidas metribuzina y ametrina y sus metabolitos producen efectos citotóxicos sobre los linfocitos humanos en cultivo, lo que podría representar un motivo para continuar los estudios de mutagenicidad y carcinogenicidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN216098) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado Tesis (PAEP-Tesis 002356) de la Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM. A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PASPA) UNAM.

REFERENCIAS

- Aizawa H. (1979). *Metabolic maps of pesticides*. Academic Press, Nueva York, pp. 195-201.
- Bayer A.G. (1994). Tratamiento de la intoxicación por plaguicidas. Guía para Médicos. Sector Agrochemicals Crop Protection Business Group, México, 81 pp.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

- principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brian C.R. (1979). The history and classification of herbicides. En: *Herbicides: physiology, biochemistry, ecology* (J.L. Audus, Ed.). Academic Press, Londres, Vol. 1, pp. 1-54.
- Brusick J. D. (1994). An assessment of the genetic toxicity of atrazine: relevance to human health and environmental effects. *Mutat. Res.* 317, 133-144.
- Calderón-Segura M.E. (1993). Intercambios de cromátidas hermanas inducidos por propoxur previa activación metabólica por *Vicia faba*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Calderón-Segura M.E. y Espinosa-Ramírez M. (1998). Efecto de butilato y de molinate sobre la división de los linfocitos humanos en cultivo con y sin activación metabólica *in vivo* e *in vitro* por *Vicia faba*. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 14, 39-47.
- Calderón-Segura M.E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R. y Espinosa-Ramírez M. (1999). *In vivo* and *in vitro* promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 2, 81-88.
- Chakrabarti S., Xiao-Xiang Z. y Claude-lise R. (1997). Influence of duration of exposure to styrene oxide on sister chromatid exchanges and cell-cycle kinetics in cultured human blood lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 395, 37-45.
- CIBA-GEIGY (1996). *Manual de protección de cultivos*. 3ª ed., Ciba Geigy, México, 334 p.
- Davies P. E., Cook L.S.J. y Barton J.L. (1994). Triazine herbicide contamination of Tasmanian streams: sources, concentrations and effects on biota. *Australian J. Marine and Freshwater Res.* 45, 209-226.
- Ducruet J. M., Sixton H. y García-Baudin J. M. (1993). Using chlorophyll fluorescence induction for a quantitative detoxification assay with metribuzin and chlorotoluron in excised wheat (*Triticum aestivum* and *T. durum*) leaves. *Pest. Sci.* 38, 295-301.
- Dunkelberg H., Fuchs J., Hengstler J.G., Klein E., Oesch F. y Struder K. (1994). Genotoxic effects of the herbicides alachlor, atrazine, pendimethaline, and simazine in mammalian cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 4, 498-504.
- Frear D.S., Mansager E.R., Swanson H.R. y Tanaka F.S. (1983). Metribuzin metabolism in tomato: isolation and identification of *N*-glucoside conjugates. *Pest. Biochem. Physiol.* 19, 270-281.
- Gawronski W.S. (1983). Tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars to metribuzin. *Weed Sci.* 31, 525-527.
- Gentile J.M., Gentile G.J., Bultman J., Sehriest 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., 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. Molec. Mutagen.* 26, 324-330.
- Gonsebatt M. E., Herrera L. A. y Ostrosky-Wegman P. (1995). Lymphocyte proliferation as a biomarker in environmental monitoring. En: *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change* (F. M. Butterworth, L.D. Corkum y J. Guzmán-Rincón, Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 81-94.
- Hatzios K.K. (1988). Biotransformations of herbicides in higher plants. En: *Environmental chemistry of herbicides* (R. Grover y A.J. Cessna, Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Vol. 2, pp. 142-175.
- Herelia P., Viigagni F., Maffei F., Morotti M., Colacci A., Perocco P. y Grilli S. (1994). Genetic safety evaluation of pesticides in different short-term tests. *Mutat. Res.* 321, 219-228.
- Higashi K. (1988). Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.* 197, 273-288.
- Husgafvel-Pursiainen K. (1987). Sister-chromatid exchange and cell proliferation in cultured lymphocytes of passively and actively smoking restaurant personnel. *Mutat. Res.* 190, 211-215.
- Ioannidou E., Lialiaris T., Morelatos D. y Dozi-Vassiliades J. (1989). Synergistic induction of cytogenetic damage by alkylating antineoplastics and 5-azacytidine in human lymphocytes. *Environ. Molec. Mutagen.* 14, 6-12.
- Junnala S., Heinonen-Tanski H., Ervio L. R. y Laitinen P. (1993). Phytotoxic persistence and microbiological effects of metribuzin in different soils. *Weed Res.* 33, 213-223.
- Kato H. (1977). Spontaneous sister chromatid exchanges detected by BrdU-labelling method. *Nature* 251, 70-72.
- Krishna G., Xu J., Nath J., Petersen M. y Ong T. (1985). *In vivo* cytogenetic studies on mice exposed to ethylene dibromide. *Mutat. Res.* 158, 81-87.
- Krugar E. L., Somasundaram L., Kanwar R. S. y Coats J. R. (1993). Persistence and degradation of (¹⁴C) deisopropylatrazine as affected by soil depth and moisture conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1959-1967.
- Kulshrestha G., Yaduraju N.T. y Mani V.S. (1982). The relative toxicity of the S-triazine herbicides atrazine and simazine to crops. *J. Environ. Sci. Health* 4, 341-354.
- 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.
- Lanfranco L. E., Bellinder R. R. y Wallace R. W. (1993). Grain rye residues and weed control strategies in reduced tillage potatoes. *Weed Technol.* 7, 23-28.
- Latt S. A. (1973). Microfluorometric detection of DNA replication in human metaphase chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 70, 3395-3399.
- 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.

- Madrigal-Bujaidar E., Ibañez C. J., Cassani M. y Chamorro G. (1997). Effect of furazolidone on sister-chromatid exchanges, cell proliferation kinetics, and mitotic index *in vivo* and *in vitro*. *J. Toxic. Environ. Health* *51*, 89-96.
- Means C.J., Plewa J. M. y Gentile M.J. (1988). Assessment of the mutagenicity of fractions from *s*-triazine-treated *Zea mays*. *Mutat. Res.* *197*, 325-336.
- Meisner L. F., Roloff B. D. y Belluck D.A. (1993). *In vitro* effects of N-nitrosoatrazine on chromosome breakage. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *24*, 108-112.
- Milburn P., O'Neill H., Gartley C., Pollock T., Richards J. E. y Bailey H. (1991). Leaching of dinoseb and metribuzin from potato fields in New Brunswick. *Can. Agricult. Eng.* *33*, 197-204.
- Murnik M. R. y Nash C. L. (1977). Mutagenicity of the triazine herbicides atrazine, cyanazine, and simazine in *Drosophila melanogaster*. *J. Toxicol. Environ. Health* *4*, 691-707.
- Naylor W. A. (1979). Herbicide metabolism in plants. En: *Herbicides: physiology, biochemistry, ecology* (J. L. Audus Ed.). Academic Press, Londres, Vol. 1, pp. 397-422.
- Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W. y Draetta P. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO. J.* *11*, 961-971.
- Perry P. y Evans H. J. (1975). Cytological detection of mutagen, carcinogen exposure by chromatid exchange. *Nature* *258*, 121-124.
- Perry P. y Wolff S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid exchange. *Nature (Londres)* *251*, 156-158.
- Peterson H.G., Boutin C., Martin P. A., Freemark K. E., Rueckner N. J. y Moody M. J. (1994). Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquatic Toxicol. (Amsterdam)* *28*, 275-292.
- Plewa J. M. (1978). Activation of chemical into mutagen by green plants. A preliminary discussion. *Environ. Health Perspect.* *27*, 45-50.
- Plewa J. M. y Gentile M. J. (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 J. M., Wagner D. E., Gentile J. G. y Gentile M. J. (1984). An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* *136*, 233-245.
- Plewa J.M., Wagner D.E. y Gentile M. J. (1988). The plant cell/microbe coinubation assay for the analysis of plant-activated promutagens. *Mutat. Res.* *197*, 207-219.
- Plewa J. M. y Wagner D.E. (1993). Activation of promutagens by green plants. *Ann. Rev. Genet.* *27*, 93-113.
- Porter W.P., Green S.M., Debink N.L. y Carlson I. (1993). Groundwater pesticides interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats. *J. Toxicol. Environ. Health* *1*, 15-34.
- Ribas G., Surrallés J., Carbonell E., Creus A., Xamena N. y Marcos R. (1998). Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* *416*, 93-99.
- Roloff B., Belluck D. y Meiner L. (1992). Cytogenetic effects of cyanazine and metolachlor on human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutat. Res.* *281*, 295-298.
- Rupa S. D., Reddy P. P. y Reddi S. O. (1989). Analysis of sister-chromatid exchanges, cell kinetic and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticide sprayers. *Mutat. Res.* *223*, 253-258.
- 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. Molec. Mutagen.* *18*, 136-138.
- Sandermann H. Jr. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.* *197*, 183-194.
- Sathiakumar N. y Delzell E. (1997). A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer. *Crit. Rev. Toxicol.* *6*, 599-612.
- Scorgie H.R. y Cooke A.S. (1979). Effects of the triazine herbicide cyanatryn on aquatic animals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *22*, 135-142.
- Shaw D.R. y Hydrick D.E. (1993). Effect of imazaquin and chlorimuron plus metribuzin on sicklepod (*Cassia obtusifolia*) seed production and germination. *Weed Technol.* *7*, 681-685.
- Smeda R.J., Hasegawa P.M., Goldsbrough P. B., Singh N. K. y Weller S.C. (1993). A serine-to-threonine substitution in the triazine herbicide-binding protein in potato cells results in atrazine resistance without impairing productivity. *Plant Physiol.* *103*, 911-917.
- 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.
- Sujatha T.V. y Hegde M. J. (1998). C-mitotic effects of trichloroethylene (TCE) on bone marrow cells of mice. *Mutat. Res.* *413*, 151-158.
- Taets C., Aref S. y Rayburn A.L. (1998). The clastogenic potential of triazine herbicide combinations found in potable water supplies. *Environ. Health Perspect.* *4*, 197-201.
- 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.
- Tu C. M. (1992). Effect of some herbicides on activities of microorganisms and enzymes in soil. *J. Environ. Sci. Health* *27*, 695-709.
- Venkatesh K., Levi P. E., Inman A. O., Monteiro-Riviere N.A., Misra R. y Hodgson E. (1992). Enzymatic and immunohistochemical studies on the role of cytochrome P450 and the flavin-containing monooxygenase of mouse skin

in the metabolism of pesticides and other xenobiotics.
Pesticide Biochem. Physiol. *43*, 53-66.
Vijayalaxmi Reiter J. R., Leal Z. B. y Meltz L.M. (1996).

Effect of melatonin on mitotic and proliferation indices,
and sister sister chromatid exchange in human blood
lymphocytes. Mutat. Res. *351*, 187-192.