

Valoración de genotoxicidad con determinación de micronúcleos en ratones expuestos a metamidofos

Dra. Blanca Rosa Noriega Ortega¹, M. en C. Ernesto Armienta Aldana², Maria Guadalupe Chávez Fonseca³, Erica Cervantes Mexia³, Laura Elena Ojeda Figueroa³, Iliana Yanet Quevedo López³.

¹Prof. E Inv. Tiempo Completo Titular "B", Departamento de Inmunología de la Escuela de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa. ²Departamento de Histología y Embriología de la Escuela de Medicina, Universidad Autónoma de Sinaloa. ³Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa

RESUMEN

Introducción. El uso inmoderado de plaguicidas puede ocasionar problemas a la salud. Los plaguicidas organofosforados son los más utilizados y pueden provocar efectos genotóxicos. Por lo que este trabajo tiene por objetivo valorar el efecto genotóxico mediante la cuantificación de micronúcleos en ratones expuestos a metamidofos (O,S-dimetil fosforoamidotioato), que es uno de los plaguicidas más utilizados en nuestro País particularmente en Sinaloa.

Material y Métodos. Se utilizaron ratones de la cepa Balb/c, se determinó la DL₅₀ en animales testigo y expuestos al plaguicida metamidofos en diferentes tiempos de exposición 2, 12, 20 y 24 semanas y se evaluó el efecto genotóxico con la cuantificación de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica.

Resultados. Los ratones tratados con metamidofos aumentaron la formación de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica conforme pasó el tiempo de exposición.

Conclusiones. El plaguicida organofosforado metamidofos induce un aumento de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica, por lo que es genotóxico.

Palabras clave: Genotóxico, micronúcleos, eritrocitos, metamidofos.

ABSTRACT

Introduction. The use inmoderate of pesticide could cause health problems. The most common used pesticides are organophosphate and could cause genotoxic effects. The objectives of present work were evaluated genotoxic effects by micronuclei quantification in mice treated with methamidophos (O,S-dimethyl phosphoramidothioate), that is the pesticide most common used in our country particularly in Sinaloa.

Material and Methods. Balb/c mice were used. LD₅₀ was determined in control and experimental groups at the different time of exposition 2, 12, 20, 24 weeks and the genotoxic effect was evaluated by means of micronuclei quantification in peripheral blood erythrocytes.

Results. In mice treated with methamidophos micronuclei in peripheral blood erythrocytes increased in a time depend manner.

Conclusions. The pesticide organophosphate methamidophos induced increased the micronucleus in peripheral blood erythrocytes, it is genotoxic.

Key Words: Genotoxic, micronucleus, erythrocytes, methamidophos.

INTRODUCCIÓN

El uso de plaguicidas es necesario, pero deben ser aplicados de manera racional, ya que las plagas pueden desarrollar resistencia a ellos obligando al aumento de la dosis de aplicación. Este aumento de dosis puede llegar a ocasionar un efecto genotóxico en el hombre debido en gran parte al consumo de productos contaminados o por el contacto durante su manejo y aplicación en los campos agrícolas¹. La

acción genotóxica de los plaguicidas repercute de manera directa en el ser humano al ocasionar alteraciones sobre el material genético (ADN) al cual se le ha relacionado con el desarrollo de cáncer y leucemia^{2,3,4,5,6}. Debido a esto en los últimos años se han llevado acabo un sin número de trabajos de investigación sobre agentes genotóxicos. La cuantificación de micronúcleos (MNs) en eritrocitos de medula ósea y sangre periférica es uno de los

ensayos más utilizados en la actualidad para detectar los efectos genotóxicos de un sin número de compuestos. Los MNs son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que por causa de agentes clastógenos o aneuploidógenos tales como los plaguicidas quedan fuera del núcleo^{7,8}. En hematología los MNs se conocen como cuerpos de Howell-Jolly cuya forma es generalmente redonda o almendrada⁹. Su formación se basa en el siguiente principio: en anafase, cualquier fragmento cromosómico, que no posee centrómero no podrá integrarse a un núcleo por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómero, dan origen a los núcleos de las células hijas. Los elementos rezagados (fragmentos o cromosomas completos) quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y una proporción de estos es transformada en uno o varios núcleos secundarios. Estos son como regla mucho más pequeños que el núcleo principal de ahí su nombre de MNs¹⁰.

Los plaguicidas Organofosforados (OFs) son los más utilizados a nivel mundial. Estos insecticidas se derivan del ácido fosfórico, inhiben la acción de la acetilcolinesterasa, producen acumulación de acetilcolina con sus consecuentes alteraciones en el sistema nervioso central. Dentro de la sintomatología por intoxicación aguda de los OFs se producen cefaleas, cansancio o debilidad, dolor muscular, visión borrosa, mareo o vértigo, ojos irritados, calambres, salivación, estados en coma o incluso la muerte¹¹. Sin embargo los problemas de salud más graves tales como el cáncer y leucemia se han relacionado con la exposición crónica a estos compuestos^{6,12}. En estudios llevados a cabo *in Vitro* la acetilcolina produce aberraciones cromosómicas en cultivos de células y se ha observado que algunos plaguicidas OFs son genotóxicos^{13,14}.

Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue valorar el efecto genotóxico del plaguicida OFs Metamidofos (O,S-dimetil fósforoamidotioato) mediante la determinación de MNs en eritrocitos de sangre periférica en ratones crónicamente expuestos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Químico

El plaguicida Metamidofos se obtuvo de los laboratorios Bayer de México, para su uso agrícola.

Animales de Experimentación

Se utilizaron grupos de 10 ratones Balb/C machos de 3 meses de edad, de 22 a 25 gramos de peso para cada prueba. Los ratones se mantuvieron en jaulas de polipropileno con temperatura controlada de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de 85 ± 5 por ciento, con ciclos de 12 horas de luz fluorescente de espectro de luz solar (vita-lite) y se alimentaron con alimento comercial para ratones (purinas) y agua.

Patrón de Exposición

Para determinar la dosis del plaguicida metamidofos a la cual fueron expuestos los animales de experimentación, se determinó mediante una curva dosis-respuesta. Se usaron varios grupos de 10 ratones, para encontrar la dosis letal media (DL50) del metamidofos con diferentes concentraciones siguiendo el método de Miller y Tainter (1944)¹⁵.

a) Ratones expuestos: Se aplicó el insecticida en una dosis de 2.6 mg/Kg a un grupo de 10 ratones a las 2, 12, 20 y 24 semanas, diluido en cloruro de sodio por vía subcutánea cada tercer día.

b) Ratones testigos. Se trabajaron con las mismas características de tiempo y cuidado, pero sin exposición al insecticida metamidofos.

Toma y Procesamiento de la Muestra para Determinación de MNs

Por medio de una punción se obtuvo una pequeña gota de sangre total (2-3 mm) de la cola de cada ratón, la cual se colocó en un portaobjetos (25 x 75 mm) limpio cerca de uno de sus extremos y con la superficie de otro portaobjetos, se realizó un extendido de tal grosor que los eritrocitos no se superpusieran unos arriba de los otros ni que estos quedaran muy separados. Esto se consiguió dando una inclinación de aproximadamente 45° al portaobjeto con el que se recorrió el frotis y guiando el recorrido del frotis con el dedo índice (sirviéndole de carril). Antes de hacer el movimiento de desplazamiento para extender el frotis se debió cuidar que la gota colocada sobre el portaobjeto se extendiera por capilaridad a lo ancho del portaobjeto deslizador. Se observaron los distintos frotis extendidos para seleccionar los más adecuados y se dejaron secar al aire por 24 horas. La tinción de las laminillas se llevó a cabo con colorante de Wright durante tres minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada y se sumergieron en una solución de

Giemsa (4 mL/50 mL de amortiguador de fosfatos a pH 6.8) durante 10 minutos.

Cuantificación de MNs

El conteo de MNs se valoró por el método descrito por Schmid (1975)⁷. La frecuencia de los MNs en los eritrocitos (EMN) fue contada mediante un microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100X). Para cada ratón se contó 4 series de 10 000 eritrocitos (normo y policromáticos), el promedio se manejó como el valor del ratón y finalmente, los valores de los ratones de cada tiempo de exposición.

Análisis Estadístico

Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar de los valores obtenidos de 10 observaciones independientes. La comparación estadística entre los grupos se efectuó mediante la prueba t Student, con valores significativos $p < 0.05$ - $p < 0.001$.

RESULTADOS

Con el objeto de valorar la genotoxicidad del plaguicida OFs metamidofos, se empleó la determinación de MNs en eritrocitos (figura 1), nuestros resultados nos indican que estos se incrementan ($p < 0.05$ - $p < 0.001$) considerablemente en razón directa al tiempo de exposición del plaguicida en comparación con los testigos (gráfica 1).

tiempo, el plaguicida metamidofos no está exento de este tipo de toxicidad. Anteriores trabajos ya habían demostrado que la exposición a este plaguicida causa mutagenicidad¹⁶, provoca neuropatía retardada¹⁷, produce efectos en las hormonas masculinas¹⁸, induce una morfología anormal de los espermatozoides¹⁹ y un aumento en la prevalencia de aneuploidía en los espermatozoides¹⁸. Esto nos condujo a pensar que sería importante valorar directamente el efecto genotóxico del metamidofos en nuestras condiciones experimentales mediante el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica ya que este plaguicida es uno de los más utilizados en los campos agrícolas sinaloenses¹¹.

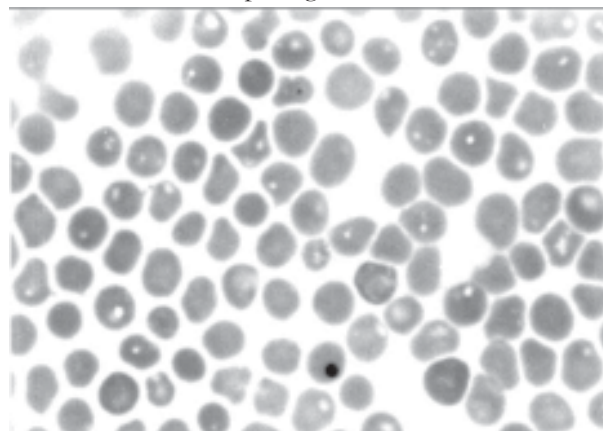
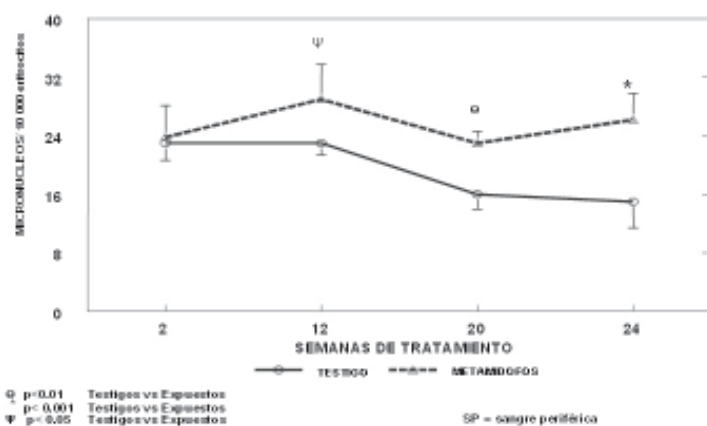


Figura 1. MNs en eritrocitos de sangre periférica tinsión Wright y Giemsa (100X).

La prueba de MNs en la actualidad es utilizada como una herramienta valiosa en el estudio de daño al ADN, con la cual se detectan los efectos de los agentes genotóxicos sobre cromosomas por la identificación de agentes clastogénicos que afectan cromosomas y aneuploidogénicos que afectan el huso acromático¹⁰. En nuestro estudio observamos que el plaguicida OFs metamidofos, clasificado como altamente tóxico por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos⁴ al compararlo con el grupo testigo sin tratamiento se incrementó el número de MNs conforme se incrementaba y prolongaba la exposición del plaguicida. Esto sugiere por un lado genotoxicidad y por otra parte que es una propiedad compartida con otros plaguicidas; como es el caso de los plaguicidas OFs monocrotofos²⁰, parathion²¹, temefós²², metidatión, fosfamidón, cloropirifós, dimetoato¹⁶, metilo-paratión²³, los organoclorados endosulfán¹⁶, toxafeno, DDT², los piretroides cipermetrina²³, deltametrina, permetrina¹⁶, los carbamatos aldicarb²⁴, pirimicarb, propoxur²³, zineb¹⁶, los fungicidas ziram,



Gráfica 1. Genotoxicidad por medio de la cuantificación de MNs en SP a los ratones expuestos a metamidofos 2.6 mg/Kg s. c. /3° día y testigos. Los valores expresan el promedio de 10 experimentos independientes \pm la DS.

CONCLUSIONES

En general los compuestos diseñados para matar, son evidentes que pueden ocasionar efectos tóxicos sobre el ADN en repetidas dosis a largo

thiram²⁵ y los herbicidas terbutrin²⁶, paraquat²⁷, terbuto²⁴, los cuales provocan un daño en el ADN e incrementan el número de MNs en las células. El efecto genotóxico que causó una alteración en la estructura en el contenido de cromosomas por la exposición de los metamidofos se debe probablemente a la acción perturbadora que provoca este plaguicida a nivel molecular el cual es expresado a través de los MNs en eritrocitos de sangre periférica que se forman por la condensación de fragmentos cromosomales o cromosomas enteros que no se incorporaron al núcleo hijo durante la mitosis (anafase) quedando como elementos rezagados incluidos en el citoplasma de las células hijas y una proporción de estos fragmentos se transformaron en un núcleo secundario, mucho más pequeño que el núcleo principal¹⁰. También se ha observado en otros trabajos experimentales que conforme se incrementa y prolonga la exposición de plaguicidas OFs aumenta el número de micronúcleos^{20,21}.

En base a los resultados obtenidos consideramos que la prueba de micronúcleos puede llegar a ser un buen biomarcador en estudios de biomonitorio para la detección en la exposición de agentes clastogénicos y aneugénicos los cuales se les relaciona con enfermedades como el cáncer y leucemia, por lo que sería interesante realizar los estudios en humanos, principalmente en los campos agrícolas del Estado dado que es el lugar donde se encuentra las personas que manejan los plaguicidas directamente y muchas veces sin la protección adecuada.

REFERENCIAS

- 1.- Grover IS, Malhi. Genotoxic effects of some organophosphorous pesticides, induction of micronuclei in bone marrow cells in rat. *Mutat Res* 1985; 155: 131-134.
- 2.- Gauthier JM, Dubeau H, Rassart E. Induction of micronuclei in vitro by organochlorine compounds in beluga whale skin fibroblasts. *Mutat Res* 1999; 439: 87-95.
- 3.- Palacios ME, Paz P, Hernández S, Mendoza L. Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Salud Publica Mex* 1999; 41: 55-61.
- 4.- Pastor S, Gutiérrez S, Creus A, Cebulska-Wasilewska A, Marcos R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of polish farmers exposed to pesticides. *Mutat Res* 2001; 495: 147-156.
- 5.- Ramírez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res* 2002; 1(3): 246-260.
- 6.- Karam MA, Ramírez G, Bustamante LP. Plaguicidas y salud de la población. *Ciencia ergo sum* 2004; 11(3): 246-254.
- 7.- Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Res* 1975; 31: 9-15.
- 8.- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor J T, Newell G, W, Salmone M F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U. S. Environmental protection agency gene-tox program. *Mutat Res* 1983; 123: 61-118.
- 9.- Miranda V, Manelli R, Machado GM. Using fluorescence for improvement of the quantitative analysis of micronucleus in cell culture. *Mutat Res* 2005; 565: 173-179.
- 10.- Norppa H, Falck GCM. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 2003; 18 (3): 221-233.
- 11.- Palacios ME, Moreno LMA. Diferencias en la salud de jornaleros y jornaleros agrícolas migrantes en Sinaloa, México. *Salud Publica Mex* 2004; 46 (4): 286-293.
- 12.- Jaga K, Dharmani C. Source of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Pan Am J Public Health* 2003; 14 (3): 171-185.
- 13.- Dulout FN, Pastor MC, Olivero OA. Malathion induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of mice dose response relationships. *Mutat Res* 1983; 122: 163-167.
- 14.- Burgeot T, His E, Galgani F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutat Res* 1995; 342: 125-140.
- 15.- Miller LC and Tainter ML. Graphical method for determination of LD₅₀. *Proc. Soc Exp Biol Med* 1944; 57:261-271.
- 16.- Bolognesi C, Perrone E, Landini E. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis* 2002; 17 (5): 391-397.
- 17.- Kellner T, Sanborn J, Wilson B. In vitro and In vivo assessment of the effects of impurities and chirality of methamidophos induced neuropathy target esterase aging. *Toxicol Sci* 2000; 54: 408-415.
- 18.- Kamijima M, Hibi H, Gotoh M, Taki K, Saito I, Wang H y Cols. A survey of semen indices in insecticides sprayers. *J Occup Health* 2004; 46: 109-118.
- 19.- Burrueal VR, Raabe OG, Overstreet JW, Wilson BW, Wiley LM. Paternal effects from methamidophos administration in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 165 (2): 148-57.
- 20.- Kumar DV, Janardhan A. An evaluation of the mutagenic potential of monocrotophos using micronucleus test. *Indian J Pharmac* 1987; 19: 242-244.
- 21.- Islas K, González C, Sánchez B, Reyes E, Levario M. In Vitro assessment of the genotoxicity of ethyl paraoxon in newborns and adults. *Human Exp Toxicol* 2005; 24: 319-324.
- 22.- Fortes CA, Alves EC, Sodr  E, Ribeiro LF, Felzenswalb I. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet Mol Res* 2002; 1 (2): 159-166.
- 23.- Undeger U, Basaran N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch Toxicol* 2005; 79: 169-176.

24.- Suzuki T, Nakagawa Y, Tayama S, Yaguchi K, Suzuki S, Suga T. Micronucleus test of herbicide terbutol and its metabolites in cultured Chinese hamster lung cells and males CD-1 mice. Bull Environ Contam Toxicol 2000; 64: 66-73.

25.- Hemavathi E, Rahiman MA. Effect of ziram, thiram and dithane M-45 on bone marrow cells of mice assessed by micronucleus test. Bull Environ Contam Toxicol 1996; 56: 190-196.

26.- Moretti M, Marcarelli M, Villarini M, Fatigoni C, Scassellati-Sforzolini G, Pasquini R. In vitro testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: cytogenetic and primary DNA damage. Toxicol in vitro 2002; 16: 81-88.

27.- Ross WE, Block ER, Chang RY. Paraquat induced DNA damage in mammalian cells. Biochem Biophys Res 1979; 91: 1302-1308.

Microcápsula Médica

ACEITE DE PESCADO PUEDE PROTEGER CONTRA DIABETES

NUEVA ORLEANS (Reuters Health) - El ácido graso omega-3, que se halla en el aceite de pescado, parece mejorar la función insulínica en personas con sobrepeso que son vulnerables a la diabetes tipo II, según expertos.

Tres meses de suplementos diarios de ácido docosahexaenoico (ADH) produjo una mejoría "clínicamente significativa" en la sensibilidad a la insulina de participantes con sobrepeso, según Yvonne Denkins, investigadora de nutrición del Instituto de Investigación Biomédica Pennington de la Universidad Estatal de Louisiana, en Baton Rouge.

Denkins presentó sus hallazgos durante el fin de semana en la conferencia anual de Biología Experimental 2002, que se celebra en Nueva Orleans.

Más de nueve de cada 10 diabéticos padecen diabetes tipo II, en la que el cuerpo deja de responder gradualmente a la insulina y las concentraciones de glucosa aumentan peligrosamente.

Estudios previos de población indicaron que el aceite de pescado podría ayudar a proteger contra la diabetes.

"Han habido estudios epidemiológicos sobre los esquimales de Greenland, una población que se alimenta principalmente de grasa de ballena", señaló Denkin. "Esta gente tiene sobrepeso, debería padecer diabetes y cardiopatía, pero no presentan estos problemas. Los científicos los han estudiado pensando que probablemente algo que comen los protege y hallaron que era el omega-3".

En el estudio, Denkins y sus colegas hicieron que 12 hombres y mujeres con sobrepeso, cuyas edades oscilaban entre 40 y 70 años, consumieran 1,8 gramos de ADH con el desayuno durante 12 semanas. Aunque ninguno de los participantes era diabético, todos sufrían de resistencia a la insulina, una condición prediabética en la que el cuerpo no responde eficazmente a la insulina.

Los investigadores usaron muestras de sangre tomadas al comienzo y final del estudio para evaluar la resistencia de cada persona a la insulina.

"Notamos un cambio en la sensibilidad a la insulina después de 12 semanas de suplementos de ADH", dijo Denkin a Reuters Health.

El 70 por ciento de los participantes en el estudio mostró mejoría en la función insulínica "y en el 50 por ciento fue un cambio clínicamente significativo", añadió.

Denkins recalcó que como la muestra de estudio era pequeña, los resultados son preliminares y que los diabéticos no deben sustituir sus medicamentos con suplementos dietéticos, incluido el aceite de pescado.

Las personas que estén considerando aumentar su consumo de aceite de pescado deben consultar a su médico antes de comenzar, especialmente si están recibiendo tratamiento cardiovascular. Esto se debe a que el ADH tiene un ligero efecto fluidificador.

Expertos en nutrición recomiendan actualmente un consumo diario de 0,6 gramos de ácido graso omega-3, preferentemente de pescado. Según Denkins, esto se puede obtener con dos porciones a la semana de pescado de mares fríos, como el arenque, la macarela y el salmón, entre otros.

fuelle: <http://www.pmministries.com/centronoticias/Nutricion/noticiasnutrindex.htm>