

EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE LOS PLAGUICIDAS CIPERMETRINA Y DIAZINÓN EN TILAPIA ROJA (*Oreochromis* sp.)

GENOTOXIC EVALUATION OF PESTICIDES CYPERMETHRIN AND DIAZINON IN RED TILAPIA (*Oreochromis* sp.)

Beatriz Henao^{1,2}, Jaime A. Palacio^{1,3} y Mauricio Camargo⁴

Resumen

Con el propósito de evaluar la genotoxicidad y el efecto de la exposición continuada a dos plaguicidas en peces, se sometieron juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) de 6,97 g de peso en promedio, a tres concentraciones de cipermetrina (0,04, 0,40 y 2,0 g/l) y a 16, 160 y 800 g/l de diazinón. Durante 24 días se tomaron 10 muestras de sangre para ser sometidas al ensayo cometa. Como control positivo se utilizó ciclofosfamida (Endoxan) a una concentración de 5 mg/l. En las tres concentraciones de cipermetrina se observó acumulación de daño en el ADN en relación con el tiempo de exposición, aunque no se observó un efecto genotóxico dependiente de las concentraciones subletales probadas. En cambio, el efecto genotóxico del diazinón se incrementó hasta el día 12 y luego se estabilizó. Estos hechos indican que el diazinón posiblemente indujo respuesta adaptativa, por lo tanto el aumento de daño producido por nuevas concentraciones del genotóxico, se equilibraron por el aumento de reparación o desintoxicación dado por la respuesta adaptativa. En contraste, es posible que la cipermetrina no induzca en la tilapia roja respuesta adaptativa. En consecuencia, los nuevos daños producidos por las exposiciones diarias al plaguicida, no alcanzaron a ser reparados o el aumento de cipermetrina no es metabolizado.

Palabras clave: ensayo cometa, electroforesis en gel de células individuales, insecticidas, genotoxicidad, plaguicidas, peces, quiebres en el ADN, SCGE.

Abstract

In order to evaluate the genotoxicity and the continuous exposure effects in fish, young red tilapia (*Oreochromis* sp.) (6.97 g mean body weight), were exposed to 0.04, 0.40, and 2.00 g/l Cypermethrin and 16, 160, and 800 g/l Diazinon. During 24 days, 10 cardiac puncture blood samples were taken and genotoxic effects were analyzed with Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) or comet assay. Cyclophosphamide (Endoxan) was used as a positive control (5 mg/l). Cypermethrin caused damage accumulation in the three concentrations in a time related manner, but a concentration related effect was not observed. By the contrary, Diazinon caused a time effect only to 12th day and then the effect was constant during the exposure time. These facts indicate that Diazinon probably induced adaptive response and that the damage was repair or detoxification occurred. Cypermethrin, in contrast, probably does not induce adaptive response, and as a consequence, the new damage by daily exposure, are not repaired or the pesticide is not detoxified.

Key words: comet assay, DNA strand breaks, fishes, genotoxicity, insecticides, SCGE, Single Cell Gel Electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

Una gran parte de los plaguicidas que ingresan a los ecosistemas acuáticos por escorrentía, lixiviación o

durante su aplicación, pueden afectar la fisiología y la supervivencia de los organismos e interactuar

Recibido: noviembre de 2004; aceptado junio de 2005.

¹ Centro de Investigaciones Ambientales. A. A. 1226. Universidad de Antioquia, Medellín (Antioquia), Colombia.

² Correo electrónico: <bhenao2002@yahoo.com>.

³ Correo electrónico: <japalaci@jaibana.udea.edu.co>.

⁴ Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226, Medellín (Antioquia), Colombia. Correo electrónico: <mcamargo@epm.net.co>.

con su ADN hasta producir mutaciones. De esta manera, la exposición a plaguicidas puede generar carcinogénesis, un proceso que involucra múltiples alteraciones genéticas que conducen en última instancia a una proliferación no controlada de células. Las sustancias químicas genotóxicas también pueden generar efectos teratogénicos y defectos hereditarios ocasionados por mutaciones en las células germinales. Además, los efectos mutagénicos pueden no manifestarse inmediatamente sino luego de varias generaciones, lo que puede aumentar la carga genética de la población.

Entre los métodos para medir quiebres en el ADN, la electroforesis en gel de células individuales (SCGE) o ensayo cometa, presenta buena sensibilidad y puede ser utilizado con casi cualquier tipo de tejido (Mitchellmore y Chipman, 1998). Además de los quiebres de cadena doble y sencilla, el ensayo cometa en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$) detecta múltiples tipos de daños inducidos química y físicamente, tales como entrecruzamiento, sitios lábiles a álcalis o sitios de reparación incompleta (Kammann et al., 2001).

Este ensayo requiere poca cantidad de células (5.000-50.000) y se puede realizar en casi cualquier tipo de célula eucariótica nucleada. Además, es rápido, poco costoso y muy sensible para detectar daños en el ADN, tal como se ha demostrado en varios estudios (Belpaeme et al., 1998; Garaj y Zeljezic, 2000; Godard et al., 1999; Lee y Steinert, 2003; Sasaki et al., 2002; Soloneski et al., 2002).

En peces, esta prueba se ha aplicado principalmente en líneas celulares y en eritrocitos debido a que son nucleados y se pueden muestrear fácilmente (Akcha et al., 2003; Belpaeme et al., 1998; De Miranda et al., 2003; Kammann et al., 2001; Pandrangi et al., 1995). Este hecho es importante porque las células sanguíneas proporcionan una fuente relativamente no invasiva de material para biomonitoreo, además, el 97% de las células sanguíneas de los peces son eritrocitos y el 3% son leucocitos, lo que asegura una homogeneidad sustancial de la muestra (Theodorakis et al., 1994).

La genotoxicidad de los plaguicidas ha sido ampliamente documentada *in vitro* e *in vivo* en diferentes

grupos taxonómicos, tales como plantas (Poli et al., 2003), anélidos (Zang et al., 2000), planarias (Guecheva et al., 2001), peces (Ateeq et al., 2002; Campana et al., 1999; Cavas y Ergene-Gözükara, 2003; Farah et al., 2003), anfibios (Freeman y Rayburn, 2004) y mamíferos (Blasiak et al., 1999; Charles et al., 1999; Freeman y Rayburn et al., 2001; Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2000; Godard et al., 1999; Klingerman et al., 2000; Kligerman y Erexson, 1999; Poli et al., 2003; Rahman et al., 2002; Soloneski et al., 2002; Vigreux et al., 1998).

En Colombia, país fundamentalmente agrícola, se requiere la aplicación de cantidades masivas de plaguicidas para el control de plagas. Además para el control de parásitos de animales, de vectores de enfermedades humanas y de cultivos ilícitos. Algunas de estas aplicaciones se hacen directamente sobre los ecosistemas acuáticos para controlar vectores y malezas acuáticas. De esta manera, los organismos acuáticos no blanco están expuestos a estos xenobióticos por aplicaciones directas y por aportes de residuos que llegan a los cuerpos de agua provenientes de ambientes terrestres y de la atmósfera, por lixiviación, escorrentía y precipitación. De otro lado, las evaluaciones de calidad ambiental sólo suelen incluir la detección de niveles permisibles en el ambiente, pero no evalúan los efectos que las bajas concentraciones de estas sustancias pueden tener sobre organismos no blanco, incluido el hombre, por periodos prolongados. Entre estos efectos, son de particular importancia los genéticos (clastogénicos, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos), que se pueden generar como consecuencia de la exposición a bajas concentraciones y por periodos prolongados.

De acuerdo con la información más reciente publicada por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 2003), diazinón y cipermetrina son dos de los insecticidas de mayor uso en Colombia. El diazinón (Basudín) [O,O-diethyl 0-2-isopropil-6-metil(pirimidina-4-yl) fosforotioato], es un organofosforado no sistémico utilizado para el control de una amplia variedad de insectos en cultivos agrícolas de diferentes zonas climáticas. Para mamíferos está clasificado como moderadamente tóxico (categoría toxicológica III) aunque es altamente tóxico para peces con una CL_{50} para truchas entre 2,6 y 3,2 mg/l.

La cipermetrina (Ripcord, Sarricade, Ambush) [α -ciano-3-phenoxibenzyl (1RS)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil-ciclopropanecarboxilato] es un insecticida piretroide medianamente tóxico (categoría toxicológica II), no sistémico de acción por contacto y estomacal, utilizado especialmente en el control de insectos en cultivos agrícolas. Se utiliza además para el control de vectores y como base para la preparación de champú antipiojos para humanos. Los piretroides se cuentan entre los más potentes insecticidas (Smith y Stratton, 1986) y muchos productos que contienen cipermetrina están clasificados como “plaguicidas de uso restringido” por la USEPA debido a la alta toxicidad para peces y algunos artrópodos acuáticos (Polat et al., 2002; Yilmas et al., 2004). La $CL_{50(96\text{ h})}$ para trucha café es de 0,0020-0,0028 mg/l (Royal Society of Chemistry, 1990).

En nuestro medio las investigaciones sobre los efectos genéticos de los plaguicidas en poblaciones no blanco son muy escasas y más aún en peces. Algunos de los trabajos que se han realizado en este campo, se han enfocado principalmente hacia la evaluación de la toxicidad aguda y la bioacumulación de estas sustancias (Palacio et al., 2002), así como de la genotoxicidad de metales pesados sobre especies ícticas (Peñalosa et al., 2003).

Tomando en consideración los aspectos anteriores, con la presente investigación se buscó evaluar si dos plaguicidas de uso común en Colombia, diazinón y cipermetrina, tienen efectos genotóxicos sobre tilapia roja, un pez tropical ampliamente cultivado en el país. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la exposición continuada a bajas concentraciones de los dos plaguicidas y si el método de medición del daño genotóxico utilizado, el ensayo cometa, es una herramienta potencialmente útil para biomonitoreo de daños genéticos ocasionados por bajas concentraciones de plaguicidas sobre esta especie íctica y aportar información útil para su validación como potencial especie centinela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancias químicas y preparación de soluciones.

Los dos plaguicidas utilizados en todos los ensayos fueron de grado técnico. El diazinón empleado fue de

97,7% de pureza, donado por Syngenta. La cipermetrina fue de 94% de pureza, donada por Novartis.

Inicialmente se prepararon soluciones patrón de cada uno de los plaguicidas, utilizando acetona como solvente. A partir de éstas, se prepararon las concentraciones de exposición para los ensayos de toxicidad letal y de genotoxicidad.

Peces. Se utilizaron ejemplares de tilapia roja, de uno a dos meses de edad con un peso promedio de 6,97 g (3,37-9,62 g), una longitud total promedio de 7,8 cm (6,5-9,0 cm) y una longitud estándar promedio de 6,1 cm (5,1-7,0 cm). Todos los ejemplares utilizados en este trabajo fueron adquiridos en la Estación Piscícola de la Universidad de Antioquia en San José del Nus (Antioquia), Colombia.

Antes de realizar los ensayos de toxicidad aguda y de genotoxicidad, los peces se aclimataron a las condiciones de laboratorio durante al menos un mes. Para este propósito se utilizaron acuarios de 600 l de capacidad, con agua filtrada en recirculación. Dos veces al día se suministró Tetramin como alimento y periódicamente se controló la calidad fisicoquímica del agua.

Diseño experimental. Ensayos de toxicidad aguda.

De cada plaguicida se emplearon seis concentraciones diferentes, con 20 ejemplares por concentración y de cada una se tenía una réplica. La concentración letal media (CL_{50}) se estimó para 24, 48, 72 y 96 horas de exposición utilizando un programa computacional basado en el método Probit (Finney, 1970; Peltier y Weaber, 1985).

Ensayos de genotoxicidad. Se evaluaron tres concentraciones de cada sustancia, correspondientes aproximadamente a 1/5, 1/25 y 1/250 de la concentración letal media a las 96 horas ($CL_{50(96\text{ h})}$), según recomendaciones tomadas de la literatura (Campana et al., 1999). Las concentraciones de diazinón fueron 16, 160 y 800 $\mu\text{g/l}$ y para cipermetrina se utilizaron 0,04, 0,40 y 2,00 $\mu\text{g/l}$. Los peces fueron expuestos durante 24 días a las tres concentraciones de plaguicida. Periódicamente se controlaron la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la alcalinidad y la dureza del agua en el control y en las tres concentraciones de plaguicida.

Se emplearon tres controles experimentales con la misma cantidad y calidad del agua de dilución utilizada para la preparación de las tres concentraciones de plaguicida. Mientras que el control negativo contenía únicamente agua de dilución, para el control del solvente se utilizó acetona al 0,0125% v/v, concentración equivalente a la máxima empleada en la preparación de las diluciones de plaguicidas. Como control positivo se utilizó Ciclofosfamida (Endoxan) a una concentración de 5 mg/l. Este es un conocido clastógeno que se ha utilizado ampliamente con células de mamíferos (Rahman et al., 2002) y con células de peces (Campana et al., 1999; Pandangri et al., 1995).

Para cada concentración de los plaguicidas se emplearon 20 ejemplares de tilapia del mismo lote, distribuidos al azar en cuatro acuarios con 5 ejemplares cada uno, en un volumen de 40 litros de solución. Diariamente se les suministró Tetratamín y se removieron los residuos de alimento y las heces. Las soluciones se renovaron cada 24 horas durante todo el período de exposición, con el propósito de minimizar las fluctuaciones en la concentración de los plaguicidas y garantizar la estabilidad de la calidad fisicoquímica del agua. Durante el período de aclimatación y en los experimentos, se mantuvo una temperatura ambiental constante de 24 ± 2 °C y un fotoperíodo de 16 horas de luz por 8 de oscuridad.

Para cada período de exposición (días 0, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20 y 24) y cada concentración de las sustancias de prueba, se muestrearon dos ejemplares de tilapia roja por punción cardíaca, con jeringas previamente impregnadas del anticoagulante K_3 EDTA al 15%. De cada ejemplar muestreado se realizaron dos placas.

Los efectos genotóxicos se evaluaron utilizando la electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa, considerando la metodología propuesta por Singh et al. (1988), Singh (2000) y Vigreux et al. (1998). Al someter a electroforesis las células expuestas a una sustancia que se quiere evaluar, la presencia de quiebres facilita que los fragmentos de ADN se muevan desde el núcleo hacia el ánodo migrando en forma de un cometa, el cual puede visualizarse con un colorante fluorescente afín con el ADN. Singh et al. (1988) fueron los primeros en demostrar que la longitud de la cola está relacionada directamente con

la cantidad de ADN dañado (Wilson et al., 1998). Estudios posteriores han corroborado que a medida que el daño en el ADN se incrementa, mayor es la migración de los fragmentos (Mitchelmore y Chipman, 1998; Soloneski et al., 2002). Por lo tanto, la longitud de la cola del cometa indica el grado de actividad genotóxica (Kammann et al., 2001; Vigreux et al., 1998).

De la muestra de sangre obtenida por punción cardíaca, se disolvió 1 μ l en 1,5 ml de PBS (Buffer salino fosfato libre de Ca^{++} y Mg^{++}) en tubos Ependorf. Posteriormente, se disolvieron 10 μ l de esta solución en 80 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (LMA, Sigma A9414), a una concentración de 5 mg/ml de PBS y precalentada a 40 °C. La suspensión se extendió en portaobjetos previamente impregnados con 100 μ l de agarosa de punto de fusión normal (NMA, Sigma A6877, tipo II EEO) a una concentración de 10 mg/ml en PBS. Cada extendido se cubrió con una laminilla y se llevó a 4 °C para su gelificación.

Después de remover la laminilla, se cubrió la muestra con una capa de 80 μ l de LMA a una concentración de 5 mg/ml, colocando nuevamente la laminilla y llevando las muestras a 4 °C durante 5 min hasta la gelificación. Una vez más se removió la laminilla y se llevaron a 4 °C durante 2 horas, sumergidas en una mezcla compuesta de 89% de solución de lisis, 10% de DMSO y 1% de Triton X-100. La solución de lisis está constituida por NaCl 146,1 g/l, EDTA 37,2 g/l, Tris 1,2 g/l, NaOH 12 g/l y Lauril sarcosinato de sodio 10 g/l, pH 10.

Luego de enjuagar las placas con PBS, las muestras fueron sometidas en una cámara de electroforesis horizontal, a un buffer de pH 13 (NaOH 10 N 30 ml/l y EDTA 200 mM 5 mL/l), durante 30 min a 4 °C. De esta manera se permitió el desenrollamiento del ADN y el rompimiento de los sitios lábiles. Posteriormente, las muestras se expusieron a 25 V y 300 mA durante 30 min. Las placas se enjuagaron nuevamente con PBS y se sumergieron 15 min en buffer neutralizante (Tris 48,5 g/l, pH 7,5), se deshidrataron con metanol absoluto por un minuto y se mantuvieron en cajas cerradas hasta el momento de analizarlas.

La medición de los cometas se hizo bajo un microscopio de fluorescencia Nikon, con una magni-

ficación de 400 X y una reglilla micrométrica en el ocular. Las placas se colorearon con bromuro de etidio (0,02 mg/ml) antes de las mediciones. En cada placa se midieron 50 cometas, para un total de 200 cometas por período y por nivel de exposición. En las mediciones se incluyeron la longitud del núcleo y la cola de los cometas, en micrómetros.

Tratamiento estadístico de la información. A los resultados se les aplicaron las pruebas no paramétricas de Rangos Múltiples y Kruskal-Wallis, para buscar si existían diferencias significativas entre los distintos períodos para cada concentración. Posteriormente, se realizó una comparación de muestras múltiples para evaluar si existían diferencias significativas entre las mediciones realizadas para las tres concentraciones de cada sustancia.

RESULTADOS

Ensayos de toxicidad aguda. En la figura 1 se ilustran los resultados de la toxicidad aguda de cipermetrina y diazinón sobre tilapia roja para diferentes períodos de exposición. El valor de la $CL_{50(96h)}$ para cipermetrina fue de 6,0 $\mu\text{g/l}$, con un intervalo de confianza del 95% de 5,5-6,6 $\mu\text{g/l}$, y para el diazinón fue de 3.990 $\mu\text{g/l}$, con un intervalo del 95% de confianza de 3.500-4.330 $\mu\text{g/l}$ (tabla 1).

Como puede apreciarse claramente en las curvas de toxicidad ilustradas en la figura 1, para los dos plaguicidas aumentó la toxicidad aguda con el tiempo de exposición, pero la cipermetrina tuvo una acción tóxica más rápida que el diazinón, lo que se evidencia con la mayor pendiente negativa de la curva (figura 1B). Por lo tanto, el impacto de los plaguicidas se debió tanto a la concentración como al tiempo de exposición, siendo menor la CL_{50} para períodos más largos.

Ensayos de genotoxicidad. Mediciones en los controles. En la figura 2 se ilustran los valores medios de la longitud de los cometas para los diferentes controles experimentales. Mientras que la longitud media mínima fue 41,70 μm ($\pm 15,97 \mu\text{m}$) en los controles negativos del ensayo con cipermetrina, la longitud máxima fue de 80,59 μm ($\pm 34,92 \mu\text{m}$), medida en el ensayo con diazinón el día 24 (tabla 2). Como se evidencia en figura 2, la longitud de los

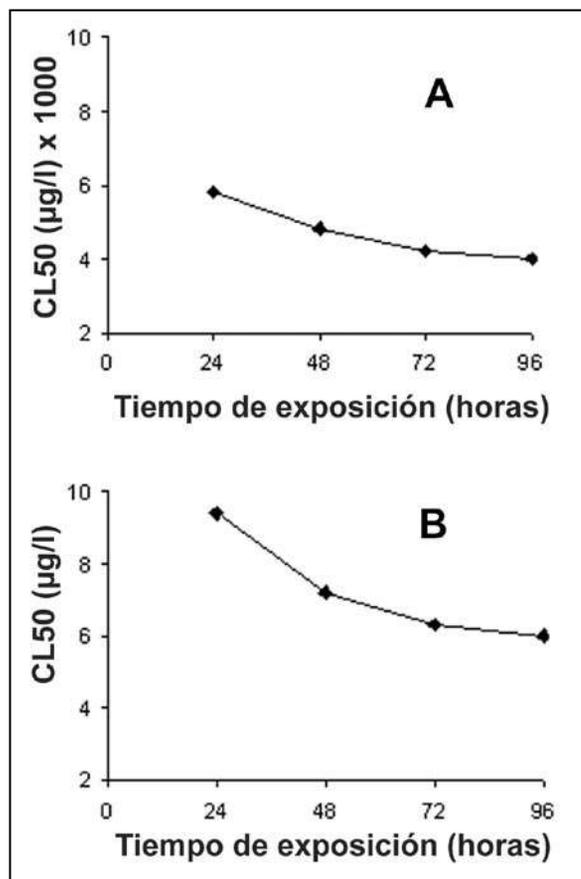


Figura 1. Curvas de toxicidad de diazinón (A) y cipermetrina (B) sobre tilapia roja (*Oreochromis sp.*), basadas en la CL_{50} a diferentes períodos de exposición

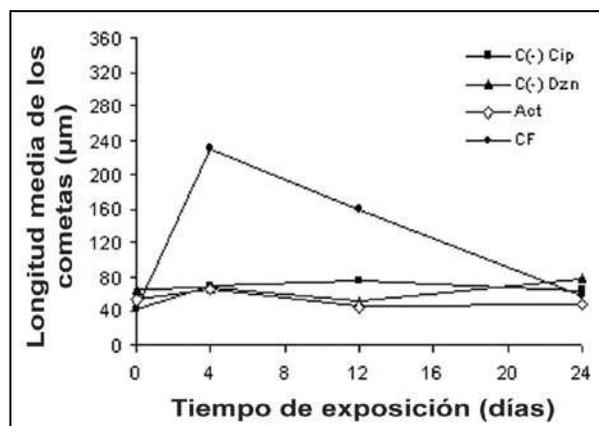


Figura 2. Efecto genotóxico en eritrocitos de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) en los controles experimentales: CF: 5 mg/l de ciclofosfamida; C(-) Cip: control negativo en el experimento con cipermetrina; C(-)Dzn: control negativo en el experimento con diazinón; y Act: 0,0125% de acetona

cometas en el control con el solvente utilizado en los ensayos, la acetona, son muy cercanos o incluso inferiores a los valores medios de los controles negativos y no hay diferencias significativas entre los valores de las longitudes medias para estos 3 controles. Estos resultados indican que el solvente orgánico a una concentración de 0,0125%, no condujo a daños genéticos detectables a través del ensayo cometa.

Los valores medios de la longitud de los cometas en los eritrocitos de tilapias expuestas a 5 mg/l de ciclofosfamida (figura 2), indican que a partir del día uno se presentaron efectos genotóxicos significativos en los ejemplares tratados respecto a los controles negativos y al control con acetona. Lo anterior indica que esta sustancia indujo quiebres en el ADN del tejido utilizado.

El efecto de la ciclofosfamida en el tiempo de exposición se evidenció desde el día 1 con un rápido incremento de la longitud de los cometas durante los primeros cuatro días, cuando los cometas alcanzaron la máxima longitud media 229,75 µm (± 39,24 µm) (figura 2). A partir de este día, el efecto disminuyó y el día 24 alcanzó valores muy cercanos a los del control, aunque todavía significativamente mayores (tabla 2).

Tratamientos con diazinón y cipermetrina. En los ensayos de genotoxicidad ninguna de las concentraciones de plaguicidas utilizadas produjo efectos letales, aunque las tres son muy diferentes entre si, siendo la mayor 50 veces la menor.

Diazinón. Las longitudes media de los cometas en los ejemplares de tilapia tratados con diazinón se registran

Tabla 1. Mortalidad de ejemplares de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) expuestos a Cipermetrina y a Diazinón

	(ug/l)	Ejemplares muertos por período de exposición (horas)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Cipermetrina	0,00	0 (0)*	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	3,65	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	4,93	0 (0)	1 (5)	2 (10)	5 (25)
	6,66	3 (15)	8 (40)	13 (65)	13 (65)
	9,00	10 (50)	16 (80)	19 (95)	19 (95)
	12,10	15 (75)	20 (100)	20 (100)	20 (100)
	16,40	19 (95)	20 (100)	20 (100)	20 (100)
	CL ₍₅₀₎ e intervalo de conf. del 95%	9,4 (9,4-10,5)	7,2 (6,6-7,8)	6,3 (5,8-6,8)	6,0 (5,5-6,6)
	(ug/l)	Período de exposición (horas)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Diazinón	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	4.000	3 (15)	5 (25)	8 (40)	9 (45)
	4.700	2 (10)	6 (30)	10 (50)	11 (55)
	5.500	7 (35)	15 (75)	19 (95)	19 (95)
	6.500	13 (65)	17 (85)	20 (100)	20 (100)
	7.600	18 (90)	20 (100)	20 (100)	20 (100)
	CL ₍₅₀₎ e intervalo de conf. del 95%	5.820 (5.390-6.380)	4.820 (4.430-5.180)	4.220 (3.850-4.520)	3.990 (3.500-4.330)

* Los datos que se presentan para cada período son acumulados y los valores entre paréntesis corresponden a los porcentajes de mortalidad.

en la tabla 2 y se representan en la figura 3A. Los efectos genotóxicos de diazinón aumentaron rápidamente hasta el día 4 y mostraron una tendencia creciente hasta el día 12, cuando alcanzaron los valores medios más altos de la longitud de la cola de los cometas. Luego, la longitud media de los cometas permaneció estable hasta el día 20, cuando se apreció una leve disminución hasta el día 24.

El diazinón no mostró un efecto de concentración, ya que las diferencias entre los daños ocasionados por los 3 niveles de exposición no evidenciaron una tendencia consistente de aumento o disminución en todos los casos. Esto a pesar de que las concentraciones (16, 160 y 800 µg/l) difieren hasta en 50 órdenes de magnitud.

Cipermetrina. Las longitudes media de los cometas en los ejemplares de tilapia tratados con cipermetrina se registran en la tabla 2 y se representan en la figura 3B. A partir del primer día se observaron efectos genotóxicos de esta sustancia sobre los eritrocitos y en todos los períodos se encontraron diferencias significativas entre las tres concentraciones y el control. En general para todos los tratamientos con cipermetrina, las longitudes máximas de los cometas se registraron el día 24, alcanzando valores de $319,32 \pm 65,02 \mu\text{m}$ en la concentración de 0,40 µg/l que corresponde a la concentración intermedia.

Para la cipermetrina se encontró un pequeño efecto de concentración ya que con 0,40 µg/l, que es 10 veces mayor que la concentración inferior de 0,04 µg/l, se observó aumento de la genotoxicidad, aunque en algunos experimentos dicho aumento no fue significativo. En cambio, con la concentración mayor, 2,00 µg/l, se observó una marcada tendencia hacia la reducción de la genotoxicidad, aunque esta disminución no fue significativa en la mayoría de los experimentos. Por lo tanto, estas variaciones pueden atribuirse al azar. Esto indica entonces que no hubo efecto de la concentración de cipermetrina.

En las tres concentraciones se observó un incremento constante en la genotoxicidad asociado con el aumento del período de exposición (figura 3B). A pesar de que la tasa de aumento fue mayor durante los primeros cuatro días, al finalizar los ensayos el

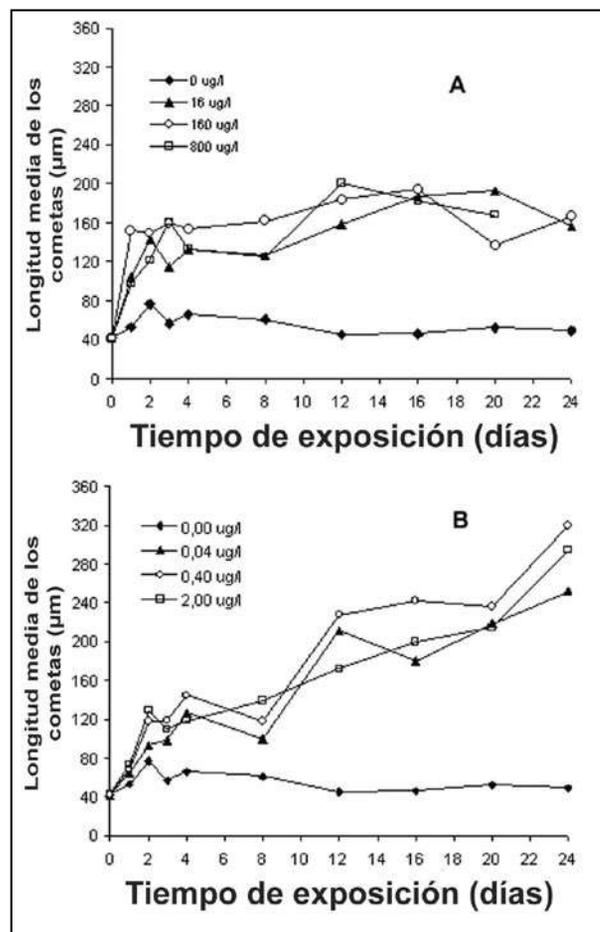


Figura 3. Efecto genotóxico en eritrocitos de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) expuestos a dos plaguicidas en diferentes concentraciones y varios períodos de exposición: **A.** Diazinón y **B.** Cipermetrina

día 24, la tendencia creciente de la genotoxicidad fue muy marcada en las tres concentraciones. Esta relación no ocurrió con el diazinón.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados de las pruebas de toxicidad aguda, la cipermetrina es cerca de 700 veces más tóxica que el diazinón para la tilapia roja, a pesar de que la cipermetrina es un insecticida del grupo de los piretroides, considerados de baja toxicidad para mamíferos. Sin embargo, debido a que los piretroides son muy lipofílicos poseen alta tasa de absorción a través de las branquias, factor que aumenta la vulnerabilidad de los peces a estas sustancias. La cipermetrina es metabolizada y eliminada de una manera significati-

Tabla 2. Longitud media de las colas de los cometas (m \pm DE) en eritrocitos de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) expuesta a Cipermetrina y Diazinón, en diferentes periodos de exposición

Sustancia	Concentración	Tiempo de exposición (días)										
		0	1	2	3	4	8	12	16	20	24	
* C (-)	%	41,7 \pm 16,0	52,9 \pm 19,7	76,4 \pm 24,4	56,8 \pm 23,9	65,6 \pm 24,8	60,6 \pm 18,7	45,2 \pm 16,7	46,2 \pm 9,9	52,1 \pm 13,2	49,2 \pm 13,6	
	12,50											
* C (+)	mg/l	41,7 \pm 16,0	50,1 \pm 13,5	136,3 \pm 26,0	124,0 \pm 27,0	229,7 \pm 39,2	160,3 \pm 38,3	159,1 \pm 26,3	140,5 \pm 34,8	69,9 \pm 16,5	57,9 \pm 10,2	
	5,00											
Cipermetrina	g/l	41,7 \pm 16,0	65,1 \pm 20,2	92,8 \pm 34,7	98,1 \pm 32,0	126,4 \pm 36,1	99,1 \pm 13,1	211,4 \pm 37,9	180,2 \pm 36,4	218,3 \pm 34,6	251,6 \pm 47,4	
	0,04											
Cipermetrina	g/l	41,7 \pm 16,0	68,8 \pm 20,8	117,5 \pm 25,1	118,3 \pm 31,2	144,5 \pm 23,3	117,6 \pm 19,0	227,5 \pm 37,0	242,8 \pm 46,5	236,3 \pm 34,6	319,3 \pm 65,0	
	0,40											
Cipermetrina	g/l	41,7 \pm 16,0	73,2 \pm 19,5	129,1 \pm 27,1	109,6 \pm 27,5	118,5 \pm 31,0	139,2 \pm 17,1	172,0 \pm 56,0	200,5 \pm 61,4	214,3 \pm 30,0	294,3 \pm 45,8	
	2,00											
Diazinón	g/l	41,7 \pm 16,0	104,7 \pm 15,5	142,6 \pm 19,6	115,1 \pm 30,8	132,2 \pm 28,8	126,2 \pm 32,0	158,7 \pm 37,6	186,4 \pm 29,0	192,6 \pm 39,1	156,9 \pm 23,6	
	16,00											
Diazinón	g/l	41,7 \pm 16,0	152,6 \pm 26,6	159,6 \pm 20,0	160,0 \pm 30,0	153,5 \pm 30,2	162,0 \pm 24,7	183,3 \pm 38,5	193,8 \pm 37,1	137,4 \pm 30,0	168,8 \pm 21,1	
	160,00											
Diazinón	g/l	41,7 \pm 16,0	97,4 \pm 13,5	121,7 \pm 32,5	160,8 \pm 34,6	132,6 \pm 22,1	124,6 \pm 30,8	200,3 \pm 44,8	183,1 \pm 26,8	167,9 \pm 27,1		
	800,00											

* C (-) = Control negativo: acetona al 12,5%. C (+) = Control positivo: ciclofosfamida 5 mg/l.

vamente más lenta en los peces que en los mamíferos y las aves, lo cual puede explicar la alta toxicidad de estos compuestos para peces (Edwards et al., 1987).

La relación exponencial decreciente observada en las curvas de toxicidad de cipermetrina y diazinón, indica que los dos plaguicidas actúan más rápidamente durante el inicio de los ensayos. Al comparar los dos plaguicidas, la cipermetrina tiene una pendiente negativa mayor que el diazinón, es decir, ejerce sus efectos tóxicos en forma más rápida.

Para los dos plaguicidas, las bajas concentraciones llegan a ser letales cuando aumenta el tiempo de exposición, lo que indica que este es un factor que tiene gran influencia sobre la toxicidad de estos xenobióticos. El impacto de estas sustancias sobre los ecosistemas naturales es importante porque la mayoría de ellas alcanzan los ambientes acuáticos en cantidades muy pequeñas. Para la evaluación del riesgo de los plaguicidas y otros contaminantes, es importante tener en cuenta si la exposición ocurre a pequeñas concentraciones en forma prolongada.

Dado que la acetona no mostró una acción genotóxica, los efectos observados se deben atribuir a las sustancias evaluadas. Para el diazinón, la cipermetrina y la ciclofosfamida, se observó incremento importante de la genotoxicidad. La ciclofosfamida mostró un efecto dependiente del tiempo de exposición sólo hasta el día cuatro y posteriormente disminuyó en forma gradual, este mismo comportamiento fue reportado por Campana et al. (1999) para esta sustancia en peces.

Son múltiples los estudios que han mostrado la presencia de genotóxicos en ingredientes de agroquímicos, capaces de inducir mutaciones, alteraciones cromosómicas y daños en el ADN. Algunos agroquímicos son genotóxicos directos (ej., generadores de aductos), pero tratándose de xenobióticos, uno de los mecanismos que ayudan a esclarecer sus efectos genotóxicos indirectos son las rutas metabólicas. Los plaguicidas organofosforados, como el diazinón, son agentes alquilantes directos de las bases del ADN e indirectos de sus proteínas, involucrando probablemente la desintegración del ADN (Mohn, 1973). Se ha encontrado que la movilidad del fósforo en los

organofosforados parece ser un buen sustrato para ataques nucleofílicos (Wild, 1975). Esta situación puede causar la fosforilación del ADN, que es un tipo de daño genotóxico (Rahman et al., 2002). De esta forma, es posible que el diazinón cause alteraciones en el ADN de eritrocitos de tilapia.

En el caso del diazinón, la bioactivación microsomal está mediada principalmente por CYPs hacia la forma metabólica diazinón-oxón mediante desulfuración oxidativa. A su vez, los CYPs también desintoxican por dearilación, produciendo 2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxypyrimidine (IMHP) (figura 4). Por lo tanto, los niveles de activación y desintoxicación del diazinón están dados por el balance entre desulfuración y dearilación, sumado a la hidrólisis del diazinón-oxón vía esterasa-A (PONI) (Timchalk, 2001).

De lo anterior se deduce una compleja red bioquímica de metabolitos, en la que intervienen enzimas de gran homología evolutiva en vertebrados, entre las que sobresalen los citocromos 1A2, 2B1/2, 2B6, 3A2, 3A4 y 2C11 (Buratti et al., 2003; Fabrizi et al., 1999). Esto hace pensar que la toxicidad in vivo del diazinón, corroborada en la presente investigación, sería multienzimática. De hecho, la curva de toxicidad/mortalidad en *Oreochromis* sp. evidencia una cinética con más perfil de tolerancia que de sensibilidad, con valores de CL_{50} aproximados de 4.000 $\mu\text{g/l}$ (a 96 horas) y hasta de 6.000 $\mu\text{g/l}$ (a 24 horas) (figura 1). Por lo tanto, se esperaría también una genotoxicidad significativa a concentraciones elevadas o en exposiciones subletales prolongadas, como de hecho se evidencia en la figura 3. Estos resultados permiten inferir una posible combinación de factores no excluyentes, como son la sensibilidad/resistencia de la especie de prueba, la toxicocinética del diazinón y la compleja vía metabólica activación/desintoxicación, bien documentada en mamíferos pero no en peces. A lo anterior siempre se debe sumar el posible papel de la también compleja reparación del ADN, poco estudiada en organismos acuáticos superiores.

Durante los primeros cuatro días los efectos genotóxicos del diazinón se incrementaron rápidamente y luego se observó un comportamiento relativamente estable en la longitud de los cometas, hasta el día 24. Situaciones similares son reportadas para otros plaguicidas (Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2000; Godard

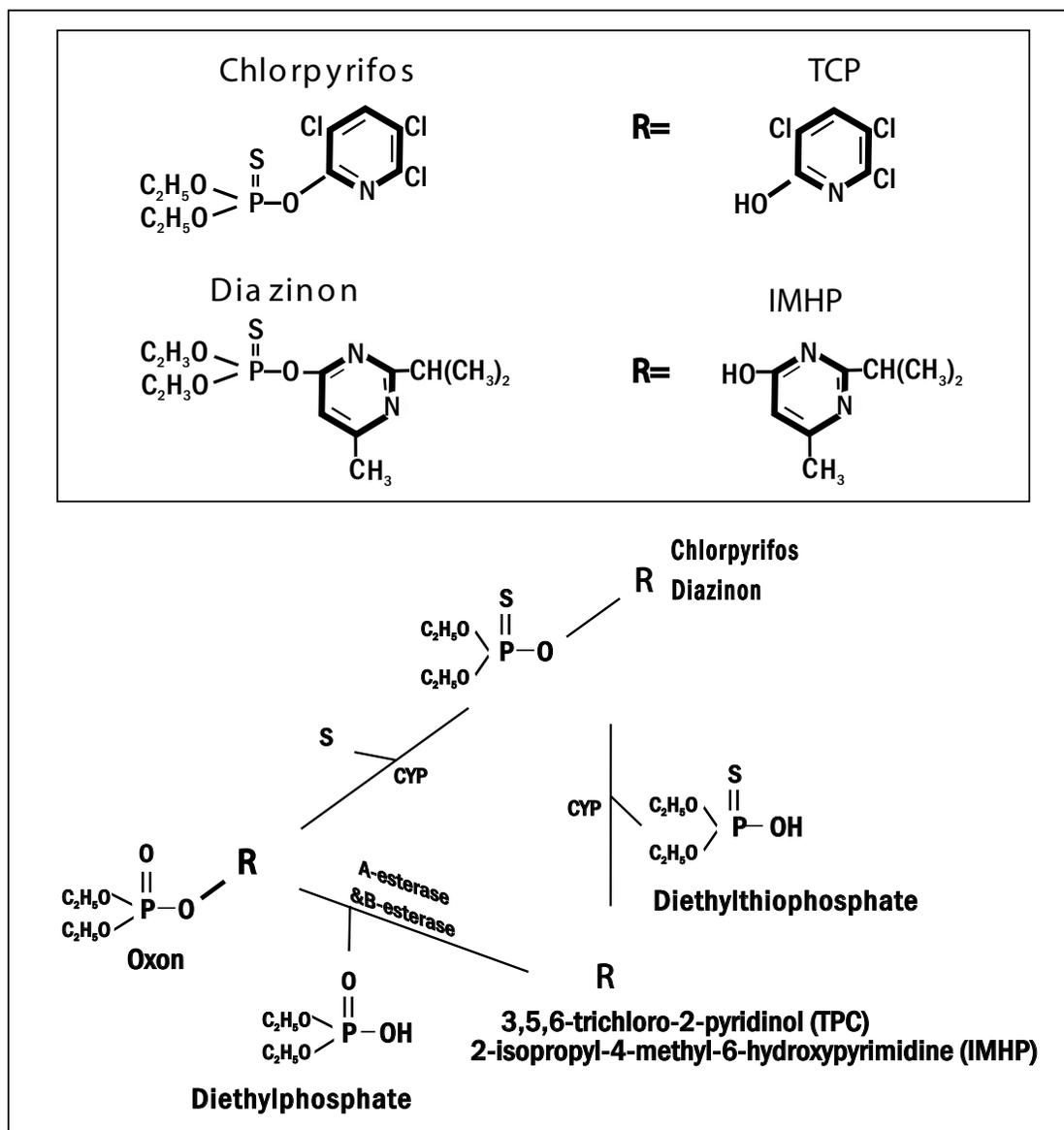


Figura 4. Vía metabólica del diazinón (tomado de Timchalk, 2001)

et al., 1999). Los factores que pueden contribuir a este equilibrio entre el nuevo daño y la reparación del mismo, son la pérdida de células dañadas, los procesos de reparación de ADN en células vivas y la interacción de enzimas metabólicas como citocromo P450 (Rahman et al., 2002). Estos resultados podrían atribuirse a que el diazinón induce una respuesta adaptativa en *Oreochromis* sp., que logra estabilizar los efectos genotóxicos mediante mecanismos de aumento de la desintoxicación del xenobiótico o de la reparación del ADN y por lo tanto, no hay acumu-

lación de daño debida a los nuevos daños del ADN. Se ha encontrado que los compuestos que dañan el ADN por alquilación, como las nitrosaminas, son inductores de respuesta adaptativa.

Para cipermetrina es notable la acumulación del daño genético como consecuencia de la exposición continua a pequeñas concentraciones no letales. Es probable que para esta sustancia no se produzca una respuesta adaptativa y por lo tanto, el daño aumente paralelamente con el incremento en el período de

exposición. Es necesario considerar que los efectos más importantes para hacer un análisis de riesgo de un xenobiótico, consisten en buscar si se presenta acumulación de daño en organismos que están expuestos a concentraciones subletales por períodos prolongados, como se hizo en estos experimentos y como ocurre en general la exposición a los mutágenos que llegan a través del agua, los alimentos y el aire.

La cipermetrina es metabolizada por citocromos P450, enzimas monooxigenasas microsomaes que desempeñan un papel dominante en el metabolismo de amplia variedad de compuestos endógenos y exógenos (Sasabe et al., 2004). La familia CYP28 hace parte de un grupo monofilético de fuerte homología regional con la familia CYP3 en vertebrados y CYP6 en insectos (Danielson et al., 1997) (figura 5).

A pesar de esta estrecha homología filogenética de los CYPs, los niveles de sensibilidad intertaxonómicos son diferentes. Así, la cipermetrina ha mostrado baja toxicidad en mamíferos pero alta en organismos acuáticos, con valores de CL_{50} inferiores a 1 mg/l para peces pequeños (WHO, 2002). En roedores, por ejemplo, la tolerancia farmacológica es mayor que en peces, aunque asociada a disminuciones significativas de enzimas desintoxicantes como P450, catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (Manna et al., 2004).

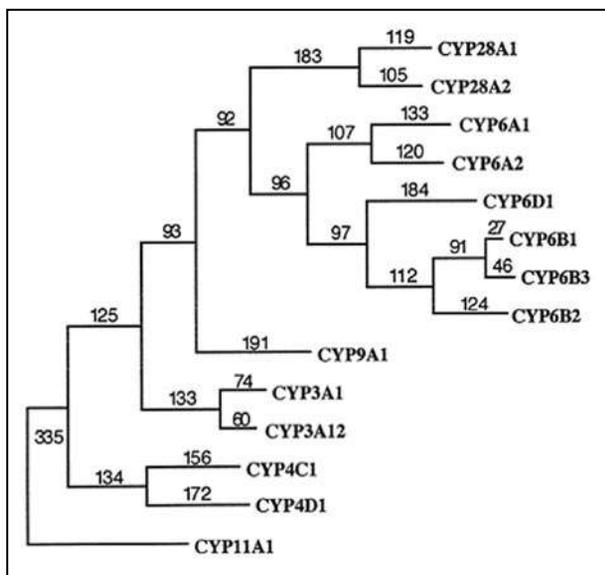


Figura 5. Filogenia de los citocromos CYP (Tomado de Danielson et al., 1997)

Incluso, un reporte con el ensayo cometa no mostró daño en el ADN linfocitario medido después de una administración oral de 60 días con 25 mg/kg de peso por día (equivalente a un 1/10 de la CL_{50}) (Gabbianelli et al., 2004). En contraste, en peces la exposición a menores concentraciones de cipermetrina ha evidenciado efecto tóxico en el metabolismo celular y en la síntesis de proteínas (David et al., 2004).

La mayor genotoxicidad de la cipermetrina se debe a que su efecto aumentó con el tiempo de exposición, mientras que con el diazinón se observó una tendencia a la estabilización y a la disminución del daño. Para ninguno de los dos plaguicidas se encontró una relación directa entre la concentración y los efectos genotóxicos.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que el impacto negativo de las sustancias xenobióticas son debidas principalmente a la exposición de los organismos no blanco a pequeñas concentraciones por períodos prolongados.

El hecho de que no haya una relación directa entre la concentración de los dos plaguicidas y el daño genotóxico, conduce a concluir que tanto el diazinón como la cipermetrina a concentraciones muy bajas producen daños genotóxicos iguales a los ocasionados por concentraciones hasta 50 veces mayores. Por lo tanto, no hay efecto de concentración, como sí ocurre con la toxicidad letal. De esta manera, se puede afirmar que concentraciones muy bajas del mutágeno, no garantizan la ausencia de daño genético. En consecuencia, no es válido fijar concentraciones ambientales permisibles.

Tanto la cipermetrina como el diazinón causaron daños genéticos a *Oreochromis* sp. en el rango de concentraciones evaluadas. El diazinón posiblemente indujo una respuesta adaptativa que no permitió la acumulación de daño, mientras que la cipermetrina indujo la acumulación de daño genético, quizás porque no induce respuesta adaptativa.

Los resultados del estudio indican que la genotoxicidad in vivo de cipermetrina a concentraciones tan

bajas como un centésimo de la $CL_{50(96h)}$ en tilapia roja (*Oreochromis* sp.), detectada con el ensayo cometa constituiría una herramienta útil para el tamizaje de efectos subletales a bajas concentraciones en organismos acuáticos no blanco de nuestro país, como *Oreochromis* sp. y que la exposición continuada a bajas concentraciones, es uno de los factores que contribuye a la peligrosidad de los mutágenos ambientales. La ocurrencia de un daño genotóxico basal o la acumulación del daño genético producido en peces por la exposición continuada a pequeñas concentraciones no tóxicas de diazinón y cipermetrina, podría indicar la posibilidad de un riesgo

para la inducción de cáncer en humanos, ya que por acumulación de daños se pueden obtener células con varias mutaciones que se podrían convertir en células iniciadoras de carcinogénesis.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) y al Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental (GAIA) de la Universidad de Antioquia, por la financiación de este proyecto.

REFERENCIAS

- Akcha F, Hubert FV, Pfol-Leszkowicz A.** 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of *in situ* exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research*, 534:21-32.
- Ateeq B, Abul Farah M, Niamat MA, Ahmad W.** 2002. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research*, 518:135-144.
- Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M.** 1998. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flat fish. *Mutation Research*, 415:167-184.
- Blasiak J, Jaloszynski P, Trzeciak A, Szyfter K.** 1999. *In vitro* studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutation Research*, 445:275-283.
- Buratti FM, Volpe MT, Meneguz A, Vittozzi L, Testai E.** 2003. CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 186(3):143-154.
- Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ, Dulout F.** 1999. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirondon interruptus interruptus*. *Mutation Research*, 438:155-161.
- Cavas T, Ergene-Gözükara S.** 2003. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutation Research*, 354:93-99.
- Charles JM, Cunny HC, Wilson RD, Ivett JL, Murli E, Bus JS, Gollapudi B.** 1999. *In vivo* micronucleus assays of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. *Mutation Research*, 444:227-234.
- Danielson PB, MacIntyre RJ, Fogleman JC.** 1997. Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome p450s: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94:1079-1082.
- David M, Mushigeri SB, Shivakumar R, Philip GH.** 2004. Response of *Cyprinus carpio* (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolic profiles. *Chemosphere*, 56(4):347-352.
- De Miranda, RE Barreto AM, Speit G.** 2003. Anesthesia of fish with benzocaina does not interfere with comet assay results. *Mutation Research*, 534:165-172.
- Edwards R, Millburn P, Hutson DH.** 1987. The toxicity and metabolism of the pyrethroids *cis*- and *trans*-Cypermethrin in Rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Xenobiotica*, 17(10):1175-1193.
- Fabrizi L, Gemma S, Testai E, Vittozzi L.** 1999. Identification of the cytochrome P450 isoenzymes involved in the metabolism of diazinon in the rat liver. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 13(1):53-61.
- Farah MA, Ateeq B, Ali MN, Ahmad W.** 2003. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54:25-29.
- Finney DJ.** 1970. *Probit Analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve*. University Press, Cambridge.
- Freeman JL, Rayburn AL.** 2004. *In vivo* genotoxicity of atrazine to anuran larvae. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 560:69-78.
- Gabbianelli, R, Nasuti C, Falcioni G and Cantalamessa F.** 2004. Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrethroids: effect of supplementation with Vitamins E and C. *Toxicology*, 203(1-3):7-26.
- Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D.** 2000. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell electrophoresis (SCGE) assay pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutation Research*, 469:279-285.
- Godard T, Fessard B, Huet S, Mourot A, Edwige D, Poul JM.** 1999. Comparative *in vitro* and *in vivo* assessment of genotoxic effects of etoposide and chlorothalonil by the comet assay. *Mutation Research*, 444:103-116.
- Guecheva T, Heriques J, Erdtmann B.** 2001. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian *in vivo*, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 497:19-27.
- ICA.** 2003. *Comercialización de plaguicidas. Importación, producción, ventas y exportación*. Instituto Colombiano Agropecuario. División de Insumos Agrícolas. Bogotá.
- Kammann U, Bunke M, Stein H.** 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation Research*, 498:67-76.
- Kligerman A, Doerr CL, Tennant A, Zucker RM.** 2000. Cytogenetic studies of three triazine herbicides. I. *In vitro* studies. *Mutation Research*, 465:53-59.
- Kligerman AD, Erexson GL.** 1999. An evaluation of the feasibility of using cytogenetic damage as a biomarker for

- alachlor exposure. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 44:95-101.
- Lee RF, Steiner S.** 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544:1-22.
- Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Das S.** 2004. Repeated dose toxicity of alfa-cypermethrin in rats. *Journal of Veterinary Sciences*, 5(3):241-245.
- Mitchelmore CL, Chipman JK.** 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399:135-147.
- Mohn G.** 1973. Comparison of the mutagenic activity of eight organophosphorus insecticides in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, 21:196.
- Palacio JA, Henao B, Vélez JH, González J, Parra CM.** 2002. Acute toxicity and bioaccumulation of pesticide Diazinon in red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *mossambicus albina*). *Environmental Toxicology*, 17(4):334-340.
- Pandangri R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M.** 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26:345-356.
- Peñalosa M, Camargo M, Palacio J.** 2003. Genotoxicidad del cloruro de mercurio en dos especies ícticas (*Prochilodus magdalenae* y *Oreochromis* sp.). *Actualidades Biológicas*, 25:105-111.
- Peltier W, Weaber C.** 1985. *Methods for measuring the acute toxicity to effluents to freshwater and marine organisms*. 3rd ed. EPA/600/4-85: US Environmental Protection Agency. Cincinnati.
- Polat, H, Erkoc FU, Viran R, Kocak O.** 2002. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. *Mutation Research*, 49:39-44.
- Poli P, de Melo MA, Buschini A, de Castro VLSS, Restivo FM, Rossi C, Zucchi Rahman MF, Mahboob M, Danadevi K, Saleha B, Paramjit G.** 2002. Assessment of genotoxic effects of chloropyrifos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutation Research*, 516:139-147.
- Royal Society of Chemistry.** 1990. *The agrochemical handbook*. 2nd ed. Old Working: Unwin Brothers Limited. Surrey, United Kingdom.
- Sasabe M, Wen Z, Berenbaum MR, Schuler MA.** 2004. Molecular analysis of CYP321A1, a novel cytochrome P450 involved in metabolism of plant allelochemicals (furanocoumarins) and insecticides (cypermethrin) in *Helicoverpa zea*. *Gene*, 338(2):163-175.
- Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S.** 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*, 519:103-119.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cellular Research*, 175:184-191.
- Singh NP.** 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research*, 455:111-127.
- Smith TM, Straton GW.** 1986. Effects of synthetic pyrethroids insecticides on nontarget organisms. *Research Reviews*, 97:93-119.
- Soloneski S, González M, Piaggio E, Reigosa MA, Larramendy ML.** 2002. Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. III. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Research*, 514:201-212.
- Theodorakis CW, D'Surney SJ, Shugart LR.** 1994. Detection of genotoxic insult as DNA strand breaks in fish blood cells by agarose gel electrophoresis. *Environmental and Toxicological Chemistry*, 13:1023-1031.
- Timchalk C.** 2001. Organophosphate pharmacokinetics. *En: Krieger R, Doull J, Ecobichon D, Gammon D, Hodgson E, Reiter L, Ross J (eds.). Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego, California. Vol. 2, pp. 929-951.
- Vigreux C, Poul JM, Deslandes E, Lebaillly P, Godard T, Sichel F, Henry-Amar M, Gauduchon P.** 1998. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutation Research*, 419:79-90.
- WHO.** 2002. *The WHO recommended classification of pesticides by hazard*. World Health Organization. <http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/en/>. Fecha de consulta: mayo de 2005.
- Wild D.** 1975. Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutation Research*, 32:133-150.
- Wilson JT, Pascoe PL, Parry JM, Dixon DR.** 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutation Research*, 399:87-95.
- Yilmaz M, Gul A, Erbasli K.** 2004. Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859). *Chemosphere*, 56(4):381-385.
- Zang Y, Zhong Y, Luo Y, Kong ZM.** 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 108:271-278.

