

1 9 8 6 - I

Reg. No. 78499028

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



“EFECTO DE LOS PLAGUICIDAS METAMIDOFOS, BAYGON Y
PARAQUAT SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE
DE LINFOCITOS MURINOS”

SALVADOR RUIZ RAMIREZ

GUADALAJARA, JALISCO. 1988



LABORATORIO
BOSQUE LA PRIMAVERA
CENTRO DE DOCUMENTACION
E INFORMACION



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente
Número 869/88

SR. SALVADOR RUIZ RAMIREZ
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "EFECTO DE LOS PLAGUICIDAS METAMI
DOFOS, BAYGON Y PARA QUAT SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE
DE LINFOCITOS MURINOS" para obtener la Licenciatura en Bio-
logía.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---
aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. Eduardo Vázquez
Valls.

A T E N T A M E N T E
"AÑO ENRIQUE DIAZ DE LEON"
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Julio 20 de 1988



FACULTAD DE CIENCIAS

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

Ing. Adolfo Espinoza de los Monteros Cárdenas.

c.c.p. El Dr. Eduardo Vázquez Valls, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente del alumno.

Al contestar este oficio cítese fecha y número

GUADALAJARA, Jal., a 11 de Julio de 1988.

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD
DE GUADALAJARA

P R E S E N T E .

Estimado Dr. Astengo:

Por medio de la presente, me permito manifiestar a usted que una vez recibida la tesis " EFECTO DE LOS PLAGUICIDAS META-MIDOFOS, BAYGON Y PARAQUAT SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE DE LINFOCITOS MURINOS" , presentada por el C. pasante de la carrera de Licenciado en Biología SALVADOR RUIZ RAMIREZ y haber realizado las observaciones pertinentes, considero que se puede imprimir y solicito a usted atentamente se realicen los trámites para el examen respectivo.

Agradezco de antemano las atenciones que se sirvan prestar, quedando de usted, para cualquier aclaración al respecto.

A T E N T A M E N T E



DR. EDUARDO VÁZQUEZ VALLS
Director de la tesis

Esta tesis se realizó en la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente (U.I.B.O.) del I.M.S.S., en la División de Patología Experimental, bajo la constante asesoría de la Q.F.B. Blanca Rosa Noriega Ortega.

Dir. de tesis Dr. Eduardo Vásquez Valls.

Dedicatorias.

A mis padres: Eterno agradecimiento por esta vida, porque estoy y lo que soy. Sin olvidar su gran esfuerzo y sacrificio.

A mis hermanos: E. Sofía, José, M^a del Pilar, M^a Guadalupe, Rosa María, Ramón y Alejandra. Por su apoyo, confianza y paciencia.

A mi tía y abuelo.

Familia González-Pérez. Por su amistad.

Graciela E.: Con gran amor y admiración. Siempre cerca de mi.

Agradecimientos.

A mi director de tesis Dr. Eduardo Vázquez Valls por su enseñanza y asesoría.

A la Q.F.B. Blanca Rosa Noriega Ortega por su importante labor en todo momento.

Al Dr. Amado González Mendoza jefe de la División de Patología Experimental, por su confianza y asesoría.

Al M. en C. Rodolfo Ramos Zepeda por su valiosa cooperación en la realización de esta tesis.

A todo el personal de la división de Patología Experimental de la U.I.B.O., principalmente a la Q.F.B. María Elena Ramos Damián.

A todos mis maestros.

A la Universidad de Guadalajara y los que la hacen posible.

A mis compañeros y amigos (grupo A) por todo lo aprendido y la experiencia compartida.

Deseo resaltar la gran labor incondicional de la Q.F.B. Blanca Rosa Noriega Ortega que a lo largo de todo el trabajo requerido en la presente tesis fué un guía insustituible. Por todo lo aprendido este tiempo mil gracias.

A todas aquellas personas que física o moralmente me ayudaron de una u otra forma para seguir adelante.

EFEECTO DE LOS PLAGUICIDAS METAMIDOFOS, BAYGON
Y PARAQUAT SOBRE LA TRANSFORMACION BLASTOIDE
DE LINFOCITOS MURINOS.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
HIPOTESIS	16
OBJETIVO	17
MATERIAL Y METODOS	18
RESULTADOS	25
DISCUSION	30
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35

INTRODUCCION.

El uso de los plaguicidas ha tenido entre otros resultados positivos el mejoramiento de la salud, el mejoramiento y conservación de las cosechas y la erradicación de plagas. Pero a su vez tiene consecuencias negativas como la contaminación ambiental, que a largo plazo será mucho mayor el daño que cause, que los beneficios que a corto plazo ofrece la utilización de estas sustancias ¹. Además debido a sus efectos tóxicos, se han presentado trastornos a la salud ^{3-7,15,16}. Entre ellos se tienen antecedentes de que los plaguicidas dañan a las células efectoras de la respuesta inmune en el humano, como son los linfocitos T ^{15,16}. En este trabajo se analizó el efecto de los plaguicidas Metamidofos, Baygon y Paraquat de uso frecuente en la agricultura y en forma doméstica, sobre la incorporación de Timidina radiactiva (³H-TdR) de linfocitos esplénicos murinos. Se encontró que estos tres plaguicidas, afectan de manera significativa la viabilidad de los linfocitos murinos estimulados en cultivo con Concanavalina A (Con-A). Con la viabilidad afectada consecuentemente la incorporación de ³H-TdR resultó también disminuída.

ANTECEDENTES.

Desde épocas muy antiguas el hombre aprendió que ciertos materiales de origen vegetal le protegían del ataque de insectos y plagas. La utilización de los plaguicidas con fines agrícolas empieza en 1865 y a partir de esta fecha ha venido en aumento su producción y uso. A través del tiempo y de acuerdo con las necesidades, se originaron diferentes tipos de plaguicidas (inorgánicos y orgánicos). Dependiendo de su grupo químico biodegradabilidad, forma de acción y según la plaga contra la cual están dirigidos. Por ejemplo insecticidas, herbicidas y fungicidas ^{2,3}.

Entre los plaguicidas inorgánicos se encuentran los derivados del arsénico, que tienen baja eficiencia para las plagas, son tóxicos para el hombre y presentan elevada persistencia en el medio ambiente ⁴. Esto ha limitado su uso.

A partir de 1940 se utilizan con mayor frecuencia los plaguicidas orgánicos, que se clasifican en: organofosforados, carbamatos, organoclorados y de

origen vegetal (nicotina, piretroides y otros). Algunos de ellos se aplican con fines agrícolas y otros son de utilidad doméstica ^{3,4} .

Existen plaguicidas que tienen un proceso de degradación muy lento, como los hidrocarburos clorados que son señalados como uno de los factores de alteración ecológica, dado que ocasionan la muerte de especies animales como aves y peces. Por otra parte se han hecho experimentos en ratones, en donde se observa que ocasionan cáncer en altas dosis. También se ha demostrado que producen cambios hormonales, concretamente en la producción de estrógenos. Pueden producir esterilidad y alteraciones en el metabolismo del calcio, lo que afecta el desarrollo de los huesos. Igualmente originan mutaciones que provocan fallas genéticas ³⁻⁵ .

El Paraquat herbicida clorado, se considera potente veneno que ocasiona daño renal, insuficiencia respiratoria y daño pulmonar ^{6,7} . El efecto tóxico del Paraquat se atribuye a la peroxidación de la membrana de las células. Transforma el oxígeno molecular en radicales superóxido y peróxido de

hidrógeno, los cuales causan daño a la membrana celular⁸⁻¹³. Así mismo el Paraquat incrementa la permeabilidad del epitelio pulmonar de las ratas, lo que favorece la absorción de drogas. Las tasas de absorción de las drogas se incrementan de 1.4 a 1.8 veces, después de 3 a 5 días de la administración de Paraquat¹⁴.

La acción de los insecticidas organofosforados en los vertebrados generalmente se manifiesta como una ruptura en la transmisión de los impulsos nerviosos en el sistema nervioso central y periférico, por inhibición de la acetilcolinesterasa, que es la enzima que regula la cantidad del neurotransmisor acetilcolina¹⁵. Además este tipo de insecticidas causan daño al material genético ocasionando aberraciones cromosómicas por acción teratogénica y mutación¹⁵⁻¹⁸. La exposición a ésteres organofosforados, produce un efecto más persistente conocido como neurotoxicidad retardada¹⁹.

La exposición prolongada a los plaguicidas en forma directa puede ser laboral, ambiental o por mal uso de ellos. La exposición indirecta ocurre cuando

se ingieren residuos de los plaguicidas que quedan en los productos agrícolas de consumo.

El contacto con los plaguicidas llega a producir aplasia medular en algunos individuos. La aplasia medular consiste en la alteración metabólica y destrucción de las células precursoras de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Las células del tejido linfoide que participan en la respuesta inmune del organismo, podrían ser igualmente afectadas ²⁰⁻²³.

En la respuesta inmune los macrófagos y linfocitos son los principales componentes celulares. Los macrófagos desempeñan diversas funciones. Los linfocitos se dividen en dos subpoblaciones principales: linfocitos B y T. Los linfocitos B en presencia de un estímulo antigénico, se diferencian en células plasmáticas que tienen capacidad para sintetizar anticuerpos. Los linfocitos T son las células efectoras de la respuesta inmune celular. Se clasifican en diferentes subclases de acuerdo a su función: Linfocitos T cooperadores, T citotóxicos, T supresores y NK. Cada subclase posee

marcadores de superficie característicos²⁴.

En relación con el efecto de los plaguicidas sobre las células efectoras de la respuesta inmune, existen al respecto diversos trabajos entre los que se encuentran los que a continuación se mencionan²⁵⁻³³.

El Dimetoate (éster fosfórico) causa disminución del 50 % en los linfocitos de ratones tratados. Además ocasiona depresión de la respuesta inmune²⁵.

El tratamiento de pollos con DDT y Mirex (organoclorados) inhibe la actividad metabólica de sus linfocitos, lo que provoca disminución en la producción de inmunoglobulinas G (IgG)²⁶. El tratamiento con cantidades subtóxicas de plaguicidas (DDT, Aroclor 1254, Carbaril, Paration metílico) causa inmunosupresión en conejos²⁷.

En relación con la actividad fagocítica, la exposición de ratones al Toxaféno (clorado) disminuye la capacidad fagocítica de sus macrófagos²⁸. Además

los insecticidas clorados DDT, DDE y G-HCH inhiben la migración de leucocitos in vitro. La intensidad de la inhibición es variable de un sujeto a otro y de acuerdo con la sustancia examinada ²⁹.

En experimentos hechos con Lindano (insecticida organoclorado) en cultivos de linfocitos por 72 horas con Fitohemaglutinina (PHA) y ³H-TdR, se observa disminución de las células blásticas ³⁰. También se ha estudiado el efecto del Malatión (organofosforado) sobre la síntesis de ácidos nucleicos en linfocitos humanos estimulados con PHA y se observa que en pequeñas dosis hay una mayor incorporación de ³H-TdR y en altas dosis disminuye la incorporación ^{15,31,32}. Así mismo insecticidas de origen vegetal (piretroides) inhiben la transformación de linfocitos murinos estimulados con Lipopolisacárido (LPS) y Con-A ³³.

Los linfocitos tienen la propiedad de activarse en cultivo, por medio de mitógenos específicos o inespecíficos. Entre los primeros se encuentran los antígenos y entre los segundos las lectinas PHA, Con-A y Fitolaca (PWM).

La activación linfocitaria valora la capacidad funcional de los linfocitos para proliferar después de la estimulación antigénica. Se refiere a una correlación in vitro de algún proceso in vivo que regularmente ocurre cuando un antígeno reacciona con los linfocitos específicamente sensibilizados en el huésped. El cultivo de linfocitos es una técnica in vitro comunmente empleada para evaluar la inmunidad celular en los enfermos con inmunodeficiencia, autoinmunidad, enfermedad infecciosa, cáncer etc ³⁴ .

La Concanavalina A se extrae del frijol (Canavalia ensiformis) en 1919. En 1970 se identifica que se conjuga a los linfocitos ³⁵ . Tiene un efecto activador de los linfocitos T, que los induce a proliferar en cultivo ³⁶ .

La Con-A es una proteína con peso molecular de 102,000 , se presenta como tetrámero a pH mayor de 7 y como dímero a pH menor de 6. Cada subunidad peptídica conjuga un ion Mn y un ion Ca, la conjugación de la Con-A a sacáridos requiere la presencia de los metales ³⁵ . En estudios recientes se muestra que la unión del mitógeno ocurre en muchos sitios de la periferia

(receptores) de la célula y llega a concentrarse en un casquete de uno de los polos de la célula y es interiorizado por pinocitosis^{37,38}. Cada linfocito tiene alrededor de 10^7 receptores por célula, los receptores para Con-A son α -D-manopiranosidos y α -D-glucopiranosidos³⁵.

Después de la incubación de los linfocitos con mitógenos (Con-A y otros), estos se unen a los receptores específicos de la superficie celular, una vez unidos se dispara una señal molecular en el interior de la célula que la afecta profundamente³⁹ y provoca una serie de eventos bioquímicos complejos que incluyen fenómenos relacionados con la membrana, como es el aumento en la síntesis de fosfolípidos, aumento en la permeabilidad a cationes divalentes, activación de la adenilato ciclasa, elevación del AMPc³⁴, aumento en la fosforilación de las nucleoproteínas y acetilación de histonas⁴⁰. Entre la secuencia de los cambios bioquímicos que preceden a la síntesis de DNA se encuentran: la síntesis acelerada de RNA y proteínas, el incremento en la actividad de enzimas tales como la timidina cinasa, la desoxicitidina cinasa y la desoxicitidilato desaminasa⁴¹.

En relación con los plaguicidas que se emplearon en este trabajo se puede señalar lo siguiente:

METAMIDOFOS.

Nombre Químico: O,S-dimetil fosfoamidotioato.

Nombre Común: Bay 71628, Metamidofos Estrella, Monitor, MTD, Orto 9006, Pillaron, SRA 5172, Tamabon, Tamaron.

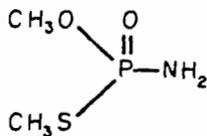
Acción: Insecticida, acaricida.

Propiedades Químicas: Cristalino, PF de 46.1 °C, fácilmente soluble en agua o etanol; menos de 1 % en keroseno, menos de 10 % en benceno o xileno a temperatura ambiente. Soluble en alcoholes, hidrocarburos alifáticos clorinados; ligeramente soluble en éter.

Toxicidad: Dosis letal media (DL₅₀) oral aguda es de 19-21 mg/Kg de peso en rata.

Aplicaciones: Para el control de ciertas larvas de lepidópteros, áfidos, gorgojos y mosquita blanca ⁴².

Fórmula:



Vías de Absorción: A través de la piel, tracto respiratorio y gastrointestinal.

La absorción por la piel tiende a ser lenta, aumentando en temperaturas elevadas y siendo mayor en presencia de dermatitis.

Acción Farmacológica: Actúa como inhibidor irreversible de la enzima acetilcolinesterasa, permitiendo la acumulación de acetilcolina y originando intoxicación en las sinapsis autónomas y centrales y en las terminaciones post-ganglionares de los nervios parasimpáticos y motores.

Intoxicación: Los síntomas incluyen dolor de cabeza, vértigos, nerviosidad, debilidad, visión borrosa, calambres, diarrea y opresión del pecho. Los signos:

Exudación, miosis, lagrimeo, salivación y secreciones excesivas del tracto respiratorio, vómito, cianosis, edema papilar, pérdida de los reflejos, espasmos musculares incontrolables, convulsiones, pérdida del control de esfínteres y coma.

Tratamiento: Administrar sulfato de atropina y oximas (2-PAM), o el toxogonin.

Respiración artificial cuando se requiera ⁴³.

BAYGON.

Nombre Químico: 2-(1-metiletoxi) fenol metilcarbamato.

Nombre Común: Propoxur, Aprocarb.

Otros Nombres: Bay 39007, Baygon, Blatanex, Propyon, Suncide, Unden.

Acción: Insecticida.

Propiedades Químicas: De color blanco a canela en cristales, PF de 91 °C.

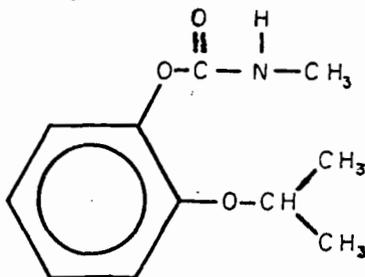
Inestable en medios alcalinos. Se cree compatible con la mayoría de insecticidas y fungicidas de uso común excepto los de naturaleza alcalina.

Soluble en agua cerca de 0.2 % a 25 °C, fácilmente soluble en la mayoría de solventes orgánicos polares.

Toxicidad: DL₅₀ oral aguda de 100-200 mg/Kg de peso en rata macho. En rata hembra la DL₅₀ oral aguda es de 70-130 mg/Kg de peso.

Aplicaciones: Es particularmente efectivo contra insectos que afectan al hombre y animales, como cucarachas, mosquitos y otros voladores. Se caracteriza por un derrive rápido, gran acción residual y efectivo ⁴².

Fórmula: Es sintetizado a partir de catecol.



Vías de Absorción: Puede penetrar al organismo por ingestión, inhalación y a través de la piel.

Acción Farmacológica: Causa inhibición reversible de la acetilcolinesterasa.

Se descompone rápidamente en el organismo.

Intoxicación: Los signos y síntomas son típicamente semejantes a los causados por los compuestos organofosforados, pero de duración más corta; comprende:

Incoordinación muscular, taquicardia y arritmia.

Tratamiento: Si el producto es ingerido, inducir al vómito y repetirlo hasta que sea claro. Administrar sulfato de atropina en dosis terapéuticas ⁴³.

PARAQUAT.

Nombre Químico: 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo ion; se presenta como una sal diclorada o sal dimetil sulfatada.

Nombre Común: Paraquat.

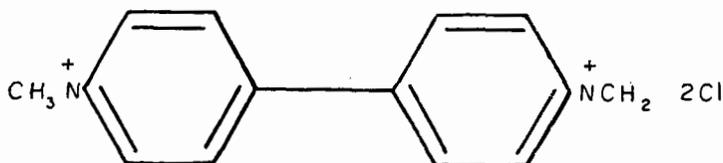
Otros Nombres: Cekuquat, Cris quat, Dextrone, Dexuron, Esgram, Gramonol, Gramoxon, Gramuron, Herbaxon, Herbaxone, Paracol, Pathclear, Pillarquat, Pillarxone.

Acción: Herbicida de contacto y disecante.

Propiedades Químicas: La sal diclorada es fácilmente soluble en agua, escasamente en alcohol, insoluble en hidrocarburos. Estable, excepto en condiciones alcalinas. Se absorbe y es rápidamente inactivado por partículas del suelo. Los cristales se descomponen a 300 °C.

Toxicidad: DL₅₀ oral aguda es de 150 mg/Kg de peso en rata. Se considera potente tóxico.

Fórmula: El Paraquat es sintetizado a partir de la piridina.



Tratamiento: Incluye la administración repetida de catárticos⁴². Cuando se ingieren grandes cantidades causa en el hombre progresiva y fatal neumonía⁴³.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Entre los plaguicidas de uso frecuente en la actualidad, se encuentran el Metamidofos, Baygon y Paraquat. Algunos de sus efectos tóxicos están bien definidos, pero se desconoce su acción sobre las células efectoras de la respuesta inmune. Por tanto se considera importante analizar este aspecto a nivel de la respuesta inmune celular, por medio de cultivos de linfocitos esplénicos murinos, en presencia de Concanavalina A y en concentraciones subtóxicas de estos plaguicidas.

HIPOTESIS.

Los plaguicidas Metamidofos, Baygon y Paraquat disminuyen la transformación blastoide de los linfocitos esplénicos murinos cultivados en presencia de Concanavalina A.

OBJETIVO.

Investigar el efecto de los plaguicidas Metamidofos, Baygon y Paraquat, sobre la síntesis de DNA en cultivos de linfocitos esplénicos murinos normales estimulados con Concanavalina A.

MATERIAL Y METODOS.

Reactivos.

Timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) (actividad específica de 6.7 Ci/uMol, New England Nuclear, Boston M. A.).

Concanavalina A (Con-A) (Gibco, C5275).

Medio Esencial Mínimo (MEM) (Gibco, 430-1600) adicionado al 5 % con Suero

Fetal de Ternera (SFT) (Gibco) inactivado y suplementado con: Penicilina

(100 UI/ml), Estreptomina (100 ug/ml), L-glutamina 2 mM, Piruvato 1 mM,

Aminoácidos no esenciales 0.1 mM y 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M.

Solución Salina Balanceada de Hanks (SSBH) adicionada con 100 UI de Penicilina

y 0.1 mg de Estreptomina /ml.

Líquido de centelleo: PPO (Merck, 2946) 2.5 g, POPOP (Sigma, P-3754)

0.4 g, Tolueno (Merck, 404168 N) 1000 ml.

Azul tripano (Sigma, T9520) al 0.4 %.

Plaguicidas.

Metamidofos (Tamaron 600, Bayer).

Baygon (Baygon C, Bayer).

Paraquat (Transquat, Transquímica).

Ratones.

Se utilizaron ratones hembras de tres meses de edad de la cepa BALB/c de 21-24 g de peso. Alojados en jaulas de polipropileno con cama de aserrín estéril, en habitaciones con temperatura constante de $22^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C. Se les proporcionó alimento comercial para roedores (Purina, México) y agua purificada para consumo voluntario.

TRANSFORMACION BLASTOIDE.

Obtención de linfocitos esplénicos murinos.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. En condiciones estériles se extrajo el bazo y se colocó en una caja de Petri estéril, con 10 ml de SSBH a 4° C. Se homogenizó el bazo con dos agujas dobladas acopladas a jeringas de 1 ml sin émbolo, en campana de flujo laminar (Veco). Posteriormente con una pipeta Pasteur estéril colocada en un pipeteador automático (Drummond Scientific Co. Broomall Pa. 19008) se disgregaron

con agitación lenta los grumos grandes. El líquido con las células de la caja de Petri se colocó en un tubo de ensaye 13 X 150 estéril. A la caja de Petri se le agregaron 5 ml de SSBH para remover las células residuales y colocarlas en el tubo de ensaye anterior. El tubo de ensaye se dejó en reposo por 5 minutos, en hielo, para que sedimentaran los restos tisulares. La suspensión celular se centrifugó a 1500 RPM por 10 minutos a 4° C. El sobrenadante se eliminó y el paquete celular se resuspendió en 15 ml de SSBH. Este procedimiento se realizó dos veces. El sobrenadante se descartó y el paquete se resuspendió en 5 ml de MEM (pH 7.2) suplementado y adicionado con SFT al 5 % estéril a 4° C. Esta suspensión se diluyó 1:100. Las células se contaron en cámara de Neubauer, se ajustaron a 5×10^6 células viables por ml de MEM. La viabilidad se determinó con azul tripano al 0.4 %.

Se determinó la dosis óptima de Con-A para la transformación blastoide en cultivos de linfocitos esplénicos murinos mediante una curva dosis-respuesta. La dosis óptima obtenida fue de 0.2 ug/0.1 ml de MEM para cada cultivo.

Cultivo de linfocitos.

Procedimiento: Los cultivos se realizaron de acuerdo con el método de Bradley L. M.⁴⁴ De los cultivos de cada ratón se hicieron 14 grupos de cultivos por cuadruplicado:

1. Linfocitos esplénicos más 0.2 ml de MEM.
2. Linfocitos esplénicos más MEM más 0.2 ug de Con-A.
3. Linfocitos esplénicos más 0.2 ug de Con-A más el plaguicida correspondiente

(Metamidofos, Baygon y Paraquat) en las siguientes concentraciones:

0.1, 1.0, 10 y 20 ug/0.1 ml de MEM. Este grupo lo formaron doce subgrupos (del 3 al 14) que correspondieron a los tres plaguicidas estudiados, agregados a los cultivos en cuatro concentraciones diferentes.

Se colocaron 5×10^5 linfocitos en cada pozo de las placas para cultivo (de 96 pozos, Nunclon, Delta. Inter-med) en un volumen de 0.1 ml de MEM.

Se agregaron a los cultivos estimulados 0.2 ug de Con-A en 0.1 ml de MEM.

Los cultivos se incubaron a 37° C en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 60 %

de humedad. A las 48 horas de incubación los cultivos se pulsaron con 1 uCi de $^3\text{H-TdR}/10 \text{ ul}$, en campana de flujo laminar. Los cultivos se incubaron nuevamente por 18-24 horas.

Cosecha de los cultivos.

A las 72 horas de incubación se retiró la placa de cultivo de la estufa y se colocó en hielo triturado. Las células de cada pozo se resuspendieron cuidadosamente por agitación con una pipeta Pasteur corta, colocada en el pipeteador automático. Las células de cada pozo se depositaron en rectángulos de papel filtro del N° 2 de 4 X 3 cm (Ederol). Los papeles se doblaron a la mitad y se identificaron con lápiz. Cada papel fue sostenido sobre una placa de cellogel por medio de una aguja. Se hizo un lavado de cada pozo y las células residuales se depositaron en el papel correspondiente. Los papeles se dejaron secar al aire. Ya con las células adheridas y completamente secos, se lavaron dos veces consecutivas por inmersión en ácido tricloroacético (Baker Analyzed, 0414) al 5 % a 4° C en agitación constante por 5 minutos. Inmediatamente se lavaron por inmersión en metanol absoluto (Baker Analyzed,

9070-60) a 4° C. Se dejan secar. Se recortaron en pequeños trozos y se colocaron en viales. A cada vial se le agregaron 5 ml de líquido de centelleo. Inmediatamente los viales se colocaron en la oscuridad en cuarto frío por 30 minutos. Después se colocaron en el contador de centelleo líquido (Packard) para la determinación del material radiactivo incorporado. Los resultados se expresaron en cuentas por minuto (cpm).

Pruebas de viabilidad.

La viabilidad de los linfocitos se determinó por medio de la exclusión del colorante azul tripano al 0.4 %. Las condiciones de los cultivos fueron las mismas que las usadas para los experimentos de transformación blastoide, con la excepción de que no se incluyó el pulso de $^3\text{H-TdR}$ a los cultivos. Las pruebas se realizaron para cada uno de los catorce grupos.

Procedimiento.

Cada cultivo se homogenizó cuidadosamente con una pipeta de 1 ml estéril colocada en el pipeteador automático (en campana de flujo laminar), se tomó

0.1 ml de la suspensión de linfocitos, en un tubo estéril con 0.1 ml de azul tripano. Se mezcló perfectamente la suspensión y se depositó una alícuota en la cámara de Neubauer. Se contaron 100 células para cada grupo en microscopio de luz (Zeiss) y se diferenciaron las células viables, que no incorporaron el colorante, de las no viables que se tiñeron de color azul. Las pruebas se realizaron a las 24, 48 y 72 horas de cada cultivo.

Análisis de los resultados.

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de la prueba "t" de "Student".

RESULTADOS.

Pruebas de viabilidad.

La viabilidad de los linfocitos esplénicos murinos cultivados por 24 horas, se muestra en la Tabla 1 y Figura 1. En ellas se observa que los linfocitos cultivados sin estímulo mitogénico (grupo 1), tuvieron una viabilidad del 84 ± 13 %. Los cultivos estimulados con Con-A (grupo 2) tuvieron 88 ± 6 % de viabilidad. Los cultivos de linfocitos estimulados con Con-A y que además se les agregó Metamidofos (grupos 3-6), mostraron una viabilidad disminuída, en comparación con los cultivos que no estuvieron en presencia de plaguicida (grupo 2). Esta disminución fue significativa solo en los grupos 5 y 6. Los cultivos de los grupos 7-10 que estuvieron en contacto con el Baygon, mostraron una disminución estadísticamente significativa en las cuatro concentraciones empleadas. El efecto fue más notorio cuando se agregaron 10 y 20 ug de Baygon. En relación con los grupos del 11 al 14 que se cultivaron en presencia de Paraquat, sólo mostraron disminución significativa (p 0.025 y 0.001), cuando se agregaron respectivamente 1 y 20 ug de este plaguicida.

TABLA 1. VIABILIDAD DE LOS LINFOCITOS ESPLENICOS MURINOS ESTIMULADOS CON CON-A CULTIVADOS EN PRESENCIA DE PLAGUICIDAS DURANTE 24 HORAS.

Grupos n=3	Plaguicida ug/0.1 ml	% de Viabilidad \bar{x} \pm DE		Prueba "t"	"p"
1.	-----	84	13	2 vs 1	NS
2.	Con-A	88	6		
METAMIDOFOS					
3.	0.1	72	9	2 vs 3	NS
4.	1.0	63	4	2 vs 4	<0.005
5.	10.0	63	21	2 vs 5	NS
6.	20.0	65	18	2 vs 6	NS
BAYGON					
7.	0.1	55	12	2 vs 7	<0.025
8.	1.0	39	17	2 vs 8	<0.010
9.	10.0	42	7	2 vs 9	0.001
10.	20.0	13	5	2 vs 10	0.001
PARAQUAT					
11.	0.1	79	14	2 vs 11	NS
12.	1.0	68	7	2 vs 12	<0.025
13.	10.0	58	23	2 vs 13	NS
14.	20.0	23	8	2 vs 14	0.001

n: Número de ratones.

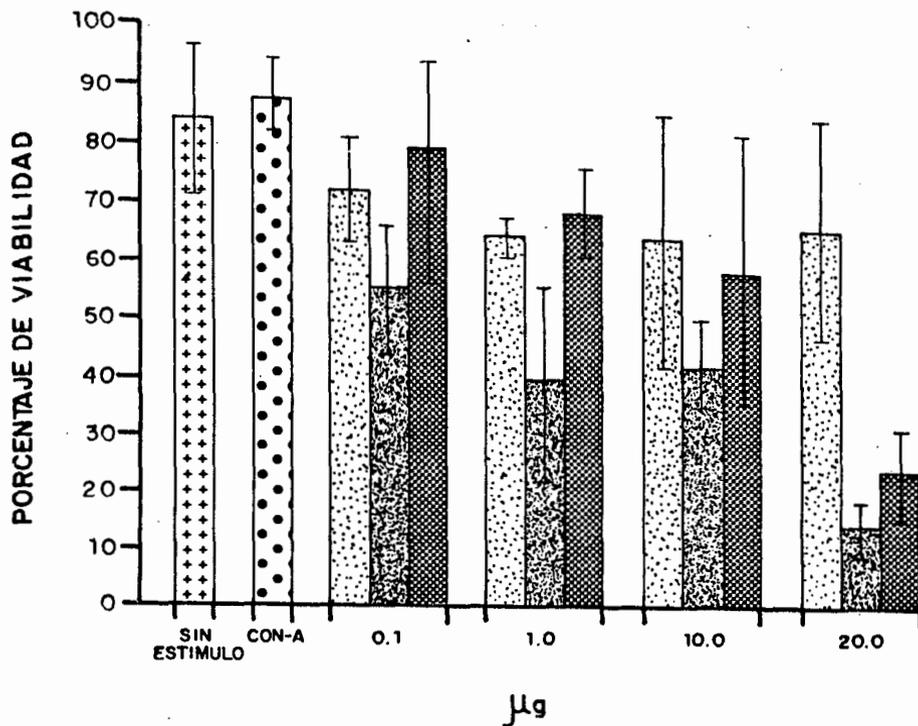
\bar{x} : Promedio.

DE: Desviación Estándar.

"p": Probabilidad.

NS: No significativo.

Figura 1.— Viabilidad de los linfocitos murinos cultivados por 24 horas, estimulados con Con-A , en presencia de Metamidofos , Baygon , y Paraquat .



En la Tabla 2 y Figura 2, se muestra la viabilidad de los linfocitos esplénicos murinos cultivados por 48 horas. Se observa que los linfocitos cultivados sin estímulo mitogénico (grupo 1), tuvieron una viabilidad del $58 \pm 6 \%$. En los cultivos con Con-A (grupo 2) la viabilidad fue del $60 \pm 4 \%$. Los cultivos de linfocitos estimulados con Con-A y que además se les agregó Metamidofos (grupos 3-6), presentaron una viabilidad significativamente disminuída ($p < 0.005$ y 0.001) los grupos 5 y 6 en comparación con los cultivos que no estuvieron en contacto con plaguicidas (grupo 2). Los cultivos de los grupos 7-10 que estuvieron en presencia de Baygon presentaron disminución en la viabilidad. En los grupos 8, 9 y 10 la disminución fue estadísticamente significativa ($p < 0.050$, 0.005 y 0.001). El fenómeno fué más claro en el grupo 10, donde se agregaron 20 ug de Baygon. En los grupos del 11 al 14 que se cultivaron en presencia de Paraquat, sólo presentaron disminución estadísticamente significativa $p < 0.025$ y 0.001 los grupos 13 y 14, en los que el plaguicida tuvo una concentración de 10 y 20 ug respectivamente.

En relación con la viabilidad de los linfocitos esplénicos murinos cultivados

TABLA 2. VIABILIDAD DE LOS LINFOCITOS ESPLENICOS MURINOS ESTIMULADOS CON CON-A CULTIVADOS EN PRESENCIA DE PLAGUICIDAS DURANTE 48 HORAS.

Grupos n=3	Plaguicida ug/0.1 ml	% de Viabilidad \bar{x} \pm DE		Prueba "t"	"p"
1.	-----	58	6	2 vs 1	NS
2.	Con-A	60	4		
METAMIDOFOS					
3.	0.1	61	21	2 vs 3	NS
4.	1.0	59	14	2 vs 4	NS
5.	10.0	32	7	2 vs 5	<0.005
6.	20.0	28	4	2 vs 6	0.001
BAYGON					
7.	0.1	67	7	2 vs 7	NS
8.	1.0	43	11	2 vs 8	0.050
9.	10.0	32	7	2 vs 9	<0.005
10.	20.0	11	6	2 vs 10	0.001
PARAQUAT					
11.	0.1	60	14	2 vs 11	NS
12.	1.0	62	17	2 vs 12	NS
13.	10.0	34	13	2 vs 13	0.025
14.	20.0	29	4	2 vs 14	0.001

n: Número de ratones.

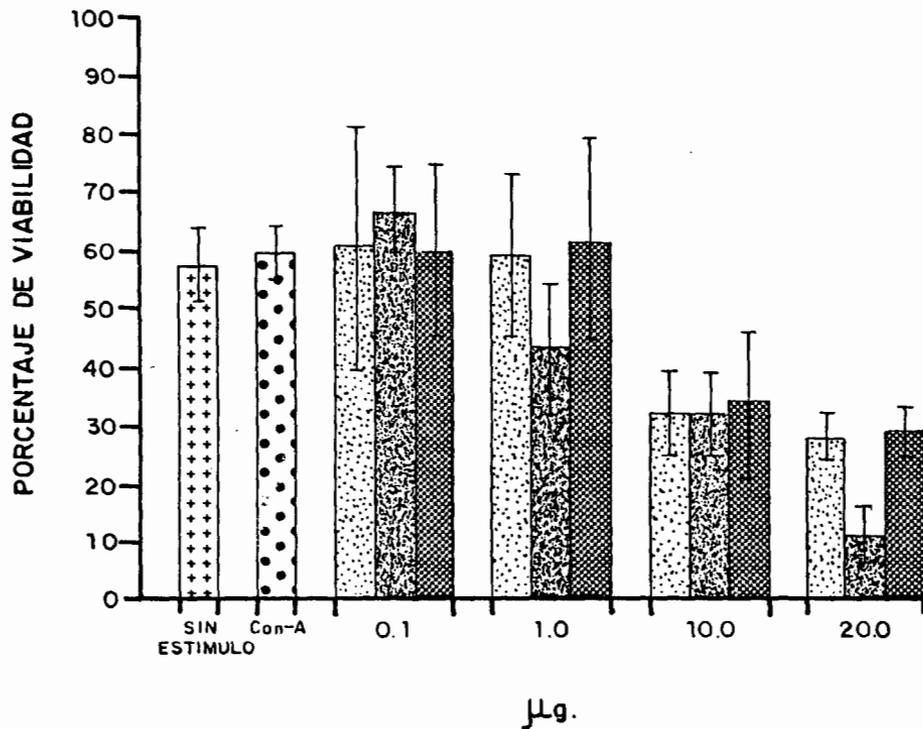
\bar{x} : Promedio.

DE: Desviación Estándar

"p": Probabilidad.

NS: No significativo.

Figura 2.- Viabilidad de los Linfocitos murinos cultivados por 48 horas, estimulados con Con-A , en presencia de Metamidofos , Baygon  y Paraquat .



por 72 horas, los resultados se muestran en la Tabla 3 y Figura 3. Los linfocitos cultivados sin estímulo mitogénico (grupo 1), presentaron una viabilidad del 45 ± 9 %. En los cultivos de linfocitos estimulados con Con-A (grupo 2) la viabilidad fue de 68 ± 5 %. Los linfocitos estimulados con Con-A a los que además se les agregó Metamidofos (grupos 3-6) mostraron disminución de la viabilidad estadísticamente significativa los grupos 3, 5 y 6 (p 0.0025, 0.005 y 0.050). Los cultivos de los grupos 9 y 10 que estuvieron en contacto con 10 y 20 ug de Baygon por 72 horas, mostraron una disminución estadísticamente significativa (p 0.001). Entre los grupos del 11 al 14 que se cultivaron en presencia de Paraquat, sólo los grupos 13 y 14 tuvieron disminución significativa de la viabilidad p 0.025 y 0.005. A estos cultivos se les agregaron 10 y 20 ug de Paraquat respectivamente.

Entre los plaguicidas empleados, el compuesto que resultó más tóxico sobre la viabilidad de los linfocitos murinos cultivados, fue el Baygon. Aunque en algunos grupos de cultivos (7 al 10) que estuvieron expuestos al Baygon durante 24, 48 y 72 horas, no se presentó disminución de la viabilidad

TABLA 3. VIABILIDAD DE LOS LINFOCITOS ESPLENICOS MURINOS ESTIMULADOS CON CON-A CULTIVADOS EN PRESENCIA DE PLAGUICIDAS DURANTE 72 HORAS.

Grupos n=3	Plaguicida ug/0.1 ml	% de Viabilidad		Prueba "t"	"p"
		\bar{x}	\pm DE		
1.	-----	45	9	2 vs 1	0.005
2.	Con-A	68	5		
	METAMIDOFOS				
3.	0.1	48	7	2 vs 3	<0.025
4.	1.0	54	9	2 vs 4	NS
5.	10.0	36	9	2 vs 5	0.005
6.	20.0	38	19	2 vs 6	0.050
	BAYGON				
7.	0.1	73	11	2 vs 7	NS
8.	1.0	68	5	2 vs 8	NS
9.	10.0	22	6	2 vs 9	0.001
10.	20.0	13	2	2 vs 10	0.001
	PARAQUAT				
11.	0.1	79	4	2 vs 11	NS
12.	1.0	64	4	2 vs 12	NS
13.	10.0	48	7	2 vs 13	<0.025
14.	20.0	37	5	2 vs 14	<0.005

n: Número de ratones.

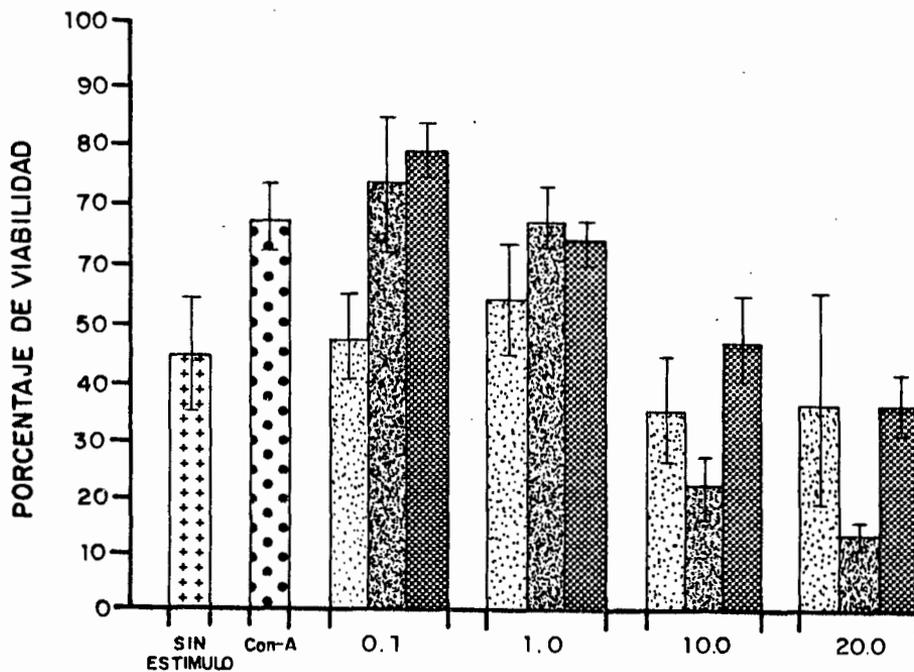
\bar{x} : Promedio.

DE: Desviación Estándar.

"p": Probabilidad.

NS: No significativo.

Figura 3.- Viabilidad de los Linfocitos murinos cultivados por 72 horas, estimulados con Con-A , en presencia de Metamidofos , Baygon , y Paraquat. .



μg.

celular. Esto ocurrió en el grupo 7 a las 48 horas de cultivo y los grupos 7 y 8 a las 72 horas en los cuales la concentración del Baygon fue de 0.1 y 1.0 ug respectivamente. En cambio a las 24 horas, en todas las concentraciones el Baygon afectó la viabilidad celular (grupos 7-10). En los grupos 7 y 11 de los cultivos a las 72 horas se observó un aumento en la viabilidad en relación con el resto de los grupos de cultivo con plaguicidas y sin ellos.

Transformación Blastóide.

En las Tablas 4, 5 y 6 y en la Figura 4, se muestran los resultados de la incorporación de $^3\text{H-TdR}$ por los linfocitos esplénicos murinos, estimulados con Con-A y en presencia de los plaguicidas Metamidofos, Baygon y Paraquat. En todos los casos en donde los plaguicidas se agregaron en concentraciones de 10 y 20 ug, se observó disminución de la incorporación de $^3\text{H-TdR}$, al compararse con los resultados de los cultivos del grupo 2 que recibió el estímulo de Con-A, en ausencia de plaguicida. Cuando se usó Metamidofos en los grupos 5 y 6, la diferencia tuvo un valor estadístico de p 0.02 y 0.01.

TABLA 4. INCORPORACION DE $^3\text{H-TdR}$ POR LINFOCITOS ESPLENICOS MURINOS ESTIMULADOS CON CON-A, EN PRESENCIA DEL PLAGUICIDA METAMIDOFOS.

Grupos n=4	Metamidofos ug/0.1 ml	\bar{x} cpm ± DE	Prueba "t"	"p"
1.	-----	3,170 1,159	2 vs 1	0.001
2.	Con-A	71,129 11,031		
3.	0.1	69,621 9,447	2 vs 3	NS
4.	1.0	68,546 20,524	2 vs 4	NS
5.	10.0	39,978 16,285	2 vs 5	0.025
6.	20.0	19,882 13,980	2 vs 6	0.010

n: Número de ratones.

\bar{x} : Promedio.

DE: Desviación Estándar.

"p": Probabilidad.

cpm: Cuentas por minuto.

NS: No significativo.

TABLA 5. INCORPORACION DE $^3\text{H-TdR}$ POR LINFOCITOS ESPLENICOS MURINOS ESTIMULADOS CON CON-A, EN PRESENCIA DEL PLAGUICIDA BAYGON.

Grupos n=4	Baygon ug/0.1 ml	\bar{x} cpm \pm DE	Prueba "t"	"p"
1.	-----	3,170 1,159	2 vs 1	0.001
2.	Con-A	71,129 11,131		
7.	0.1	68,085 15,687	2 vs 7	NS
8.	1.0	55,148 18,386	2 vs 8	NS
9.	10.0	1,760 320	2 vs 9	0.001
10.	20.0	1,828 445	2 vs 10	0.001

n: Número de ratones.

\bar{x} : Promedio.

DE: Desviación Estándar.

"p": Probabilidad.

cpm: Cuentas por minuto.

NS: No significativo.

TABLA 6. INCORPORACION DE $^3\text{H-TdR}$ POR LINFOCITOS ESPLENICOS MURINOS ESTIMULADOS CON CON-A, EN PRESENCIA DEL PLAGUICIDA PARAQUAT.

Grupos n=4	Paraquat ug/0.1 ml	\bar{x} cpm \pm DE	Prueba "t"	"p"
1.	-----	3,170 1,159	2 vs 1	0.001
2.	Con-A	71,129 11,031		
11.	0.1	71,794 16,631	2 vs 11	NS
12.	1.0	74,017 12,994	2 vs 12	NS
13.	10.0	16,253 4,124	2 vs 13	0.001
14.	20.0	1,582 316	2 vs 14	0.001

n: Número de ratones.

\bar{x} : Promedio.

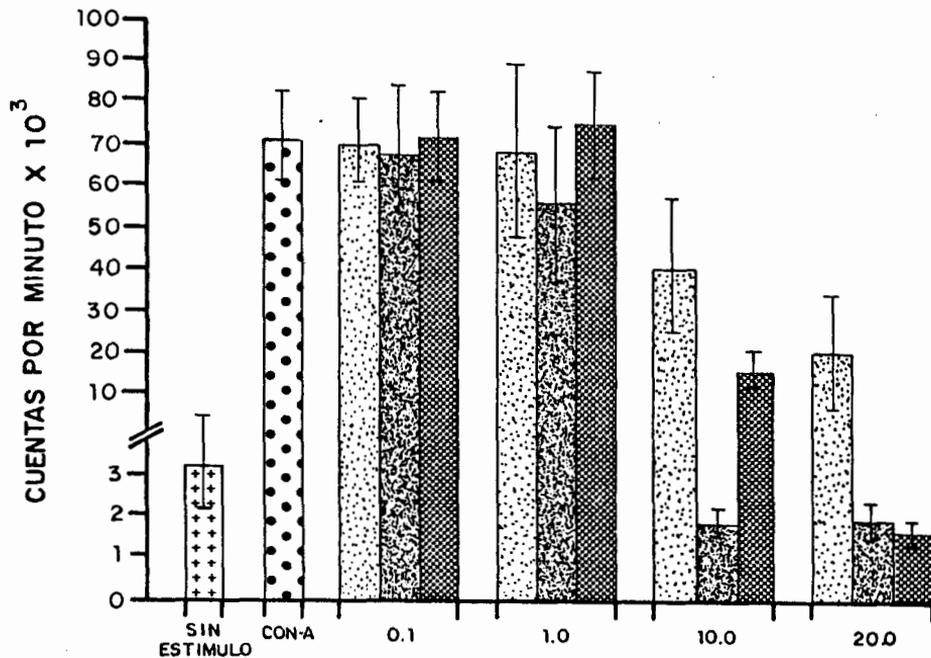
DE: Desviación Estándar.

"p": Probabilidad.

cpm: Cuentas por minuto.

NS: No significativo.

Figura 4.- Incorporación de $^3\text{HtdR}$ por linfocitos murinos estimulados en cultivo por Con-A, , en presencia de los plaguicidas Metamidofos , Baygon , Paraquat. .



Con el Baygon en los grupos 9 y 10 la diferencia tuvo un valor de $p < 0.001$. Al igual que cuando se agregó Paraquat en los grupos 13 y 14. El Metamidofos y Baygon agregados a los cultivos de linfocitos en concentraciones de 0.1 y 1.0 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ provocaron disminución en la incorporación de $^3\text{H-TdR}$, la disminución no fue significativa. El Paraquat en las mismas concentraciones originó un incremento en la incorporación de $^3\text{H-TdR}$, este efecto fue más notorio cuando se agregó 1.0 μg .

DISCUSION.

Los plaguicidas Metamidofos, Baygon y Paraquat en concentraciones de 10 y 20 ug, tuvieron un efecto citotóxico sobre los linfocitos murinos estimulados en cultivo por Con-A. Dicho efecto se observó por la disminución en la viabilidad celular después de 24, 48 y 72 horas de iniciados los cultivos. En la mayoría de los casos la disminución de la viabilidad fue estadísticamente significativa, al compararse con los cultivos estimulados con Con-A en ausencia de plaguicida. Estos resultados concuerdan con los informados por Walter y cols ¹⁶ . quienes encontraron que el insecticida Malatión agregado en cultivos de linfocitos humanos en concentraciones de 50 y 70 ug/ml indujo disminución significativa en la viabilidad de los linfocitos en cultivo.

El Metamidofos, Baygon y Paraquat disminuyeron la incorporación de ³H-TdR por los linfocitos esplénicos murinos estimulados en cultivo con Con-A cuando fueron agregados en concentración de 10 y 20 ug. La disminución fue mucho más notoria cuando se empleó el Baygon a estas concentraciones, en el grupo 9 (1,760 ± 320 cpm) y en el grupo 10 (1,828 ± 445 cpm) en comparación

con 71,129 cpm que fueron los resultados del grupo 2 cuyos linfocitos fueron estimulados con Con-A. Así mismo al agregar 20 ug de Paraquat se encontró también una importante disminución de la incorporación de $^3\text{H-TdR}$ en el grupo 14 ($1,528 \pm 316$ cpm). Un resultado similar fue descrito por Czajkowska y cols.¹⁵ quienes estudiaron el efecto del Malati6n sobre la sntesis del DNA en cultivos de linfocitos humanos estimulados con PHA.

El Paraquat en concentraciones de 0.1 y 1.0 ug agregados a los cultivos de linfocitos ocasionaron un ligero incremento en la sntesis de DNA. Este resultado es similar al encontrado por Czajkowska y cols. quienes demostraron que dosis de 10 ug/ml adicionado a los cultivos de linfocitos provoc6 un incremento en la sntesis de DNA. Chung y cols.⁴⁵ estudiaron el efecto de dosis bajas de los insecticidas DDT y Dieldrin sobre la sntesis de 6cidos nucleicos en c6lulas HeLaS. Demostraron que dosis de 0.5-10 ppm incrementaron el contenido total de DNA y RNA, este efecto lo atribuyen a que dichos insecticidas en bajas dosis probablemente estimulan las enzimas participantes en la sntesis de esas macromol6culas mientras que altas dosis la inhiben.

En cambio el Metamidofos y el Baygon en concentraciones de 0.1 y 1.0 ug no aumentaron la síntesis de DNA. Esto probablemente se debe a las características propias de cada plaguicida.

En este trabajo se observó que la exposición de los linfocitos esplénicos murinos de ratones normales a concentraciones crecientes de los plaguicidas Metamidofos, Baygon y Paraquat, disminuyeron significativamente su transformación blastoide al cultivarse en presencia de Con-A. Este fenómeno aparentemente se debió más al daño en la viabilidad que al trastorno en la prueba de transformación blastoide, puesto que la disminución que se observó en esta propiedad de los linfocitos, se presentó conforme ocurrió la muerte celular. Por lo tanto debe tomarse este resultado como una prueba más de la toxicidad de los plaguicidas, lo que de alguna manera indica que la exposición a ellos puede ocasionar trastornos importantes sobre las células efectoras de la respuesta inmune, como son los linfocitos T. Aunque existen reportes en los que se refiere un efecto supresor de algunos plaguicidas sobre las células efectoras de la respuesta inmune de los animales expuestos tanto

in vivo^{25,27,28} como en experimentos in vitro³³ a diversos plaguicidas.

CONCLUSIONES.

Los plaguicidas Metamidofos, Baygon y Paraquat tuvieron un efecto tóxico sobre los linfocitos esplénicos murinos cultivados in vitro en presencia de Con-A.

La viabilidad y la incorporación de H-TdR de los linfocitos murinos resultaron disminuídas significativamente cuando se agregaron a los cultivos los plaguicidas Metamidofos, Baygon y Paraquat, en concentraciones de 10 y 20 ug.

El plaguicida más tóxico fue el Baygon.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Curry-Lindahl K. Conservar para sobrevivir. 1ª. Ed. Diana pp. 288-297, 1974.
2. Salmeron De D.J., Salmeron De D.J. Intoxicaciones producidas por pesticidas. 2ª. Ed. M.A. pp. 13-80, 1977.
3. Cremlyn R. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. 1ª. Ed. Limusa pp. 11-332, 1982.
4. Parker J.S. Control de plagas de plantas y animales. Manejo y control de plagas de insectos. 1ª. Ed. Limusa vol.3 pp. 379-454, 1978.
5. Arata A.A. El uso de plaguicidas en la agricultura y la salud pública. El punto de vista de la ecología humana. 139:59, 1984.
6. Proudfoot A.T., Stewart M.S., Levitt T., Widdop B. Paraquat poisoning: significance of plasma-paraquat concentrations. Lancet II:330-332, 1979.
7. Addo E., Poon-King T. Leucocyte suppression in treatment of 72 patients with paraquat poisoning. Lancet II:1117-1120, 1986.
8. Moody C.S., Hassan H.M. Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79:2855-2859, 1982.

9. Giri S.N., Hollinger M.A. The inhibitory effect of paraquat on histamine and isoproterenol induced changes of cyclic nucleotides in rat lungs slices. *Experientia* 35:1219-1220, 1979.
10. Barabás K., Szabó L., Matkovics B., Berencsi G. Effects of paraquat on peroxide metabolism enzymes and lipid peroxidation in the rat. *Gen. Pharmac.* 15:133-137, 1984.
11. Raffin T.A., Simon L.M., Douglas W.H.J., Theodore J., Robin E.D. The effects of variable O_2 tension and exogenous superoxide dismutase on type II pneumocytes exposed to paraquat. *Lab. Invest.* 42:205-208, 1980.
12. Andersen R.A., Ingebrigtsen K., Nafstad I., Mikalsen A. Biochemical characteristics of rat superoxide dismutase and the effect caused by paraquat injection on the enzyme activity in various tissues. *Gen. Pharmac.* 15:205-209, 1984.
13. Ingebrigtsen K., Nafstad I., Andersen R.A. Distribution and transplacental transfer of paraquat in rats and guinea-pigs. *Gen. Pharmac.* 15:201-204, 1984.
14. Gardiner T.H., Schanker L.S. Effect of paraquat-induced lung damage on permeability of rat lung to drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151:288-292, 1976.

15. Czajkowska A., Walter Z. Effect of malathion on nucleic acid synthesis in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Hum. Genet.* 56:189-194, 1980.
16. Walter Z., Czajkowska A., Lipecka K. Effect of malathion on the genetic material of human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin (PHA). *Hum. Genet.* 53:375-381, 1980.
17. Grover I.S., Malhi P.K. Genotoxic effects of some organophosphorus pesticides. I. Induction of micronuclei in bone marrow cells in rat. *Mutat. Res.* 155:131-134, 1985.
18. Dulout M.C., Pastori M.C., Olivero O.A. Malathion-induced chromosomal aberrations in bone-marrow cells of mice: dose-response relationships. *Mutat. Res.* 122:163-167, 1983.
19. Abou-Donia M.B. Organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21:511-548, 1981.
20. Fumio M. Toxicology of insecticides. Dynamics of insecticide movement in the animal body. Plenum. Press. 503:7, 1975.
21. Casida J.F. Insecticide Biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 278:42, 1973.
22. Abtobkhodzhaeva N.M. Effect of the pesticide kaiakhop on immune

reaktsii organizma. Gigat. Sanit. 2:77,1983.

23. Jackson J.A., Chart I.S., Ganderson J.N., Garder R. Pirimicarb induced immune haemolytic anemia in dogs. Scand. J. Haematol. 19:360-365, 1977.
24. Laurence J. Sida y sistema inmunitario. Investigación y ciencia. núm. 113 Feb.:44-54, 1986.
25. Tiafenbach B., Lange P. Studies on the action of dimethoate on the immune system. Arch. Toxicol. J. 4:167, 1980.
26. Subba Rao D.S.V., Glick B. Pesticide effects on the immune response and metabolic activity and chicken lymphocytes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154:27-29, 1977.
27. Street J.C., Sharma R.P. Alteration of induced cellular and humoral immune responses by pesticides and chemicals of enviromental concern: quantitative studies of immunosuppression by DDT, aroclor 1254, carbaryl, carbofuran and methylparathion. Toxicol. Appl. Pharmacol. 32:587-602, 1975.
28. Allen A.L., Koller L.D., Pollock G.A. Effect of toxaphene exposure on immune responses in mice. Vet. Med. J. Toxicol. Environ. Health. 11:1, 1983.

29. Trackzyk Z., Blaton O., Arczynska E., Wit B., Sawicki W., Gorski T., Rudowski W. Effect of chlorinated pesticides on leukocyte migration in vitro. Acta Med. Pol. 19(4):451-459, 1978.
30. Roux F., Treich I., Brun C., Desoize B., Fournier E. Effect of lindane on human lymphocyte responses to phytohemagglutinin. Biochem. Pharmacol. 28:2419-2426, 1979.
31. Rodgers K.E., Imamura T., Devens B.H. Effects of subchronic treatment with 0,0,S-trimethyl phosphorothioate on cellular and humoral immune response systems. Toxicol. Appl. Pharmacol. 81:310-318, 1985.
32. Thomas I.K. and Imamura T. Immunosuppressive effect of an impurity of malathion: inhibition of murine T-and-B lymphocyte responses by 0,0,S-trimethyl phosphorothioate. Toxicol. Appl. Pharmacol. 83:456-464, 1986.
33. Stelzer K.J., Gordon M.A. Effects of pyrethroids on lymphocyte mitogenic responsiveness. Res. Commun. Chem. Phatol. Pharmacol. 46:137-150, 1984.
34. Stites D.P., Stobo J.D., Fudenberg H.H., Wells J.V. Inmunología básica y clínica. 5ª. Ed. Manual Moderno pp. 13-373, 1985
35. Barret J.T. Inmunología: Inmunoquímica e inmunobiología. 4ª. Ed. Interamericana pp. 85, 1985.

36. Dwyer J.M., Johnson C.H. The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 46:237-249, 1981.
37. Biberfeld P. Endocytosis and lysosome formation in blood lymphocytes transformed by PHA. *J. Ultrstruct. Res.* 37:41, 1971.
38. Taylor R.B., Deffus W.P.H., Raff M.C. and De Petris S. Redistribution and pinocytosis of lymphocyte immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature New. Biol.* 66:225, 1971.
39. Lehninger A.L. *Bioquímica*. 2ª. Ed. Omega pp. 1008-1009, 1983.
40. Jean-Francois B. *Inmunología*. 1ª. Ed. Limusa pp. 57-75, 1984.
41. Pegoraro L. and Berrengo M.G. Thimidine kinase, deoxycytidine kinase and deoxycytidylate deaminase activities in PHA stimulated human lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* 68:293, 1971.
42. Willoughby O. *Fram Chemicals handbook*. Meister Public Shing Company, 1983.
43. Velez L.E. *FITO FILO*. Primeros auxilios y tratamientos de envenenamientos por plaguicidas. 2ª. Ed. Dirección General de Sanidad Vegetal, S.A.R.H. pp. 47-101, 1979.

44. Bradley L. Cell proliferation. En Mishel B.B., Shiigi S.M. (eds.) Selected methods in cellular immunology. W.H. Freeman Co. pp. 153-161, 1980.
45. Chung R.A., Huang I-L.O., Brown R.W. Studies of DNA, RNA and protein synthesis in HeLa S cells exposed to DDT and dieldrin. J. Agric. Food. Chem. 15:497-500, 1967.