



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

VALORACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO INDUCIDO POR EL HERBICIDA DIURÓN A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS Y EL ENSAYO COMETA EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RICARDO IVÁN PERAZA VEGA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRÁN
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

M. EN C. MARIA EUGENIA HERES Y PULIDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

MÉXICO, D. F., NOVIEMBRE DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/690/15

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de septiembre de 2015** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **PERAZA VEGA RICARDO IVÁN** con número de cuenta **301249070** con la tesis titulada **"Valoración del daño genotóxico inducido por el herbicida diuron a través de la prueba de mutación y recombinación somáticas y el ensayo cometa en *Drosophila melanogaster*"**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRÁN:**

Presidente: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
Vocal: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Secretario: DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAÍZ
Suplente: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA
Suplente: DRA. MAHARA ANGÉLICA VALVERDE RAMÍREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de octubre de 2015

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/grf*

Agradecimientos:

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme llevar a cabo la Maestría en el campo de Biología Experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a través de una beca (No. de becario 292749) para realizar mis estudios de Maestría en el programa del Posgrado en Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutor por sus observaciones, apoyo e interés en este trabajo:

- Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán (Tutora)
 - Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz
 - M. en C. María Eugenia Heres y Pulido

Agradecimientos a título personal:

Agradezco de manera especial a las profesoras del Laboratorio de Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias; a la Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán por haber aceptado ser mi tutora en este trabajo y por todo su apoyo durante todos estos años, a la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz por su valioso apoyo y por haberme permitido unirme al equipo de trabajo del laboratorio desde la licenciatura. A la M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez por haber sido tutora de mi tesis de licenciatura por medio de la cual puede obtener el título de Biólogo para ingresar a la Maestría y por ayudarme en la obtención de sangre de donde obtuve los linfocitos empleados en una parte de este trabajo.

Le agradezco a la M. en C. María Eugenia Heres y Pulido por sus precisas observaciones, comentarios e interés en mi tesis. Al Dr. Emilio Rojas y la Dra. Mahara Valverde por su ayuda en la realización del ensayo cometa al igual que la Dra. María Alexandra Rodríguez Sastre. También le agradezco a la M. en C. Irma Elena Dueñas García por sus valiosos comentarios sobre mi trabajo.

Finalmente quiero agradecer a las personas más importantes en mi vida y sin quienes este logro no hubiera sido posible: a mis padres, Ricardo y Silvia, a mi hermana Karen y a mi novia Claudia, gracias por su comprensión y ayuda incondicional desde el comienzo hasta el final de este trabajo.

Dedicado a la memoria de mi mamá.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Genotoxicidad y mutagenicidad	3
Plaguicidas	4
Toxicidad de plaguicidas	5
Biotransformación y bioactivación de xenobióticos	9
Biotransformación de xenobióticos en plantas	13
Biotransformación de xenobióticos en insectos	14
Herbicidas	16
Diurón	19
Biotransformación del diurón	20
Objetivos	23
Antecedentes	24
Genotoxicidad y carcinogenicidad del diurón	24
Ensayo SMART	25
Ensayo cometa	30
Justificación	31
Hipótesis	32
Materiales y Métodos	32
Compuestos	32
Concentraciones	32
Tratamientos	33
Ensayo SMART	34
<i>Cruzas</i>	34
<i>Tratamiento directo</i>	34
<i>Obtención del extracto acuoso</i>	34
<i>Tratamiento con extracto</i>	35
<i>Elaboración de laminillas</i>	35

<i>Análisis en el microscopio</i>	36
<i>Análisis estadístico</i>	36
Ensayo cometa	37
<i>Cepas utilizadas</i>	37
<i>Concentraciones</i>	37
<i>Tratamientos</i>	38
<i>Disección de larvas</i>	38
<i>Elaboración de laminillas</i>	38
<i>Lisis alcalina</i>	39
<i>Electroforesis</i>	39
<i>Neutralización</i>	39
<i>Tinción y Visualización</i>	39
<i>Análisis estadístico</i>	40
Resultados	42
Toxicidad del diurón	42
Ensayo SMART en ala	43
Ensayo cometa	48
Análisis de correlación	53
Discusión	54
<i>SMART en ala</i>	54
<i>Ensayo cometa</i>	56
<i>Correlación entre los resultados de ambos ensayos</i>	58
Conclusiones	60
Referencias	61

Resumen

El objetivo principal de este trabajo fue el de determinar la genotoxicidad del herbicida diurón en células somáticas de *Drosophila melanogaster* por medio de la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) y del ensayo cometa con células de discos imaginales de las alas. De igual manera, para determinar la relación entre el metabolismo del diurón y su nivel de genotoxicidad se emplearon dos tipos de larvas con diferentes capacidades metabólicas. Para el ensayo SMART, un tipo de larvas se obtuvo a partir de la cruce de hembras de la cepa *flr³* con machos de la cepa *mwh* (cruza estándar: ST), el otro tipo se obtuvo de la cruce de hembras de la cepa *ORR;flr³* con machos *mwh* (cruza de alta bioactivación: HB). La cruce HB mejora la sensibilidad del ensayo SMART para la detección de promutágenos que requieren ser activados por los citocromos P450 (CYPs). Para el ensayo cometa se usaron igualmente dos tipos larvas, un tipo proveniente directamente de la cepa *flr³* y el otro de la cepa *ORR;flr³*. Las larvas de ambos ensayos fueron expuestas de manera crónica a diferentes concentraciones de diurón junto con los grupos testigo concurrentes. Asimismo, se utilizó un extracto acuoso de raíces de maíz tratadas con diferentes concentraciones del herbicida para determinar si los productos del metabolismo del diurón en la planta presentaban propiedades genotóxicas. De esta manera, la evaluación de la genotoxicidad del diurón fue llevada a cabo desde tres enfoques; (1) administración directa de diferentes concentraciones de diurón a larvas de ambas cruces (ensayo SMART); (2) administración de extractos acuosos a larvas de ambas cruces (ensayo SMART); (3) administración directa de diferentes concentraciones de diurón a larvas de ambas cepas (ensayo cometa).

Se registró un efecto genotóxico por parte del diurón bajo los tres enfoques empleados. En el ensayo SMART, cuando el diurón fue administrado de manera directa, se observó un nivel de genotoxicidad menor en la cruce HB en comparación con la cruce ST, lo cual sugiere que un metabolismo eficiente del diurón puede disminuir su genotoxicidad. Cuando se administró el extracto de raíces de maíz tratadas con diurón, se obtuvo una respuesta positiva similar en ambas cruces debido a la biotransformación del diurón ocurrida en la planta. En el ensayo cometa, el nivel de daño observado fue muy similar para las dos cepas, esto se debe probablemente a que el tiempo de exposición al herbicida en el ensayo cometa fue menor al del ensayo SMART. Lo anterior se fundamenta en el hecho de que el diurón es capaz de promover la expresión de CYPs involucrados en su metabolismo, de tal manera que el tiempo de exposición puede afectar el nivel de genotoxicidad observado. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el diurón es capaz de producir rompimientos en el DNA, mutaciones y eventos de recombinación mitótica. Asimismo, se encontró una correlación positiva entre la respuesta del ensayo SMART y la del ensayo cometa. Finalmente, con este trabajo queda demostrada la utilidad de emplear las células de los discos imaginales de alas de *Drosophila melanogaster* en el ensayo cometa en combinación con el ensayo SMART pues de esta manera se logra obtener mayor información acerca de la genotoxicidad causada por un agente en particular.

Abstract

The main objective of this work was to determine the genotoxicity of the herbicide diurón in somatic cells of *Drosophila melanogaster* through the wing spot test and an imaginal disc cells comet assay. Additionally, to determine the relationship between diurón metabolism and its genotoxic effect level, two metabolically different larvae were employed. In the wing spot test, one type of larvae were obtained from *flr³* strain females mated to *mwh* males (standard cross: ST), the other type was obtained from *ORR;flr³* females mated to *mwh* males (high bioactivation cross: HB). It is well known that *ORR;flr³* individuals have high levels of cytochromes P450 (CYPs) which improves the wing spot test sensibility to detect promutagens requiring CYPs mediated activation. In the comet assay, the larvae were obtained directly from *flr³* and *ORR;flr³* strains. Larvae from both assays were chronically exposed to different concentrations of diurón along with concurrent controls. Additionally, an aqueous extract obtained from maize roots, previously treated with different diurón concentrations, was used in order to determine if diurón plant metabolism products were capable of producing a genotoxic response. In this manner, diurón genotoxicity evaluation was carried out from three different endpoints: (1) direct administration of different diurón concentrations to larvae from both crosses (wing spot test); (2) aqueous extracts administration to larvae from both crosses (wing spot test); (3) direct administration of different diurón concentrations larvae from both strains (comet assay).

A genotoxic effect was obtained at all endpoints tested. In the wing spot test, when diurón was directly administered, a lower genotoxicity level was found for the HB cross in comparison to ST cross. This latter suggests that an efficient diurón metabolism can reduce the genotoxic effect of this compound. A similar positive response between both crosses was observed when aqueous extract was administered due to diurón plant biotransformation. In the comet assay, a very similar response was registered for both strains, this was probably due to the fact that diurón exposure duration for the comet assay was shorter than for the wing spot test. This latter idea is based on the fact that diurón is capable of promoting the expression of CYPs involved in its own metabolism, in this sense; time of exposure can affect the genotoxicity level observed. The results obtained from this work demonstrate that diurón is capable of producing DNA breaks, mutations, and somatic recombination events. A positive correlation between wing spot test and comet assay response was found. Employing imaginal disc cells from *Drosophila melanogaster* in the comet assay, in combination with the wing spot test is a very useful approach to obtain more information about the genotoxic effect caused by a particular agent.

Introducción

El presente trabajo tuvo como propósito la determinación de la genotoxicidad del herbicida diurón. Este compuesto es utilizado para el control de malezas en diversos cultivos y está incluido en la lista de plaguicidas autorizados para su uso en México. El diurón está clasificado como un plaguicida de toxicidad baja, sin embargo, los estudios que se han realizado sobre su efecto genotóxico son contradictorios y no se cuenta con una conclusión clara al respecto. Por tal motivo, es importante determinar de manera precisa el nivel de daño que este compuesto y sus metabolitos pueden ocasionar al DNA. La valoración precisa de la genotoxicidad de este herbicida puede ayudar a determinar el nivel de riesgo al que están expuestas las personas involucradas en su fabricación, así como establecer mejores medidas de seguridad.

Con tal propósito se realizaron dos pruebas de genotoxicidad, el ensayo cometa y el ensayo SMART en la empleando a *Drosophila melanogaster* como modelo biológico. Dichos ensayos están ampliamente validados como pruebas adecuadas para la determinación de la genotoxicidad de xenobióticos. La utilización de células de discos imaginales de *Drosophila melanogaster* en el ensayo cometa, para la valoración del efecto genotóxico de un xenobiótico, representa una técnica novedosa que en combinación con el ensayo SMART, permite estudiar de mejor manera el mecanismo de genotoxicidad.

Genotoxicidad y mutagenicidad

En genética, el término genotoxicidad se usa para hacer referencia a la propiedad que tienen algunos compuestos químicos para dañar al DNA de una célula y causar mutaciones, las cuales pueden conducir a cáncer. Los términos, genotoxicidad y mutagenicidad son frecuentemente confundidos y usados indistintamente, sin embargo es importante aclarar que todos los mutágenos son genotóxicos, mientras que no todos los compuestos genotóxicos son mutagénicos pues sus alteraciones pueden tener efectos directos o indirectos sobre el DNA (Nagarathna *et al.*, 2013). La mutagenicidad se refiere a la inducción de cambios transmisibles permanentes en la estructura del DNA. Estos cambios (mutaciones) pueden involucrar uno o varios genes. La genotoxicidad es un término más amplio que se refiere a la capacidad de un agente para interactuar con el DNA y/o con la maquinaria celular que regula la integridad del genoma (Davis y Ward, 2014). Las pruebas de genotoxicidad y mutagenicidad representan una parte importante en la evaluación del riesgo por exposición a ciertos compuestos químicos.

Plaguicidas

Un plaguicida o pesticida se define como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destine a controlar una plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), 2013). Los plaguicidas representan el único medio efectivo para controlar los vectores de enfermedades, plagas de hierbas e insectos en diversas circunstancias. La población humana se beneficia por el uso de los plaguicidas, la forma más evidente de dicho beneficio es la posibilidad de contar con una variedad de alimentos más amplia y a precios más bajos (*Environmental Protection Agency* (EPA), 2014). No obstante, existen datos sobre la relación que hay entre la exposición a plaguicidas y el aumento en la tasa de enfermedades crónicas, así como diferentes tipos de cáncer, diabetes, desórdenes neurodegenerativos, defectos de nacimientos y desórdenes reproductivos (Mostafalou y Abdollahi, 2013).

Si bien existen múltiples formas de clasificar a los plaguicidas (como pueden ser: uso, composición química, modo de acción, etc.), la manera más común de clasificarlos se basa en el tipo de organismo sobre el que actúan. Por ejemplo, un plaguicida que se use para matar o controlar el crecimiento de los hongos será incluido en la categoría de los fungicidas (INECC, 2013), de la misma manera un plaguicida utilizado para controlar o evitar el crecimiento de plantas no deseadas en un cultivo se clasifica como herbicida. Existen cuatro clases principales de plaguicidas: insecticidas, herbicidas, fungicidas y rodenticidas (Costa, 2008). Al interior de cada categoría existen varias subcategorías con características químicas y toxicológicas diferentes. Por ejemplo, entre los insecticidas se pueden encontrar compuestos organofosforados, carbamatos, organoclorados, piretroides, entre otros. De igual forma, dentro de cada una de estas subcategorías existen diferencias importantes entre los compuestos, tal es el caso de los compuestos organoclorados como el DDT, el aldrin y el clordecone (Costa, 2008). Por esta razón, es necesario un contar con un conocimiento amplio y detallado acerca de las características toxicológicas de cada compuesto para evaluar de forma adecuada el riesgo que representan hacia aquellas especies distintas a la que se desea controlar y su impacto ambiental.

Como se ha descrito, los plaguicidas se ubican en una categoría heterogénea de compuestos biológicamente activos, que se caracterizan por diferentes grados de toxicidad para especies distintas al organismo que se quiere atacar, dentro de las cuales se encuentra el ser humano (Bolognesi *et al.*, 2011). La exposición a plaguicidas por parte de los seres humanos puede ocurrir por las vías oral, dérmica y por inhalación. Las dosis elevadas por la vía oral, pueden conducir a la intoxicación y a la muerte. Las dosis crónicas bajas, por otro lado, producen efectos a largo plazo y pueden ser ingeridas por la población general a través del consumo de alimentos en los cuales se emplearon plaguicidas para su producción (Costa, 2008). Las personas involucradas en la producción, transporte y aplicación de plaguicidas se encuentran en mayor riesgo de exposición. Se ha demostrado que muchos plaguicidas pueden tener efectos neurológicos, inmunológicos, reproductivos y estar involucrados en

procesos carcinogénicos (Gilden *et al.*, 2010). Por ejemplo, los insecticidas organofosforados y carbamatos afectan la sinapsis neuronal por medio de la inhibición de la acetilcolinesterasa; además, estudios epidemiológicos sugieren que la exposición a plaguicidas puede estar asociada con la enfermedad de Parkinson (Wirdefeldt *et al.*, 2011).

Toxicidad de plaguicidas

La toxicidad de un plaguicida se debe generalmente a la inhibición de una enzima diana, o en algunos casos, la toxicidad es causada por la sobre-expresión o sobre-estimulación de dicha enzima. Desafortunadamente, algunos pesticidas también interfieren con las enzimas de organismos que no son los que se desean controlar, por ejemplo, los compuestos organofosforados pueden ocasionar una toxicidad aguda por medio de la inhibición de la enzimas acetilcolinesterasas y butirilcolinesterasas en mamíferos (Kwong, 2002; Chowdhary *et al.*, 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha elaborado una recomendación para la clasificación de plaguicidas que se basa principalmente en datos de toxicidad aguda oral y dérmica en ratas de laboratorio (Tabla 1) (*International Programme on Chemical Safety (IPCS)*, 2010).

Tabla 1. Clasificación de plaguicidas de la OMS de acuerdo a su toxicidad aguda (IPCS, 2010).

Clasificación OMS 2009		DL50 en rata (mg/Kg peso corporal)	
		Oral	Dérmica
Ia	Extremadamente peligroso	< 5	< 50
Ib	Altamente peligroso	5 - 50	50 - 200
II	Moderadamente peligroso	50 - 200	200 - 2000
III	Ligeramente peligroso	Más de 2000	Más de 2000
U	Peligro agudo poco probable	5000 o más alta	

Para el uso responsable de los plaguicidas se debe tomar en consideración el balance entre los beneficios que pueden obtenerse a partir de su utilización contra los posibles riesgos a la salud humana y degradación del ambiente (Costa, 2008). Los beneficios principales son las consecuencias inmediatas de los efectos de los plaguicidas, es decir, el control de la plaga y el aumento en las ganancias directas que se esperan de su uso, esto se traduce en una mayor producción de alimentos (Aktar *et al.*, 2009). La atención pública sobre los posibles efectos negativos de la producción y uso de plaguicidas ha conducido a buscar una mayor responsabilidad por parte de la industria química y personas del campo así como la creación de una legislación más estricta (Stenersen, 2004). La relación costo-beneficio por el empleo de pesticidas es evaluada de forma distinta en cada

país, por ejemplo, cada uno de los países de la Unión Europea cuentan con diferentes planes de acción para la aplicación sustentable de plaguicidas (European Comission, 2015). Todas las actividades relacionadas con el uso de plaguicidas deben estar basadas en criterios científicos y no sólo en consideraciones comerciales (Aktar *et al.*, 2009).

Dado que la utilización irresponsable de plaguicidas representa un riesgo a la salud, en distintos países se han desarrollado normas y medidas para asegurar un empleo adecuado de éstos y que los residuos se mantengan en niveles inferiores a los que podrían causar efectos adversos. En México, la dependencia encargada de regular el uso y manejo de plaguicidas es la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST), dicha comisión está integrada por la Secretaría de Salud, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (Diario Oficial de la Federación, 2013). De acuerdo al Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos, las Secretarías previamente mencionadas están facultadas para ejercer las atribuciones que les confieren los ordenamientos legales en materia de plaguicidas. En el Artículo 4° de dicho Reglamento se menciona que, para el registro y autorización de plaguicidas, es necesario realizar estudios sobre las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas, ecotoxicológicas, de destino ambiental y físicas que corresponden al tipo de formulación. Dichos estudios deben ser desarrollados conforme a las guías reconocidas por organismos internacionales como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la OMS, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA) y el Consejo Internacional para la Colaboración sobre plaguicidas (CIPAC) (Diario Oficial de la Federación, 2014). Algunos ejemplos de las pruebas toxicológicas empleadas para el registro de plaguicidas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Algunas pruebas toxicológicas requeridas para el registro de plaguicidas (Costa, 2008).

Prueba	Especies animales
Letalidad aguda (oral, dérmica, inhalación)	Rata, ratón, cobayo, conejo
Irritación dérmica	Conejo, rata, cobayo
Sensibilización dérmica	Cobayo
Irritación ocular	Conejo
Neurotoxicidad retrasada aguda	Gallina
Estudios de genotoxicidad (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>)	Bacterias, células de mamífero, ratón, rata, <i>Drosophila</i>
Teratogenicidad	Conejo, ratón, rata, hámster
Estudio de toxicidad de dos a cuatro semanas (oral, dérmica, inhalación)	Rata, ratón
Estudio de toxicidad de 90 días (oral)	Rata
Estudio de toxicidad crónica (oral; 6 meses - 2 años)	Rata, perro
Estudio de oncogenicidad	Rata, ratón
Estudio de reproducción/fertilidad	Rata
Estudio de neurotoxicidad en el desarrollo	Rata

De acuerdo con la CICOPLAFEST, los estudios toxicológicos para el registro de plaguicidas deben comprender evaluaciones de los efectos a corto y largo plazo en animales así como de su metabolismo. Los estudios a corto plazo incluyen la evaluación de la toxicidad aguda de los plaguicidas en mamíferos, dosis letal media y concentración letal media (DL_{50} y CL_{50}), en dos especies de roedores (una de ellas debe ser la rata) y en ambos sexos; irritación en la piel y ojos tras una aplicación (rata, conejo); y ensayos de toxicidad subcrónica por vía oral en dos roedores diferentes (INECC, 2007). Los estudios de toxicidad a largo plazo incluyen: efectos en médula ósea, en células sanguíneas, carcinogenicidad, mutagenicidad, sobre la reproducción, neurotoxicidad, efectos multigeneracionales, determinación del nivel sin efecto observable (NOEL) y del nivel sin efecto adverso observable (NOAEL); además es preciso calcular la ingesta diaria admisible (IDA) (INECC, 2007). Los estudios sobre metabolismo comprenden: absorción o vías de entrada al organismo, distribución, biotransformación, excreción. Se requieren, además, valores de consumo (canasta básica), así como ingestión teórica máxima del residuo del plaguicida en la dieta diaria (TMDI) e ingestión estimada máxima diaria (EMDI). Aunado a ello, las empresas deben proporcionar información sobre: precauciones para el manejo de los plaguicidas, signos y síntomas de intoxicación, tratamiento médico a intoxicados, antídotos y dosis, categoría toxicológica (de acuerdo con la NOM-Y-302-1988), y equipo de protección para su aplicación (INECC, 2007).

La CICOPLAFEST publicó en los años 1991 a 1998 el Catálogo Oficial de Plaguicidas, que contiene los productos registrados, usos autorizados, características principales, indicaciones para su uso e información de riesgos por exposición y tratamiento de intoxicaciones. La última actualización de dicho catálogo corresponde al año 2004. De esta manera, los únicos plaguicidas cuya importación, comercialización y uso están permitidos en México, son los que han sido registrados por esta dependencia (CICOPLAFEST, 2004). En el catálogo de la

CICOPLAFEST se adopta la clasificación de toxicidad con base en la DL₅₀ expresada en mg/Kg, que fue recomendada por la OMS durante su vigésima octava asamblea en 1975. En este caso la DL₅₀ hace referencia a la obtenida en ratas cuando el plaguicida se administra por vía oral o dérmica de manera aguda. De forma paralela, se emplea la CL₅₀ expresada en mg/m³ o también en ppm (Tabla 3) (IPCS, 2002; CICOPLAFEST, 2004).

Tabla 3. Clasificación de plaguicidas de acuerdo a su toxicidad aguda del Catálogo de Plaguicidas publicado por la CICOPLAFEST (CICOPLAFEST, 2004).

Categoría	DL ₅₀ en mg/kg								Cl ₅₀ por inhalación Vapor mg/l Exposición: 1 h	
	Oral				Dérmica					
	Sólido		Líquido		Sólido		Líquido		Más de	Hasta
I Extremadamente Tóxicos	Más de -	Hasta 5.0	Más de -	Hasta 20.0	Más de -	Hasta 10.0	Más de -	Hasta 40.0	Más de -	Hasta 0.5
Ii Altamente Tóxicos	5.0	50.0	20.0	200.0	10.0	100.0	40.0	400.0	0.5	2.0
Iii Moderadamente Tóxicos	50.0	500.0	200.0	2000.0	100.0	1000.0	400.0	4000.0	2.0	10.0
Iv Ligeramente Tóxicos	500.0	-	2000.0	-	1000.0	-	4000.0	-	10.0	-

El catálogo también incluye la clasificación de carcinogenicidad, tanto de la EPA como la de la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) (Tabla 4) (CICOPLAFEST, 2004).

Tabla 4. Clasificación de los Plaguicidas de acuerdo a su carcinogenicidad (CICOPLAFEST, 2004).

	EPA		IARC
Grupo A	Carcinógeno para los humanos	Grupo 1	Carcinógeno para los humanos
Grupo B1	Probable carcinógeno para los humanos (suficiente evidencia en animales)	Grupo 2 ^a	Probable carcinógeno para los humanos
Grupo B2	Probable carcinógeno para los humanos (insuficiente evidencia en animales)	Grupo 2 ^B	Posible carcinógeno para los humanos
Grupo C	Posible carcinógeno para los humanos	Grupo 3	No clasificable como carcinógeno para los humanos
Grupo D	No clasificable como carcinógeno para los humanos	Grupo 4	Es probable que no sea carcinógeno para los humanos
Grupo E	Sin evidencia de carcinogenicidad para los humanos		

Biotransformación y bioactivación de xenobióticos

Un xenobiótico es cualquier compuesto químico que puede ser hallado en un organismo sin que sea producido por este último (por ejemplo: plaguicidas y medicamentos). Un xenobiótico pasa por una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos al interior de un organismo a través de la absorción, distribución, biotransformación y finalmente la excreción del compuesto. La mayoría de los xenobióticos que ingresan al organismo son lipofílicos. Esta propiedad les permite penetrar las membranas lipídicas, ser transportados por lipoproteínas en la sangre y ser absorbidos rápidamente por el órgano diana. La lipofilicidad de un xenobiótico es, por lo tanto, un factor físico-químico importante que determina la bioacumulación y toxicidad del compuesto. Por otro lado, el sistema excretor de los organismos requiere cierto grado de hidrofílicidad del compuesto para una excreción eficiente. En ausencia de un mecanismo de excreción, la exposición constante a un compuesto lipofílico puede resultar en la acumulación de éste. Por lo tanto, los organismos han desarrollado ciertos procesos bioquímicos que convierten los compuestos lipofílicos en una versión hidrofílica que permita su excreción (Dekant, 2009).

Se entiende como biotransformación al proceso bioquímico catalizado por enzimas que altera las propiedades físicas y químicas de los xenobióticos, partiendo de las formas que favorecen su absorción a través de las membranas (formas lipofílicas) a aquellas que favorecen su eliminación del organismo (formas hidrofílicas) (Parkinson y Ogilvie, 2008). La biotransformación de xenobióticos es catalizada por varios sistemas enzimáticos que pueden dividirse en cuatro categorías de acuerdo a la reacción que catalizan:

- 1) Hidrólisis (por ejemplo, carboxilesterasas)
- 2) Reducción (carbonilreductasas)
- 3) Oxidación (citocromos P450)
- 4) Conjugación (UDP-glucuronisiltransferasa)

Las primeras tres reacciones (hidrólisis, reducción y oxidación) son llamadas con frecuencia reacciones de fase I, mientras que a las reacciones de conjugación se les denomina reacciones de fase II. Esta clasificación fue establecida por Williams en 1959 y tiene como propósito el hacer una distinción entre las reacciones que resultan en un aumento o disminución de la toxicidad de los xenobióticos, así como de su polaridad, de aquellas reacciones que sólo producen la disminución de la toxicidad (Williams, 1959). Aunque la conjugación de muchos xenobióticos es precedida por reacciones de hidrólisis, reducción y oxidación (de tal forma que puede decirse que los xenobióticos pasan por la fase I antes que la fase II), existen varios casos donde los xenobióticos son sujetos de una oxidación después de la conjugación (cuando las reacciones de fase II ocurren antes que las de la fase I). Por ejemplo, el gemfibrozil, un medicamento usado para disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre, es conjugado con ácido glucorónico antes de pasar por una reacción de oxidación llevada a cabo por los citocromos P450 (CYPs) (Ogilvie *et al.*, 2006). Por otra parte, existen muchos

xenobióticos que son conjugados de forma directa sin pasar por las reacciones de la fase I. Además, no todas las reacciones de la fase II resultan en una desintoxicación, ya que todas las enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos son capaces de incrementar la toxicidad de uno o más xenobióticos lo cual depende de la estructura de la molécula (Parkinson y Ogilvie, 2008).

Las enzimas que participan en la biotransformación de xenobióticos, en general, tienen sólo una localización en el interior de la célula (Tabla 5) y si bien existe un número limitado de enzimas, éstas presentan un amplio rango de sustratos específicos (Parkinson y Ogilvie, 2008). En los seres humanos, por ejemplo, tan solo el CYP2D6 y el CYP3A4 metabolizan más de la mitad de los fármacos administrados por la vía oral (González y Tukey, 2006).

Tabla 5. Localización de algunas enzimas relacionadas con la biotransformación de plaguicidas y el tipo de reacción que llevan a cabo en mamíferos (Parkinson y Ogilvie, 2008).

Reacción	Enzima o reacción específica	Localización
Hidrólisis	Carboxilesterasa	Retículo endoplásmico, citosol, lisosomas
	Fosfatasa alcalina	Membrana plasmática
	Peptidasa	Lisosomas
	Epóxido-hidrolasa	Retículo endoplásmico, citosol
Reducción	Azo y Nitro reducción	Citosol
	Carbonil (aldo-ceto) reducción	Citosol, retículo endoplásmico
	Disulfuro reducción	Citosol
	Sulfóxido reducción	Citosol
	Quinona reducción	Citosol, retículo endoplásmico
	Dihidropirimidina deshidrogenasa	Citosol
	Deshalogenación reductiva	Retículo endoplásmico
	Deshidroxilación (citocromo b5)	Retículo endoplásmico
	Deshidroxilación (aldehído oxidasa)	Citosol
Oxidación	Alcohol deshidrogenasa	Citosol
	Aldehído deshidrogenasa	Mitocondria, citosol.
	Aldehído oxidasa	Citosol
	Xantina oxidasa	Citosol
	Monoamina oxidasa	Mitocondria
	Diaminina oxidasa	Citosol
	Peroxidasa	Retículo endoplásmico, lisosomas
	Flavin-monooxigenasas	Retículo endoplásmico
	Citocromos P450	Retículo endoplásmico
Conjugación	UDP-glucuronosiltransferasa	Retículo endoplásmico
	Sulfotransferasa	Citosol
	Glutation transferasa	Citosol, retículo endoplásmico, mitocondria
	Aminoácido transferasa	Mitocondria, retículo endoplásmico
	N-Acetiltransferasa	Mitocondria, citosol
	Metiltransferasa	Citosol, retículo endoplásmico

Los CYPs están involucradas en el metabolismo de una variedad de moléculas de señalización tales como hormonas, vitaminas, oxilipinas, etc. (Nebert, 1994), aunque son mejor conocidos por su capacidad para metabolizar xenobióticos (Coon *et al.*, 1996). El número de familias y subfamilias de CYPs presentes en un organismo está usualmente relacionado con el número de funciones que llevan a cabo. Los CYPs de la misma familia (o subfamilia para grupos grandes) pueden catalizar pasos subsecuentes en la misma ruta o reacciones similares sobre diferentes sustratos (Nelson, 2011). Por ejemplo, los miembros de la subfamilia CYP71C del

maíz catalizan la secuencia de reacciones que va de indol a benzoxazinona DIMBOA (Gierl y Frey, 2001), un efectivo antibiótico que actúa en contra de ciertos patógenos como *Agrobacterium tumefaciens* (Sahi *et al.*, 1990).

La actividad de los CYPs se puede ver afectada por muchos factores endógenos y ambientales. Entre los factores ambientales, existen compuestos que causan la inhibición o la inducción de la actividad de los CYPs. El receptor nuclear pregnano X (PXR) y el receptor constitutivo androstano (CAR) son los principales reguladores de la expresión de CYPs en mamíferos (Pelkonen *et al.*, 2008). Se ha sugerido que muchos plaguicidas funcionan como agonistas de PXR. En un estudio donde se probó el efecto de 200 plaguicidas en PXR, se encontró que 106 pesticidas fueron capaces de activar PXR en humanos y 93 lograron activar el mismo receptor en ratones. Todos los compuestos del tipo piretroides que fueron probados en el mismo estudio resultaron ser agonistas de PXR. De igual manera, se ha demostrado que el metalaxil, el diurón y otros plaguicidas del tipo carbamatos son capaces de activar a PXR en humanos y ratones (Kojima *et al.*, 2011). Por su parte, CAR también es activado por algunos plaguicidas como el cipermetrin, alaclor, imazalil y clorpirifos (Wyde *et al.*, 2003; Baldwin y Roling, 2009;). En diversos estudios se ha observado que los compuestos organofosforados, piretroides, carbamatos y derivados de urea son inductores de la expresión de CYPs (Sousa *et al.*, 1997; Das *et al.*, 2006, 2008a, 2008b; Lemaire *et al.*, 2004; Takeuchi *et al.*, 2008; Rudzok *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Casabar *et al.*, 2010). Los plaguicidas pueden inducir la expresión de los CYPs involucrados en su propio metabolismo así como en el de otros compuestos que son sustratos de las mismas enzimas (Abass *et al.*, 2012).

El resultado general de las reacciones de biotransformación es la desintoxicación, de forma que los xenobióticos sean transformados en metabolitos que puedan ser mejor excretados. Sin embargo, dependiendo de la estructura del compuesto químico o de las enzimas que catalizan las reacciones de biotransformación, frecuentemente se producen metabolitos con un potencial tóxico más alto que el que tenía el compuesto original. En las décadas de 1940 y 1950, los estudios de James y Elizabeth Miller demostraron las primeras evidencias de la conversión *in vivo* de carcinógenos químicos en metabolitos reactivos. El término “activación metabólica” fue acuñado por dichos investigadores para describir este fenómeno (Conney, 2001). La activación metabólica, también conocida como bioactivación, es la base para la toxicidad y carcinogenicidad de muchos xenobióticos con una reactividad química baja (Dekant, 2009).

Muchos plaguicidas están sujetos a una bioactivación por los CYPs que se encuentran en el hígado (Abass *et al.*, 2010) y en otros tejidos. Por ejemplo, en la desulfuración de los insecticidas organofosforados y en el metabolismo de los carbamatos surgen metabolitos más tóxicos que los compuestos originales (Buratti *et al.*, 2003, 2005; Poet *et al.*, 2003; Usmani *et al.*, 2004; Leoni *et al.*, 2006; Abass *et al.*, 2007, 2012, 2010; Foxenberg *et al.*, 2007; Croom *et al.*, 2010).

La formación de metabolitos reactivos más tóxicos se asocia frecuentemente con las reacciones de fase I, sin embargo, las reacciones de fase II pueden estar también involucradas en este proceso, así como la combinación de reacciones de fase I y fase II (deBethizy y Hayes, 1994). Estos metabolitos reactivos pueden combinarse de forma covalente con constituyentes celulares tales como el DNA, RNA o proteínas y ocasionar procesos de carcinogénesis, mutagénesis y necrosis celular (Parke, 1987; Anders *et al.*, 1992; Guengerich, 1992; Levi y Hodgson, 2001; Amacher, 2006; Skipper *et al.*, 2009).

Biotransformación de xenobióticos en plantas

Las plantas están equipadas con un sistema de protección muy versátil contra la potencial acción fitotóxica de los xenobióticos. El metabolismo de xenobióticos en plantas se asemeja al del hígado de los animales, en lo que se refiere a los niveles y patrones de metabolitos, tipos de enzimas y secuencias de cDNA. Los residuos de xenobióticos que resultan de la fase I (transformación) y la fase II (conjugación) son usualmente almacenados en los tejidos de la planta (vacuolas y paredes celulares) durante la fase III (compartimentalización) (Sandermann, 1992).

Los CYPs presentes en las plantas están implicados en la biosíntesis de ligninas, terpenos, alcaloides, esteroides, ácidos grasos y muchos compuestos secundarios que actúan como agentes de defensa, así como en el metabolismo de un amplio rango de xenobióticos tales como herbicidas e insecticidas (Gorinova *et al.*, 2005). Además, los CYPs de las plantas juegan un papel importante en la selectividad de los herbicidas (Werck-Reichhart *et al.*, 2000) pues la desintoxicación metabólica es uno de los mecanismos principales para dicha selectividad y es responsable, en muchos casos, de la tolerancia por parte de los cultivos y hierbas resistentes. Se ha establecido que las reacciones catalizadas por los CYPs son, con frecuencia, el origen de dicha tolerancia (Werck-Reichhart, 1995).

Este fenómeno de selectividad es un recurso ampliamente utilizado en la agricultura para el control de malezas que compiten con los cultivos tolerantes a un herbicida particular. La selectividad de los herbicidas está basada, en la mayoría de los casos, en la capacidad diferencial de las plantas para desintoxicar metabólicamente el herbicida (Lamoureux y Shimabukuro, 1991; Cole, 1994). La inactivación metabólica de los herbicidas ha sido empleada en la ingeniería genética de cultivos para desarrollar una tolerancia a estos compuestos (Hinchee *et al.*, 1993).

El grupo de enzimas más importante en el metabolismo de xenobióticos en las plantas está conformada por diversas familias de CYPs. Se han anotado y nombrado 7446 secuencias relacionadas con CYPs en plantas y este número supera al de otros taxones: 7430 en vertebrados, 5600 en insectos, 5729 en hongos, 1254 en bacterias, 48

en arqueas y dos en virus (Nelson, 2013; Pfam: EBI, 2015).

En el genoma de las plantas, la superfamilia de genes P450 incluye hasta el momento aproximadamente 464 secuencias en *Arabidopsis thaliana*, 332 en *Oryza sativa*, 416 en *Zea mays*, 603 en *Vitis vinifera*, 484 en *Populus trichocarpa*, 142 en *Carica papaya*, 372 en *Sorghum bicolor* y 543 en *Glycine max* (Schuler, 2011; Mizutani, 2012; Pfam: EBI, 2015). Sin embargo, estas cifras aumentan cada año y se desconoce la función de la mayoría de los productos de estos genes. Por ejemplo, en 2010 se contaban 246 genes para *Arabidopsis* y el número de genes P450 caracterizados funcionalmente era de aproximadamente 60, lo cual significa que más del 70% de sus 246 genes P450 aún no estaban caracterizados (Mizutani y Ohta, 2010). De manera general, los citocromos de las plantas se agrupan en 127 familias, en comparación con las 19 familias en vertebrados, 67 en insectos, 399 en hongos y 333 en bacterias (Nelson y Werck-Reichhart, 2011).

Se ha demostrado que las plantas son capaces de concentrar agentes ambientales y bioactivar pro-mutágenos (Plewa, 1978). Las plantas metabolizan agentes xenobióticos por medio de mecanismos que involucran oxidación, hidrólisis, conjugación y en ocasiones reducción. En plantas, como en animales, el último paso de la biotransformación es la conjugación. Los conjugados son fácilmente excretados por los animales, pero dado que las plantas no cuentan con un sistema excretor, éstos son polimerizados e incorporados a sus componentes estructurales de tal manera que los productos iniciales, los metabolitos intermedios y los productos finales pueden, en primer lugar, dañar a la propia planta, y segundo, conjugarse y almacenarse hasta ser liberados en el tracto gastrointestinal o en otros órganos de los animales que las consumen, entre ellos el ser humano (Sandermann, 1988).

Biotransformación de xenobióticos en insectos

Al igual que en plantas y mamíferos, los CYPs juegan un papel importante en los insectos para la biotransformación de xenobióticos tales como insecticidas, toxinas producidas por plantas y en el metabolismo de compuestos endógenos (Hodgson, 1983; Agosin, 1985). Estas enzimas pueden encontrarse en las rutas de la biosíntesis de ecdisteroides y hormonas durante el desarrollo, crecimiento y reproducción de los insectos (Feyereisen, 2012). El número de CYPs entre especies de insectos puede variar considerablemente; por ejemplo, se conoce que existen aproximadamente 65 genes en *Apis mellifera*, 211 en *Aedes aegypti* y 170 en *Drosophila melanogaster* (Pfam: EBI, 2015).

La mayoría de los CYPs que se han estudiado en insectos se expresan en ambos sexos, aunque existen excepciones como CYP6L1, el cual sólo está presente en los miembros del sexo masculino de *Blattella germanica* (Wen y Scott, 2001) y el producto del gen *Neofem4*, un citocromo P450 de la familia CYP4 presente

en las termitas reina de *Cryptotermes secundus* (Hoffmann *et al.*, 2014). Asimismo, la actividad de los CYPs puede variar de un tejido a otro. Se ha observado que existe actividad de monooxigenasas en varios tejidos tales como los cuerpos grasos, intestino medio, túbulo de Malpighi, sistema nervioso (Korytko y Scott, 1998) y antenas (Wojtasek y Leal, 1999) siendo el intestino medio donde se produce la actividad más elevada (Hodgson, 1983). La expresión de algunos genes de CYPs puede ocurrir de manera generalizada en el cuerpo del adulto (por ejemplo, *Cyp6d1*) (Scott y Lee, 1993; Korytko y Scott, 1998), puede ser específica de ciertos tejidos (*Cyp4g5* en el sistema nervioso y *Cyp6l1* en los tejidos reproductivos de individuos macho) (Maïbèche-Coisne *et al.*, 2000; Wen y Scott, 2001), o puede expresarse solamente en los estadios larvarios (*Cyp6b2*) (Scott *et al.*, 1998a). En este sentido, se sabe que existen importantes variaciones en los niveles de actividad de los CYPs durante el desarrollo de la mayoría de los insectos. De forma general, no hay niveles de actividad de CYPs detectables en los huevos, posteriormente, esta actividad aumenta y disminuye en cada estadio larvario, nuevamente son indetectables durante la etapa de pupa para ser posteriormente expresados en altos niveles en los adultos (Scott, 2008).

Se ha demostrado que ciertos mecanismos de resistencia a insecticidas están asociados con uno o más genes de enzimas involucradas con la desintoxicación de xenobióticos tales como los CYPs, esterasas y glutatión-S-transferasas (Matambo *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2011). Algunos inhibidores de CYPs tales como el piperonil butóxido ocasionan una pérdida total de la resistencia a insecticidas, lo cual demuestra que la resistencia es debida, en muchos casos, a la actividad de los CYPs (Bergé *et al.*, 1998). Un ejemplo de lo anterior es la línea RDDT^R de *Drosophila melanogaster*, la cual es resistente a DDT y presenta 40 veces más cantidad de CYP6A2 que la cepa susceptible (Brun *et al.*, 1996). De hecho, varios CYPs pueden ser sobreproducidos en un solo individuo, por ejemplo, CYP6A2 y CYP4E2 en la línea RDDT^R de *Drosophila* (Amichot *et al.*, 1994) y CYP6A1 y CYP6D1 en las moscas LearnPyrR (Carino *et al.*, 1994). Esta sobreproducción puede deberse a una sobreexpresión de los genes que codifican estas proteínas (Bergé *et al.*, 1998) como ocurre en el caso de la línea 91-R, otra línea resistente a DDT de *Drosophila melanogaster*, en la que se ha demostrado una sobreexpresión de *Cyp6a2* (Waters *et al.*, 1992). Otro ejemplo es la sobreexpresión de *Cyp6g1*, la cual también confiere resistencia a los insecticidas DDT e imidacloprid en *Drosophila melanogaster* (Daborn *et al.*, 2001). A pesar que se conocen formas de inhibir la actividad de los CYPs en insectos, aún no existen insecticidas comerciales con esta capacidad. Lo anterior es debido a la gran cantidad de especies que se desea combatir y a que cada una cuenta con una configuración enzimática propia (Feyereisen, 2015). La caracterización del número total de genes de CYPs, implicados en la regulación de la resistencia a insecticidas, representa un aspecto importante de la toxicología de insectos (Liu *et al.*, 2015).

Herbicidas

Los herbicidas son compuestos químicos capaces de matar o lesionar severamente a las plantas. Representan un amplio grupo de compuestos químicos que actúan sobre distintos procesos metabólicos y de transferencia de energía en las plantas (Duke, 1990). Se trata de moléculas orgánicas con propiedades físicas y químicas que les permiten penetrar las barreras que rodean el simplasto (matriz extracelular y membrana celular) (Coupland, 1991). El transporte a largas distancias de la mayoría de los herbicidas sistémicos dentro de la planta ocurre por medio del xilema y del floema. La mayoría de los herbicidas entran a las células por difusión no facilitada (Kreuz *et al.*, 1996). Una de las formas de clasificar a los herbicidas es por su modo de acción. Algunos de los mecanismos por lo que los herbicidas ejercen su efecto biológico se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de herbicidas de acuerdo a su mecanismo de acción

(*Take Action On Weeds*, 2014).

Modo de acción	Sitio de acción	Familia química	Ingrediente activo	Ejemplos (nombre comercial)
Inhibidores de la síntesis de lípidos	Inhibición de acetil CoA carboxilasa	Ariloxifenoxipropionato (fops)	clodinafop	Discover NG
			cihalofop	Clincher
			fenoxaprop	Ricester, Tecoma, otros.
			fluazifop	Fusilade DX
			quizalofop	Assure II, Targa
		Ciclohexanodiona (dims)	cletodim	Select Max, otros
			setoxidim	Poast, Poast Plus
Fenilpirazolina	pinoxaden	Axial XL		
Inhibidores de la síntesis de aminoácidos	Inhibición de la acetolactato sintetasa	Imidazolinona	imazamox	Raptor, Beyond
			imazapic	Plateau
			imazaquin	Scepter
			imazetapir	Pursuit, Newpath
		Ácido pirimidiniltiobenzoico	bispiribac	Regiment
			piritibac	Staple
		Sulfonilaminocarboniltiazolinona	flucarbazone	Everest, Pre-Pare
			propoxicarbazona	Olympus
			tiencarbazona	Capreno, otros
		Sulfonilurea	bensulfuron	Londax
			clorimuron	Classic
			clorsulfuron	Glean
			foramsulfuron	Option
halosulfuron	Permit			
iodosulfuron	Autumn			
mososulfuron	Osprey			

			metsulfuron	Ally
			nicosulfuron	Accent Q
			ortosulfuron	Strada
			primisulfuron	Beacon
			prosulfuron	Peak
			rimsulfuron	Resolve, Matrix
			sulfosulfuron	Maverick
			tifensulfuron	Harmony
			triasulfuron	Amber
			tribenuron	Express
			trifloxisulfuron	Envoke
			triflusulfuron	UpBeet
		Triazolopirimidina	cloransulam	FirstRate
			florasulam	Orion (componente)
			flumetsulam	Python
			penoxsulam	Grasp
			pyroxsulam	PowerFlex HL
	Inhibidor de EPSP sintetasa (5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato)	Ninguna aceptada	glifosato	Roundup, Touchdown, varios.
Reguladores del crecimiento	Receptores de auxinas T1R1	Ácido benzoico	dicamba	Banvel, Clarity, otros.
		Ácido carboxílico	clopiralid	Stinger
			fluroxipir	Starane
			triclopir	Grandstand
			quinclorac	Facet, Paramount
	Fenoxi	2,4-D	2,4-D, otros.	
		MCPA	MCPA, otros.	
	Inhibición del transporte de auxinas	Semicarbazona	diflufenzopir	Status (componente)
Inhibidores de la fotosíntesis	(1) Inhibición del fotosistema II (sitio de unión distinto de 2 y 3)	Fenilcarbamato	desmedifam	Betenex
			fenmedifam	Betamix (componente)
		Triazina	atrazina	A Atrex, otros.
			prometrin	Caparol
			simazina	Princep, Simanex
		Triazinona	hexazinona	Velpar
			metribuzin	Sencor, otros.
	Uracil	terbacil	Sinbar	
	(2) Inhibición del fotosistema II (diferente de 1 y 3)	Benzotiadiazol	bentazon	Basagran
		Nitrilo	bromoxinil	Buctril, otros.
	(3) Inhibición del fotosistema II (diferente de 1 y 2)	Amida	propanil	SuperWham
		Urea	diurón	Direx, Karmex
fluometuron			Cotoran	
linuron			Lorox, Linex	
Inhibidores del metabolismo del	Inhibición de la glutamina sintetasa	Organofosforado	glufosinato	Liberty

nitrógeno				
Inhibidores de pigmentos	Inhibición de la biosíntesis de diterpenos	Isoxazolidinona	clomazon	Command
	Inhibidores de HPPD	Isoxazol	isoxaflutol	Balance Flexx
		Pirazol	pirasulfotol	Huskie (componente)
		Pirazolona	topramezona	Armezón, Impact
		Triketona	mesotriona	Callisto
tembotriona	Laudis			
Disruptores de membranas celulares	Inhibidores de PPO	Aрил triazinona	sulfentrazona	Spartan
			carfentrazona	Aim
			flutiacet	Cadet
		Difenileter	acifluorfen	Ultra Blazer
			fomesafen	Flexstar, Reflex, otros.
			lactofen	Cobre, Phoenix
	N-fenilftalimida	flumiclorac	Resource	
		flumioxazin	Valor	
	Pirimidinediona	saflufenacil	Sharpen	
	Desviación de electrones del fotosistema I	Bipiridilio	diquat	Reglone
paraquat			Gramoxone SL	
Inhibición del crecimiento de la raíz de la semilla	Inhibición de la síntesis de lípidos	Tiocarbamato	butilato	Sutan +
			cicloato	Ro-Neet
			EPTC	Eradicane, Eptam
			tiobencarb	Bolero
			trialato	Far-Go
	Inhibición de ácidos grasos de cadena larga	Cloracetamida	acetoclor	Degree, Harness, Surpass, Topnotch, Warrant, otros.
			alaclor	Intro, Micro-Tech
			s-metolaclor	Dual Magnum, otros.
			dimetenamid-P	Outlook
		Oxiacetamida	flurfenacet	Define
		Pirazol	piroxasulfona	Zidua
Desconocido	Benzofurano	etofumesato	Nortron	
Sin definir	Inhibición de ácidos nucleicos	Arsénico	MSMA	MSMA

Otra de las maneras de clasificar a los herbicidas es con base en el tiempo de aplicación, de esta forma, los herbicidas de pre-implantación se usan en el suelo antes de sembrar; los herbicidas pre-emergentes se utilizan antes de que surja la vegetación no deseada; y los herbicidas post-emergentes se aplican al suelo o al follaje después de la germinación del cultivo o de la hierba que se quiere controlar (Ecobichon *et al.*, 2001). Los herbicidas no selectivos pueden matar toda la vegetación, mientras que los compuestos selectivos se usan para matar hierbas no deseadas sin dañar los cultivos. En los últimos años, el desarrollo de cultivos resistentes a

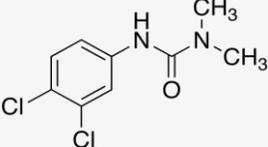
herbicidas por medio de ingeniería genética ha permitido el uso de herbicidas selectivos (Duke, 2005).

En términos de toxicidad general, los herbicidas, como grupo de plaguicidas, presentan una toxicidad aguda relativamente baja en comparación, por ejemplo, con los insecticidas. Existen excepciones tales como el paraquat, un herbicida con una elevada toxicidad aguda y clasificado como un probable carcinógeno para humanos (EPA, 1993). Un cierto número de herbicidas pueden causar irritación en la piel y dermatitis por contacto, particularmente en individuos propensos a reacciones alérgicas (Costa, 2008).

Diurón

En México existen más de 100 herbicidas regulados por la CICOPALAFEST (Diario Oficial de la Federación, 2013). El diurón es un herbicida pre-emergente registrado para su uso en México para el control de malezas en campos de cultivo de caña de azúcar, cebada, espárrago, maíz, sorgo, trigo, cítricos, algodón, entre otros (CICOPALAFEST, 2004). El diurón pertenece a los herbicidas clasificados, por su composición química, como fenilureas sustituidas. Dicho herbicida se encuentra en la categoría de toxicidad IV del catálogo de plaguicidas y de acuerdo a las hojas de datos publicadas por la CICOPALAFEST presenta un valor de LD₅₀ oral y dérmica mayor a 5000 mg/kg en ratas. Por exposición aguda puede ocasionar irritación ocular así como depresión del sistema nervioso central; por exposición crónica el diurón presenta posibles efectos teratogénicos y puede causar daño en el hígado (CICOPALAFEST, 2004) (Tabla 7). Respecto a su modo de empleo, las indicaciones de los fabricantes suelen ser distintas para cada tipo de presentación, por ejemplo; para la versión comercial Koa 80WDG® se recomienda diluir de 2 a 2.5 kg por hectárea en 200 ó 300 litros de agua. Asimismo, dependiendo de la textura del suelo y del tipo de cultivo las cantidades de peso y volumen pueden variar. De acuerdo con el mismo ejemplo, al diluir 2 kg de diurón comercial en 250 litros de agua se obtiene una concentración aproximada de 30 mM, de tal forma que las personas encargadas de su aplicación, así como los cultivos sobre los cuales se aplica el herbicida, pueden estar expuestos dicha concentración. Por otra parte, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), recomienda utilizar de 880 a 1200 g por hectárea para el control de malezas en cultivos de algodón (INIFAP, 2010).

Tabla 7. Características químicas del herbicida diurón.

Sinónimos	N'-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetilurea; 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea; DCMU; DMU
Chemical abstract number (CAS)	330541
Fórmula química	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O (233.1)
Estructura química	
Nombres comerciales	Karmex, Karmex DL, Koa 80WDG Diurón 80WP, Diurón 4L, Direx 4L, Di-on, Diurex, Duirol, Dailon, Rout, Diater, Unidron, Crisuron y Cekiuron.
Apariencia	Blanco, sin olor, sólido cristalino
Punto de fusión	158-159°C
Punto de ebullición	180-190°C
Solubilidad en agua	42 ppm (mg/L) a 25°C

El mecanismo herbicida del diurón se basa en su capacidad para inhibir la fotosíntesis. El diurón es un inhibidor del fotosistema II, no permite la producción de oxígeno y bloquea la transferencia de electrones (Wessels y van der Veen, 1956). El fotosistema II es un complejo multienzimático que emplea energía luminosa para catalizar la foto-oxidación del agua. El centro de reacción de este complejo se compone de las proteínas D1, D2, CP43, CP47 y el complejo II (Rhee *et al.*, 1998). Los herbicidas clasificados como fenilureas sustituidas inhiben la transferencia fotodependiente de electrones uniéndose a un residuo de la proteína D1 inhibiendo así el transporte de electrones (Duke, 1990; Arnaud *et al.*, 1994).

Biotransformación del diurón

Las reacciones básicas del metabolismo biológico de los herbicidas fenilureas, como el diurón, son las N-desmetilaciones seguidas de la oxidación de los grupos aromáticos. Los compuestos son gradualmente transformados por los microorganismos a 3-arilureas, que posteriormente son metabolizadas a arilaminas, dióxido de carbono y amoníaco (Abass *et al.*, 2012; Čerňáková, 1995; Engelhardt, Wallnöfer, & Plapp, 1972).

Diversos aspectos sobre el metabolismo del diurón se conocen desde hace tiempo. Se ha visto que este compuesto se absorbe por el tracto gastrointestinal en ratas y perros. Los niveles de diurón en los tejidos están

directamente relacionados con la dosis y no se ha observado un almacenamiento aparente en éstos (Hodge *et al.*, 1967). En mamíferos, el diurón es principalmente metabolizado mediante reacciones de desalquilación de los grupos metil urea. Asimismo se ha demostrado la hidrólisis del diurón a 3,4-dicloroanilina y oxidación a 3,4-diclorofenol, así como la hidroxilación del carbono 2 y/o 6 del anillo de benceno. El metabolito predominante del diurón en la orina fue N-(3,4-diclorofenil)-urea. El diurón es también parcialmente excretado sin cambios por la orina y las heces (Böhme y Ernst, 1965; Hodge *et al.*, 1967; Abass *et al.*, 2007). En estudios metabólicos con ratas y perros, el metabolito predominante en orina fue N-(3,4-diclorofenil) urea. Pequeñas cantidades de N-(3,4-diclorofenil)-N-metilurea, 3,4-dicloroanilina, 3,4-diclorofenol, y diurón sin cambios fueron detectados (Hodge *et al.*, 1967).

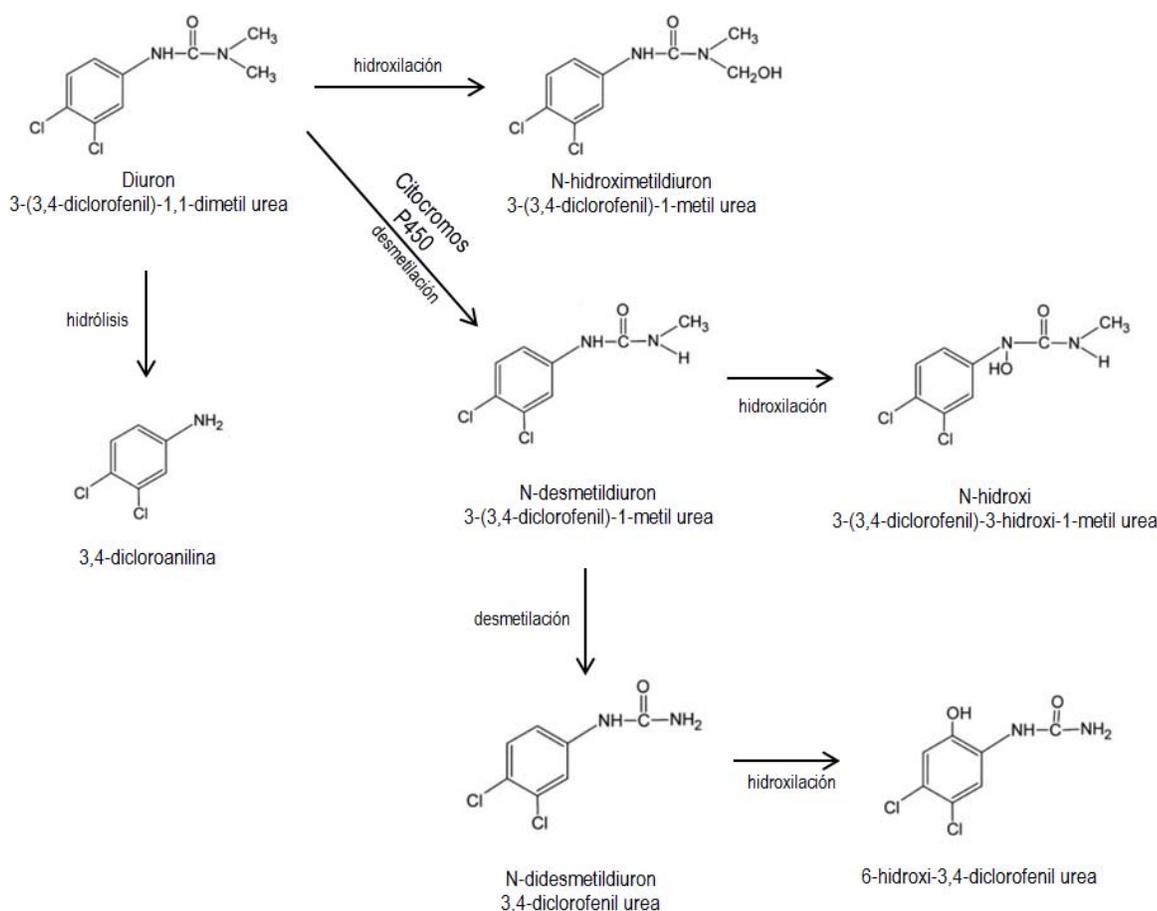


Figura 1. Principales reacciones de biotransformación del diurón en mamíferos (Abass, *et al.*, 2007).

El citocromo humano CYP3A4, expresado en levadura, puede catalizar el metabolismo del clortolurón, un compuesto similar al diurón. El metabolismo es dependiente de NADPH y el clortolurón es degradado por

acción de CYP3A4 en cuatro metabolitos principales: productos hidroxilados-N-monodesmetilados, anillos hidroxilados metilados, N-didesmetilados y N-monodesmetilados (Mehmood *et al.*, 1996).

En un estudio de un paciente hospitalizado, el diurón fue completamente metabolizado, principalmente a través de desmetilación (2 y 180 mg/L) y didesmetilación (70 y 68 mg/L) en sangre y orina respectivamente. Además en extractos de orina se encontraron 36 mg/L de hidroxifenildiurón y 0.2 mg/L de 3,4-dicloroanilina (Van Boven *et al.*, 1990). Se ha observado que existe una desmetilación en el átomo de nitrógeno terminal del diurón en homogenizados de hígado humano y siete tipos de microsomas de hígado de mamífero, incluyendo el humano. De las enzimas CYP humanas más activas en la desmetilación del diurón se encuentran CYP1A1, CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 (Abass, *et al.*, 2007). En otro estudio, el diurón fue capaz de inducir la expresión de CYP2B6 pero no logró activar CAR, lo cual indica que algunos plaguicidas pueden inducir CYP2B6 a través de mecanismos independientes de CAR (Abass *et al.*, 2012). El diurón tiene la capacidad de activar PXR (Kojima *et al.*, 2011). Otros citocromos de mamíferos activados por el este herbicida son, CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9 y CYP2C19 (Abass *et al.*, 2012).

Se considera al diurón como un potente inductor de las enzimas metabolizadoras del hígado (por ejemplo, la benzo(a)pireno monooxigenasa, 7-O-desetilasa y la 7-etoxicumarina-O-desetilasa) (Schoket y Vincze, 1985, 1990; Schoket *et al.*, 1987). Se ha observado que el diurón induce un aumento en la actividad de CYPs y otras enzimas como la epóxido hidrolasa microsómica, glutatión S-transferasa y la UDP-glucoroniltransferasa de manera dependiente de la dosis (dosis oral de 1/20 a 1/4 de la DL₅₀) en ratas (Schoket y Vincze, 1990). De igual modo, se ha documentado una inducción proporcional a la dosis de enzimas microsómicas hepáticas en ratas alimentadas con diurón en la dieta (100, 250, 500, 1000 y 2000 ppm) durante 13 semanas. Se ha observado una respuesta diferencial al diurón entre sexos en ratas, siendo los machos más susceptibles que las hembras (Kinoshita y DuBois, 1970).

En plantas se ha observado la presencia de productos resultantes de la desmetilación del diurón, específicamente en *Triticum aestivum* y *Raphanus sativus* (Pascal-Lorber *et al.*, 2010). De igual forma, se ha demostrado que el CYP71A10 de *Glycine max* puede metabolizar ciertos herbicidas del tipo fenilureas, entre ellos el diurón, mediante reacciones de desmetilación (Siminszky *et al.*, 1999) para dar lugar a metabolitos moderadamente menos tóxicos para la planta que el compuesto original (Dalton *et al.*, 1966; Rubin y Eshel, 1971). Por su parte, CYP76B1 en *Helianthus tuberosus*, CYP76B6 en *Catharanthus roseus* y CYP71A11 y CYP81B1 en *Nicotiana tabacum*, pueden metabolizar herbicidas pertenecientes a la clase fenilureas (Robineau *et al.*, 1998; Yamada, 2000; Didierjean *et al.*, 2002). Las enzimas de la subfamilia CYP76C de *Arabidopsis thaliana* metabolizan una variedad de fenilureas en presencia de NADPH, siendo CYP76C1, CYP76C2 y CYP76C4 capaces de metabolizar el diurón (Höfer *et al.*, 2014).

Algunos estudios han reportado que en microsomas de trigo y maíz existe un amplio rango de CYPs que llevan a cabo N-desmetilaciones e hidroxilaciones anillo-metil de herbicidas del tipo fenilureas tales como primisulfuron (Fonné-Pfister y Kreuz, 1990) y clortoluron, la aril hidroxilación de herbicidas sulfonilureas como el triasulfuron (Frear, 1991; Moreland *et al.*, 1993; Thalacker *et al.*, 1994; Persans y Schuler, 1995) y la aril hidroxilación de otros herbicidas como el bentazon que da lugar al metabolito 6-hidroxibentazon (McFadden *et al.*, 1990). La presencia de derivados monometilados y desmetilados del diurón en las raíces de maíz, soya, algodón y avena sugiere que al menos una parte del herbicida es metabolizada en las raíces (Smith y Sheets, 1967). Se ha reportado, con base en estudios de extractos de suelo de campos de algodón tratados con diurón, que el diurón monometilado es la mitad de fitotóxico que el compuesto original; los productos que se forman removiendo el segundo grupo metilo 1-(3,4-diclorofenil)urea y por hidrólisis de la urea, 3,4-dicloroanilina no presentaron propiedades herbicidas (Dalton *et al.*, 1966). Esta evidencia sugiere que la descomposición microbiana es el principal proceso de disposición de las fenilureas en los suelos. Se ha reportado al hongo *Rhizoctonia solani* como el microorganismo probado más eficiente en la degradación de diurón (Vroumsia *et al.*, 1996).

Objetivos

- Evaluar el efecto genotóxico del herbicida diurón a través del ensayo SMART en alas de *Drosophila melanogaster*.
- Valorar la genotoxicidad de este herbicida con el ensayo cometa utilizando células de los discos imaginales de las alas de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos particulares

- Evaluar la genotoxicidad del diurón en el ensayo SMART administrándolo de forma directa a las larvas de *Drosophila melanogaster*.
- Determinar el efecto del metabolismo del maíz sobre la genotoxicidad del diurón por medio del empleo de un extracto acuoso de raíces tratadas con el herbicida a través del ensayo SMART.
- Comparar la respuesta de genotoxicidad del diurón cuando se administra de manera directa con la obtenida después de exponer a las larvas al extracto acuoso.
- Establecer la técnica para el uso de células de discos imaginales de *Drosophila melanogaster* en el ensayo cometa.
- Comparar la respuesta de genotoxicidad obtenida entre el ensayo SMART y el ensayo cometa, así como entre las distintas cepas y cruza utilizadas.

Antecedentes

Genotoxicidad y carcinogenicidad del diurón

Si bien desde hace tiempo se han realizado diversos estudios, *in vivo* e *in vitro*, acerca de la genotoxicidad y carcinogenicidad del diurón, de forma general, son escasos y hay resultados contradictorios entre unos y otros que dependen del protocolo experimental, concentraciones utilizadas y puntos a evaluar. Al respecto, se ha reportado que el diurón tuvo un efecto mutagénico en el ensayo de inhibición de síntesis de DNA testicular y el ensayo de Ames (Seiler, 1978), por otro lado, se ha observado que una sola dosis de 170 ó 340 mg/kg de diurón, administrada de forma intraperitoneal, puede inducir la formación de micronúcleos en células de la médula ósea de ratones a las 30 y 48 h después del tratamiento (Agrawal *et al.*, 1996). Asimismo, el diurón resultó ser un posible agente genotóxico de manera directa o después de la bioactivación con la fracción S9 en concentraciones de 900 y 112.5 ug/mL, respectivamente, mediante el ensayo *Vibrio fischeri* / Mutatox (Canna-Michaelidou y Nicolaou, 1996).

En estudios de dos años con ratas y perros a los que se les administró diurón, en concentraciones de hasta 2500 ppm, no se observó evidencia de carcinogenicidad en vejiga, riñón, hígado, pulmón, entre otros órganos (Hodge *et al.*, 1967). De igual modo, no se registró incremento en la formación de tumores en ratones tratados diariamente con este herbicida en una concentración de 464 mg/kg durante los primeros 7 a 28 días de edad seguido de 1000 ppm de diurón en la dieta durante 18 meses (Reinhold, 1987). En contraste, en otros trabajos se ha observado un efecto carcinogénico (hiperplasia) en la vejiga de ratas tratadas con diurón en concentración de 2500 ppm durante 15 semanas (da Rocha *et al.*, 2010; Fava *et al.*, 2015). Los autores incluso sugieren un mecanismo de carcinogenicidad relacionado con la citotoxicidad del compuesto generada por la toxicidad química del compuesto y/o sus metabolitos y la posterior proliferación regenerativa del tejido. En otro trabajo se reportó que el diurón no tiene efecto en la iniciación de procesos carcinogénicos en la piel de ratones en concentración de 250 mg/kg (250 ppm) (Ferruccio *et al.*, 2010).

En otros estudios con gametos y embriones de ostiones, y el ensayo de letales recesivos en *Drosophila melanogaster*, se observó un efecto genotóxico del diurón en las concentraciones de 0.05 $\mu\text{g/L}^{-1}$ y 40 ppm respectivamente (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 1989; Akcha *et al.*, 2012). En cambio, el diurón no mostró un efecto genotóxico usando la versión alcalina del ensayo cometa con células de vejiga y leucocitos de sangre periférica de ratas Wistar expuestas 20 semanas a diferentes concentraciones (125, 500 y 2500 ppm) (Nascimento *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha descrito que el diurón, en una concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (2500 ppm), es capaz de inducir recombinación mitótica en *Aspergillus nidulans* con base en el aumento del promedio de homocigosis

(Cardoso *et al.*, 2010). En contraste, se ha reportado que el diurón no presentó un efecto recombinogénico en células CHO en combinación con metilmetanosulfonato empleando el ensayo cometa en su versión alcalina (da Rocha *et al.*, 2010).

El diurón no indujo intercambios de cromátidas hermanas en raíces de *Vicia faba* y en linfocitos humanos tratados en concentraciones de 10 a 300 ppm (Gómez-Arroyo *et al.*, 1990). Sin embargo, se demostró que este herbicida puede aumentar significativamente el número de aberraciones cromosómicas en raíces de *Allium cepa* en concentración de 1 ppm (Sharma y Vig, 2012). Lo anterior puede deberse a varios factores, por ejemplo, diferencias en la susceptibilidad entre especies y el mecanismo de genotoxicidad del diurón.

Los distintos estudios sobre la genotoxicidad del diurón, como puede observarse, no muestran una conclusión general clara al respecto, sin embargo, apuntan a que al menos existe la probabilidad de que presente propiedades genotóxicas.

Ensayo SMART

La mayoría de los mutágenos y carcinógenos a los que se ven expuestos los seres humanos requieren ser metabolizados antes de presentar un efecto genotóxico, esto representa un problema en las pruebas de mutagenicidad dado que los ensayos con bacterias o cultivos celulares carecen generalmente de una capacidad metabólica suficiente, mientras que otros organismos como los roedores, usados en estudios sobre metabolismo *in vivo*, no permiten llevar a cabo pruebas mutagénicas muy extensas, ni con un número elevado de individuos (Zijlstra y Vogel, 1988).

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es un organismo particularmente adecuado para el estudio de los efectos genéticos de estos compuestos ya que representa un sistema de activación *in vivo* que permite el análisis de varios tipos de daño genético desde el nivel molecular al nivel cromosómico (Vogel *et al.*, 1983).

Los CYPs en insectos pueden ser detectados en un amplio rango de tejidos. La actividad más elevada de estas enzimas ocurre en el intestino medio, cuerpos grasos pericutilares y en los túbulos de Malpighi (Chung *et al.*, 2009; Hodgson, 1983), sin embargo, la expresión de CYPs individuales puede variar entre tejidos (Korytko y Scott, 1998). En este sentido, puede decirse que en los insectos los túbulos junto con los cuerpos grasos desempeñan un papel análogo al del hígado y los riñones de los mamíferos en cuanto a desintoxicación y excreción se refiere (Yang *et al.*, 2007).

Existe una variación notable en la actividad y niveles de los CYPs durante el desarrollo de los insectos. De forma general, no existen niveles detectables en los huevos, en los diferentes estadios larvarios dichos niveles aumentan y disminuyen, en la etapa de pupa vuelven a ser indetectables y finalmente vuelven a expresarse en los adultos (Agosin, 1985; Chung *et al.*, 2009; Giraudo *et al.*, 2010). Los patrones de expresión de los CYPs individuales pueden variar a lo largo del ciclo de vida (Scott *et al.*, 1998b).

En el genoma de *Drosophila melanogaster* se han identificado cerca de 170 genes de citocromos P450 (Dos Santos *et al.*, 2015; Pfam: EBI, 2015). Al respecto, se ha demostrado que *DDT-R*, un gen que confiere resistencia al plaguicida DDT, está asociado con una transcripción elevada de un alelo del gen *Cyp6g1* (Daborn *et al.*, 2002).

Las células somáticas de *Drosophila melanogaster* ofrecen la posibilidad para desarrollar ensayos rápidos, flexibles y de corto plazo capaces de detectar un amplio espectro de agentes genotóxicos (Graf y Singer, 1992). El ensayo SMART (por las siglas en inglés de: *Somatic Mutation and Recombination Test*) es una prueba *in vivo* que permite detectar daño genotóxico en células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Se trata de una herramienta ampliamente utilizada que ofrece una manera rápida de medir el potencial de un compuesto químico para inducir la pérdida de la heterocigosis que resulta luego de una mutación somática, recombinación mitótica, rearreglo, ruptura o pérdida cromosómica. Este bioensayo hace uso de los marcadores recesivos “multiple wing hairs” (*mwh*) y “flare” (*flr*³) ubicados en el cromosoma 3 (3-0.3 y 3-38.8 respectivamente) en individuos transheterocigotos (Graf y Van Schaik, 1992). La mutación *mwh* en condición homocigota produce un cambio en el fenotipo normal de los tricomas del ala que se traduce en la presencia de más de un tricoma por célula (generalmente tres) mientras que la mutación *flr* se caracteriza por la formación de tricomas en forma de “flama” (Lindsley y Zimm, 1992).

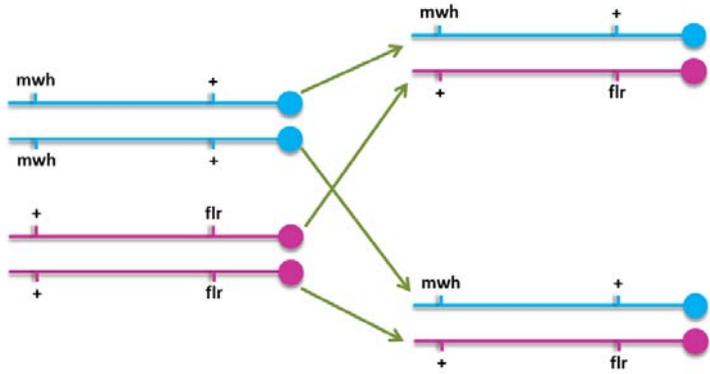
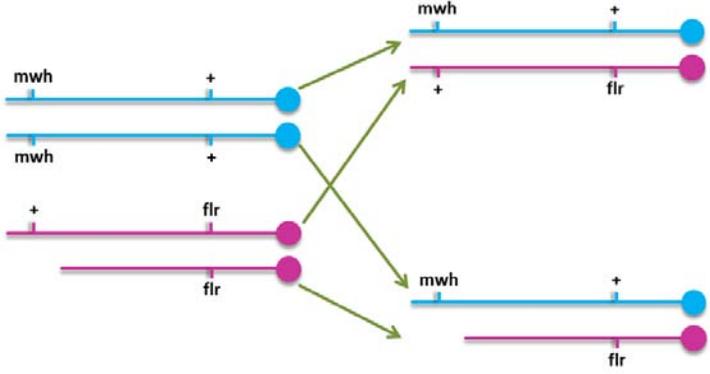
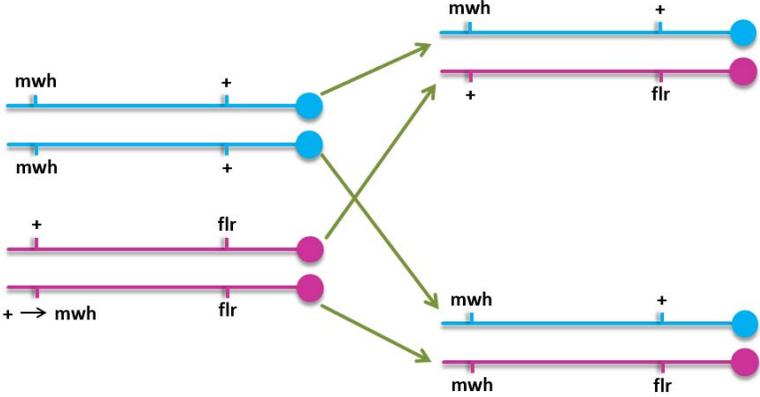
La larva de *Drosophila*, está conformada por dos tipos de tejidos: el que constituye el cuerpo de la larva y aquellos que van a dar origen al cuerpo del adulto, estos últimos se encuentran agrupados en estructuras particulares llamadas discos imaginales. Las células de los discos imaginales proliferan mitóticamente y cuando ocurre una alteración genética en una de sus células, puede dar lugar a clonas celulares con la misma alteración. Al tener dos marcadores genéticos en el mismo cromosoma, como son *mwh* y *flr*³, es posible detectar en el fenotipo de la mosca cuando ocurren mutaciones puntuales, alteraciones cromosómicas (por ejemplo, la delección de *flr*³ o *mwh*) y eventos de recombinación somática a través de la generación de clonas celulares (conocidos como “manchas”) visibles en la superficie del ala del organismo adulto (Graf *et al.*, 1984). El número total de clones inducidos en un grupo de organismos tratados químicamente arroja datos cuantitativos robustos concernientes a la actividad genotóxica global de un compuesto, mientras que los tipos de manchas observadas permiten identificar los mecanismos involucrados en su producción (Frei y Würigler, 1988, 1995).

La pérdida de la heterocigosis produce manchas sencillas *mwh*, pequeñas y grandes, por un evento de mutación puntual, deleción, intercambio entre marcadores, o por no-disyunción. Las manchas pequeñas se pueden originar a través de dos mecanismos: (i) aneuploidía segmental, la cual resulta por no-disyunción y ocasiona una reducción en la capacidad de proliferación (Frei *et al.*, 1992), o (ii) daño tardío por los metabolitos secundarios del compuesto original (Graf y Singer, 1992). Las manchas grandes son producidas por un daño temprano en las células de los discos imaginales del ala de la larva y divisiones celulares continuas de las células que expresan los marcadores. La recombinación proximal al centrómero, que involucra el intercambio del fragmento cromosómico que contiene ambos marcadores, conduce a la expresión de los marcadores *mwh* y *flr* en las células adyacentes en la forma de manchas gemelas (Tabla 8) (Graf *et al.*, 1984).

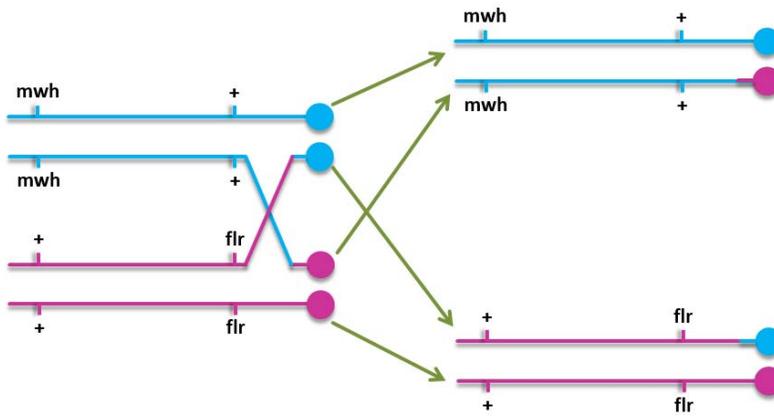
Para el ensayo se emplean tres cepas de *Drosophila melanogaster*: *flr³* (*flare*), *mwh* (*multiple wings hairs*) y *ORR;flr³*. Los individuos de la cepa *flr³* y *ORR;flr³* se caracterizan por ser heterocigotos (*flr³ / TM3, Bd^{ser}* y *ORR / ORR;flr³ / TM3, Bd^{ser}* respectivamente), pues la mutación *flr* en condición homocigota es letal para el individuo. Por esta razón se emplea el balanceador TM3 el cual presenta múltiples inversiones que impiden la recombinación con su cromosoma homólogo. El balanceador TM3 cuenta además con el marcador *Bd^{ser}*, el cual produce un fenotipo de alas con borde aserrado, esto permite seleccionar las moscas que presentan el TM3 (Lindsley y Zimm, 1992).

El ensayo SMART requiere la utilización de la cruce estándar (ST) con niveles normales de CYPs (Graf *et al.*, 1989) y la cruce de alta bioactivación (HB) (Frölich y Würigler, 1989; Graf y Van Schaik, 1992). La cruce ST se obtiene a partir de hembras *flr³* y machos *mwh*, mientras que la HB es el resultado de la cruce entre hembras *ORR;flr³* con machos *mwh*. Esta última es altamente sensible a procarcinógenos y promutágenos debido a que la cepa empleada (*ORR / ORR; flr³ / TM3, Bd^{ser}*) tiene los cromosomas 1 y 2 de una línea Oregon R (R) resistente a DDT y presenta una sobreexpresión de CYP6A2 que es debida a una mutación en el gen regulador de citocromos P450 *Rst(2)DDT* (Graf y Van Schaik, 1992; Lindsley y Zimm, 1992; Saner *et al.*, 1996). La actividad de CYP6A2 en la cruce HB es siempre mayor que en la ST y puede estar sujeta a variación dependiendo de la presencia de distintos xenobióticos (Vázquez-Gómez *et al.*, 2010). La cruce HB mejora la sensibilidad del ensayo SMART para el caso de promutágenos que requieren ser activados por los citocromos P450.

Tabla 8. Eventos genéticos detectables en el ensayo SMART empleando los marcadores *flr* y *mwh*.

Evento	Resultado
Normal	Fenotipo normal
 <p>The diagram shows two pairs of homologous chromosomes. The top pair is blue and has a blue circle at the right end, with markers 'mwh' and '+' on the left chromosome. The bottom pair is pink and has a pink circle at the right end, with markers '+' and 'flr' on the left chromosome. Green arrows indicate normal recombination events between the two pairs, resulting in four chromosomes: two blue (one with 'mwh' and '+', one with '+' and 'flr') and two pink (one with '+' and 'flr', one with 'mwh' and '+').</p>	 <p>A cluster of approximately 10 teardrop-shaped wings, representing a normal fly phenotype.</p>
Delección	Mancha sencilla
 <p>The diagram shows the same initial chromosomes as above. A green arrow indicates a deletion event where a segment of the pink chromosome containing the 'flr' marker is lost. The resulting chromosomes are: two blue (one with 'mwh' and '+', one with '+' and 'flr') and one pink (one with '+' and 'flr', one with 'mwh' and '+').</p>	 <p>A cluster of wings, some of which are smaller and have a distinct shape, representing a 'Mancha sencilla' (simple wing spot) phenotype.</p>
Mutación puntual	Mancha sencilla
 <p>The diagram shows the same initial chromosomes as above. A green arrow indicates a point mutation event where the '+' marker on the pink chromosome is replaced by 'mwh'. The resulting chromosomes are: two blue (one with 'mwh' and '+', one with '+' and 'flr') and two pink (one with '+' and 'flr', one with 'mwh' and 'flr').</p>	 <p>A cluster of wings, some of which are smaller and have a distinct shape, representing a 'Mancha sencilla' (simple wing spot) phenotype.</p>

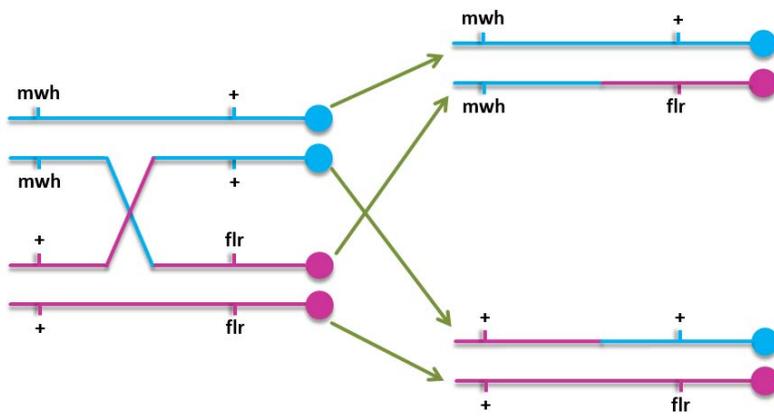
Recombinación proximal al centrómero



Mancha gemela



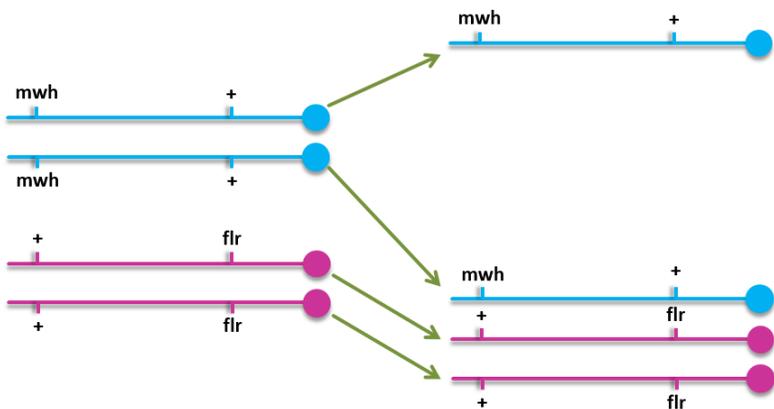
Recombinación distal al centrómero



Mancha sencilla



No disyunción



Mancha sencilla



Ensayo cometa

El ensayo cometa es una prueba para estudiar el daño al DNA con la cual puede detectarse el daño genético ocasionado por agentes físicos y químicos (Fairbairn *et al.*, 1995). Este ensayo es una de las técnicas más sensibles, rápidas y económicas utilizadas en eucariontes para la valoración de la genotoxicidad de un compuesto y permite la evaluación cuantitativa y cualitativa de daño (rompimientos simples o dobles) al DNA generado en concentraciones muy bajas (Tice *et al.*, 2000).

En esta técnica, se emplean células de un tejido proveniente del organismo expuesto al agente del cual se quiere evaluar su posible genotoxicidad, se obtiene un número relativamente pequeño de células (aproximadamente 1000 células) que son suspendidas en un gel delgado de agarosa sobre un portaobjetos para luego ser colocadas en una solución de lisis, posteriormente se realiza una electroforesis y se tiñen con un colorante de unión al DNA (suele utilizarse bromuro de etidio) (Speit y Hartmann, 1999). Las células con un elevado daño genético muestran una migración incrementada de DNA cromosómico desde el núcleo hacia el ánodo que se asemeja a la forma de un cometa (Collins, 2004). La determinación de la cantidad relativa de DNA que migra es una forma muy sencilla que permite medir el número de rupturas en el DNA en células individuales (Olive y Banáth, 2006).

Los modelos más utilizados para estudios sobre toxicología genética, emplean células de ratas y ratones, sin embargo, en años recientes se ha incrementado la preocupación sobre la ética en el uso de organismos superiores en la investigación científica y particularmente en la toxicología (Siddique *et al.*, 2005). En este sentido, *Drosophila melanogaster*, al ser un organismo del cual se ha documentado ampliamente su genética y su desarrollo, se ha establecido como modelo para estudiar enfermedades que afectan a los seres humanos y para realizar investigación sobre toxicología (Festing *et al.*, 1998). En la actualidad se conocen muchos de los patrones de expresión de las enzimas involucradas con el metabolismo de xenobióticos en *Drosophila melanogaster* (Yang *et al.*, 2007), por lo cual representa un modelo adecuado para la valoración de la genotoxicidad de xenobióticos así como de sus productos metabólicos. Recientemente, se ha adaptado el ensayo cometa para aplicarlo en *Drosophila melanogaster*, organismo con el que es posible evaluar *in vivo* la genotoxicidad de compuestos químicos y contaminantes ambientales (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Siddique *et al.*, 2005). Estos estudios emplean hemocitos, células de ganglio e intestino de larvas de tercer estadio como células diana y han demostrado que *Drosophila melanogaster* es un modelo adecuado para evaluar la genotoxicidad *in vivo* con el ensayo cometa (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Siddique *et al.*, 2005; Carmona *et al.*, 2011), además ofrece la posibilidad de detectar mecanismos relacionados con la reparación del DNA (Bilbao *et al.*, 2002).

En este trabajo se evaluó el potencial genotóxico del herbicida diurón utilizando como modelo biológico a *Drosophila melanogaster* mediante el empleo del ensayo SMART combinado con el ensayo cometa, este último

se llevó a cabo, de forma novedosa y original en las células de los discos imaginales de las larvas de tercer estadio que darán origen a las alas en el adulto. Estas células son también las analizadas mediante el ensayo SMART, propuesto en esta investigación, en las alas de las moscas adultas. Al utilizar ambos ensayos con el mismo tipo de células blanco se obtuvo mayor información acerca de los eventos de daño al DNA de la que se obtendría empleando una sola prueba. Esto permitió una valoración más amplia acerca de la genotoxicidad del diurón (Figura 1).

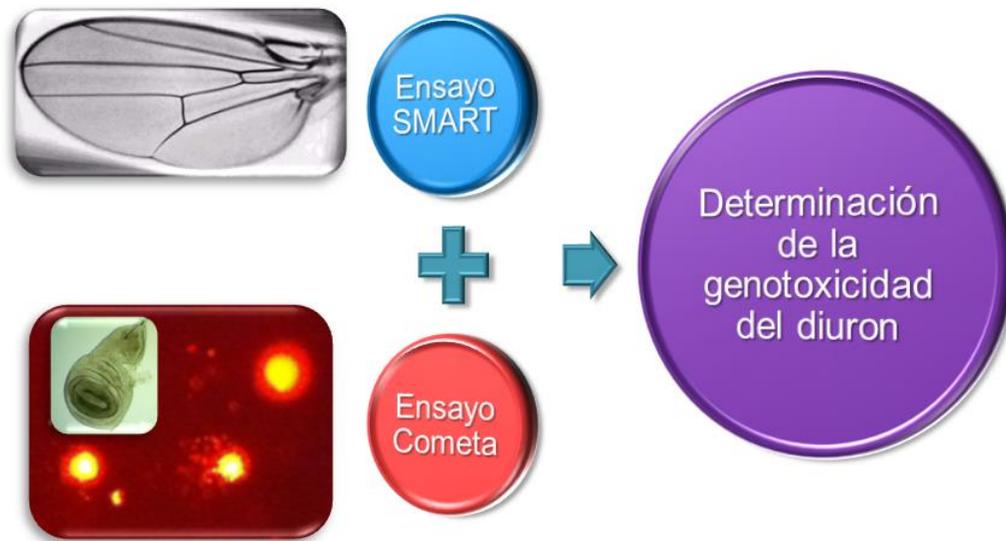


Figura 2. Al emplear el ensayo SMART y el ensayo cometa se logrará obtener una valoración más precisa de la genotoxicidad del diurón sobre las células de los discos imaginales de las alas de *Drosophila melanogaster*.

Justificación

Se han realizado diversos estudios sobre la genotoxicidad del diurón, sin embargo, existen discrepancias importantes entre ellos, por lo tanto, no es posible tener una conclusión clara al respecto. El diurón es un herbicida de amplio uso y autorizado en México para diversos cultivos, es por ello que se requiere conocer con certeza el nivel de riesgo que representa su uso. Este trabajo tiene como propósito determinar la genotoxicidad de dicho compuesto por medio del ensayo SMART y el ensayo cometa empleando células de los discos imaginales de las alas de *Drosophila melanogaster*. El uso simultáneo de ambos ensayos permitirá averiguar, con mayor información, si el diurón, en su versión comercial, tiene propiedades genotóxicas.

Hipótesis

A pesar de que los estudios sobre la genotoxicidad del diurón no permiten tener una conclusión clara al respecto, algunos de ellos han demostrado que el diurón puede tener un efecto genotóxico en diferentes modelos biológicos, por lo tanto, es probable que este mismo efecto pueda observarse en *Drosophila melanogaster* empleando el ensayo SMART y el ensayo cometa. De existir un efecto genotóxico por parte del diurón en las células de los discos imaginales de las alas de *Drosophila*, esto se verá reflejado en un aumento en la frecuencia de manchas, en comparación con el testigo negativo. De igual manera, si el diurón es capaz de ocasionar rompimientos en el DNA, esto dará como resultado un aumento en la longitud de la cola de los cometas analizados en el ensayo cometa. El uso de ambos ensayos permitirá obtener mayor información sobre el mecanismo de genotoxicidad del diurón.

Materiales y Métodos

Compuestos

Diurón, (Koa 80WDG®) (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) de Makhteshim Agan de México y bentazon (Basagran 480®) (3-isopropil-1H-2,1,3-benzotiadiazin-4 (3H)-ona 2,2-dióxido) de BASF Mexicana fueron adquiridos en la tienda de agroquímicos “El Sembrador”, México D.F. Ciclofosfamida (No. CAS 6055-19-2), colagenasa (9001-12-1), EDTA (6381-92-6) Trizma Base (77-86-1), Triton X-100 (9002-93-1), hidróxido de sodio (1310-73-2), agarosa regular (9012-36-6), agarosa de bajo punto de fusión (LGT) (39346-81-1) y bromuro de etidio (1239-45-8) de Sigma-Aldrich, México. Cloruro de sodio (7647-14-5) y ácido clorhídrico (7647-01-0) de J.T. Baker, México.

Concentraciones

A fin de establecer las concentraciones a usar para la valoración de genotoxicidad del diurón se realizó la determinación de la concentración letal media (CL_{50}) en *Drosophila melanogaster*. Se emplearon larvas de 72 h provenientes de la cruce estándar *flr³* x *mwh*, las larvas se colocaron en viales con diferentes concentraciones; 31, 62.3, 125, 250, 500 y 1 M. Se cuantificó la mortalidad a las 48 h y con los datos obtenidos se calculó la CL_{50} .

Con base en el valor calculado de la CL_{50} se eligieron tres concentraciones para el ensayo SMART y 4 para el ensayo cometa (Tabla 8). Las concentraciones empleadas en el ensayo cometa fueron seleccionadas porque permiten a las larvas alcanzar un tamaño adecuado para la disección el cual no es posible en concentraciones superiores a 10 mM en la cual se observó una reducción importante en el tamaño de las larvas. Con la finalidad de comparar la respuesta entre ambos ensayos empleando al menos dos concentraciones en común, se utilizaron

dos concentraciones más (5 mM y 10 mM), las cuales también fueron empleadas en el ensayo cometa. Para los grupos testigo negativo se empleó agua destilada y para los testigos positivos se utilizó ciclofosfamida [5 mM], un agente promutágeno cuya genotoxicidad ha sido demostrada en diferentes estudios (Anderson *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1993; Gervot *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 1999), y bentazon [48%], un herbicida el cual ha resultado ser genotóxico en *Drosophila melanogaster* (Heres-Pulido *et al.*, 2008; Kaya *et al.*, 2004).

Tabla 9. Concentraciones de diurón y testigos empleados para el ensayo SMART en cada tipo de tratamiento. *Concentraciones incluidas en el ensayo SMART en la modalidad de tratamiento directo con el fin de comparar la respuesta entre ambos ensayos.

	Ensayo SMART		Ensayo cometa
	Directo	Extracto	Directo
Testigo negativo	Agua destilada	Agua destilada	Agua destilada
Diurón	-	-	2.5 mM
	5 mM*	-	5 mM
	-	-	7 mM
	10 mM*	-	10 mM
	30 mM	30 mM	-
	60 mM	60 mM	-
	120 mM	120 mM	-
Testigo positivo	Ciclofosfamida 5 mM	Bentazon 48%	Ciclofosfamida 5 mM

Tratamientos

En este trabajo, la valoración del efecto genotóxico del diurón se llevó a cabo de dos maneras, una de ellas fue de forma directa, es decir, administrando las diferentes concentraciones del herbicida directamente al medio de cultivo y la otra por medio de un extracto acuoso obtenido de las raíces primarias de plántulas de maíz tratadas con las distintas concentraciones del herbicida. Para el caso del tratamiento directo se empleó ciclofosfamida [5 mM] como testigo positivo y con respecto al tratamiento con el extracto de maíz se utilizó bentazon 48%. En ambos casos se usó agua destilada como testigo negativo y los tratamientos fueron crónicos. Cada experimento se realizó por duplicado con tres réplicas por concentración y testigos. El ensayo cometa se realizó únicamente en la modalidad de tratamiento directo.

Ensayo SMART

Cruzas

El ensayo se llevó a cabo con dos tipos de cruza; la cruza ST se obtuvo con machos *mwh* y hembras *flr³*, mientras que la cruza HB con machos *mwh* y hembras *ORR; flr³*. Se siguió el método propuesto por Graf y colaboradores en 1984 (Graf *et al.*, 1984). Se colectaron hembras vírgenes de las cepas *flr³* y *ORR;flr³* y se colocaron en viales con medio de cultivo a base de harina de maíz y azúcar suplementado con levadura fresca, por otra parte se colectaron machos de la cepa *mwh* y fueron agregados a los viales con las hembras en una proporción 2:1 de hembras y machos respectivamente.

Los viales se mantuvieron durante seis horas a temperatura ambiente, luego de este tiempo las moscas fueron retiradas de los viales y éstos se guardaron durante 72 h a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). De ambas cruzas se obtuvo una descendencia trans-heterocigota para los marcadores *flr³* y *mwh*.

Tratamiento directo

Las larvas de 72 h, se extrajeron de los viales con ayuda de una solución de sacarosa 20% y una malla fina de nylon. Las larvas se colocaron en diferentes viales conteniendo medio de cultivo instantáneo Carolina® con las distintas concentraciones y testigos a emplear para el estudio. Los viales se mantuvieron a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) hasta que los adultos emergieron 10-12 días después. Las moscas fueron recolectadas de los viales y fijadas en etanol 70%.

Obtención del extracto acuoso

Para obtener el extracto acuoso se colocaron semillas de maíz entre dos capas de algodón estéril humedecido con agua destilada y se dejaron germinar a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad y manteniendo una humedad adecuada para la germinación. Se emplearon 100 semillas por concentración. Cuando las raíces tuvieron un tamaño promedio de 4 cm (5 días después), las semillas se retiraron del algodón y se sumergieron en soluciones con las diversas concentraciones de diurón durante cuatro horas. Posteriormente se enjuagaron 3 veces con agua destilada y se les cortó la raíz a una distancia de 3 a 4 cm de la punta. Las raíces se colectaron en un recipiente distinto para cada concentración, se cuantificó el peso fresco de las raíces y se homogeneizaron con ayuda de un mortero previamente enfriado, el homogeneizado fue filtrado con algodón estéril añadiendo luego un volumen de amortiguador a base de sodio y fosfato libre de iones de Ca y Mg con pH de 7.4 (PBS) frío equivalente al peso de las raíces (1:1). Esto se centrifugó a $10,000 \times g$ a una temperatura de 4°C durante 15 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se añadió a viales con medio de cultivo instantáneo Carolina® (Figuras 3 y 4).

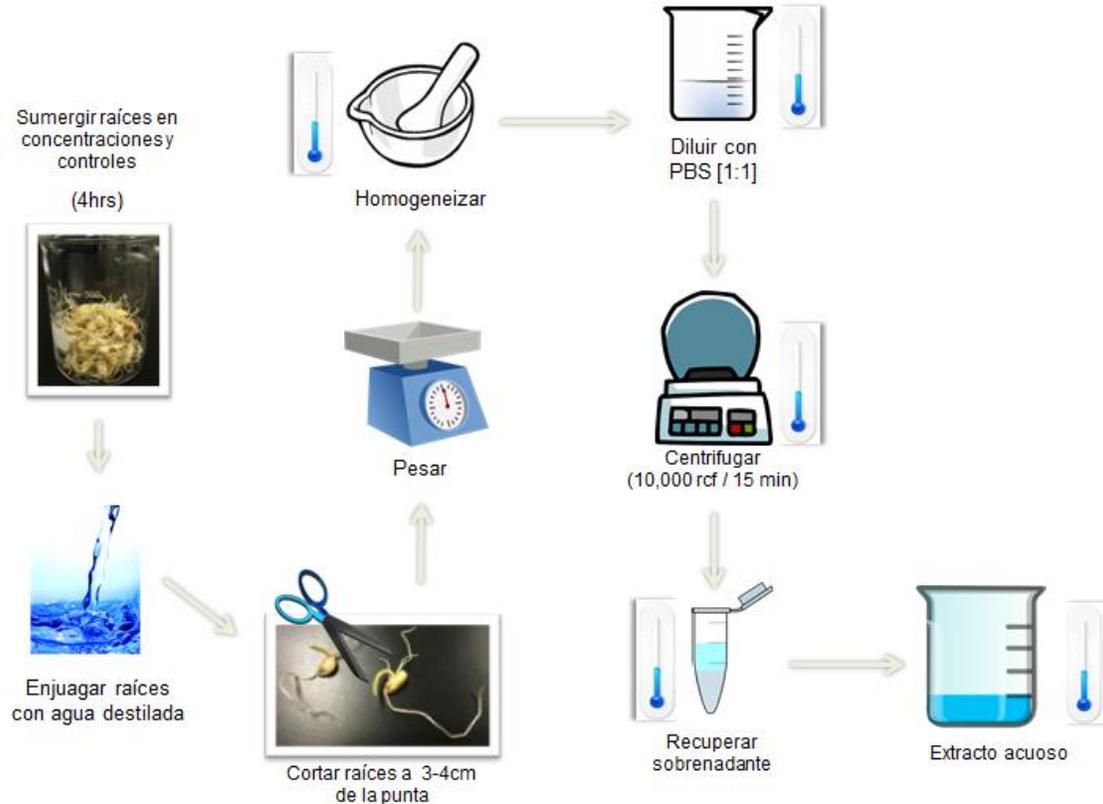


Figura 3. Procedimiento generalizado para la obtención del extracto acuoso de raíces de maíz. El símbolo de termómetro azul indica que ese paso en particular debe llevarse a cabo en frío (4°C).

Tratamiento con extracto

Las larvas de 72 h de la craza ST y HB fueron transferidas a los viales conteniendo los extractos pertenecientes a cada concentración. Al igual que con el tratamiento directo, los viales se mantuvieron a temperatura ambiente (~25°C) hasta que los adultos emergieron después de 10-12 días. Las moscas fueron recolectadas de los viales y fijadas en etanol al 70%.

Elaboración de laminillas

Las cruza ST y HB producen dos tipos de descendencia que difiere fenotípicamente con base en el marcador Bd^{ser} : (i) alas de tipo silvestre en moscas heterocigotas para los marcadores ($mhw +/+ flr^3$ ó ORR ; $mwh +/+ flr^3$); (ii) alas aserradas en moscas heterocigotas para el balanceador ($mwh +/TM3$, Bd^{ser} ó ORR ; $mwh +/TM3$, Bd^{ser}).

Con las moscas de fenotipo silvestre provenientes de cada concentración y grupos testigo de cada tratamiento, se elaboraron tres laminillas con 20 pares de alas cada una. Para lo anterior, las moscas fueron enjuagadas en agua, sus alas fueron retiradas y sumergidas en solución Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato de cloral, 50 mL de agua) para luego ser alineadas en un portaobjetos en cuatro filas de cinco pares, en las primeras dos filas se alinearon alas de hembras y en las dos últimas se colocaron alas de machos. Se colocó un cubreobjetos con una gota de solución Faure sobre las alas y sobre éste una pesa de ~75 g para lograr que las alas quedaran bien extendidas y adheridas sobre el portaobjetos. Después de 24 h, cuando la solución Faure se secó, se limpió el borde del cubreobjetos y se selló con esmalte.

Análisis en el microscopio

Las alas se observaron en un microscopio compuesto a 40x, se visualizó tanto el lado dorsal como el ventral. Se realizó un registro del tipo, ubicación y cantidad de manchas observadas en cada ala por laminilla de cada concentración y tratamiento. El tamaño de las manchas o clonas (número de células que la conforman) representa el número de divisiones celulares que ocurrieron desde el tiempo de inducción de la clona, ya sea por un evento de mutación o recombinación, en la célula del disco imaginal del ala de la larva y el comienzo de la diferenciación del ala (Graf *et al.*, 1984).

Análisis estadístico

Se comparó la frecuencia de cada tipo de manchas (sencillas o gemelas), las categorías de tamaño de mancha (mancha pequeña < 2 células; mancha grande > 2 células) y la frecuencia total de manchas por mosca de cada tratamiento con la frecuencia de los testigos negativos. El diagnóstico estadístico se llevó a cabo con el programa SMART basado en la prueba Kastenbaum-Bowman ($p = 0.05$) (Frei y Würigler, 1988). Los resultados no significativos hablan de una falta de sensibilidad o la ausencia de genotoxicidad en la concentración evaluada en el ensayo. Los resultados significativos representan un efecto genotóxico cuando las frecuencias del tratamiento son más elevadas que en el testigo (Frei y Würigler, 1988).

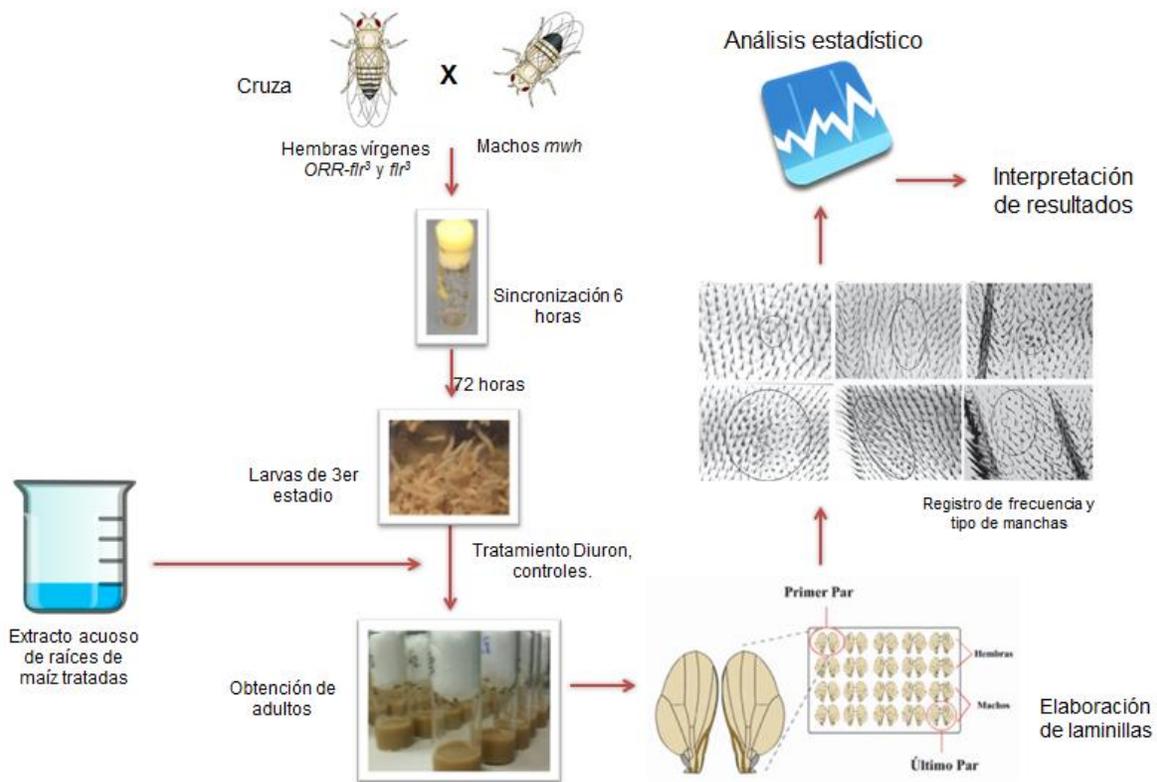


Figura 4. Esquema general de los pasos a seguir para la realización del ensayo SMART.

Ensayo cometa

Cepas utilizadas

Para la realización del ensayo cometa se emplearon las mismas cepas que en el ensayo SMART, es decir, se usó la cepa flr^3 y la cepa $ORR;flr^3$. Las moscas de ambas cepas se sincronizaron durante seis horas en viales con medio de cultivo suplementado con levadura fresca en una proporción 2:1 de hembras y machos. Los viales se mantuvieron a temperatura ambiente durante 72 h.

Concentraciones

Las concentraciones de diurón empleadas en el ensayo cometa fueron: 2.5, 5, 7.5 y 10 mM. Para el testigo negativo se utilizó agua destilada y para el testigo positivo se utilizó ciclofosfamida en concentración 5 mM.

Tratamientos

Las larvas de 72 h de ambas cepas fueron colectadas de los viales de la misma manera que en el ensayo SMART y se colocaron en viales conteniendo medio de cultivo instantáneo Carolina® con las diferentes concentraciones de diurón y testigos a emplear. Las larvas permanecieron en estos viales durante 24 h a temperatura ambiente (Figura 4).

Disección de larvas

Las larvas de 96 h de cada concentración y testigo fueron diseccionadas en frío para obtener los discos imaginales. Las larvas fueron extraídas de los viales y lavadas en PBS frío, luego fueron transferidas a una solución de hipoclorito de sodio al 5% en PBS y finalmente se enjuagaron en PBS frío. Por cada concentración y cada cepa se diseccionaron 20 larvas para obtener un total de 40 discos. La disección de cada larva se realizó en una gota de PBS frío y los discos fueron depositados en 200 μ L del mismo búfer. Se centrifugaron durante 5 minutos a una velocidad de 1,100 x g y una temperatura de 4°C. Se eliminó el sobrenadante y los discos fueron resuspendidos con 100 μ L de una solución de colagenasa [2 mg/mL]. Se mantuvieron en agitación constante en un Thermomixer® durante 45 min / 37°C / 700 rpm. A la suspensión celular se le añadió 50 μ L de PBS frío y se filtró con una malla de nylon con una apertura de 53 μ m para eliminar cualquier residuo grande del tejido. La colagenasa fue removida lavando la suspensión celular tres veces durante 5 minutos en PBS frío con agitación manual suave. Se calculó el porcentaje de viabilidad de la suspensión celular con azul tripan (Strober, 2001), el cual fue de 94.48%. Se prepararon alícuotas de 20 μ L para cada laminilla.

Elaboración de laminillas

Se prepararon portaobjetos con una capa de agarosa regular al 0.5% y secados a 50°C. Cada alícuota de células fue resuspendida con 75 μ L de agarosa LGT al 0.5% y se colocaron dos alícuotas en cada portaobjetos, inmediatamente se les colocó encima un cubreobjetos de 22 x 22 mm y se guardaron en refrigeración por 5 minutos para permitir la solidificación de la agarosa. Se sacaron del refrigerador, se les retiró el cubreobjetos y se les añadió otros 75 μ L de agarosa LGT al 0.5% sobre la capa anterior, se les puso nuevamente un cubreobjetos y se guardaron en refrigeración durante 5 minutos. A la par de la elaboración de las laminillas con células de discos imaginales, se elaboraron, de la misma manera, laminillas con 5 μ L de una suspensión de linfocitos tratados con peróxido de hidrógeno en concentración 100 μ M de forma que hubiera una laminilla de linfocitos por cada experimento. Lo anterior fue con el propósito de contar con un control metodológico con un nivel de daño constante. De esta manera, si el valor de daño en alguna laminilla de linfocitos cambiaba, todas las laminillas de ese experimento se descartarían.

Lisis alcalina

Las laminillas fueron retiradas del refrigerador, se les quitó el cubreobjetos y se sumergieron en una solución de lisis fría a base de NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM y Trizma base 10 mM (pH 10). Se mantuvieron en refrigeración durante al menos una hora.

Electroforesis

Se retiraron las laminillas de la solución de lisis y se colocaron en una cámara de electroforesis dispuesta sobre una cama de hielo en un cuarto con luz tenue. Se agregó el amortiguador de electroforesis (pH > 13) a base de NaOH 300 mM y EDTA 1 mM. Las laminillas permanecieron en éste durante 10 minutos para permitir el desenrollamiento del DNA. Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis empleando el mismo amortiguador con una corriente de 300 mA y un voltaje de 0.93 V/cm² durante 20 minutos. En cada electroforesis se colocó una laminilla de linfocitos.

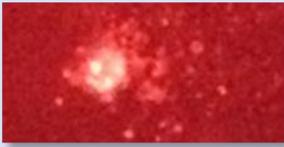
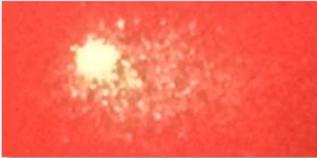
Neutralización

Las laminillas se extrajeron de la cámara de electroforesis y se les añadió amortiguador con una concentración 0.4 M de Trizma base y un pH de 7.5 durante 5 min. Se escurrieron y nuevamente se les agregó amortiguador por 3 minutos más. Se les agregó etanol al 96% durante 3 minutos y se dejaron escurrir y deshidratar.

Tinción y Visualización

Las laminillas fueron teñidas con bromuro de etidio (20mg/ml: 25µl por laminilla) y observadas en un microscopio de fluorescencia (Olympus, Japan) con un objetivo de 40x. Si bien, el análisis de los cometas suele realizarse con ayuda de un software de análisis de imágenes, la inspección visual es igualmente válida y existe una alta concordancia entre ambos métodos (Collins *et al.*, 1997). El motivo de llevar a cabo el análisis de manera visual fue el reducido tamaño de las células, el cual no permitía un análisis adecuado con el software disponible. El conteo se realizó con base en cinco categorías de daño de acuerdo a lo propuesto por Collins en 2004 (Tabla 10). A cada categoría se le otorgó un valor entre 0 y 4: (0) = sin daño y (4) = daño máximo. Se cuantificaron 100 cometas por concentración. Igualmente, se contaron 100 cometas de las laminillas de linfocitos de cada experimento.

Tabla 10. Clasificación visual de cometas de acuerdo a la categoría de daño.

Categoría de daño	Aspecto del cometa
0	
1	
2	
3	
4	

Análisis estadístico

Se calculó el parámetro “Total Comet Score” (TCS) con base en el número de cometas observados en cada categoría de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$(\% \text{ de células en la clase 0}) \times 0 + (\% \text{ de células en la clase 1}) \times 1 + (\% \text{ de células en la clase 2}) \times 2 + (\% \text{ de células en la clase 3}) \times 3 + (\% \text{ de células en la clase 4}) \times 4$$

El valor del TCS se encuentra en el rango de 0 a 400 unidades arbitrarias, valores cercanos a cero indican poco daño, mientras que los valores cercanos a 400 representan un daño elevado. Con los valores de TCS de las laminillas de linfocitos de cada experimento y sus repeticiones, realizadas como control del procedimiento de lisis y electroforesis, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis ($p = 0.05$) con la finalidad de detectar si existían variaciones significativas. Una vez que se comprobó estadísticamente que el nivel de daño en los linfocitos no

fue significativamente distinto entre todos los casos (TCS promedio = 57.26 ± 5.78), y que por lo tanto, no hubo variaciones metodológicas que pudieran afectar los resultados, se realizó el análisis de los datos obtenidos con las células de los discos imaginales del ala, para comparar la respuesta entre concentraciones y grupos testigo así como entre cepas mediante pruebas de Kruskal-Wallis, la de comparación múltiple de Dunn y la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon, respectivamente ($p = 0.05$). De igual manera, se llevó a cabo una regresión lineal ($p = 0.05$) con los valores de cada repetición TCS obtenidos en las cepas *flr³* y *ORR;flr³*, para determinar si existía una influencia significativa de las distintas concentraciones de diurón sobre los valores de TCS.

Para comparar la respuesta de genotoxicidad observada entre el ensayo SMART y en el ensayo cometa, se realizó un análisis de Spearman ($p = 0.05$) con los valores de TCS y la frecuencias relativas de manchas sencillas y gemelas de ambas cruza y cepas. Dicho análisis se utiliza para variables discretas de tipo ordinal (Vaughan, 2001; Weinberg y Abramowitz, 2002)

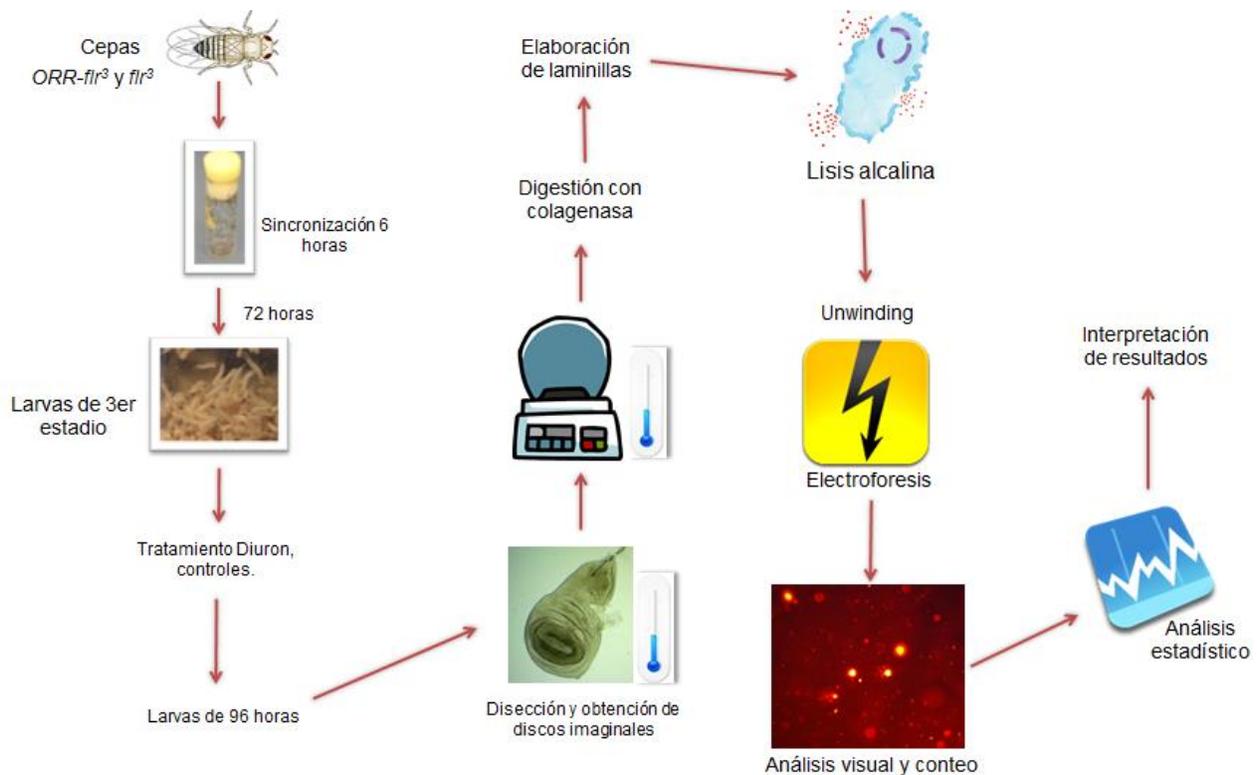


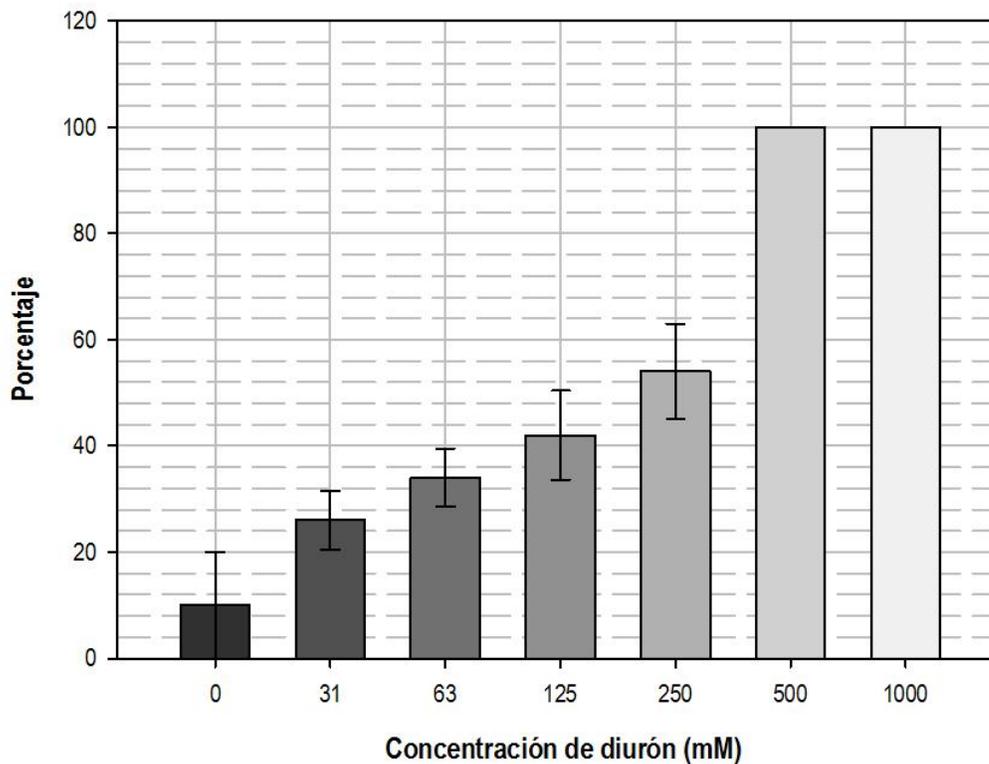
Figura 5. Vista general del ensayo cometa con células de discos imaginales de *Drosophila melanogaster*.

Resultados

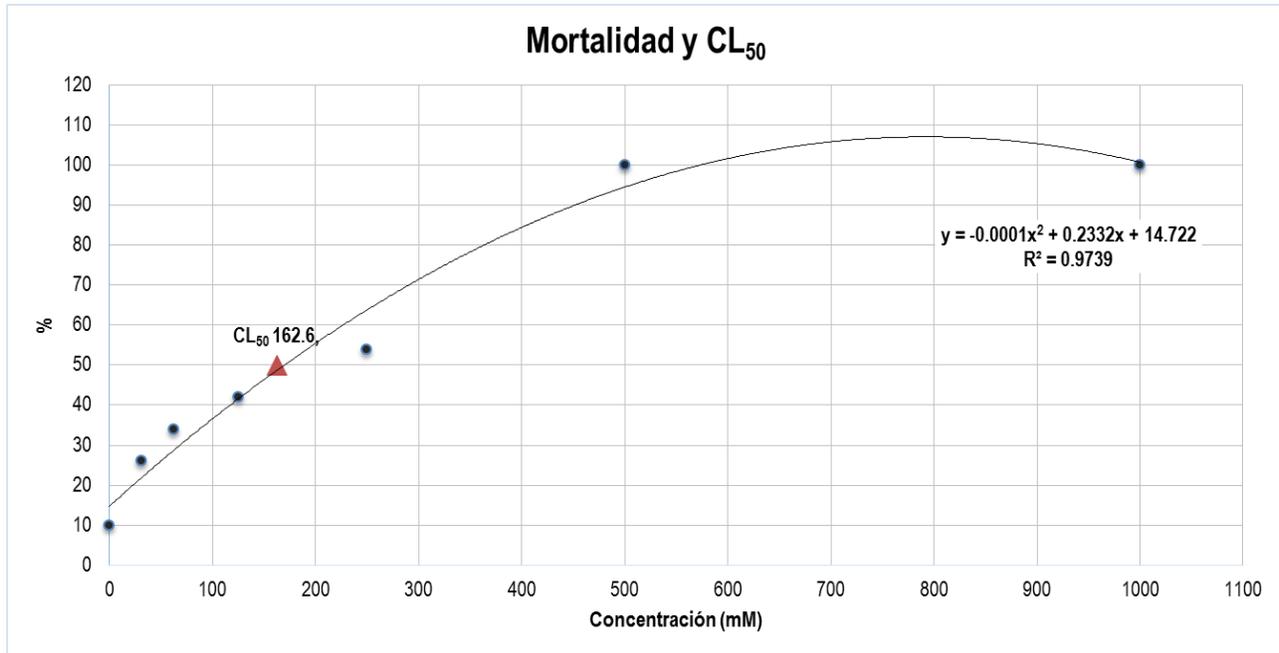
Toxicidad del diurón

Con los datos de mortalidad obtenidos del tratamiento de larvas de 72 h provenientes de la crucea *flr³ x mwh* con diferentes concentraciones de diurón (31, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 mM) se calculó la CL₅₀. Se realizó una regresión polinomial la cual tuvo un valor $R^2 = 0.9739$. A partir de la ecuación de la función se obtuvo el valor de la CL₅₀ el cual fue 162.6 mM (Gráficas 1 y 2).

Porcentaje promedio de mortalidad a diferentes concentraciones de diurón



Gráfica 1. Porcentaje promedio de mortalidad de larvas de 72 h bajo diferentes concentraciones de diurón. El promedio de cada concentración se obtuvo con base en el número de larvas muertas registradas a las 48 h de exposición.



Gráfica 2. Regresión polinomial para calcular el valor de la CL₅₀ del diurón.

Ensayo SMART en ala

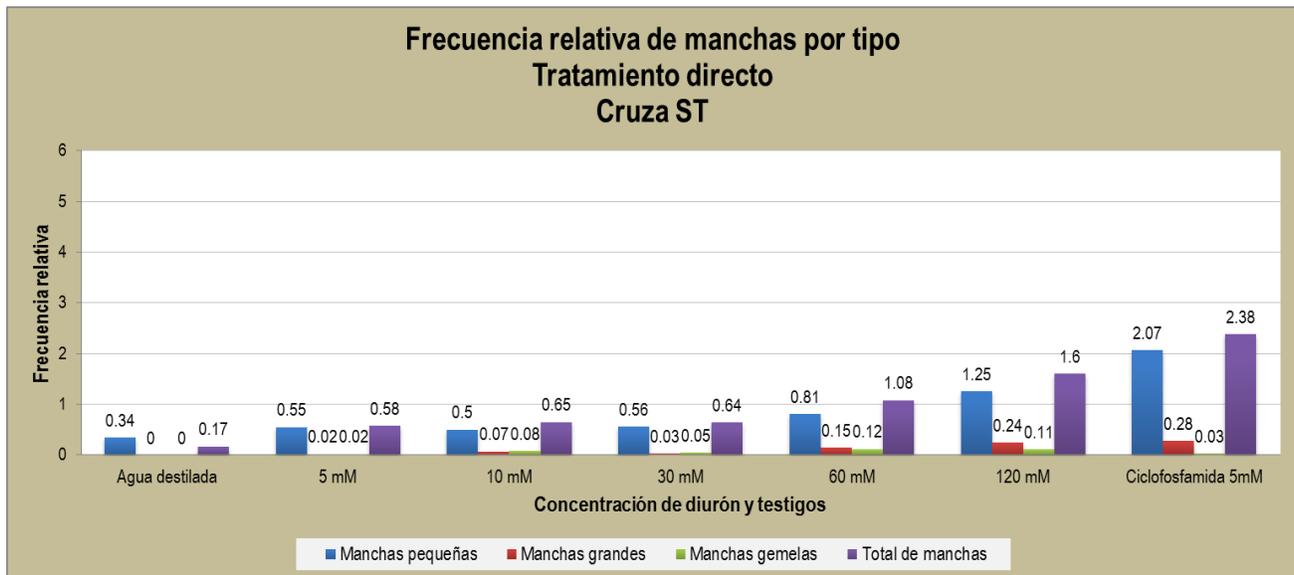
En el tratamiento con diurón administrado de forma directa, se observó en ambas cruzas un aumento en la frecuencia de manchas directamente proporcional a la concentración. En cuanto al total de manchas, con la cruz ST, se observó un efecto genotóxico a partir de la concentración más baja (5 mM) en tanto que con la HB el mismo efecto se logró a partir de la concentración 60 mM. En el tratamiento con el extracto de raíces de maíz, se registró una respuesta positiva (indicando de un efecto genotóxico) en todas las concentraciones de diurón empleadas y con ambas cruzas. En este último caso, a diferencia del tratamiento directo, no se presentó una respuesta dosis-efecto, es decir, no se observó una relación directa entre la concentración y la frecuencia de manchas.

En lo que se refiere a la frecuencia de manchas gemelas, en la cruz ST se registró una frecuencia significativamente diferente al testigo de agua destilada en las concentraciones 10, 60 y 120 mM. A continuación se presentan los datos de la frecuencia y tipo de manchas observados en cada tratamiento y en cada cruz:

Tabla 11. Diagnóstico estadístico del experimento con diurón en forma directa empleando la cruza estándar.

DIURÓN DIRECTO CRUZA ST						
Concentración de diurón y testigos	No. de individuos	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico Estadístico				Manchas <i>mwh</i>
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Total de manchas m=2	
Agua destilada	59	0.34 (20)	0 (0)	0 (0)	0.17 (20)	20
5 mM	60	0.55 (33)i	0.02 (1)i	0.02 (1)i	0.58 (35)+	35
10 mM	60	0.50 (30)i	0.07 (4)i	0.08 (5)+	0.65 (39)+	39
30 mM	59	0.56 (33)+	0.03 (2)i	0.05 (3)i	0.64 (38)+	38
60 mM	52	0.81 (42)+	0.15 (8)+	0.12 (6)+	1.08 (56)+	54
120 mM	55	1.25 (69)+	0.24 (13)+	0.11 (6)+	1.60 (88)+	88
Ciclofosfamida 5 mM	60	2.07 (124)+	0.28 (17)+	0.03 (2)i	2.38 (143)+	140

Los datos se presentan de acuerdo con Frei y Würigler (1988) para comparar con el testigo negativo (agua destilada): -, negativo; +, positivo; i, inconcluso ($p = 0.05$) (Frei y Würigler, 1988).

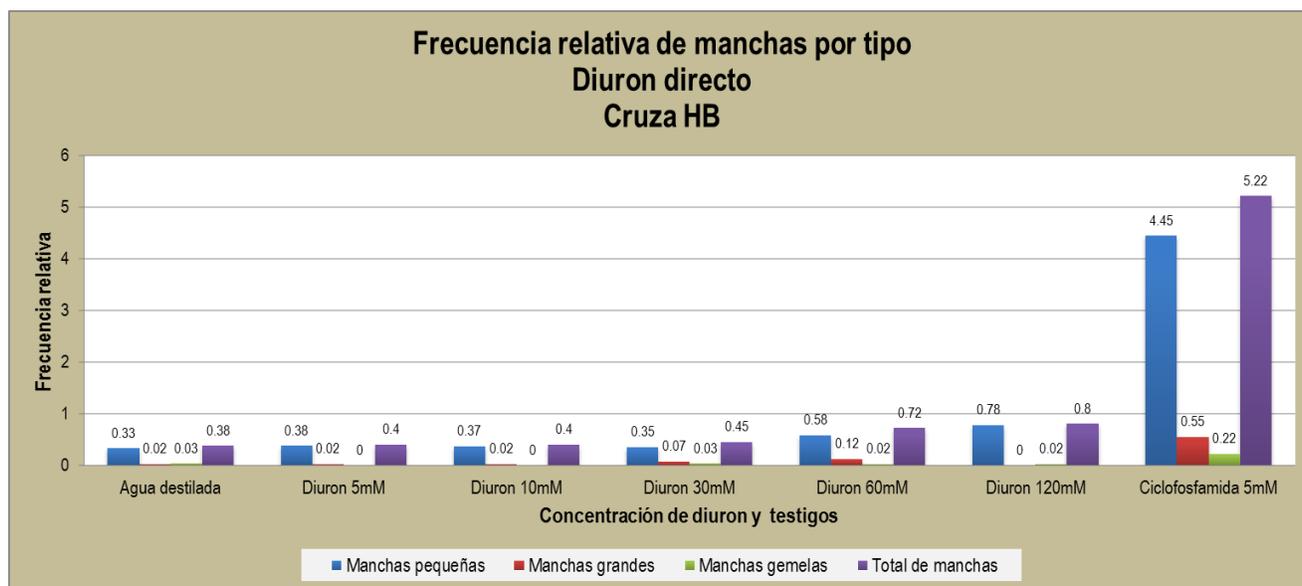


Gráfica 3. Frecuencia relativa del tipo de manchas en el ensayo con diurón administrado de forma directa empleando la cruza estándar. El valor relativo se obtiene dividiendo el número de manchas de cada categoría entre el total de individuos.

Tabla 12. Diagnóstico estadístico del experimento con diurón en forma directa empleando la cruza de alta bioactivación.

DIURÓN DIRECTO CRUZA HB

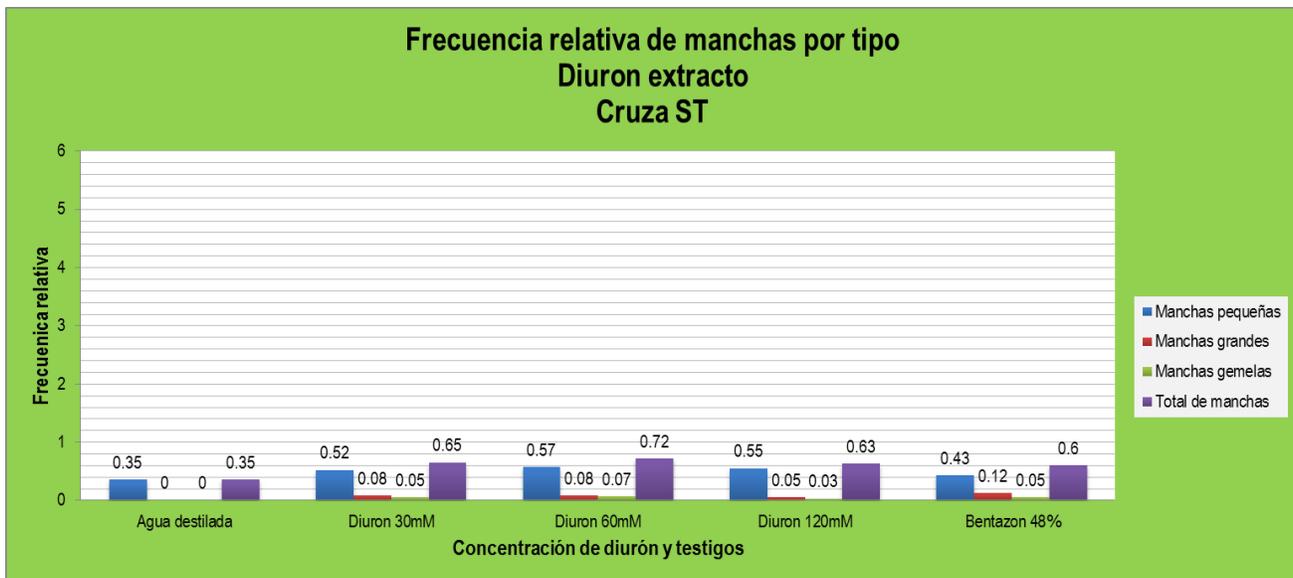
Concentración de diurón y testigos	No. de individuos	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico Estadístico				Manchas <i>mwh</i>
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Total de manchas m=2	
Agua destilada	58	0.33 (19)	0.02 (1)	0.03 (2)	0.38 (22)	22
5 mM	60	0.38 (23)i	0.02 (1)i	0.00 (0)-	0.40 (24)-	24
10 mM	60	0.37 (22)i	0.02 (1)i	0.00 (0)-	0.40 (24)-	24
30 mM	60	0.35 (21)-	0.07 (4)i	0.03 (2)i	0.45 (27)-	27
60 mM	60	0.58 (35)+	0.12 (7)+	0.02 (1)i	0.72 (43)+	40
120 mM	60	0.78 (47)+	0 (0)i	0.02 (1)i	0.80 (48)+	48
Ciclofosfamida 5 mM	60	4.45 (267)+	0.55 (33)+	0.22 (13)+	5.22 (313)+	306



Gráfica 4. Frecuencia relativa del tipo de manchas en el ensayo con diurón administrado de forma directa empleando la cruza de alta bioactivación.

Tabla 13. Diagnóstico estadístico del experimento con extracto de raíces de maíz tratadas con diurón empleando la craza estándar.

DIURÓN EXTRACTO CRUZA ST						
Concentración de diurón y testigos	No. de individuos	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico Estadístico				Manchas <i>mwh</i>
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Total de manchas m=2	
Agua destilada	60	0.35 (21)	0 (0)	0 (0)	0.35 (21)	21
30 mM	60	0.52 (31) _i	0.08 (5) ₊	0.05 (3) _i	0.65 (39) ₊	39
60 mM	60	0.57 (34) _i	0.08 (5) ₊	0.07 (4) _i	0.72 (43) ₊	43
120 mM	60	0.55 (33) _i	0.05 (3) _i	0.03 (2) _i	0.63 (38) ₊	38
Bentazon (48%)	60	0.43 (26) _i	0.12 (7) ₊	0.05 (3) _i	0.60 (36) ₊	36

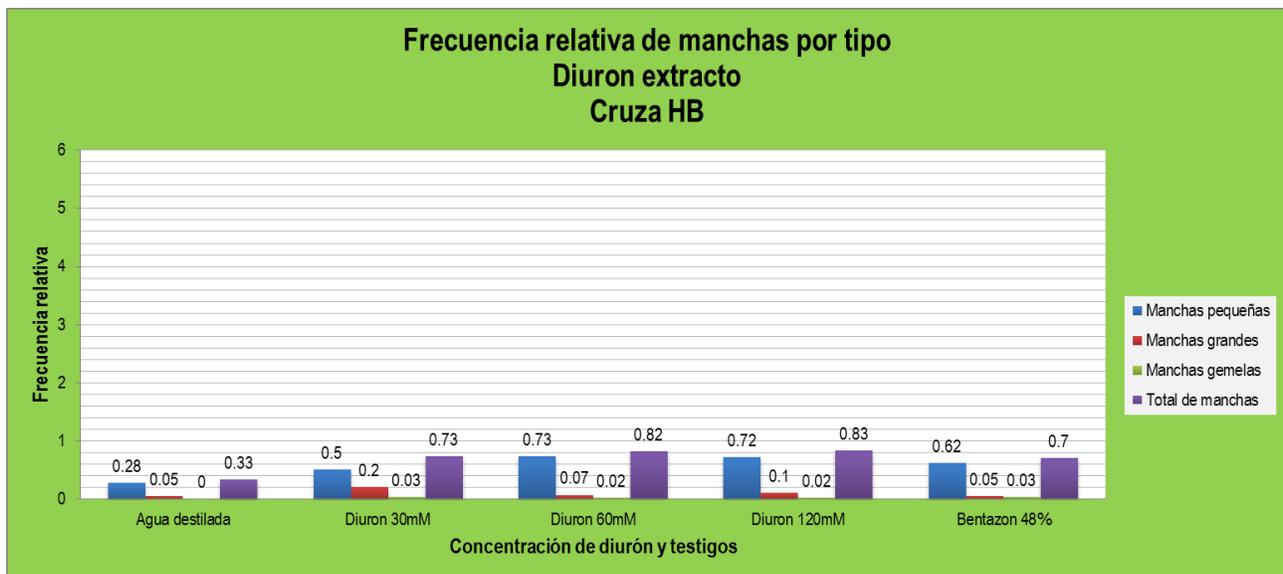


Gráfica 5. Frecuencia relativa del tipo de manchas en el ensayo con el extracto de raíces de maíz tratadas con diurón empleando la craza estándar.

Tabla 14. Diagnóstico estadístico del experimento con extracto de raíces de maíz tratadas con diurón empleando la cruz de alta bioactivación.

DIURÓN EXTRACTO CRUZA HB

Concentración de diurón y testigos	No. de individuos	Manchas por ala (Número de manchas) Diagnóstico Estadístico				Manchas <i>mwh</i>
		Manchas pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Total de manchas m=2	
Agua destilada	60	0.28 (17)	0.05 (3)	0 (0)	0.33 (20)	20
Diurón 30 mM	60	0.50 (30)+	0.20 (12)+	0.03 (2)i	0.73 (44)+	43
Diurón 60 mM	60	0.73 (44)+	0.07 (4)i	0.02 (1)i	0.82 (49)+	49
Diurón 120 mM	60	0.72 (43)+	0.10 (6)i	0.02 (1)i	0.83 (50)+	50
Bentazon (48%)	60	0.62 (37)+	0.05 (3)i	0.03 (2)i	0.70 (42)+	42



Gráfica 6. Frecuencia relativa del tipo de manchas en el ensayo con el extracto de raíces de maíz tratadas con diurón empleando la cruz de alta bioactivación.

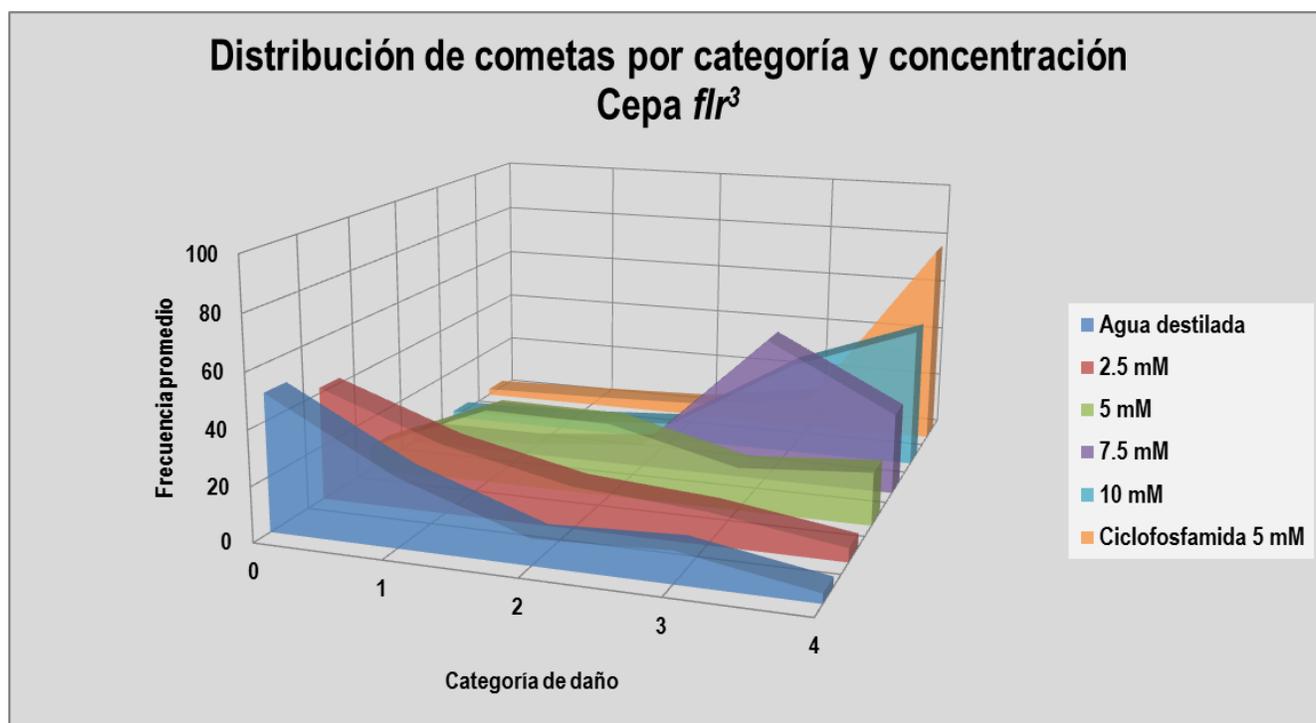
Tabla 15. Resumen de la respuesta de evaluación de genotoxicidad del diurón por medio del ensayo SMART.

Tratamiento	Cruza	Concentración	Respuesta
Directo	ST	Agua destilada	-
		5 mM	+
		10 mM	+
		30 mM	+
		60 mM	+
		120 mM	+
		Ciclofosfamida 5 mM	+
	HB	Agua destilada	-
		5 mM	-
		10 mM	-
		30 mM	-
		60 mM	+
		120 mM	+
		Ciclofosfamida 5 mM	+
Extracto	ST	Agua destilada	-
		30 mM	+
		60 mM	+
		120 mM	+
		Bentazon (48%)	+
	HB	Agua destilada	-
		30 mM	+
		60 mM	+
		120 mM	+
		Bentazon (48%)	+

(+) = Efecto positivo; (-) = Sin efecto positivo.

Ensayo cometa

Con el ensayo cometa nuevamente se observó un efecto genotóxico causado por el diurón en la concentración 10 mM, así como con el testigo positivo, en las dos cepas utilizadas. No se observó una diferencia significativa en la respuesta entre la cepa *flr³* y la cepa *ORR;flr³* (de acuerdo a una prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon con los valores de TCS; $p = 0.05$). En las dos cepas se registró un cambio gradual en la distribución de cometas por categoría de daño que fue dependiente de la concentración. En el testigo de agua destilada y las concentraciones más bajas de diurón, la frecuencia de cometas se distribuye, en mayor medida, en las categorías de menor daño, mientras que en las concentraciones más altas y el testigo de ciclofosfamida la distribución de cometas se desplaza hacia las categorías de mayor daño (Gráficas 7 y 8; Tablas 16 y 17).

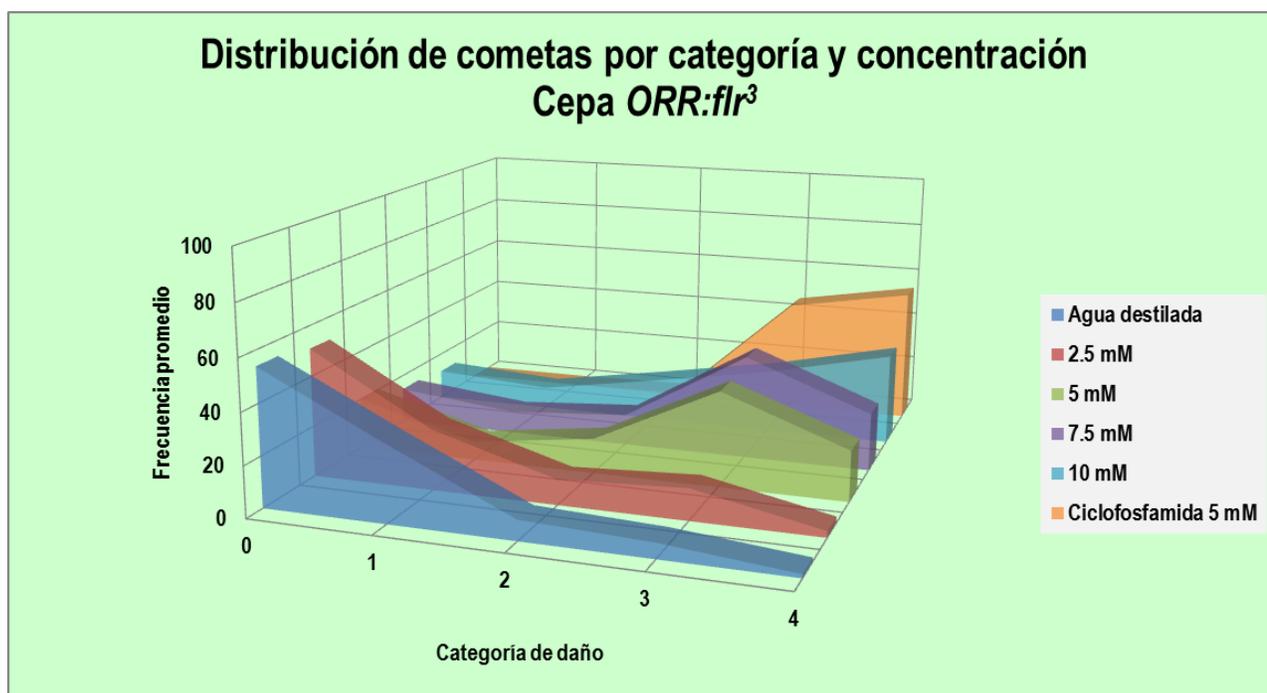


Gráfica 7. Distribución de cometas observados con la cepa *flr³* por categoría de daño, concentración de diurón y grupos testigo. (Cat. 0) = sin daño - (Cat. 4) = máximo daño.

Tabla 16. Frecuencia de cometas cuantificados empleando la cepa *flr³* para cada categoría en cada concentración y testigos.

	Cepa <i>flr³</i>					TCS
	0	1	2	3	4	
Agua destilada	50 ± 2.16	25.5 ± 3.42	9.5 ± 2.52	11.5 ± 1.29	3.5 ± 3.0	93 ± 8.76
2.5 mM	42 ± 2.94	25.5 ± 3.42	15.5 ± 3.11	12 ± 1.63	5 ± 2.0	112.5 ± 11.47
5 mM	9 ± 3.16	28 ± 4.16	27.5 ± 1.29	16 ± 2.94	19.5 ± 2.08	209 ± 12.99
7.5 mM	3.5 ± 1.29	4 ± 2.0	8.5 ± 2.08	54 ± 4.97	30 ± 1.41	303 ± 7.87
10 mM	2.5 ± 2.08	3.5 ± 1.91	6.5 ± 3.42	35 ± 4.97	52.5 ± 8.70	331.5 ± 15.80*
Ciclofosfamida 5 mM	2.5 ± 1.91	3.5 ± 1.0	5 ± 1.63	12 ± 2.45	77 ± 3.46	357.5 ± 8.21*

(±) Desviación estándar. * Significativamente diferente con respecto al testigo negativo (agua destilada) con base en una prueba de Kruskal-Wallis y un análisis de comparación múltiple de Dunn ($p = 0.05$).



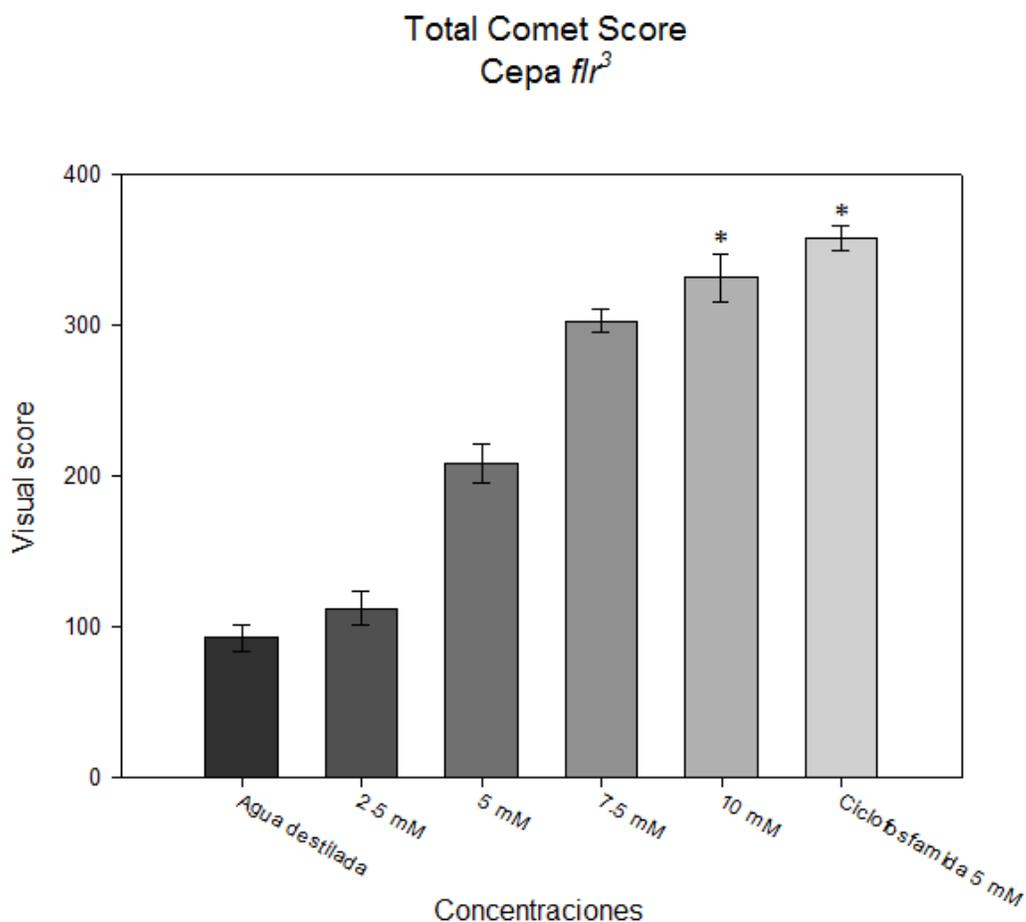
Gráfica 8. Distribución de cometas observados con la cepa *ORR; flr³* por categoría de daño, concentración de diurón y grupos testigo. (Cat. 0) = sin daño - (Cat. 4) = máximo daño.

Tabla 17. Frecuencia de cometas cuantificados empleando la cepa *ORR; flr³* para cada categoría en cada concentración y testigos.

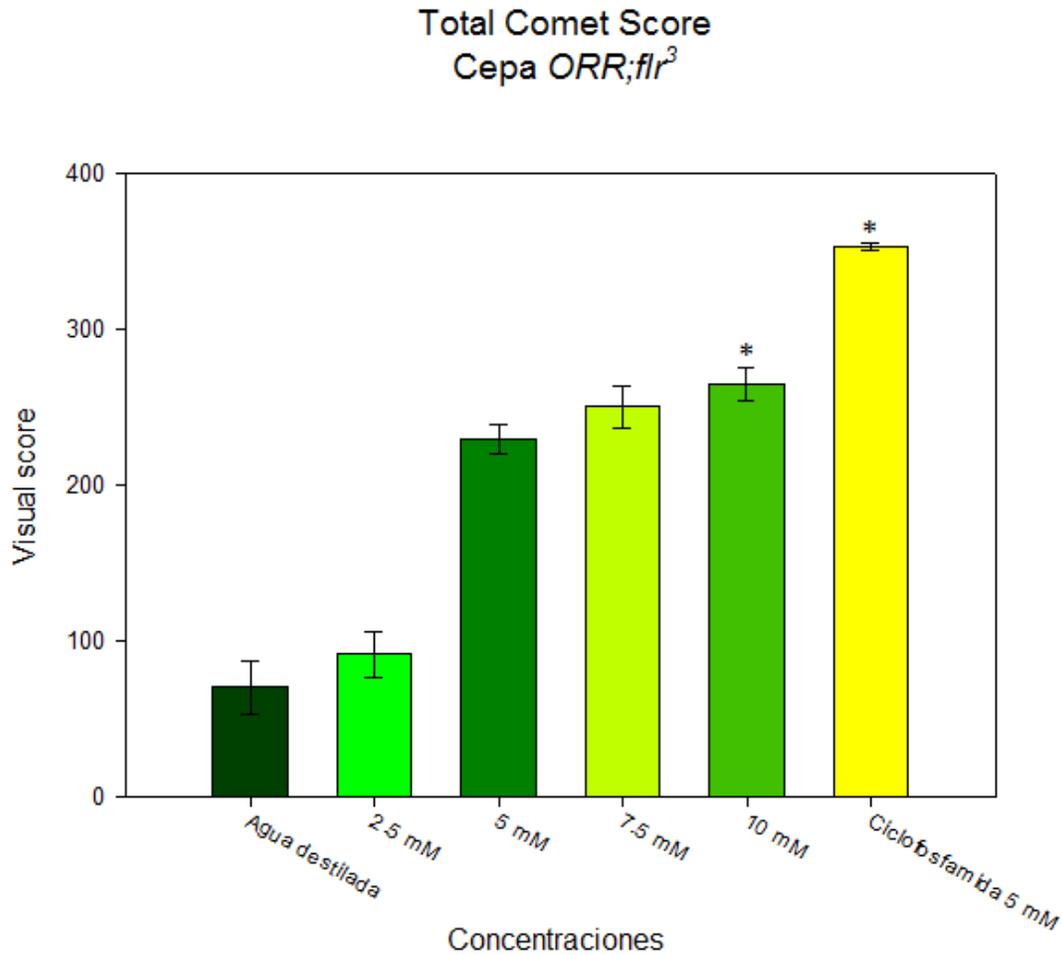
	Cepa <i>ORR; flr³</i>					TCS
	0	1	2	3	4	
Agua destilada	54 ± 4.16	30.5 ± 3.42	8 ± 2.16	6 ± 3.56	1.5 ± 1.91	70.5 ± 16.94
2.5 mM	51 ± 3.92	24 ± 2.94	10 ± 2.58	12.5 ± 3.42	2.5 ± 1	91.5 ± 14.66
5 mM	20.5 ± 3.11	7.5 ± 2.38	14 ± 2.94	38 ± 2.58	20 ± 4.69	229.5 ± 9.75
7.5 mM	14 ± 2.94	9 ± 2.58	12.5 ± 1.91	41.5 ± 4.20	23 ± 2.58	250.5 ± 13.67
10 mM	12 ± 2.58	9 ± 1.63	17 ± 2.58	25.5 ± 4.80	36.5 ± 2.08	265.5 ± 10.47*
Ciclofosfamida 5 mM	0 ± 0	0 ± 0	0.5 ± 1	45.5 ± 3.70	54 ± 2.94	353.5 ± 2.38*

(±) Desviación estándar * Significativamente diferente con respecto al testigo negativo (agua destilada) con base en una prueba de Kruskal-Wallis y un análisis de comparación múltiple de Dunn (p = 0.05).

Los valores calculados de TCS para cada concentración muestran una clara respuesta dependiente de la concentración. A medida que la concentración de diurón aumenta también lo hace el valor de TCS, de la misma manera que como ocurre con los valores de frecuencia por categorías de daño. Con la concentración de 10 mM de diurón y la ciclofosfamida, el valor de TCS es significativamente diferente al del agua destilada en ambas cepas (Gráficas 9 y 10).

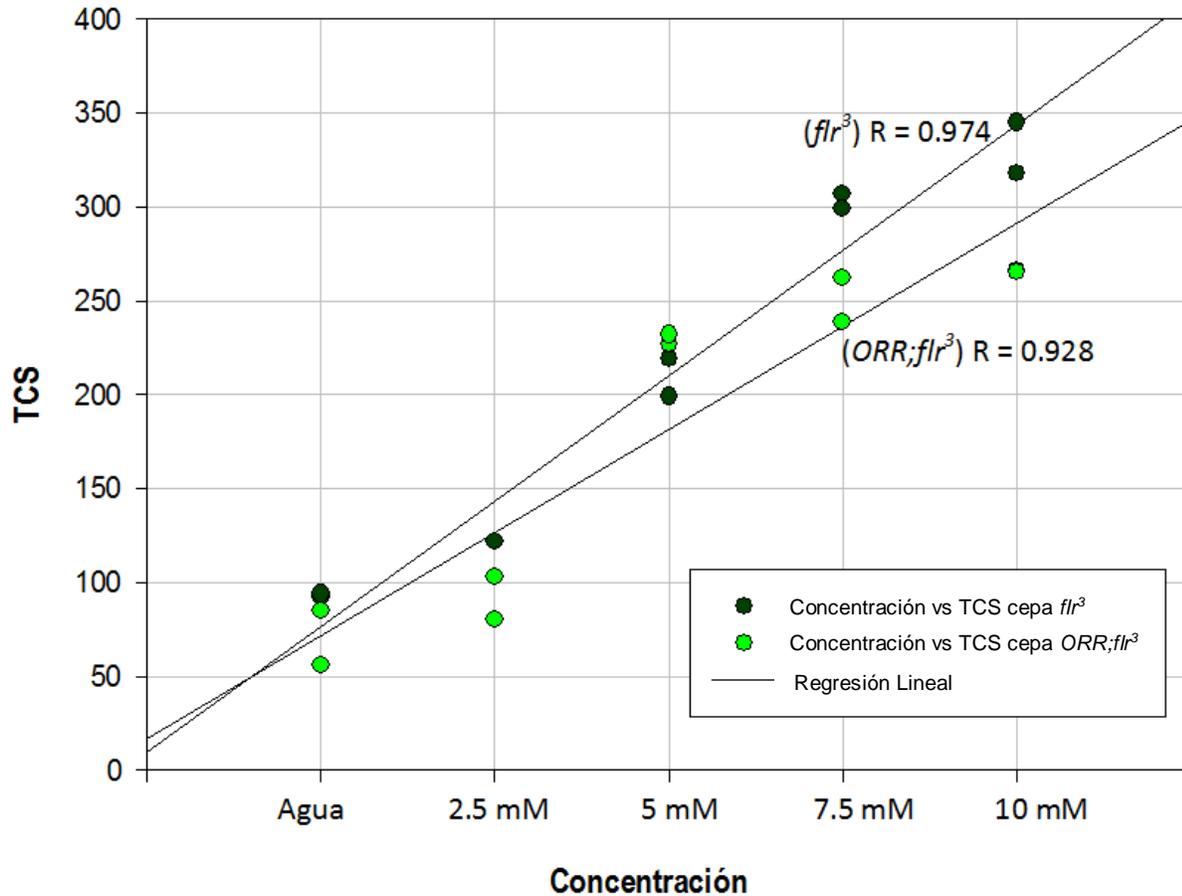


Gráfica 9. Valores de Total Comet Score (TCS) para cada concentración de diurón y testigos empleando la cepa *flr*³. Un valor cercano a 0 indica que el daño es muy bajo mientras que uno cercano a 400 representa un daño elevado. *Respuesta significativamente distinta a la del testigo negativo (agua destilada) de acuerdo a un análisis de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunn ($p = 0.05$).



Gráfica 10. Valores de Total Comet Score para cada concentración de diurón y testigos empleando la cepa *ORR;flr³*. *Respuesta significativamente distinta a la del testigo negativo ($p = 0.05$) con base en una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una de comparación múltiple de Dunn.

Con base en el análisis de regresión lineal con los datos de TCS, se encontró una influencia significativa de la concentración de diurón sobre el valor de TCS tanto en la cepa *flr³* ($R = 0.974$) como en la cepa *ORR;flr³* ($R = 0.928$) ($p < 0.05$) (Gráfica 11). La prueba de comparación de pendientes ($p = 0.05$; $F = 1.53377$) mostró que no existe una diferencia significativa entre ambas y arrojó una pendiente agrupada de 60.825 con una ordenada al origen de 13.175.



Gráfica 11. Regresión lineal para determinar la influencia de la concentración de diurón sobre el valor de TCS en las cepas flr^3 y $ORR;flr^3$.

Análisis de correlación

De acuerdo con el análisis estadístico de correlación de Spearman, se encontró una correlación positiva entre la respuesta observada en el ensayo cometa con las dos cepas y la frecuencia de manchas sencillas de la cruz ST en el ensayo SMART así como en los casos que se muestran en la Tabla 18. Los casos donde la correlación es significativa (*) denotan que existe una asociación entre las variables (sin embargo un análisis de correlación nunca demuestra una relación del tipo causa-efecto entre las variables). Una correlación positiva indica que las dos variables a comparar se comportan de manera similar. Una correlación negativa indica que las dos variables tienen comportamientos opuestos.

Tabla 18. Matriz de correlación para la respuesta de genotoxicidad entre el ensayo SMART y el ensayo cometa

		Ensayo cometa		SMART						
				Tratamiento directo				Extracto acuoso		
		TCS <i>flr</i> ³	TCS <i>ORR; flr</i> ³	MS ST	MS HB	MG ST	MG HB	MS ST	MS HB	MG ST
Ensayo cometa		TCS <i>flr</i> ³								
		TCS <i>ORR; flr</i> ³	0.99*							
SMART	Tratamiento directo	MS ST	0.95*	0.95*						
		MS HB	0.8	0.8	0.99*					
		MG ST	0.2	0.2	0.09	0.14				
		MG HB	0.32	0.32	0.39	0.39	-0.77*			
	Extracto acuoso	MS ST	-	-	0.21	0.21	0.98*	-0.7		
		MS HB	-	-	0.4	0.4	0.9*	-0.8*	0.82*	
		MG ST	-	-	0.36	0.36	0.67	-0.14	0.76*	0.36
		MG HB	-	-	0.53	0.53	0.11	0.47	0.22	0.11

(*) Correlación significativa de acuerdo a un análisis de correlación de Spearman ($p = 0.05$). TCS = Total Comet Score; ST = cruza estándar; HB = cruza de alta bioactivación; MS = frecuencia de manchas sencillas; MG = manchas gemelas; (-) no comparable porque hay menos de dos concentraciones en común.

Discusión

SMART en ala

En el ensayo SMART en ala, en ambas modalidades del experimento (diurón administrado de forma directa y a través del extracto de la planta) se observó un efecto genotóxico. Cuando el diurón se administró de forma directa se observó un claro efecto dosis-respuesta en las dos cruza utilizadas, es decir, a medida que la concentración de diurón se incrementa, también lo hace la frecuencia de manchas sencillas (Gráficas 3 y 4). En la cruza ST se presentó un efecto genotóxico en todas las concentraciones de diurón utilizadas, mientras que en la cruza HB el mismo efecto sólo se alcanzó en las concentraciones de 60 y 120 mM (Tablas 11 y 12). Lo anterior fue debido, muy probablemente, a las diferencias metabólicas existentes entre las dos cruza, pues como se mencionó anteriormente, la cruza HB presenta niveles altos de citocromos P450 (Graf y Van Schaik, 1992; Saner *et al.*, 1996; Vázquez-Gómez *et al.*, 2010) que le permiten metabolizar de forma más eficiente a los agentes xenobióticos y en este caso, el metabolismo del diurón tuvo como consecuencia una menor genotoxicidad. Esto sugiere que la cruza HB fue capaz de metabolizar el diurón de tal forma que no se alcanzó a provocar un efecto genotóxico en las concentraciones de 5, 10, y 30 mM sino hasta 60 y 120 mM por lo que es

posible que la capacidad de desintoxicación haya sido rebasada (Tablas 12 y 15). Estos resultados sugieren que, en *Drosophila melanogaster*, la biotransformación del diurón no resulta en una bioactivación del compuesto, es decir, no se obtienen metabolitos más genotóxicos que el compuesto original, sino lo contrario, con niveles más elevados de citocromos P450 el proceso de desintoxicación es más eficiente.

La diferente capacidad metabólica entre las cruzas ST y HB se ve nuevamente demostrada por la notable discrepancia en la frecuencia de manchas sencillas para el tratamiento con ciclofosfamida (Gráficas 3 y 4; Tablas 11 y 12). Al respecto, este compuesto es considerado un promutágeno que requiere, ser bioactivado para generar un efecto genotóxico. La ciclofosfamida es bioactivada por varios CYPs y se producen metabolitos más reactivos que son capaces de producir lesiones en el DNA las cuales pueden resultar en rompimientos cromosómicos (Chang *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995; Gervot *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000). Por este motivo, no resulta extraña la elevada frecuencia de manchas registrada en la craza HB, pues dicho aumento debió ser producto de una bioactivación más eficiente de la ciclofosfamida en comparación con la craza ST, esto se tradujo en un incremento de metabolitos tóxicos (Saner *et al.*, 1996) que finalmente indujeron una frecuencia de manchas más elevada. En estudios anteriores con el ensayo SMART en ala, se ha encontrado que la ciclofosfamida es capaz de inducir una frecuencia de manchas superior en la craza HB en comparación con la craza ST. Al respecto, Spanó y colaboradores en el 2001 reportaron una respuesta dosis-efecto en ambas cruzas tratadas con distintas concentraciones de ciclofosfamida, no obstante, la craza HB presentó una frecuencia general de manchas sencillas y gemelas más elevada que la craza ST (Spanó *et al.*, 2001).

En la modalidad del ensayo SMART donde se utilizó el extracto de raíces de maíz tratadas con diurón, se registró un efecto genotóxico similar en todas las concentraciones con las dos cruzas. En este caso, a diferencia del tratamiento directo, no se observó un efecto dosis-respuesta claro (Gráficas 5 y 6). Esto se podría explicar con dos propuestas: (1) Los productos de la biotransformación del diurón en la planta fueron similares y causaron el daño genotóxico; (2) el diurón no es metabolizado por los citocromos P450 de la planta y la genotoxicidad se debe al compuesto primario. Si hubiera ocurrido lo segundo, los resultados de SMART hubieran sido semejantes a los del tratamiento directo, lo cual no fue el caso. Los resultados indican que la genotoxicidad se debe a los productos del metabolismo de la planta, los cuales fueron capaces de generar un efecto genotóxico muy similar en las dos cruzas con todas las concentraciones empleadas. Por otro lado, al no haber diferencia en la respuesta entre ambas cruzas, como lo ocurrido con el tratamiento directo, es probable que dichos productos no pudieran ser sujetos de una biotransformación posterior en las larvas o que fueran metabolizados de una forma que no se vio reflejada en una respuesta diferente entre las dos cruzas. Además, resulta evidente que la biotransformación del diurón ocurrida en las raíces de la planta es muy distinta a la que sucede en las larvas de *Drosophila*, pues los metabolitos producidos por las larvas, específicamente en la craza HB (en el tratamiento directo), no resultaron ser genotóxicos en la concentración de 30 mM mientras que la misma concentración utilizada en el extracto, sí resultó ser genotóxica en la misma craza (Tablas 12 y 14). Al,

respecto, se sabe que las plantas pueden metabolizar compuestos xenobióticos de diversas maneras y que tanto en animales como en plantas, generalmente, el último paso de la biotransformación molecular es la conjugación (Parkinson y Ogilvie, 2008). Dichos conjugados pueden ser excretados en los animales, pero en las plantas, estos productos quedan almacenados (Sandermann, 1988, 1992). Esta importante diferencia en el procesamiento de xenobióticos entre plantas y animales puede estar jugando un papel en los resultados obtenidos en este trabajo. La acumulación de metabolitos del diurón en las raíces de maíz puede estar relacionada con el hecho de que se haya registrado un efecto genotóxico similar en las dos cruzas, puesto que ambas recibieron los metabolitos finales del proceso de biotransformación del diurón, los cuales podrían ser más tóxicos para *Drosophila* que el compuesto original como ocurre con varios plaguicidas (Poet *et al.*, 2003; Buratti *et al.*, 2003, 2005; Usmani *et al.*, 2004; Mutch y Williams, 2006; Foxenberg *et al.*, 2007; Abass, *et al.*, 2007, 2010, 2012; Leoni *et al.*, 2008; Croom *et al.*, 2010;). Como se mencionó anteriormente, algunas enzimas de las familias CYP71 y CYP76 en plantas son capaces de metabolizar el diurón y otros herbicidas del tipo fenilureas, de igual manera el maíz presenta varios miembros de dichas familias (Monaco *et al.*, 2013) que probablemente participan en la biotransformación del diurón. De acuerdo a esta idea, la biotransformación de este compuesto en las raíces de maíz pudo haber resultado en una bioactivación, generando metabolitos secundarios que tuvieron en ambas cruzas un efecto directo en las células imaginales del ala.

Ensayo cometa

Uno de los objetivos de este trabajo fue el desarrollar una técnica para el uso de las células de los discos imaginales de *Drosophila melanogaster* en el ensayo cometa. La utilización de este organismo en el ensayo cometa es relativamente nueva, existen estudios donde se hace uso de las células del intestino (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Siddique *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2011), ganglio (Bilbao *et al.*, 2002) y hemocitos (Carmona *et al.*, 2011) en los cuales ha quedado demostrada la utilidad de este organismo en el ensayo cometa para la evaluación de la genotoxicidad de determinados agentes xenobióticos. Hasta la fecha, sólo se cuenta con un reporte donde se emplean discos imaginales (de patas, alas y ojos) de *Drosophila* en el ensayo cometa (Verma *et al.*, 2012). Si bien, el enfoque principal del estudio mencionado no fue el de determinar la genotoxicidad de un xenobiótico en particular (el ensayo cometa se usó como herramienta complementaria para medir la sensibilidad al daño en el DNA en individuos con el alelo mutante *l(3)pl10^R*), sí representa un antecedente sobre el uso de los discos imaginales en el ensayo cometa. El método utilizado en dicho estudio para el ensayo cometa va de acuerdo a lo propuesto por Siddique *et al.*, 2005 para el uso de células de intestino de *Drosophila*. Aunque la técnica utilizada en el presente trabajo sigue una línea similar a la de este último, también contiene varias modificaciones dirigidas a desarrollar un método óptimo de acuerdo a las dificultades que implicaba utilizar un tipo celular distinto al de intestino. Al respecto, se ha reportado que la desagregación mecánica y química de tejidos sólidos puede inducir daño adicional al DNA (Burlinson *et al.*, 2007). En el presente trabajo, el daño basal observado

fue más elevado que el que se ha publicado para otras células somáticas en *Drosophila* (Siddique *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2011). Sin embargo, dado que las comparaciones se hicieron contra sus correspondientes testigos negativos, en este estudio fue posible detectar la genotoxicidad del diurón y de los compuestos usados en los testigos positivos.

Los resultados obtenidos en el ensayo cometa, el cual evalúa rompimientos dobles en el DNA, otorgan mayor información acerca del posible mecanismo de genotoxicidad del diurón. En este caso, no se observó una respuesta distinta entre las cepas *flr³* y *ORR;flr³*, pues en ambas se registró una respuesta significativamente mayor a la del testigo negativo a partir de la concentración 10 mM. Esto indica, que el diurón es capaz de generar un importante daño en el DNA que se traduce en rompimientos de cadena sencilla o doble y por otra parte que dichas rupturas, probablemente, estén directamente relacionadas con el efecto genotóxico observado en el ensayo SMART. Si los rompimientos en la cadena de DNA no son reparados o se reparan de forma errónea pueden dar lugar a mutaciones, algunas de las cuales podrían producir la pérdida de la heterocigosidad para los marcadores *flr* y *mwh* (Graf *et al.*, 1984).

Se propone que la uniformidad en la respuesta observada entre las dos cepas en el ensayo cometa, en contraste con el ensayo SMART, se debe al tiempo de exposición de las larvas al tratamiento. En el ensayo cometa las larvas de tercer estadio se expusieron por 24 h y después de este periodo se extrajeron los discos imaginales, en cambio en el caso del ensayo SMART las larvas de tercer estadio se expusieron por un periodo de ~48 h hasta el estadio de pupa. Por esta razón, es probable que el efecto genotóxico del diurón, que se observó de forma más acentuada en la cruza ST en el ensayo SMART, sea producto de una acumulación del daño en dicha cruza, en otras palabras; el daño que se observa en el ensayo cometa, probablemente se trate de un tipo de daño inicial que afecta de la misma manera a las dos cepas dado el breve tiempo de exposición (24 h) el cual no es suficiente para observar un proceso de desintoxicación, sin embargo, cuando el tiempo de exposición aumenta (~48 h en SMART) se hace presente la eficiente capacidad metabólica de la cruza HB la cual es capaz de desintoxicar de mejor manera a las células.

Para apoyar la idea anterior y como se mencionó previamente en este trabajo, se ha observado que en mamíferos el diurón es capaz de inducir la expresión de CYPs involucrados en su propio metabolismo como son CYP1A1, CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 (Abass *et al.*, 2012). Los primeros cuatro guardan una homología con *Cyp18a1*, mientras que CYP3A4 es homólogo de *Cyp9f2*, *Cyp6a2* y *Cyp6g1* en *Drosophila melanogaster*, (Cunningham *et al.*, 2014; Homologene, 2015). Los CYPs producidos por estos genes tienen características de óxido-reductasas y mono-oxigenasas. Tanto *Cyp9f2*, como *Cyp18a1* están además relacionados con el desarrollo de los discos imaginales (Chen *et al.*, 2010; Rewitz *et al.*, 2010), lo cual indica una presencia importante en las células de los discos. Dicho lo anterior, existe la posibilidad de que la expresión en *Drosophila melanogaster* de *Cyp9f2* y *Cyp18a1*, junto con otros CYPs como *Cyp6a2* y *Cyp6g1*, sea inducida por la exposición al diurón

(como ocurre en mamíferos), si este es el caso, el tiempo de exposición, así como las características metabólicas de cada cepa, deben jugar un papel importante en la biotransformación y genotoxicidad de este compuesto.

Con el ensayo cometa se demostró que el diurón es capaz de generar un daño elevado en el DNA, parte de este daño podría, en teoría, ser reparado por medio de un proceso de reparación por recombinación entre cromosomas homólogos. Es bien sabido que la recombinación entre cromosomas homólogos representa un mecanismo importante para la reparación de rompimientos de cadena doble en el DNA (Li y Heyer, 2008; Daley *et al.*, 2014; Prakash *et al.*, 2015). Lo anterior apoya el hecho de que en la cruce ST del ensayo SMART en ala, la frecuencia de manchas gemelas (uno de los productos de un evento de recombinación entre marcadores y centrómeros) en las concentraciones de 10, 60 y 120 mM, cuando el diurón se administró de forma directa, es significativamente diferente con respecto al testigo de agua destilada. Este efecto recombinogénico no se observó en ninguna concentración con la cruce HB. Los resultados en las manchas gemelas de la cruce ST indican que el diurón presenta un efecto recombinogénico, el cual ha sido demostrado con anterioridad (Cardoso *et al.*, 2010) y sugiere la posibilidad de que en la cruce ST se presentó un proceso de reparación por recombinación entre homólogos en mayor proporción que en la cruce HB. La recombinación es una de las causas de la pérdida de la heterocigosis (Bishop, 1991; Happle, 1999; Marshall, 1991; Sengstag, 1994) y, por lo tanto, puede promover la manifestación de los marcadores *flr* y *mwh* (Graf *et al.*, 1984). En este sentido, se observa nuevamente que una biotransformación eficiente del diurón, como la ocurrida en la cruce HB, puede inhibir la genotoxicidad del diurón, en este caso, un efecto recombinogénico.

Correlación entre los resultados de ambos ensayos

Para conocer la relación entre la respuesta de genotoxicidad de ambos ensayo se hizo un análisis de correlación de Spearman con las frecuencias relativas de manchas registradas en el ensayo SMART en ala y los valores de TCS del ensayo cometa (Tabla 18). Los casos en los cuales se encontró una correlación positiva o negativa se explican por los argumentos arriba mencionados. Se observó una correlación significativa positiva entre los valores de TCS de las cepas *flr*³ y *ORR;flr*³ ($r_s = 0.99$), lo cual apoya la idea de que ambas cepas fueron afectadas sin diferencias significativas tal y como se comprobó con la prueba de comparación de pendientes. La correlación positiva registrada en los valores de TCS de ambas cepas y el valor de frecuencia relativa de manchas sencillas de la cruce ST ($r_s = 0.95$) se podría deber a dos factores; (1) ambas cepas usadas en el ensayo cometa, como se mencionó, tuvieron una respuesta de genotoxicidad muy similar y (2) la cruce ST, como también se ha dicho, fue la más afectada en el ensayo SMART y por lo tanto su respuesta de genotoxicidad es significativa con valores similares a los resultados del ensayo cometa. De igual forma, existe una correlación positiva entre las frecuencias relativa de manchas sencillas de las cruces ST y HB ($r_s = 0.99$) cuando el diurón fue administrado de forma directa debido a que, a pesar de que en la cruce ST la respuesta fue significativa en

todas las concentraciones y en la cruza HB no lo fue, en ambas se registró un claro efecto dosis-respuesta en el que a mayor concentración de diurón mayor fue la frecuencia de manchas sencillas. La correlación negativa significativa para la frecuencia relativa de manchas gemelas entre las cruzas ST y HB ($r_s = -0.77$) con el tratamiento directo se explica porque la frecuencia de dichas manchas sólo fue significativa en la cruza ST, por la ausencia de recombinación entre centrómeros en la cruza HB. La correlación positiva que se registró para la frecuencia relativa de manchas sencillas entre las cruzas ST y HB ($r_s = 0.82$) tratadas con el extracto acuoso se debe a que su frecuencia fue similar en ambas cruzas, lo cual confirma que no hubo diferencia en el daño genotóxico provocado por el extracto acuoso. Otros casos en donde sí se encontró una correlación positiva fue entre la frecuencia de manchas sencillas bajo el tratamiento con el extracto acuoso y la frecuencias de manchas gemelas con el tratamiento directo de la cruza ST ($r_s = 0.98$), y entre las manchas gemelas y sencillas de la cruza ST del tratamiento con extracto acuoso ($r_s = 0.76$). En estos dos casos se trata de tratamientos y tipos de manchas diferentes, por lo que se asume que el primer caso se debió al papel que juega el maíz en el metabolismo del diurón, lo cual dio como resultado una similitud entre la frecuencia de las manchas sencillas del extracto acuoso y las gemelas del tratamiento directo, que son producto de un efecto recombinogénico significativo. En el segundo caso, la asociación indica que en la cruza ST el daño representado por las manchas gemelas es similar a la de las manchas sencillas, lo cual puede interpretarse como un efecto similar en la mutación y recombinación derivada de los metabolitos del diurón en la planta. La asociación negativa entre las manchas sencillas de la cruza HB tratada con el extracto acuoso y las manchas gemelas de la cruza HB con el tratamiento directo ($r_s = -0.80$) se explica por la diferencia de los tratamientos y el tipo de mancha. Estos resultados sugieren que aunque cada ensayo detecta el daño al DNA desde diferentes enfoques genéticos, es posible asociar la respuesta de genotoxicidad registrada en cada uno de ellos. Los casos donde no se encontró una correlación significativa se explican porque no hubo una asociación en el comportamiento de los valores a comparar.

El trabajo aquí presentado, demuestra que el empleo de las células de los discos imaginales de las alas de *Drosophila melanogaster* en el ensayo cometa es adecuado para la valoración de la genotoxicidad de xenobióticos dada por rompimientos de DNA, además, la realización simultánea del ensayo SMART permite obtener mayor información acerca del mecanismo de genotoxicidad del agente que se desea evaluar (mutación y recombinación). De igual manera, el uso de dos cepas y cruzas distintas (flr^3 y $ORR;flr^3$; ST y HB) en cada ensayo, confirma la relevancia de la bioactivación para producir o no efectos genotóxicos.

Conclusiones

La respuesta observada tanto en el ensayo SMART como en el ensayo cometa demuestra que el diurón es capaz de producir un efecto genotóxico en las células de los discos imaginales de las alas de *Drosophila melanogaster*. La diferencia en la respuesta registrada entre ambos ensayos sugiere, por un lado, que existe una probable inducción de la transcripción de citocromos P450 relacionados con su metabolismo la cual está relacionada con el tiempo de exposición, y por otro lado, que el metabolismo del diurón influye de forma importante en el grado y tipo de daño que dicho compuesto puede generar.

El extracto de raíces de maíz tratadas con diurón resultó ser genotóxico al mismo nivel en ambas cruzas. Esta similitud indica que las raíces de maíz son capaces de producir metabolitos que no son sujetos de biotransformación en las larvas y que por lo tanto pueden actuar de manera directa y ocasionar el mismo efecto genotóxico en las dos cruzas de *Drosophila melanogaster*.

Los resultados obtenidos en este trabajo comprueban que el diurón es un agente genotóxico. Este compuesto es capaz de producir rompimientos de la cadena de DNA, mutaciones y eventos de recombinación somática. La presencia de productos genotóxicos en los extractos de raíces de maíz demuestra la existencia de un riesgo para los consumidores de cultivos en lo que se usa el diuron.

Finalmente, con este trabajo queda demostrada la utilidad de emplear las células de los discos imaginales de alas de *Drosophila melanogaster* en el ensayo cometa en combinación con el ensayo SMART. La utilización de ambos ensayos, junto con el uso de las cepas *flr³* y *ORR;flr³* y las cruzas ST y HB, permite obtener mayor información acerca de la genotoxicidad causada por un agente en particular.

Referencias

- Abass, K., Lämsä, V., Reponen, P., Küblbeck, J., Honkakoski, P., Mattila, S., *et al.* (2012). Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology*, **294**, 17-26.
- Abass, K., Reponen, P., Jalonen, J. y Pelkonen, O. (2007a). In vitro metabolism and interaction of profenofos by human, mouse and rat liver preparations. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **87**, 238-247.
- Abass, K., Reponen, P., Mattila, S. y Pelkonen, O. (2010). Metabolism of carbosulfan II. Human interindividual variability in its in vitro hepatic biotransformation and the identification of the cytochrome P450 isoforms involved. *Chemico-Biological Interactions*, **185**, 163-173.
- Abass, K., Reponen, P., Turpeinen, M., Jalonen, J. y Pelkonen, O. (2007b). Characterization of Diurón N -Demethylation by Mammalian Hepatic Microsomes and cDNA-Expressed Human Cytochrome P450 Enzymes. *Drug Metabolism and Disposition*, **35**, 1634-1641.
- Agosin, M. (1985). Role of microsomal oxidations in insecticide degradation. En *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol 12* (ed. Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I.). Pergamon, pp. 648-712.
- Agrawal, R.C., Kumar, S. y Mehrotra, N.K. (1996). Micronucleus induction by diurón in mouse bone marrow. *Toxicology Letters*, **89**, 1-4.
- Akcha, F., Spagnol, C. y Rouxel, J. (2012). Genotoxicity of diurón and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic Toxicology*, **106-107**, 104-113.
- Aktar, M.W., Sengupta, D. y Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, **2**, 1-12.
- Amacher, D.E. (2006). Reactive intermediates and the pathogenesis of adverse drug reactions: the toxicology perspective. *Current Drug Metabolism*, **7**, 219-229.
- Amichot, M., Brun, a, Cuany, a, Helvig, C., Salaün, J.P., Durst, F., *et al.* (1994). Expression study of CYP genes in *Drosophila* strains resistant or sensitive to insecticides. En *Cytochrome P450 8th International Conference*. pp. 689-692.
- Anders, M.W., Dekant, W. y Vamvakas, S. (1992). Glutathione-dependent toxicity. *Xenobiotica; The Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, **22**, 1135-1145.
- Anderson, D., Bishop, J.B., Garner, R.C., Ostrosky-Wegman, P. y Selby, P.B. (1995). Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutation research*, **330**, 115-181.
- Arnaud, L., Taillandier, G., Kaouadji, M., Ravanel, P. y Tissut, M. (1994). Photosynthesis inhibition by phenylureas: a QSAR approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **28**, 121-133.
- Baldwin, W.S. y Roling, J. a. (2009). A concentration addition model for the activation of the constitutive androstane receptor by xenobiotic mixtures. *Toxicological Sciences*, **107**, 93-105.
- Bergé, J.B., Feyereisen, R. y Amichot, M. (1998). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **353**, 1701-1705.
- Bilbao, C., Ferreira, J. a., Comendador, M. a. y Sierra, L.M. (2002). Influence of mus201 and mus308 mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells in vivo measured with the comet assay. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **503**, 11-19.

- Bishop, J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**, 235-248.
- Böhme, C. y Ernst, W. (1965). The metabolism of urea-herbicides in the rat. *Food and Cosmetics Toxicology*, 797-802.
- Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P. y Marcos, R. (2011). Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*.
- Boven, M. Van, Laruelle, L. y Daenens, P. (1990). HPLC analysis of diurón and metabolites in blood and urine. *Journal of Analytical Toxicology*, **14**, 231-234.
- Brun, a, Cuany, a, Mouel, T. Le, Berge, J. y Amichot, M. (1996). Inducibility of the *Drosophila melanogaster* P450 Gene, CY6A2, by Phenobarbital in Insecticide Susceptible or Resistant Strains. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **26**, 697-703.
- Buratti, F.M., D'Aniello, A., Volpe, M., Meneguz, A. y Testai, E. (2005). Malathion Bioactivation in the Human Liver: The Contribution of Different Cytochrome P450 Isoforms. *Drug Metabolism And Disposition*, **33**, 295-302.
- Buratti, F.M., Volpe, M.T., Meneguz, A., Vittozzi, L. y Testai, E. (2003). CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **186**, 143-154.
- Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., et al. (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation research*, **627**, 31-5.
- Canna-Michaelidou, S. y Nicolaou, A.S. (1996). Evaluation of the genotoxicity potential (by Mutatox(TM) test) of ten pesticides found as water pollutants in Cyprus. *Science of the Total Environment*, **193**, 27-35.
- Cardoso, R. a., Pires, L.T. a, Zucchi, T.D., Zucchi, F.D. y Zucchi, T.M. a D. (2010). Mitotic crossing-over induced by two commercial herbicides in diploid strains of the fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics and Molecular Research*, **9**, 231-238.
- Carino, F. a., Koener, J.F., Plapp Jnr, F.W. y Feyereisen, R. (1994). Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **24**, 411-418.
- Carmona, E.R., Creus, A. y Marcos, R. (2011). Genotoxic effects of two nickel-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation research*, **718**, 33-37.
- Casabar, R.C.T., Das, P.C., DeKrey, G.K., Gardiner, C.S., Cao, Y., Rose, R.L., et al. (2010). Endosulfan induces CYP2B6 and CYP3A4 by activating the pregnane X receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **245**, 335-343.
- Čerňáková, M. (1995). Biological degradation of isoproturon, chlortoluron and fenitrothion. *Folia Microbiologica*, **40**, 201-206.
- Chang, T.K.H., Weber, G.F., Crespi, C.L. y Waxman, D.J. (1993). Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Research*, **53**, 5629-5637.
- Chen, S., Zhang, Y.E. y Long, M. (2010). New Genes in *Drosophila* Quickly Become Essential. *Science*, **330**, 1682-1685.
- Chowdhary, S., Bhattacharyya, R. y Banerjee, D. (2014). Acute organophosphorus poisoning. *Clinica Chimica Acta*, **431**, 66-76.
- Chung, H., Sztal, T., Pasricha, S., Sridhar, M., Batterham, P. y Daborn, P.J. (2009). Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 5731-5736.
- CICOPLAFEST. (2004). *Catálogo de Plaguicidas*. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas Fertilizantes y Sustancias Tóxicas.

- Cole, D.J. (1994). Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pesticide Science*, **42**, 209-222.
- Collins, A., Dušinská, M., Franklin, M., Somorovská, M., Petrovská, H., Duthie, S., *et al.* (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **30**, 139-146.
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, **26**, 249-261.
- Conney, A.H. (2001). In memoriam: James A. Miller (1915-2000). *Cancer Research*, **61**, 3847-3848.
- Coon, M.J., Vaz, a D. y Bestervelt, L.L. (1996). Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversozymes. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **10**, 428-434.
- Costa, L.G. (2008). Toxic effects of pesticides. En *Casarett And Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (ed. Klaassen, C.). McGraw-Hill, pp. 883-930.
- Coupland, D. (1991). Detoxification of herbicides in plants. En *Herbicide Resistance in Weeds and Crops* (ed. Caseley, J.C. & Atkin, R.K.). Butterworth-Heinemann, Oxford, p. 263.
- Croom, E.L., Wallace, A.D. y Hodgson, E. (2010). Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. *Toxicology*, **276**, 184-191.
- Cunningham, F., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., *et al.* (2014). Ensembl 2015. *Nucleic Acids Research*, **43**, D1, D662-D669.
- Daborn, P., Boundy, S., Yen, J., Pittendrigh, B. y Ffrench-Constant, R. (2001). DDT resistance in *Drosophila* correlates with Cyp6g1 over-expression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidacloprid. *Molecular Genetics and Genomics*, **266**, 556-563.
- Daborn, P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., Goff, G. Le, Feil, E., Jeffers, S., *et al.* (2002). A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, **297**, 2253-2256.
- Daley, J.M., Gaines, W.A., Kwon, Y. y Sung, P. (2014). Regulation of DNA Pairing in Homologous Recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **6**, a017954+.
- Dalton, R.L., Evans, A.W. y Rhodes, R.C. (1966). Disappearance of Diurón from Cotton Field Soils. *Weeds*, **14**, 31-33.
- Davis, A. M. y S. E. Ward (2014). *The handbook of medicinal chemistry : principles and practice*. Royal Society of Chemistry. p. 398.
- Das, P.C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E. y Rose, R.L. (2006). Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, **164**, 200-214.
- Das, P.C., Cao, Y., Rose, R.L., Cherrington, N. y Hodgson, E. (2008a). Enzyme induction and cytotoxicity in human hepatocytes by chlorpyrifos and N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Drug Metabolism and Drug Interactions*, **23**, 237-260.
- Das, P.C., Streit, T.M., Cao, Y., Rose, R.L., Cherrington, N., Ross, M.K., *et al.* (2008b). Pyrethroids: cytotoxicity and induction of CYP isoforms in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, **23**, 211-236.
- deBethizy, J.D. y Hayes, J.R. (1994). Metabolism: a determinant of toxicity. En *Principles and Methods of Toxicology* (ed. Hayes, A. W.). 3.^a edn. pp. 101-148.
- Dekant, W. (2009). The role of biotransformation and bioactivation in toxicity. En *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (ed. Luch, A.) Experientia Supplementum, **99**, 57-86.

- Diario Oficial de la Federación. (2013). ACUERDO que establece la clasificación y codificación de mercancías cuya importación y exportación está sujeta a regulación por parte de las dependencias que integran la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertiliza. *Diario Oficial de la Federación*.
- Diario Oficial de la Federación. (2014). DECRETO por el que se reforman, adicionan y derogan diversas disposiciones del Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóx. *Diario Oficial de la Federación*.
- Didierjean, L., Gondet, L., Perkins, R., Lau, S.-M.C., Schaller, H., O'Keefe, D.P., *et al.* (2002). Engineering herbicide metabolism in tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a cytochrome P450 enzyme from Jerusalem artichoke. *Plant Physiology*, **130**, 179-189.
- Duke, S.O. (1990). Overview of herbicide mechanisms of action. *Environmental Health Perspectives*, **87**, 263-271.
- Duke, S.O. (2005). Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. *Pest Management Science*, **61**, 211-218.
- Ecobichon, D.J., Robert, I.K. y William, C.K. (2001). Carbamate Insecticides. En *Handbook of Pesticide Toxicology* (ed. Krieger, R.). 2.^a edn. Academic Press, pp. 1087-1106.
- Engelhardt, G., Wallnöfer, P.R. y Plapp, R. (1972). Identification of N, O-dimethylhydroxylamine as a microbial degradation product of the herbicide, linuron. *Applied Microbiology*, **23**, 664-666.
- Environmental Protection Agency. (1993). Paraquat [Documento electrónico]. *Integrated Risk Information System*. URL <http://www.epa.gov/iris/subst/0183.htm> [accedido en 2014].
- Environmental Protection Agency. (2014). About Pesticides [Documento electrónico]. URL <http://www.epa.gov/pesticides/about/> [accedido en 2014].
- European Commission. (2015). National Action Plans for Sustainable Use of Pesticides [Documento electrónico]. URL http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/sustainable_use_pesticides/national_action_plans_en.htm [accedido en 2015].
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. y O'Neill, K.L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation research*, **339**, 37-59.
- Fava, R.M., Ferragut Cardoso, A.P., Rocha, M.S. da, Nascimento E Pontes, M.G., Camargo, J.L.V. de y Oliveira, M.L.C.S. de. (2015). Evaluation of early changes induced by diurón in the rat urinary bladder using different processing methods for scanning electron microscopy. *Toxicology*, **333**, 100-106.
- Ferruccio, B., Franchi, C.A.D.S., Boldrin, N.F., Oliveira, M.L.C.S. de y Camargo, J.L.V. de. (2010). Evaluation of diurón (3-[3,4-dichlorophenyl]-1,1-dimethyl urea) in a two-stage mouse skin carcinogenesis assay. *Toxicologic Pathology*, **38**, 756-764.
- Festing, M.F.W., Baumans, V., Combes, R.D., Halder, M., Hendriksen, C.F.M., Howard, B.R., *et al.* (1998). Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. *Atla*, **26**, 283-301.
- Feyereisen, R. (2012). Insect CYP Genes and P450 Enzymes. En *Insect Molecular Biology and Biochemistry* (ed. Gilbert, L.I.). Elsevier, pp. 236-316.
- Feyereisen, R. (2015). Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. *Pest Management Science*, **71**, 793-800.
- Fonné-Pfister, R. y Kreuz, K. (1990). Ring-methyl hydroxylation of chlortoluron by an inducible cytochrome P450-dependent enzyme from maize. *Phytochemistry*, **29**, 2793-2796.

- Foxenberg, R.J., McGarrigle, B.P., Knaak, J.B., Kostyniak, P.J. y Olson, J.R. (2007). Human hepatic cytochrome P450-specific metabolism of parathion and chlorpyrifos. *Drug Metabolism and Disposition*, **35**, 189-193.
- Frear, D.S. (1991). Induced microsomal oxidation of diclofop, triasulfuron, chlorsulfuron, and linuron in wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **41**, 274-287.
- Frei, H., Clements, J., Howe, D. y Würgler, F.E. (1992). The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation research*, **279**, 21-33.
- Frei, H. y Würgler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation research*, **203**, 297-308.
- Frei, H. y Würgler, F.E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation research*, **334**, 247-258.
- Frölich, a y Würgler, F.E. (1989). New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation research*, **216**, 179-187.
- Gervot, L., Rochat, B., Gautier, J.C., Bohnenstengel, F., Kroemer, H., Berardinis, V. de, *et al.* (1999). Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics*, **9**, 295-306.
- Gierl, A. y Frey, M. (2001). Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. *Planta*, **213**, 493-498.
- Gilden, R.C., Huffling, K. y Sattler, B. (2010). Pesticides and health risks. *Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing*, **39**, 103-110.
- Giraud, M., Unnithan, G.C., Goff, G. Le y Feyereisen, R. (2010). Regulation of cytochrome P450 expression in *Drosophila*: Genomic insights. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **97**, 115-122.
- Gómez-Arroyo, S., Cortés-Eslava, J., Ramírez-Domínguez, A., Gutiérrez-Abad, A. y Villalobos-Pietrini, R. (1990). Cytogenetic effects produced by the ureic herbicides diurón and linuron in *Vicia faba* and human lymphocytes cultures. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 69-74.
- González, F.J. y Tukey, R.H. (2006). Drug metabolism. En *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics* (ed. Goodman, L.S., Gilman, A., Brunton, L.L., Lazo, J.S. y Parker, K.L.). McGraw-Hill, Nueva York, pp. 156-180.
- Gorinova, N., Nedkovska, M. y Atanassov, a. (2005). Cytochrome P450 monooxygenases as a tool for metabolizing of herbicides in plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, **19**, 105-115.
- Graf, U., Frei, H., Kägi, a, Katz, a J. y Würgler, F.E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation research*, **222**, 359-373.
- Graf, U. y Schaik, N. Van. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation research - Environmental Mutagenesis and Related Subjects Including Methodology*, **271**, 59-67.
- Graf, U. y Singer, D. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic maturation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, **8**, 15-27.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, a J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., *et al.* (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, **6**, 153-188.
- Guengerich, F.P. (1992). Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacology & Therapeutics*, **54**, 17-61.

- Happle, R. (1999). Loss of heterozygosity in human skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **41**, 143-161.
- Heres-Pulido, M.E., Lombera-Hernández, S., Dueñas-García, I., Perales-Canales, I., Castañeda-Partida, L., Rocha-Ortiz, C., et al. (2008). Genotoxicity of triasulfuron in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is modulated by winter wheat seedlings. *Mutation research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **653**, 70-75.
- Hinchee, M.A.W., Padgett, S.R., Kishore, G.M., Delaney, X. y Fraley, R.T. (1993). Herbicide-tolerant crops. En *Transgenic Plants. Vol. 1: Engineering and Utilization* (ed. Kung, S. & Wu, R.). Academic Press, San Diego, pp. 243-263.
- Hodge, H.C., Downs, W.L., Panner, B.S., Smith, D.W. y Maynard, E. a. (1967). Oral toxicity and metabolism of diurón (N-(3,4-dichlorophenyl)-N',N'-dimethylurea) in rats and dogs. *Food and Cosmetics Toxicology*, **5**, 513-531.
- Hodgson, E. (1983). The significance of cytochrome P-450 in insects. *Insect Biochemistry*, **13**, 237-246.
- Höfer, R., Boachon, B., Renault, H., Gavira, C., Miesch, L., Iglesias, J., et al. (2014). Dual function of the CYP76 family from *Arabidopsis thaliana* in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides. *Plant Physiology*, **166**, 1149-1161.
- Hoffmann, K., Gowin, J., Hartfelder, K. y Korb, J. (2014). The Scent of Royalty: A P450 Gene Signals Reproductive Status in a Social Insect. *Molecular Biology and Evolution*, **31**, 1-8.
- Homologene (2015) National Center for Biotechnology Information. [Documento electrónico]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/111391> [accedido en 2015].
- Huang, Z., Roy, P. y Waxman, D.J. (2000). Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochemical Pharmacology*, **59**, 961-972.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2007). Coordinación Intersecretarial para el control de sustancias químicas [Documento electrónico]. URL <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/folleto/97/97.html> [accedido en 2007].
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2013). Plaguicidas [Documento electrónico]. URL <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/768-sqre-plaguicidas> [accedido en 2013].
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (2010). *Manejo de maleza en algodón en el norte de Tamaulipas*. Folleto Técnico Núm 47.
- International Programme on Chemical Safety. (2002). *The WHO recommended classification of pesticides by hazards and guidelines to classification 2000-2002*. World Health Organization. p. 3
- International Programme on Chemical Safety. (2010). *The Who Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*. World Health Organization. p. 5.
- Kaya, B., Marcos, R., Yanikoğlu, A. y Creus, A. (2004). Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutation research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **557**, 53-62.
- Kinoshita, F.K. y DuBois, K.P. (1970). Induction of hepatic microsomal enzymes by herban, diurón, and other substituted urea herbicides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **17**, 406-417.
- Kojima, H., Sata, F., Takeuchi, S., Sueyoshi, T. y Nagai, T. (2011). Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using in vitro reporter gene assays. *Toxicology*, **280**, 77-87.
- Korytko, P.J. y Scott, J.G. (1998). CYP6D1 protects thoracic ganglia of houseflies from the neurotoxic insecticide cypermethrin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **37**, 57-63.

- Kreuz, K., Tommasini, R. y Martinoia, E. (1996). Old Enzymes for a New Job (Herbicide Detoxification in Plants). *Plant Physiology*, **111**, 349-353.
- Kwong, T. (2002). Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, **24**, 144-149.
- Lamoureux, G.L. y Shimabukuro, R.H. (1991). Glutathione and glucoside conjugation in herbicide selectivity. En *Herbicide Resistance in Weeds and Crops* (ed. Caseley, J.J., Cussans, G. G., y Atkin, R. K.). Oxford, pp. 227-261.
- Lemaire, G., Sousa, G. De y Rahmani, R. (2004). A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. *Biochemical Pharmacology*, **68**, 2347-2358.
- Leoni, C., Buratti, F.M. y Testai, E. (2008). The participation of human hepatic P450 isoforms, flavin-containing monooxygenases and aldehyde oxidase in the biotransformation of the insecticide fenthion. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **233**, 343-352.
- Levi, P.E. y Hodgson, E. (2001). Reactive metabolites and toxicity. En *Introduction to Biochemical Toxicology* (ed. Hodgson, E. y Smart, R.C.). John Wiley & Sons, Ltd, Nueva York, NY, pp. 199-220.
- Li, X. y Heyer, W.-D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, **18**, 99-113.
- Lindsley, D.L. y Zimm, G.G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, California.
- Liu, N., Li, M., Gong, Y., Liu, F. y Li, T. (2015). Cytochrome P450s – Their expression, regulation, and role in insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **120**, 77-81.
- Maibèche-Coisne, M., Monti-Dedieu, L., Aragon, S. y Dauphin-Villemant, C. (2000). A new cytochrome P450 from *Drosophila melanogaster*, CYP4G15, expressed in the nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **273**, 1132-1137.
- Marshall, C.J. (1991). Tumor suppressor genes. *Cell*, **64**, 313-326.
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J.L. y Morcillo, G. (2012). Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, **155**, 333-343.
- Matambo, T.S., Paine, M.J.I., Coetzee, M. y Koekemoer, L.L. (2010). Sequence characterization of cytochrome P450 CYP6P9 in pyrethroid resistant and susceptible *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Genetics and Molecular Research : GMR*, **9**, 554-564.
- McFadden, J.J., Gronwald, J.W. y Eberlein, C. V. (1990). In vitro hydroxylation of bentazon by microsomes from naphthalic anhydride-treated corn shoots. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **168**, 206-213.
- Mehmood, Z., Williamson, M.P., Kelly, D.E. y Kelly, S.L. (1996). Metabolism of organochlorine pesticides: the role of human cytochrome P450 3A4. *Chemosphere*, **33**, 759-769.
- Mizutani, M. (2012). Impacts of Diversification of Cytochrome P450 on Plant Metabolism. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **35**, 824-832.
- Mizutani, M. y Ohta, D. (2010). Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 291-315.
- Monaco, M.K., Sen, T.Z., Dharmawardhana, P.D., Ren, L., Schaeffer, M., Naithani, S., et al. (2013). Maize Metabolic Network Construction and Transcriptome Analysis. *The Plant Genome*, **6**.

- Moreland, D.E., Corbin, F.T. y McFarland, J.E. (1993). Oxidation of multiple substrates by corn shoot microsomes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **47**, 206-214.
- Mostafalou, S. y Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **268**, 157-177.
- Mukhopadhyay, I., Chowdhuri, D.K., Bajpayee, M. y Dhawan, A. (2004). Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, **19**, 85-90.
- Mutch, E. y Williams, F.M. (2006). Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver. *Toxicology*, **224**, 22-32.
- Nagarathna, P.K.M., Johnson-Wesley, M., Sriram-Reddy, P. y Reena, K. (2013). Review on Genotoxicity, its Molecular Mechanisms and Prevention. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **22**, 43, 236-243.
- Nascimento, M.G., Luiza, M., Sartor, C., Lima, A.S. y Camargo, V. De. (2006). Effects of Diurón [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder of male Wistar rats. *Toxicology*, **224**, 66-73.
- Nebert, D.W. (1994). Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. *Biochemical Pharmacology*, **47**, 25-37.
- Nelson, D. (2013). Cytochrome P450 Homepage [Documento electrónico]. URL <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html> [accedido en 2013].
- Nelson, D. y Werck-Reichhart, D. (2011). A P450 centric view of plant evolution. *The Plant Journal*, **66**, 194-211.
- Nelson, D.R. (2011). Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, **1814**, 14-18.
- Niu, G., Rupasinghe, S.G., Zangerl, A.R., Siegel, J.P., Schuler, M. a. y Berenbaum, M.R. (2011). A substrate-specific cytochrome P450 monooxygenase, CYP6AB11, from the polyphagous navel orangeworm (*Amyelois transitella*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **41**, 244-253.
- Ogilvie, B.W., Zhang, D., Li, W., Rodrigues, a. D., Gipson, A.E., Holsapple, J., *et al.* (2006). Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: Implications for drug-drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition*, **34**, 191-197.
- Olive, P.L. y Banáth, J.P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, **1**, 23-29.
- Parke, D. V. (1987). Activation mechanisms to chemical toxicity. *Archives of Toxicology*, **60**, 5-15.
- Parkinson, A. y Ogilvie, B.W. (2008). Biotransformation of xenobiotics. En *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (ed. Klaassen, C.). McGraw-Hill, pp. 883-930.
- Pascal-Lorber, S., Alsayeda, H., Jouanin, I., Debrauwer, L., Canlet, C. y Laurent, F.O. (2010). Metabolic fate of [¹⁴C]Diurón and [¹⁴C]linuron in wheat (*Triticum aestivum*) and radish (*Raphanus sativus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 10935-10944.
- Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J. y Raunio, H. (2008). Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology*, **82**, 667-715.
- Persans, M.W. y Schuler, M. a. (1995). Differential induction of cytochrome P450-mediated triasulfuron metabolism by naphthalic anhydride and triasulfuron. *Plant Physiology*, **109**, 1483-1490.

- Pfam: EBI. (2015). Family P450 [Documento electrónico]. *European Molecular Biology Laboratory. The European Bioinformatics Institute*. URL <http://pfam.xfam.org/family/P450#tabview=tab7> [accedido en 2015].
- Plewa, M.J. (1978). Activation of chemicals into mutagens by green plants: A preliminary discussion. *Environmental Health Perspectives*, **Vol. 27**, 45-50.
- Poet, T.S., Wu, H., Kousba, a. a. y Timchalk, C. (2003). In vitro rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon. *Toxicological Sciences*, **72**, 193-200.
- Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W. y Jasin, M. (2015). Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **7**, a016600.
- Reinhold, V.N. (1987). *Dangerous Properties of Industrial Materials Report, Volume 7*. Van Nostrand Reinhold.
- Rewitz, K.F., Yamanaka, N. y O'Connor, M.B. (2010). Steroid hormone inactivation is required during the juvenile-adult transition in *Drosophila*. *Developmental Cell*, **19**, 895-902.
- Rhee, K.H., Morris, E.P., Barber, J. y Kühlbrandt, W. (1998). Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature*, **396**, 283-286.
- Robineau, T., Batard, Y., Nedelkina, S., Cabello-Hurtado, F., LeRet, M., Sorokine, O., *et al.* (1998). The Chemically Inducible Plant Cytochrome P450 CYP76B1 Actively Metabolizes Phenylureas and Other Xenobiotics1. *Plant Physiology*, **118**, 1049-1056.
- Rocha, M.S. da, Nascimento, M.G., Cardoso, a. P.F., Lima, P.L. a De, Zelandi, E. a., Camargo, J.L. V De, *et al.* (2010). Cytotoxicity and regenerative proliferation as the mode of action for Diurón-Induced urothelial carcinogenesis in the rat. *Toxicological Sciences*, **113**, 37-44.
- Rodríguez-Arnaiz, R., Ramos-Morales, P., Gaytán-Oyarzún, J.C. y Rodríguez-Zúñiga, D.L. (1989). The herbicides dalapon and diurón tested for genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*.
- Roy, P., Yu, L.J., Crespi, C.L. y Waxman, D.J. (1999). Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metabolism and Disposition*, **27**, 655-666.
- Rubin, B. y Eshel, Y. (1971). Phytotoxicity of Fluometuron and Its Derivatives to Cotton and Weeds. *Weed Science*, **19**, 592-594.
- Rudzok, S., Schmücking, E., Graebisch, C., Herbarth, O. y Bauer, M. (2009). The inducibility of human cytochrome P450 1A by environmental-relevant xenobiotics in the human hepatoma derived cell line HepG2. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **28**, 370-378.
- Sahi, S. V, Chilton, M.D. y Chilton, W.S. (1990). Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 3879-3883.
- Sandermann, H. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutation research*, **197**, 183-194.
- Sandermann, H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences*, **17**, 82-84.
- Saner, C., Weibel, B., Würigler, F.E. y Sengstag, C. (1996). Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **27**, 46-58.
- Santos, G. Dos, Schroeder, A.J., Goodman, J.L., Strelets, V.B., Crosby, M.A., Thurmond, J., *et al.* (2015). FlyBase: introduction of the *Drosophila melanogaster* Release 6 reference genome assembly and large-scale migration of genome annotations. *Nucleic Acids Research*, **43**, D690-7.

- Schoket, B. y Vincze, I. (1985). Induction of rat hepatic drug metabolizing enzymes by substituted urea herbicides. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, **56**, 283-288.
- Schoket, B. y Vincze, I. (1990). Dose-related induction of rat hepatic drug-metabolizing enzymes by diurón and chlorotoluron, two substituted phenylurea herbicides. *Toxicology Letters*, **50**, 1-7.
- Schoket, B., Zilahy, Z., Molnar, J. y Vincze, I. (1987). Comparative investigation of antipyrine half-life and induction of cytochrome P-450 dependent monooxygenase in rats treated with phenylurea herbicides. *In Vivo*, **1**, 185-188.
- Schuler, M. a. (2011). P450s in plant-insect interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, **1814**, 36-45.
- Scott, J.G. (2008). Insect cytochrome P450s: thinking beyond detoxification. En *Recent Advances in Insect Physiology, Toxicology and Molecular Biology* (ed. Nannan, L.). pp. 117-124.
- Scott, J.G. y Lee, S.S. (1993). Tissue distribution of microsomal cytochrome P-450 monooxygenases and their inducibility by phenobarbital in the insecticide resistant LPR strain of house fly, *Musca domestica* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **23**, 729-738.
- Scott, J.G., Liu, N. y Wen, Z. (1998a). Insect cytochromes P450 : diversity , insecticide resistance and tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **121**, 147 - 155.
- Scott, J.G., Liu, N. y Wen, Z. (1998b). Insect cytochromes P450 : diversity , insecticide resistance and tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **121**, 147 - 155.
- Seiler, J.P. (1978). Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens I. Mutagenicity tests with some urea herbicides. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **58**, 353-359.
- Sengstag, C. (1994). The role of mitotic recombination in carcinogenesis. *Critical Reviews in Toxicology*, **24**, 323-353.
- Sharma, A., Shukla, a K., Mishra, M. y Chowdhuri, D.K. (2011). Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. *Mutation research*, **721**, 142-146.
- Sharma, S. y Vig, A.P. (2012). Genotoxicity of atrazine, avenoxan, diurón and quizalofop-P-ethyl herbicides using the *Allium cepa* root chromosomal aberrations assay. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*, **6**, 90-95.
- Siddique, H.R., Chowdhuri, D.K., Saxena, D.K. y Dhawan, A. (2005). Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, **20**, 285-290.
- Siminszky, B., Corbin, F.T., Ward, E.R., Fleischmann, T.J. y Dewey, R.E. (1999). Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 1750-1755.
- Skipper, P.L., Kim, M.Y., Patty Sun, H.L., Wogan, G.N. y Tannenbaum, S.R. (2009). Monocyclic aromatic amines as potential human carcinogens: Old is new again. *Carcinogenesis*, **31**, 50-58.
- Smith, J.W. y Sheets, T.J. (1967). Uptake, distribution, and metabolism of monuron and diurón by several plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **15**, 577-581.
- Sousa, G. De, Fontaine, F. y Rahmani, R. (1997). Insecticide Induction Cytotoxicity and CYP 1 A 1 / 2 in Primary Human and Rat Hepatocyte Cultures. *Toxicology in vitro*, **11**, 451-457.
- Spanó, M. a, Frei, H., Würzler, F.E. y Graf, U. (2001). Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, **16**, 385-394.

- Speit, G. y Hartmann, a. (1999). The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology*, **113**, 203-212.
- Stenersen, J. (2004). *Chemical pesticides: mode of action and toxicology*. CRC Press. Nueva York, NY.
- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols In Immunology / Edited By John E. Coligan ... [et Al.]*, **Appendix 3**, Appendix 3B.
- Take Action On Weeds. (2014). Understanding Herbicides [Documento electrónico]. URL <http://takeactiononweeds.com/understanding-herbicides/> [accedido en 2014].
- Takeuchi, S., Iida, M., Yabushita, H., Matsuda, T. y Kojima, H. (2008). In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diurón and linuron. *Chemosphere*, **74**, 155-165.
- Thalacker, F.W., Swanson, H.R. y Frear, D.S. (1994). Characterization, Purification, and Reconstitution of an Inducible Cytochrome P450-Dependent Triasulfuron Hydroxylase from Wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **49**, 209-223.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, a., Kobayashi, H., et al. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**, 206-221.
- Usmani, K. a., Hodgson, E. y Rose, R.L. (2004). In vitro metabolism of carbofuran by human, mouse, and rat cytochrome P450 and interactions with chlorpyrifos, testosterone, and estradiol. *Chemico-Biological Interactions*, **150**, 221-232.
- Vaughan, L. (2001). *Statistical Methods for the Information Professional: A practical, painless approach to understanding, using and interpreting statistics*. Vol. 367. Information Today Inc. pp. 140-141.
- Vázquez-Gómez, G., Sánchez-Santos, A., Vázquez-Medrano, J., Quintanar-Zúñiga, R., Monsalvo-Reyes, A.C., Piedra-Ibarra, E., et al. (2010). Sulforaphane modulates the expression of Cyp6a2 and Cyp6g1 in larvae of the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test and is genotoxic in the ST cross. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, **48**, 3333-9.
- Verma, A., Sengupta, S. y Lakhotia, S.C. (2012). DNAPol- ϵ gene is indispensable for the survival and growth of *Drosophila melanogaster*. *Genesis*, **50**, 86-101.
- Vogel, E., Zijlstra, J.A., Blijleven, W.G.H. y Breimer, D.D. (1983). Metabolic activation and mutagenic properties of procarcinogens in *Drosophila*. En *In Vitro Toxicity Testing Of Environmental Agents* (ed. Kolber, A., Wong, T., Grant, L., DeWoskin, R. & Hughes, T.). Springer, pp. 215-231.
- Vroumsia, T., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., Benoit-Guyod, J.L. y Khadrani, a. (1996). Biodegradation of three substituted phenylurea herbicides (chlortoluron, diurón, and isoproturon) by soil fungi. A comparative study. *Chemosphere*, **33**, 2045-2056.
- Waters, L.C., Zelhof, a C., Shaw, B.J. y Ch'ang, L.Y. (1992). Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 4855-4859.
- Weinberg, S. L. y Abramowitz, S. K. (2002). *Data analysis for the Behavioral Sciences Using SPSS*. Cambridge University Press. pp. 130-140.
- Wen, Z. y Scott, J.G. (2001). Cytochrome P450 CYP6L1 is specifically expressed in the reproductive tissues of adult male German cockroaches, *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **31**, 179-187.
- Werck-Reichhart, D. (1995). Herbicide metabolism and selectivity: role of cytochrome P450. *Brighton Crop Protection Conference, Weeds*, **2**, 813-822.

- Werck-Reichhart, D., Hehn, A. y Didierjean, L. (2000). Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in Plant Science*, **5**, 116-123.
- Wessels, J.S.C. y Veen, R. van der. (1956). The action of some derivatives of phenylurethan and of 3-phenyl-1,1-dimethylurea on the Hill reaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, **19**, 548-549.
- Williams, R.T. (1959). Detoxication Mechanisms. The Metabolism and Detoxication of Drugs, Toxic Substances and Other Organic Compounds. *British Journal Of Industrial Medicine*. 2.^a edn. John Wiley & Sons, Ltd, Nueva York, NY.
- Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D. y Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European Journal of Epidemiology*, **26 Suppl 1**, S1-S58.
- Wojtasek, H. y Leal, W.S. (1999). Degradation of an alkaloid pheromone from the pale-brown chafer, *Phyllopertha diversa* (Coleoptera: Scarabaeidae), by an insect olfactory cytochrome P450. *FEBS Letters*, **458**, 333-336.
- Wyde, M.E., Bartolucci, E., Ueda, A., Zhang, H., Yan, B., Negishi, M., *et al.* (2003). The environmental pollutant 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene induces rat hepatic cytochrome P450 2B and 3A expression through the constitutive androstane receptor and pregnane X receptor. *Molecular Pharmacology*, **64**, 474-481.
- Xie, S.-H., Liu, A.-L., Chen, Y.-Y., Zhang, L., Zhang, H.-J., Jin, B.-X., *et al.* (2010). DNA damage and oxidative stress in human liver cell L-02 caused by surface water extracts during drinking water treatment in a waterworks in China. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **51**, 229-235.
- Yamada, T. (2000). Molecular Cloning of Novel Cytochrome P450 Species Induced by Chemical Treatments in Cultured Tobacco Cells,. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **68**, 11-25.
- Yang, D., Wang, X., Chen, Y.-T., Deng, R. y Yan, B. (2009). Pyrethroid insecticides: isoform-dependent hydrolysis, induction of cytochrome P450 3A4 and evidence on the involvement of the pregnane X receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **237**, 49-58.
- Yang, J., McCart, C., Woods, D.J., Terhzaz, S., Greenwood, K.G., ffrench-Constant, R.H., *et al.* (2007). A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiological Genomics*, **30**, 223-31.
- Zijlstra, J. a y Vogel, E.W. (1988). Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity of some nitrosamines, triazenes, hydrazines and seniciphylline in *Drosophila melanogaster*. *Mutation research*, **202**, 251-267.