



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Ciencias

**“Evaluación del efecto
genotóxico del extracto de raíz
de Cucurbita pepo tratada con el
herbicida Clomazone en
Drosophila melanogaster”.**

Actividad de Apoyo a la Investigación

**TESINA QUE PARA OBTENER EL
TÍTULO DE**

BIÓLOGA

PRESENTA:

Mariana Camila Muñoz Ponce Nava

Directora de tesina:

**Dra. América Nitxin Castañeda
Sortibrán**





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.

Agradecimientos

La culminación de este trabajo no habría sido posible sin el apoyo invaluable de diversas personas e instituciones a lo largo de este proceso.

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la Doctora América Nitxin Castañeda Sortibrán, por su guía, paciencia y apoyo incondicional a lo largo de esta investigación. Su mentoría ha sido fundamental para el desarrollo de este proyecto y para mi formación académica.

Agradezco al Doctor Marco Antonio Carballo Ontiveros por su excepcional apoyo durante el desarrollo de este proyecto. Su vasto conocimiento sobre el ensayo SMART en *Drosophila* no solo me proporcionó una base sólida de conocimientos, sino que también despertó mi interés en esta área de investigación. Agradezco su paciencia y dedicación al asesorarme en los concursos de divulgación, donde sus consejos y retroalimentación fueron cruciales para mi éxito. Su lectura crítica y constructiva del manuscrito de la tesina fue fundamental para pulir y mejorar cada aspecto del documento.

Asimismo, agradezco profundamente a la Bióloga Daniela Núñez Ledezma, por su invaluable apoyo en la realización de las técnicas necesarias para este estudio, así como por su paciencia y disposición para ayudarme a resolver dudas a lo largo del proceso. Su acompañamiento fue clave para el desarrollo de esta investigación.

De igual manera, expreso mi gratitud a la Bióloga Claudia Mónica Flores Loyola, cuya tesis sentó las bases para este trabajo. Sin sus aportes en el estudio de la genotoxicidad del Clomazone, no habría sido posible llevar esta investigación un paso más allá, enfocándola en la evaluación de la genotoxicidad en vegetales germinados en este herbicida.

Agradezco también a la Facultad de Ciencias y a la Universidad Autónoma de México, por brindarme los recursos y el espacio necesarios para llevar a cabo este estudio, así como a mis profesores por compartir su conocimiento y experiencia, contribuyendo a mi crecimiento como Profesionista.

Agradezco también a mis sinodales, la Doctora María de Jesús Guadalupe Vázquez Cuevas, la Maestra Fabiola Ramírez Corona, la Maestra Zeltzin Muñoz Juárez y el Doctor Marco Tulio Solano por sus valiosas críticas y comentarios constructivos, los cuales han contribuido significativamente a que este escrito alcance su mejor versión.

Agradecimientos personales

Agradezco a mi madre, por estar siempre para mí, incluso en los momentos más difíciles. Su apoyo incondicional y su guía han sido un pilar fundamental en mi formación.

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

Agradezco mi padre, por su presencia y respaldo inquebrantable, por brindarme su confianza y enseñarme el valor de la perseverancia.

A ambos, gracias por su paciencia, por creer en mí y por recordarme siempre que soy capaz de lograr grandes cosas. Este logro es también suyo.

Finalmente, agradezco a mis amigos por estar siempre para mí, por su compañía y por ser una red de apoyo incondicional a lo largo de la carrera. Su amistad ha sido fundamental, no solo para compartir conocimientos y ayudarnos mutuamente en los estudios, sino también para hacer de este camino una experiencia más enriquecedora y llevadera.

A todos los que, de alguna manera, contribuyeron a la realización de este proyecto, mi más sincero agradecimiento.

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster*

Índice

Agradecimientos.....	1
Resumen:	5
1. Introducción.....	6
1.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.1.1 Ventajas de <i>D. melanogaster</i> , como modelo biológico	6
1.1.2 Ensayos con <i>D. melanogaster</i>	6
1.2 Genotoxicidad y toxicología	7
1.2.1 Qué es la genotoxicidad.....	7
1.2.2 Toxicología.....	9
1.2.3 Mutación.....	10
1.3 Xenobióticos y su metabolización.....	13
1.3.1 Xenobióticos.....	13
1.3.2 Citocromo P450	14
1.4 Malezas y su control químico	15
1.4.1 Malezas.....	15
1.4.2 Herbicidas	15
1.4.3 Clomazone.....	16
1.6 Ensayo SMART.....	19
1.6.1 Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	19
1.6.2 Cruzas progenitoras.....	21
1.6.3 Montaje de alas	23
1.6.4 Lectura de resultados	24
2 Antecedentes	26
3 Justificación	27
4 Hipótesis	27
5 Objetivos	27
5.6 General	27
5.7 Particulares	28
6 Materiales y métodos	28
6.6 Compuestos químicos.....	28

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster*

6.7	Determinación de la LC ₅₀	28
6.8	Método.....	29
6.8.1	Tratamientos.....	29
6.8.2	Cruzas progenitoras.....	29
6.8.3	Preparación de muestras fijas.....	30
6.8.4	Lectura de muestras fijas.....	30
6.8.5	Análisis estadístico.....	30
7	Resultados.....	32
8	Discusión.....	35
9	Conclusión.....	37
10	Referencias.....	37
11	Referencias electrónicas.....	43

Resumen:

El Clomazone es un herbicida ampliamente utilizado en la agricultura para erradicar malezas de hoja ancha y algunas gramíneas que infestan diversos cultivos, entre ellos, la calabacita (*Cucurbita pepo*). Este compuesto se caracteriza por su absorción a través de las raíces de las plantas, se emplea en un gran número de cultivos (Soya, arroz, tabaco, sandía y pepino por mencionar algunos), su alta solubilidad en agua y su moderada persistencia en el suelo facilitan su dispersión al ambiente y su posible bioacumulación en productos agrícolas de consumo humano. Al ser una sustancia química presente en productos agrícolas, su alta solubilidad en agua y su moderada persistencia en el suelo facilitan su dispersión al ambiente y su posible bioacumulación en productos agrícolas de consumo humano.

En este estudio, se evaluó el potencial genotóxico del extracto de raíces de calabacitas (*Cucurbita pepo*), mediante tratamientos con Clomazone al 2.5, 5 y 10% de concentración respectivamente. Evaluando su efecto por medio del ensayo de mutación y recombinación somática (SMART, por sus siglas en inglés), en células de las alas de la mosca *Drosophila melanogaster*. La prueba detecta la pérdida de heterocigosis. Utiliza larvas transheterocigotas del tercer estadio con los marcadores recesivos *flr³* y *mwh*, los cuales se expresan en los tricomas en la superficie de las alas de las moscas. Las larvas se obtuvieron de las cruza estándar (ST, por sus siglas en inglés) y de alta bioactivación (HB, por sus siglas en inglés), esta última aplicada para determinar si los extractos son dependientes de activación metabólica para ser genotóxicos.

Los resultados obtenidos indican que el extracto de raíces de calabacitas tratadas con Clomazone son genotóxicas en todas las concentraciones evaluadas en la crusa estándar. Mientras que en la crusa de alta bioactivación solo la concentración más alta mostró un efecto positivo a la prueba. Además, al comparar los datos de ambas cruza pudimos concluir que el extracto de raíces de calabacitas tratadas con Clomazone no es promutagénico dado que la crusa de alta bioactivación no muestra diferencias significativas respecto a la crusa estándar.

1. Introducción

1.1 *Drosophila melanogaster*

1.1.1 Ventajas de *D. melanogaster*, como modelo biológico

La mosca de la fruta, *D. melanogaster*, ha tenido una larga y duradera relación con los seres humanos. Los humanos producen desechos orgánicos y las moscas los consumen (Rodríguez-Arnaiz y Ayala, 2016). Sin embargo, también ha acompañado a los científicos a lo largo de la historia en el descubrimiento y estudio de procesos fisiológicos y mecanismos biológicos extrapolables al humano, así como en el apoyo a la docencia de la Genética (Rodríguez-Arnaiz y colaboradores, 2006, Rodríguez-Arnaiz y Ayala, 2016). *D. melanogaster* es un modelo experimental muy útil, por las siguientes características: 1) son pequeñas; 2) requieren poco espacio para su cultivo; 3) son fáciles de cruzar; 4) su ciclo de vida es de 10 días a 21 días, lo que permite obtener muchas generaciones en un corto periodo de tiempo; 5) pueden ovipositar hasta 500 huevecillos; 6) sus etapas de desarrollo son visibles morfológicamente bajo el microscopio estereoscópico; 7) son sencillas de manipular; 8) su genoma está ampliamente caracterizado; 9) su gran similitud genética con los mamíferos que, a pesar de pertenecer a linajes filogenéticamente separados, ha permanecido con pocos cambios a través de la evolución de forma que existen rutas metabólicas y características compartidas entre las moscas y los humanos; 10) sus características morfológicas son claramente identificables y; 11) representa un menor costo con respecto a otros modelos de animales utilizados para la experimentación (Rodríguez-Arnaiz y Ayala, 2016, Santalla y colaboradores, 2016).

1.1.2 Ensayos con *D. melanogaster*

D. melanogaster ha sido partícipe de una gran variedad de experimentos realizados respecto a herbicidas y sus posibles efectos nocivos, por ejemplo: Castañeda-Sortibrán

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

y colaboradores (2019), realizaron un ensayo de genotoxicidad utilizando el modelo de mosca de la fruta, con cruza estándar (ST) y de alta bioactivación (HB) para tres herbicidas, simacina, Clomazone y linurón, encontrando que producen un aumento significativo en la frecuencia de manchas, particularmente en la cruza estándar. Por su parte, Kaya y colaboradores (2000), llevaron a cabo la evaluación de genotoxicidad utilizando a *D. melanogaster* como modelo, mediante las cruza estándar y de alta bioactivación para los herbicidas: Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, hidrazida maleica, propanil y glifosato, observando un aumento en la frecuencia de eventos mutagénicos y recombinogénicos, especialmente en la cruza de alta bioactivación. Semren y colaboradores (2018), realizaron una revisión de estrés oxidante en herbicidas, entre ellos la atrazina, para la cual, también se utilizó el modelo de la mosca de la fruta; concluyeron que la atrazina genera un aumento de especies reactivas de oxígeno en *D. melanogaster*. Marín Insfrán y colaboradores,(2022), realizaron un ensayo de SMART con *D. melanogaster* con cruza estándar y de alta bioactivación para cuantificar la genotoxicidad de tres herbicidas Hechos con base en glifosato muy utilizados en Paraguay (GBH1,GBH2, y GBH3), detectaron diferencias significativas de toxicidad en todos las variantes probadas, siendo GBH2 la más genotóxica.

1.2 Genotoxicidad y toxicología

1.2.1 Qué es la genotoxicidad

De acuerdo con Rodríguez Arnaiz y Ayala (2016): “un agente genotóxico se denomina a aquel agente químico, físico o biológico capaz de producir mutaciones” (FIG. 1). También puede decirse que un agente genotóxico, es aquél químico o genotoxina capaz de causar daño al DNA, ya sea en células somáticas o germinales. En el caso de las células somáticas, el impacto de una sustancia genotóxica puede derivar en cáncer, mientras que, en células germinales puede derivar en defectos congénitos y del desarrollo (Phillips y Arlt, 2009).

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de *Cucurbita pepo* tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

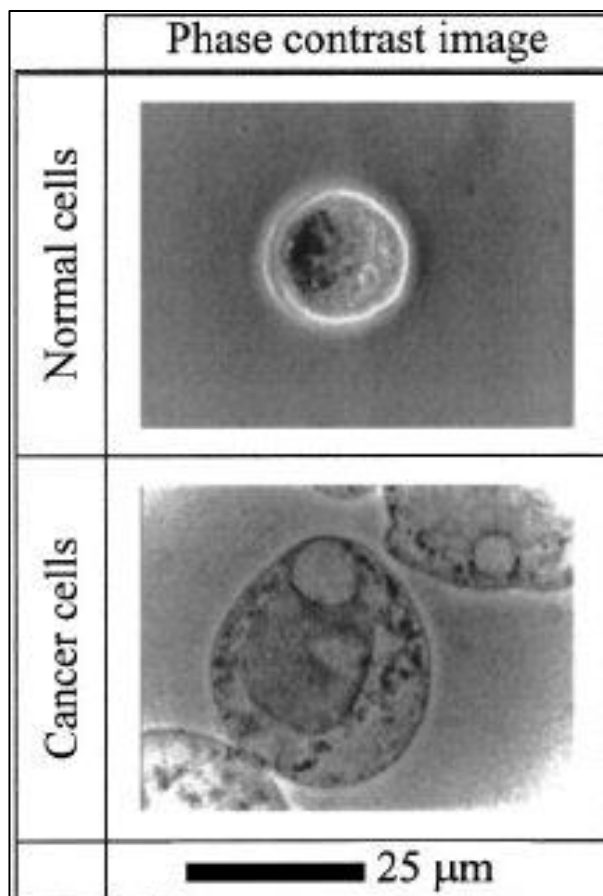


Figura 1: Fotografía de célula somática normal (arriba) y célula mutada o cancerígena (abajo), se observa un cambio en el fenotipo y morfología de la célula cancerígena respecto a la célula normal.

Imagen obtenida de: Zuluaga, A. S. F. y colaboradores (2002). Contrast agents for confocal microscopy: how simple chemicals affect confocal images of normal and cancer cells in suspension. *Journal of Biomedical Optics*, 7(3), 398-403.

La evaluación de la genotoxicidad busca determinar el riesgo asociado al consumo y la exposición a agentes genotóxicos. Para ello, se realizan análisis experimentales en organismos modelo que permiten observar detalladamente los procesos metabólicos involucrados en la genotoxicidad (Phillips y Arlt, 2009)

Aunque, es común asociar la genotoxicidad con carcinogénesis es importante mencionar que estos conceptos no están completamente ligados, es decir, la carcinogénesis no tiene necesariamente un origen genotóxico y los genotóxicos no necesariamente causan carcinogénesis (McLennan y colaboradores, 2014, Krebs y colaboradores, 2017). Un carcinógeno genotóxico, por lo general es, inespecífico, causando tumores en todos los tejidos de diferentes tipos, sin importar el sexo, la especie, y a menudo, dependiendo de la dosis, aunque sin formar umbrales. Por otro lado, los carcinógenos no genotóxicos suelen generar tumores siguiendo un patrón, siendo específicos de una especie, un sexo y/o un tejido, además inducen daño en dosis altas, aunque sean pocos eventos de

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

exposición al compuesto. Los químicos cancerígenos genotóxicos presentan un riesgo mayor en el humano que los no genotóxicos, las células adquieren las características del cáncer a través de la mutación somática y la selección (Cairns, 1975; Nowell, 1976; Phillips y Arlt, 2009; Martincorena y Campbell, 2015).

Entre otros efectos que pueden inducir los agentes genotóxicos se incluyen: mutaciones puntuales, inserciones, deleciones y recombinaciones cromosómicas, estos efectos inducidos por agentes genotóxicos generalmente son útiles para las evaluaciones experimentales, dado que pueden verse reflejadas en el fenotipo del organismo modelo y por consiguiente permiten determinar el daño genético (Phillips y Arlt, 2009), como sucede con la prueba SMART donde se busca detectar la pérdida de heterocigosis y la recombinación en las células de las alas de *D. melanogaster* (Graf y colaboradores., 1984).

1.2.2 Toxicología

La toxicología se define como el estudio de los efectos perjudiciales asociados a sustancias químicas en los seres vivos (Phillips y Arlt, 2009).

La palabra tóxico viene del “*toxicus*” que significa venenoso. La toxicología tiene es una herramienta muy importante para proteger la salud humana y es una disciplina que ha existido por milenios, lo cual se ve reflejado en todo el conocimiento asociado a la medicina tradicional de las diferentes culturas respecto a los efectos curativos y adversos de plantas, animales, etc. (Luch, 2008) de las diferentes culturas a través de la historia de la humanidad. Sin embargo, la toxicología se ha diversificado en diferentes ramas y su estudio se ha especializado, a nivel molecular para estudiar los efectos de los xenobióticos a nivel metabólico (Luch, 2008).

Antiguamente la toxicología se limitaba al estudio de sustancias consideradas estrictamente tóxicas, sin embargo, todo tiene un potencial tóxico dependiente de la dosis administrada, consumida y la resistencia del organismo a la sustancia. Además, los

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

efectos pueden ser variables dependiendo del tiempo de exposición (agudos y crónicos) (Phillips y Arlt, 2009).

1.2.3 Mutación

Una mutación es aquel cambio o alteración heredable que ocurre en algún sitio del genoma, todas las mutaciones son cambios en la secuencia de DNA (McLennan y colaboradores, 2014, Rodríguez-Arnaiz y Ayala, 2016, Krebs y colaboradores, 2017). Las mutaciones son un fenómeno que ocurre en la naturaleza de forma aleatoria, todos los seres vivos las experimentan como resultado de sus interacciones con el ambiente o procesos de la maquinaria celular, a éstas se les denomina mutaciones espontáneas y no son altamente frecuentes (Rodríguez-Arnaiz y Ayala, 2016, Krebs y colaboradores, 2017). Las mutaciones son fenómenos que pueden ocurrir de varias formas (Tabla 1), entre ellas se destacan: las mutaciones puntuales: son cambios que ocurren en una sola base, o en muy pocas bases adyacentes; este tipo se divide en dos: las transiciones, en las cuales una purina se cambia por otra purina o el cambio de una pirimidina por otra pirimidina; y las transversiones, en las que una purina se reemplaza por una pirimidina o viceversa (McLennan y colaboradores., 2014, Rodríguez-Arnaiz y Ayala 2016); las mutaciones cromosómicas: aquellas aberraciones en el número o estructura de los cromosomas (Rodríguez-Arnaiz y Ayala, 2016); las mutaciones homeóticas: mutaciones producidas por grupos celulares que alteran el plan corporal (Rodríguez-Arnaiz y Ayala, 2016) y las mutaciones inducidas: el aumento de la incidencia de mutaciones provocado por compuestos químicos (Krebs y colaboradores, 2017).

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

Tabla1. Clasificación de mutaciones por su tipo con ejemplos de cada uno.

Mutación	Definición	Ejemplo
Mutación puntual	Cambios que ocurren en una sola base o algunas bases adyacentes.	Transición: cambio entre purinas (A↔G) o entre pirimidinas (C↔T)
		Transversión: cambio entre purinas y pirimidinas (A↔T o C↔G o T↔G o C↔A)
Mutación cromosómica	Alteraciones en el número o estructura de los cromosomas.	Traslocaciones, inversiones, deleciones y duplicaciones
Mutación homeótica	Mutaciones que afectan grupos celulares y el plan corporal.	Cambios en genes reguladores del desarrollo
Mutación inducida	Mutaciones cuya incidencia aumenta al exponer al organismo a agentes físicos, químicos o biológicos.	Uso de agentes mutagénicos como compuestos químicos o radiación.
Mutación Silenciosa	Mutaciones en regiones no codificantes o que ni alteran el producto del gen codificante.	Cualquier mutación sin efectos observables
Mutación de cambio de sentido	Mutaciones en regiones codificantes que alteran el producto del gen codificante.	Cambio de un aminoácido funcional por uno letal (Ocurre en los primeros dos nucleótidos de un codón)

Las mutaciones pueden tener efectos variados dependiendo de su naturaleza y sitio de aparición. Las mutaciones que ocurren en sitios específicos de la secuencia pueden no tener un efecto si ocurren en una sección no codificante del DNA, en este tipo de situaciones se dice que la mutación es una mutación silenciosa (McLennan y colaboradores, 2014). Por otro lado, si la mutación ocurre en una sección codificante, de forma que afecta al producto del gen codificante, se conoce como una mutación de cambio de sentido, dependiendo del aminoácido afectado por la mutación el cambio de sentido puede tener un efecto nulo o letal, si la mutación ocurre en el primer nucleótido de un codón el efecto puede ser letal o de cambio de sentido; cuando las mutaciones ocurren en el segundo y tercer nucleótido de un codón pueden tener efectos de cambio de sentido o resultar en mutaciones silenciosas (McLennan y colaboradores, 2014).

Como se mencionó anteriormente las mutaciones pueden ser inducidas, es decir que la frecuencia de las mutaciones puede aumentar al exponer a los organismos a agentes físicos, químicos o biológicos, denominados mutágenos (Tabla 2) (Rodríguez-Arnaiz y Ayala, 2016, Krebs y colaboradores, 2017). Los mutágenos tienen diferentes capacidades y, pueden afectar desde un nucleótido en específico hasta un gen e incluso el genoma completo. La potencia de los agentes mutagénicos puede cuantificarse en función del aumento de la incidencia de mutaciones comparado con la incidencia de mutaciones espontáneas (Krebs y colaboradores., 2017).

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

Tabla 2. Clasificación de los agentes mutagénicos según su tipo con ejemplos.

Tipo de mutágeno	Efecto	Potencia mutagénica
Físicos	Pueden afectar el DNA directamente como roturas de cadena	Ejemplo: radiación UV, radiación ionizante.
Químicos	Inducen mutaciones al interactuar con los nucleótidos del DNA	Ejemplo: Agentes alquilantes, compuestos como la ciclofosfamida.
Biológicos	Organismos como virus que afectan la estructura o expresión genética	Ejemplo: Virus que integran su genoma en el DNA del huésped.

Una consecuencia de las mutaciones es la pérdida de heterocigosis, este fenómeno se da cuando un organismo que posee dos alelos, uno silvestre y uno mutante, pierde la función del silvestre como resultado de la mutación, de forma que únicamente queda la versión mutante del alelo el cual se expresa (NIH, Consultado 2024).

Sin embargo, las mutaciones pueden no ser definitivas, existen procesos de reparación de daño al DNA en las células. Cuando en el DNA ocurre el rompimiento de una hebra (SSB, por sus siglas en inglés), éste puede ser reparado en “Eucariontes superiores” gracias a la DNA ligasa. La poli(ADP-ribosa) se activa y sintetiza polímeros que sirven como etiqueta y atraen al complejo proteico encargado de la reparación del DNA (McLennan y colaboradores, 2014). Otra forma de reparación para las SSB es la escisión, la hay de dos tipos; la reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés), en la cual la cadena con el daño es seccionada por una endonucleasa en un número determinado hacia cada lado de la lesión y, el segmento es eliminado, de esta forma el segmento se transcribirá de la cadena no lesionada corrigiendo el error (McLennan y colaboradores, 2014, Krebs y colaboradores, 2017). La segunda forma de reparación por escisión es la reparación por escisión de base (BER, por sus siglas en inglés), en la cual las bases modificadas individuales son identificadas por glucosilasas selectivas que se encargan de la ruptura del enlace N-glucosílico de la o las bases alteradas y la desoxirribosa produciéndose así un sitio apurínico o apirimidínico (AP, por sus siglas en inglés). Una AP endonucleasa corta este sitio y el daño es reparado mediante transcripción a partir de la cadena sin daño, cuando se presenta reparación por BER en ocasiones ocurre una pérdida espontánea de bases como consecuencia de la

escisión, esta pérdida también se soluciona al momento de la transcripción (Mc.Lennan y colaboradores, 2014, Krebs y colaboradores, 2017). Si una ruptura SSB no es reparada apropiadamente, ocurren los rompimientos de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés). Para reparar este tipo de daño existen dos mecanismos: la recombinación homóloga y la unión de terminaciones no homologas (Mc.Lennan y colaboradores, 2014, Krebs y colaboradores, 2017). En el caso de la recombinación homóloga ocurre una recombinación de cromosomas homólogos en células somáticas para reparar una DSB, el proceso de recombinación es igual al ocurrido durante la meiosis, sin embargo, ocurre únicamente en el segmento dañado gracias a proteínas de señalización durante la mitosis celular (Mc.Lennan y colaboradores, 2014, Krebs y colaboradores, 2017). La unión de extremos no homólogos entra en acción cuando no hay cromátidas hermanas disponibles para llevar a cabo la recombinación, en este tipo de reparación, los extremos resultantes de la DSB son unidos nuevamente uno con el otro, sin embargo, esta forma de reparación puede ser problemática, dado que puede generar deleciones y adiciones al momento de la reparación (Krebs Y colaboradores, 2017). Finalmente, tenemos la reparación por falta de coincidencia, ésta entra en acción durante la replicación del DNA para corregir errores en la replicación, los errores ocurren en las hebras hijas y se corrige en las mismas (McLennan y colaboradores, 2014).

1.3 Xenobióticos y su metabolización

1.3.1 Xenobióticos

“Uno de los campos de investigación en los que D. melanogaster ha jugado un importante papel es en el de la toxicología genética; disciplina que trata de conocer los efectos genotóxicos que se producen en los organismos cuando son expuestos a Xenobióticos” (Rodríguez Arnaiz y colaboradores, 2006).

Los xenobióticos son sustancias químicas ajenas al organismo y pueden ingresar al cuerpo mediante la ingesta, inhalación y absorción a través de los epitelios (Acosta y Acosta, 2019). Además, algunos xenobióticos pueden ejercer su genotoxicidad debido a

la exposición prolongada (Phillips y Arlt, 2009). Muchos xenobióticos pueden ser metabolizados, lo cual implica la modificación de su estructura (Acosta y Acosta, 2019).

1.3.2 Citocromo P450

Los xenobióticos se encuentran en el mundo que nos rodea y estamos en constante contacto con ellos; los organismos cuentan con barreras encargadas de mantener a los xenobióticos fuera del organismo, sin embargo, dichas barreras pueden fallar.

Los xenobióticos no tienen valor nutrimental, por lo que no son incorporados a las vías metabólicas a las que se incorporan los nutrientes, a pesar de no pasar a las vías metabólicas intermediarias, tienen que ser eliminados, crear una ruta metabólica específica para cada compuesto metabólico requeriría de grandes cantidades de tiempo y energía por, lo que no sería muy eficiente. Por ello, un sistema metabólico más eficiente para este tipo de sustancias será aquel que procesa un amplio rango de compuestos. Algunas enzimas de la familia del citocromo P450 cumplen con dichas características (Donato, 2004; Rodríguez y Rodeiro, 2014).

El citocromo P450 es un complejo enzimático que conforma a una superfamilia de enzimas, específicamente hemoproteínas monooxidasas con función catalítica. Las enzimas de esta superfamilia son muy versátiles, diversas y con gran variedad de sustratos, muchos de ellos xenobióticos. Estas enzimas tienen un papel crucial en la desintoxicación de los organismos; transforman a los xenobióticos, a través de procesos enzimáticos, en moléculas hidrosolubles y polares con la finalidad de neutralizarlos y facilitando su excreción. A pesar de su tarea de desintoxicación, ocasionalmente tiene efectos adversos al activar los compuestos produciendo fenómenos toxicológicos y carcinogénicos (Donato, 2004; Rodríguez y Rodeiro, 2014).

El citocromo P450 está ampliamente conservado y distribuido en los organismos vivos, está presente desde las bacterias hasta los mamíferos, e incluso en plantas, protistas y hongos. En el cuerpo humano está en diferentes órganos, pero hay más isoformas en el

hígado y los intestinos, a nivel celular se encuentran en las mitocondrias y el retículo endoplásmico (Donato, 2004; Rodríguez y Rodeiro, 2014). Su distribución tan amplia y conservada permite su estudio en diversos modelos biológicos y sus funciones se pueden extrapolar al ser humano.

1.4 Malezas y su control químico

1.4.1 Malezas

Se considera una maleza a toda aquella planta que interfiere con las actividades de agricultura humanas, esto puede incluir plantas cultivables y útiles para los humanos, por ello, la denominación de maleza es subjetiva y antropocéntrica (Labrada y Parker, Consultado 2024). Las malezas pueden ser un obstáculo para la agricultura, debido a que compiten por los recursos, merman los cultivos, pueden actuar como reservorios de patógenos, e incluso algunas malezas pueden secretar sustancias tóxicas. Además, las malezas son una obstrucción para los procesos de cosecha y aumentan los costos de producción (Rosales y Esqueda, 2005, Labrada y Parker, Consultado 2024).

1.4.2 Herbicidas

Las malezas pueden ser controladas mediante ciertas estrategias que pueden ser de diferente naturaleza, por ejemplo, de forma mecánica, biológica, cultural o química. Es el control químico el más utilizado en los cultivos modernos (Rosales y Esqueda, 2005).

Los herbicidas son sustancias químicas que impiden el desarrollo de las plantas, son utilizados en cultivos, procesos industriales y áreas urbanizadas, han sido utilizados extensivamente desde la década de 1940 (Rosales y Esqueda, 2005). Si los herbicidas no se utilizan y manejan de manera adecuada pueden causar contaminación, daño a las personas que lo manejan e incluso a los cultivos de importancia económica (Rosales y Esqueda, 2005).

Los herbicidas pueden identificarse y clasificarse de varias maneras, de forma que se facilite su uso y manejo agrícola. Todos los herbicidas cuentan con tres nombres en su

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

etiquetado: el nombre químico, que describe su composición molecular; el nombre común, que es un nombre genérico de uso general; y el nombre comercial, que ayuda a identificar la empresa que lo mercantiliza (Rosales y Esqueda, 2005; Caseley, consultado 2024). Existen distintas formas de clasificarlos: 1) Según la época de aplicación los herbicidas, pueden ser preemergentes, los cuales son aplicados al cultivo antes de que emerjan las malezas y los cultivo, por lo general a una profundidad diferente a la de las semillas, de este modo se evita la germinación de las malezas; y post emergentes, que se aplican después de la germinación de las malezas y el cultivo, aunque en etapas tempranas del desarrollo y en sitios específicos donde se encuentran las malezas (Rosales y Esqueda, 2005). 2) Según su selectividad, pueden ser selectivos, los cuales eliminan malezas específicas sin afectar otras plantas aledañas, esto se logra al respetar la dosis y forma de aplicación; y los no selectivos, este tipo causa daño a todas las plantas con las que entra en contacto (Rosales y Esqueda, 2005; Caseley, consultado 2024). 3) Según su tipo de acción, pueden ser herbicidas de contacto, estos actúan directamente sobre los órganos vegetales con los que entran en contacto; y sistémicos, los cuales son absorbidos por la planta y distribuidos a lo largo de su organismo para ejercer su efecto (Rosales y Esqueda, 2005; Caseley, consultado 2024). Finalmente 4) según su modo de acción los herbicidas siguen una secuencia en la que acciona el herbicida desde su aplicación hasta la muerte de las malezas y se subdividen en inhibidores de crecimiento, inhibidores de la síntesis de pigmentos, inhibidores de la síntesis de lípidos y los destructores de membrana celular (Rosales y Esqueda, 2005; Caseley, consultado 2024).

1.4.3 Clomazone

El herbicida Clomazone ha sido ampliamente utilizado como control pre y post-emergente de malezas anuales y perennes de hoja ancha y gramíneas y se aplican en el cultivo maíz, sorgo, trigo y caña de azúcar (Van Scoy y Tjeerdema, 2014). Fue aprobado para su uso por primera vez en 1986 y pertenece a la familia de las isoxalonas

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de *Cucurbita pepo* tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

(Van Scoy y Tjeerdema, 2014). Su persistencia en el suelo varía entre uno a cuatro meses (Mervosh y colaboradores, 1995; Figueroa y Kogan, 2005).

El Clomazone interfiere en la síntesis de pigmentos incluyendo a los de la clorofila (CONABIO, 2006) ocasionando blanqueamiento de las plantas inhibiendo a la vía del metileritritol fosfato (MEP) (Van Scoy y Tjeerdema, 2014).

El amplio uso de herbicidas como el Clomazone ha sido benéfico para el control de las malezas asociadas a muchos cultivos. Sin embargo, su aplicación tiene ciertas desventajas (Jurado y colaboradores, 2011) y existe un potencial riesgo tóxico y genotóxico para los agricultores, especialmente si no se respetan las instrucciones de uso (Kale y colaboradores, 1995; EPA, 2007).

En un estudio previo de Castañeda-Sortibrán y colaboradores (2019) el Clomazone indujo daño genotóxico demostrando a través de la prueba de Mutación y Recombinación Somática (*SMART*, por sus siglas en inglés) (Castañeda-Sortibrán y colaboradores, 2019). La prueba *SMART* en alas de *D. melanogaster* ha demostrado ser una muy buena herramienta para detectar varias alteraciones genéticas inducidas por herbicidas (Torres y colaboradores, 1992; Kaya y colaboradores, 2000; Pérez-Vergara y colaboradores, 2016).

Se ha demostrado para otros herbicidas (Benigni y colaboradores, 1979; Plewa y colaboradores, 1984; Rasquinha y colaboradores, 1988; Plewa y Wagner, 1993; Heres-Pulido y colaboradores, 2008; Panigrahi y colaboradores, 2021). Los herbicidas y la bioactivación que pueden ejercer las plantas de ellos pueden generar efectos mutagénicos dañinos para el humano que los consume (Salvagni y colaboradores, 2011; Marín-Morales y colaboradores, 2013; Hashimi y colaboradores, 2020)

1.5 *Cucurbita pepo*

La calabacita (*Cucurbita pepo*) es uno de los alimentos básicos en la dieta mexicana (FIG. 2), se utilizan en productos alimenticios tales como aceites, semillas tostadas, encurtidos y cremas por mencionar algunos (CONABIO, 2006, Aguilar-Carpio y colaboradores, 2022). Además, tiene cualidades deseables para la nutrición como grandes cantidades de potasio, fibra, calcio, vitaminas A y C, magnesio y carbohidratos;

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de *Cucurbita pepo* tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

tiene también propiedades antioxidantes (Aguilar-Carpio y colaboradores, 2022). *C. pepo* crece en climas húmedos y tiene hábitos de crecimiento rastrero y arbustivo, son cultivadas principalmente para el consumo alimenticio y sus frutos son consumidos antes de que alcancen la madurez, dado que al madurar se endurece su pulpa y cáscara (CONABIO, 2006). México es el sexto mayor productor de calabacita produce el 2.6% de calabacita a nivel global, Canadá, Japón y Estados Unidos son los principales importadores de calabacita mexicana (84% de la producción) (Aguilar-Carpio y colaboradores, 2022).



Figura 2. Ejemplificación de especie utilizada y otros nombres comunes por los que se le conoce a *Cucurbita pepo*. Imagen de la revista Arqueología mexicana (<https://arqueologiamexicana.mx/mexico-antiguo/las-especies-de-calabaza-de-mexico9>).

La familia de las cucurbitáceas tiene una resistencia limitada a herbicidas, se ha encontrado que en la familia de las cucurbitáceas tienen variedades sensibilidades a los efectos del Clomazone, y *C. pepo* es resistente a los efectos del Clomazone, por lo que el Clomazone es utilizado comúnmente en su cultivo, además de no presentar merma ni afectaciones a los productos cultivados de forma que puede usarse el Clomazone como herbicida para esta planta con pocos efectos secundarios (Figueroa y Kogan, 2005).

1.6 Ensayo SMART

La prueba de mutación y recombinación somática en el ala de *D. melanogaster* (SMART; por sus siglas en inglés Somatic Mutation and Recombination Test) proporciona una alternativa relativamente rápida para evaluar el potencial de una sustancia química para inducir la pérdida de heterocigosidad (LOH, por sus siglas en inglés) resultante de una mutación genética, reordenamiento cromosómico, rotura de cromosomas o pérdida de cromosomas (Graf y colaboradores, 1984). En el bioensayo SMART en *D. melanogaster*, las cepas flare o flama (*flr³*) y tricomas múltiples en las alas (*multiple wing hairs*, *mwh* por sus siglas en inglés) se utilizan por sus características genéticas específicas que facilitan la detección de mutaciones somáticas, las cuales se pueden observar directamente en las alas de los adultos. Además, *D. melanogaster* ha mostrado ser sensible a una variedad de agentes genotóxicos, incluyendo a herbicidas, lo que la hace adecuada para la detección de distintos tipos de daño genético (Graf y colaboradores, 1984, 1989; Rodríguez de Andrade y colaboradores, 2004; Pitchakarn y colaboradores, 2021; Yalcin y colaboradores, 2024).

1.6.1 Cepas de *Drosophila melanogaster*

Para el ensayo SMART se utilizan las siguientes cepas: una portadora de la mutación *mwh* y otra portadora de la mutación *flr³*, las cuales producen tricomas anómalos en las alas de *D. melanogaster* en las cruces al presentar daño genético, permitiendo la cuantificación de la mutagénesis. En la cepa *flr³* los citocromos p450 se expresan de forma facultativa mientras que en una tercera cepa ORR- *flr³* se expresan los citocromos p450 de forma constitutiva. Esta expresión constitutiva de los citocromos p450 de la cepa ORR-*flr³* es fundamental para la detección de bioactivación de una sustancia (Frölich y Würgler, 1989).

Cepa de Genotipo: *mwh/mwh*

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

El gen *mwh*, se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma tres de *D. melanogaster*, a 0.3 unidades de mapa. Es una mutación que provoca que las células del ala produzcan de tres a cinco tricomas en lugar de uno solo. Esto permite la fácil identificación de mutaciones en las células somáticas, ya que cualquier cambio en el número de tricomas en las alas puede ser un indicador de daño genético (Lindsley y Zimm, 1992).

Cepas de Genotipo: *flr³/In(3LR)TM3,Bds* y *ORR-flr³/In(3LR)TM3,Bds*

El gen *flr³* (flare-flama), también está en el cromosoma tres a 38.8 unidades de mapa y es recesivo. Cuando se encuentra en homocigosis provoca que los tricomas del ala estén deformados y en forma de flama. *flr³* es esencial para la viabilidad celular por lo que la mutación resulta letal cuando está en homocigosis, lo que significa que los individuos que la poseen no sobrevivirán si ambos alelos son mutantes, por lo que en el bioensayo *SMART* se pueden observar las alteraciones genéticas sólo en las células somáticas que van a dar origen a los tricomas del ala en la mosca. Para mantener la cepa *flr³*, se usa un cromosoma que tiene la mutación y su cromosoma homólogo tiene un balanceador. El cromosoma balanceador es un tipo especial de cromosoma que se usa para mantener mutaciones recesivas letales o semiletas en la población, al tener múltiples inversiones se previenen la recombinación con su cromosoma homólogo y así se evita la formación de individuos letales homocigotos. En este caso "T" representa el tercer cromosoma, esta letra es seguida por una "M", para "invertido múltiple". En heterocigosis (una copia mutante y una copia normal), los individuos sobreviven. En TM3 además porta un rasgo fenotípico dominante fácilmente observable. La mutación *Ser*, esta cepa tiene una mutación en las alas de las moscas manifiestan muescas o escotaduras en el borde anterior de las alas, lo que da la apariencia de que las alas están "dentadas" o "serradas" (Lindsley y Zimm, 1992). Además, se puede usar la cepa resistente al DDT Oregón R(R) en la cual existe una alta expresión constitutiva de actividades dependientes del citocromo P450. La cepa Oregón R(R) *flare*, se denomina comúnmente como *ORR-flare* u *ORR-flr³* (Frölich y Würigler, 1989).

1.6.2 Cruzas progenitoras

Los machos *mwh/mwh* se cruzan con hembras vírgenes (FIG. 3) *flr³/ln(3LR)TM3,Bds* u *ORR-flr³/ln(3LR)TM3,Bds*. Estas cruzas se realizan en una proporción de hembras: machos de 2:1. Se colocan hembras vírgenes *ORR-flr³* y *flr³* con machos *mwh* de no más de 72 h de edad, se sincroniza la crua y se permite el libre apareamiento durante tres días.

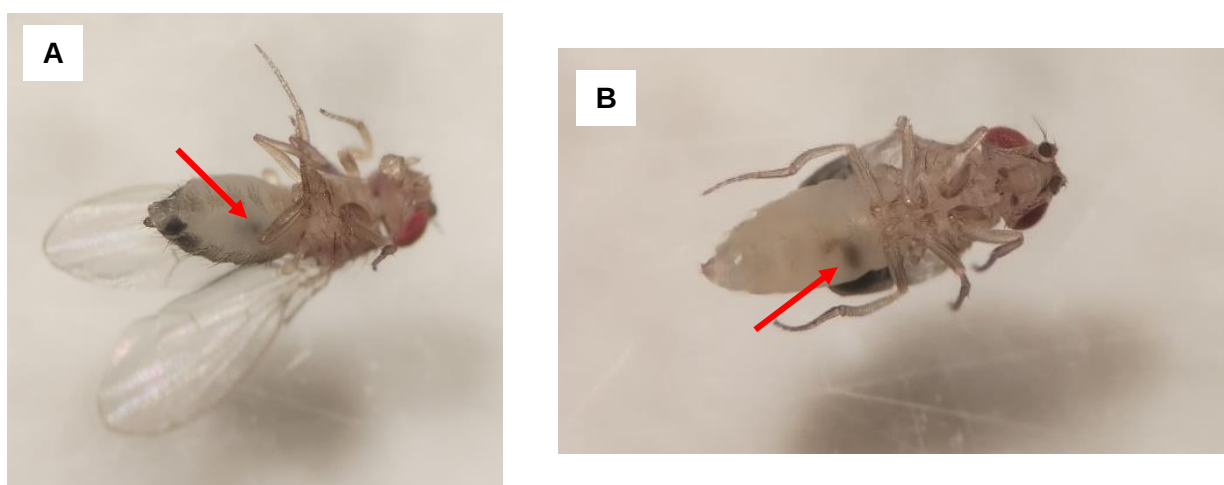


Figura 3. A y B hembras vírgenes de una cepa silvestre. Se observa señalado en rojo el meconio utilizado para identificarlas como vírgenes.

Cruza Estándar:

Actividad enzimática: La crua estándar (*ST*, por sus siglas en inglés) (FIG. 4), tiene una actividad enzimática basal ya que las cepas de machos y hembras expresan la actividad de los citocromos P450 de forma basal o facultativa (Frölich y Würgler, 1989). Es útil para identificar mutágenos directos, es decir, aquellos que son genotóxicos sin necesidad de ser metabolizados previamente.

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

Ensayo de mutación somática y recombinación en *Drosophila melanogaster*

Cruza estándar

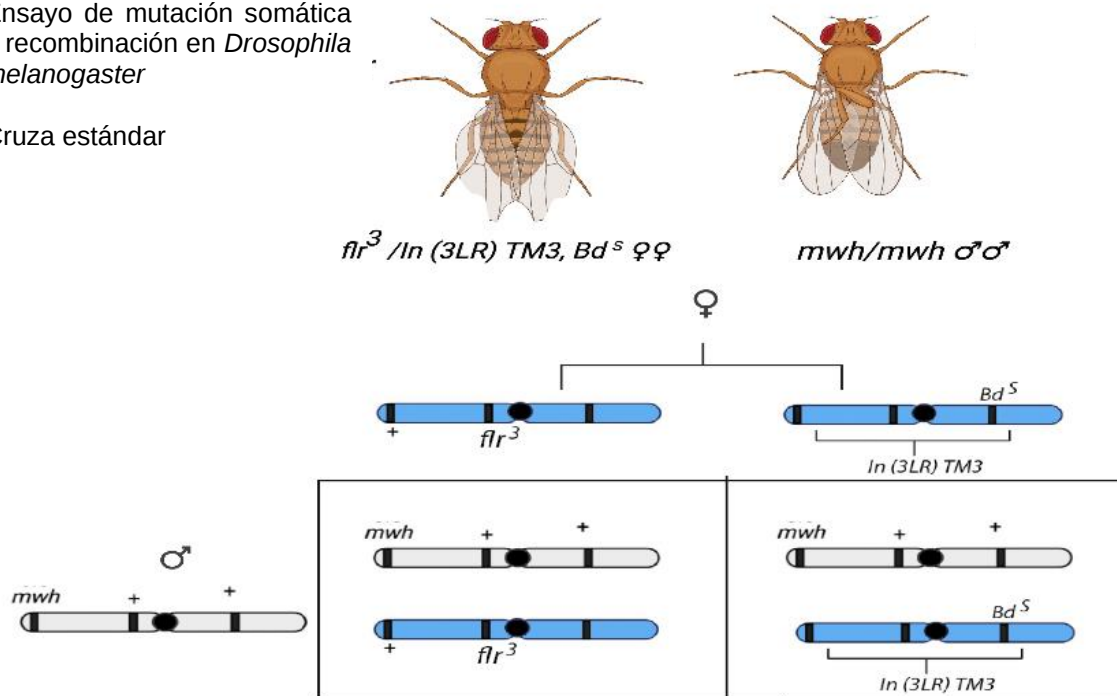


Figura 4. Genotipos y fenotipos del cruce empleado (P) y genotipos y fenotipos del ala de la primera generación de la craza estándar (Modificado de Castañeda-Sortibrán y colaboradores, 2011).

Cruza de Alta Bioactivación:

La craza de alta bioactivación (*HB* por sus siglas en inglés) (FIG. 5) tiene una sobreexpresión de enzimas del sistema citocromo P450 ya que se lleva a cabo con machos *mwh* y hembras *ORR-flr³* (Oregón R(R)-*flare*), una cepa resistente a pesticidas que expresan constitutivamente a los citocromos P450, lo que aumenta su capacidad para bioactivar compuestos xenobióticos, convirtiéndolos en metabolitos activos que pueden ser genotóxicos. Es especialmente útil para detectar la genotoxicidad de promutágenos, que son compuestos que requieren activación metabólica para convertirse en mutágenos. Esto permite evaluar la capacidad de los compuestos para causar daño genotóxico después de ser metabolizados (Frölich y Würigler, 1989; Graf y van Shaik, 1992; Dunkov y colaboradores, 1996; Rodríguez-Arnaiz y colaboradores, 2006).

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

Ensayo de mutación somática y recombinación en *Drosophila melanogaster*

Cruza de alta bioactivación

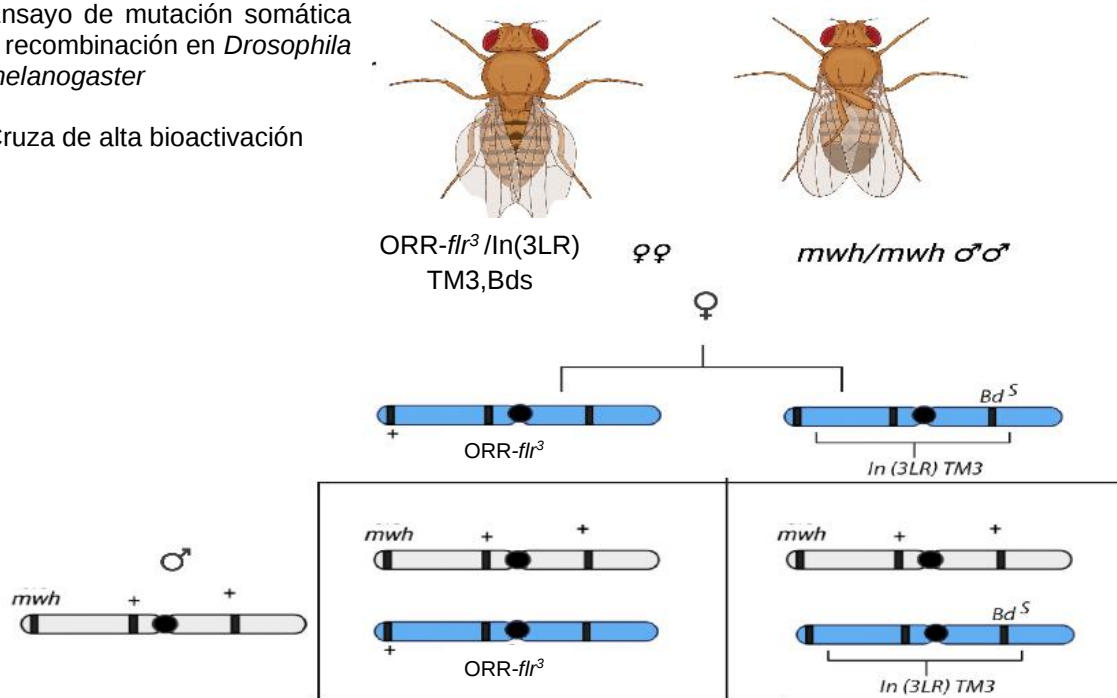


Figura 5. Genotipos y fenotipos del cruce empleado (P) y genotipos y fenotipos del ala de la primera generación de la cruce de alta bioactivación (Modificado de Castañeda-Sortibrán y colaboradores, 2011).

1.6.3 Montaje de alas

Los adultos maduros expuestos al tratamiento son sacrificados y se realiza la disección de las alas de las moscas transheterocigotas, caracterizadas por presentar un fenotipo silvestre (Graf y colaboradores, 1984), se colocan 20 alas de los adultos, 10 pares de alas de hembras y 10 pares de alas de machos (FIG. 6).

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

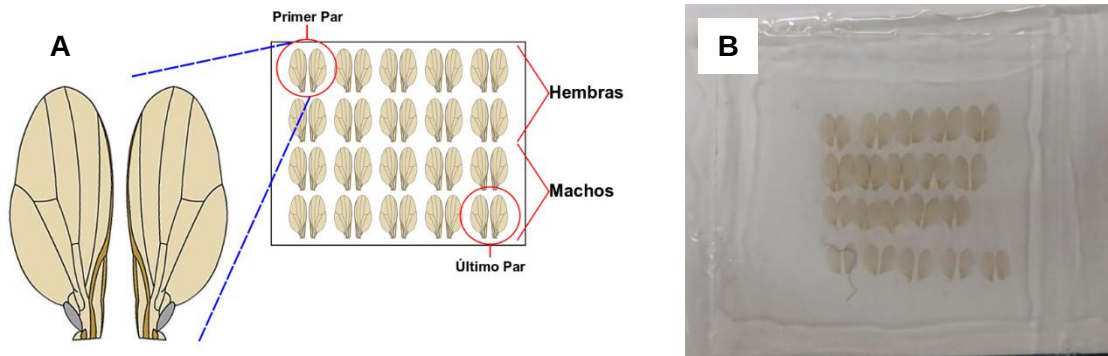


Figura 6. A. Esquema de la preparación permanente con 20 pares de alas, 10 pares de alas de hembras y 10 pares de alas de machos (esquema de Carballo Ontiveros M.A.) B. muestra permanente de pares de alas (Fotografía Muñoz Ponce Nava M.C, 2024)

1.6.4 Lectura de resultados

Finalizado el proceso de realización de las laminillas, deben observarse al microscopio y evaluadas ala por ala detalladamente. La mitad de la progenie de la cruce estándar será heterocigota para *mwh* y *flr*³, y la otra mitad *mwh*/ *In(3LR)TM3,Bds*. Las larvas heterocigotas *mwh/flr*³ son las más importantes para el ensayo SMART. Estas larvas son heterocigotas para dos marcadores recesivos que permiten detectar mutaciones y recombinaciones somáticas, las mutaciones que se inducen pueden causar diferentes escenarios (FIG. 7).

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de *Cucurbita pepo* tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster*

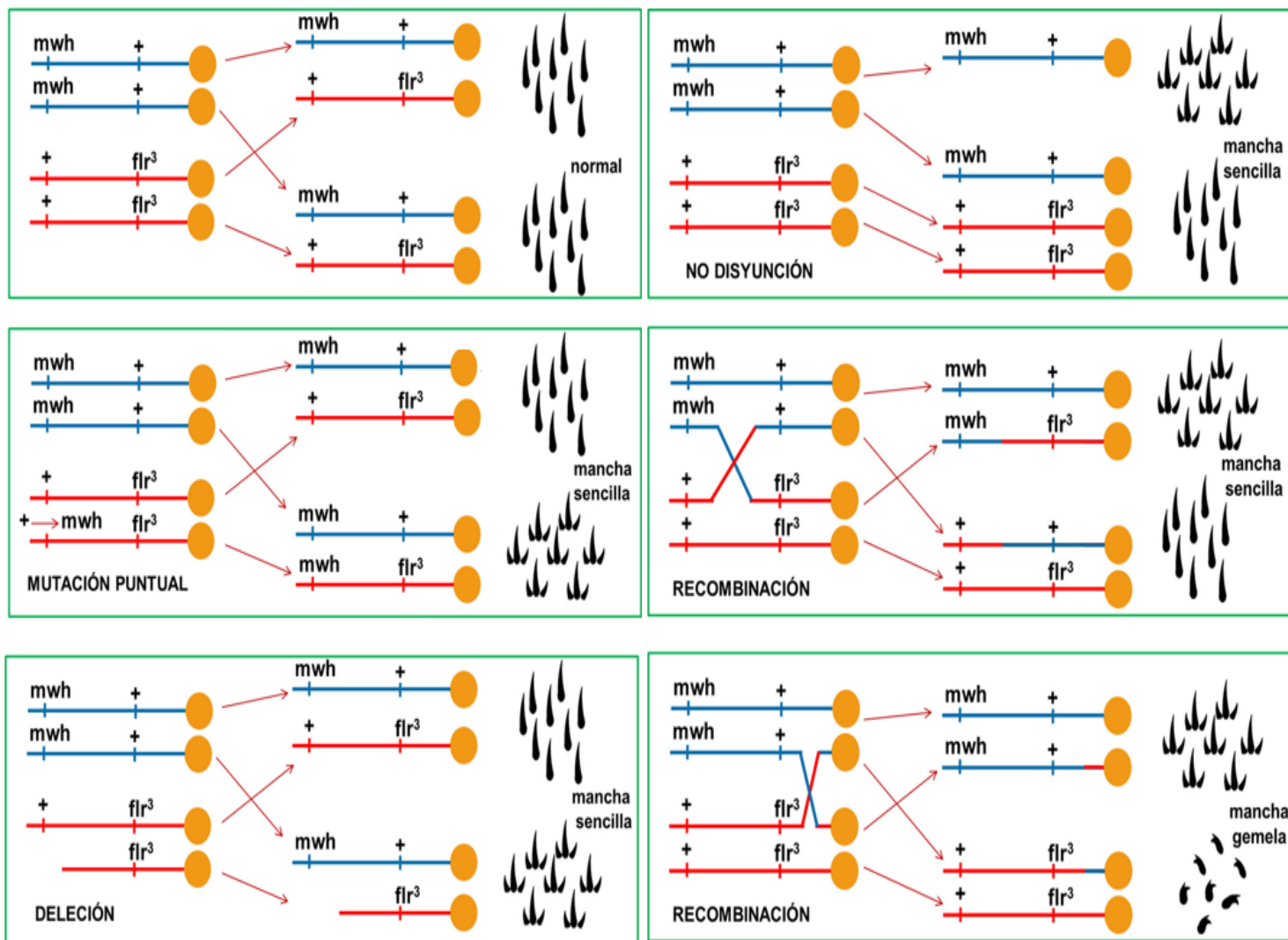


Figura 7. Diagrama esquemático que ilustra los mecanismos para la formación de clones (manchas) mediante delección, mutación puntual y recombinación, detectadas mediante la prueba SMART en *D. melanogaster* (Adaptado de Graf y colaboradores, 1984 por Carballo Ontiveros M. A.).

Si un agente genotóxico induce una alteración genética en una célula en división mitótica de un disco del ala en desarrollo, puede dar lugar a un clon o clones de células *mwh* y/o *flr³*, es decir, una "mancha" (FIG. 8), visible en la superficie del ala de la mosca adulta (Graf y colaboradores, 1984; Rodríguez de Andrade y colaboradores, 2004). Si, por otro lado, ocurre un evento de recombinación entre los cromosomas homólogos, las células hijas muestran clones formados tanto por células que manifiestan el marcador *mwh* como *flr³* (FIG. 8). Así, el número total de clones inducidos en un grupo de moscas tratadas

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

proporciona datos cuantitativos sobre la actividad genotóxica total de un compuesto, mientras que los tipos de clon pueden revelar los mecanismos mutacionales involucrados en la producción de clones (Rodríguez de Andrade y colaboradores, 2004). El registro de las manchas se realiza de acuerdo con Graf y colaboradores (1984) (FIG. 7).

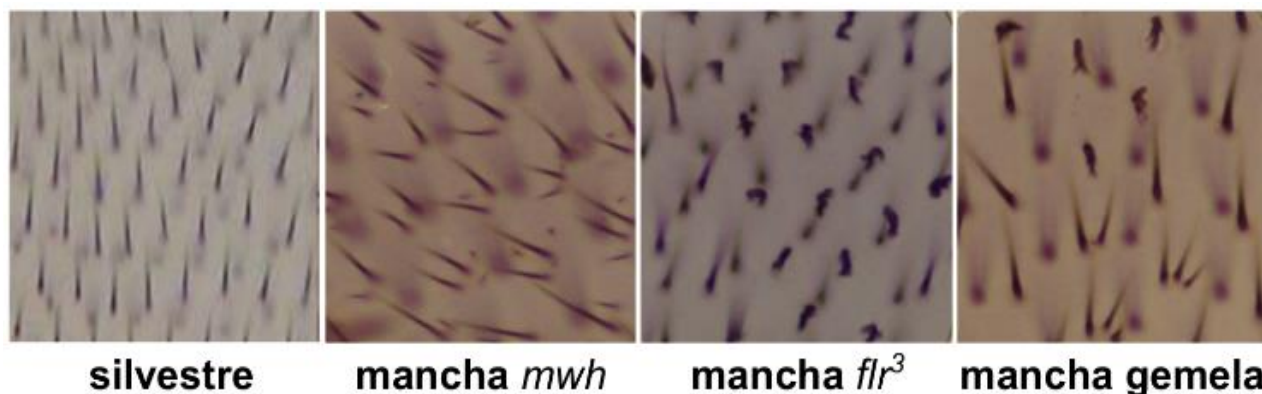


Figura 8. Se observan los tipos de manchas presentes expuestos en 4 diferentes escenarios. 1) Sin manchas. 2) Mancha mwh. 3) Mancha flr³. 4) Mancha gemela.

2 Antecedentes

Como ya se mencionó anteriormente, el control químico de las malezas es el más utilizado en la agricultura moderna, dado que si se utilizan adecuadamente suelen ser muy eficientes y no tienden a ser muy costosos (Rosales y Esqueda, 2005). Aunque los herbicidas son ampliamente utilizados, muchas personas no comprenden completamente sus posibles efectos dañinos sobre el ambiente o la salud y frecuentemente no siguen los lineamientos de seguridad y prevención necesarios para su manejo adecuado (Rosales y Esqueda, 2005). Además, los efectos que pueden inducir no han sido ampliamente caracterizados. Con respecto al herbicida Clomazone.

Flores-Loyola (2016) realizó un estudio de genotoxicidad con el ensayo *SMART* en el cual determinó que el Clomazone al ser ingerido directamente por *D. melanogaster* en las concentraciones de 2.5, 5, y 10% (determinadas a partir de la dosis letal mínima) tiene propiedades genotóxicas. Sin embargo, el consumo del Clomazone por el ser humano no es directo, sino a partir de los productos cultivados en este herbicida. Es por

esta razón que en el presente proyecto se busca evaluar la posible toxicidad del Clomazone a partir del extracto de raíz de *C. pepo* expuesta a las tres concentraciones del herbicida Clomazone determinadas por Flores-Loyola (2016).

3 Justificación

Existen pocos estudios referentes a los posibles efectos genotóxicos del Clomazone. Es de nuestro conocimiento que al estar dentro del organismo actúa como un xenobiótico. Además, sabemos gracias a Flores-Loyola (2016), que tiene un efecto genotóxico al ser consumido directamente. Sin embargo; el Clomazone llega al consumidor a través de la ingesta de cultivos asperjados. El efecto indirecto tal y como se describe, no ha sido caracterizado ni reportado. Con base en la información previa, en este trabajo se busca evaluar el potencial genotóxico del Clomazone al ser consumido de forma indirecta, al ser extraído de la raíz de calabacita (*C. pepo*) en el modelo biológico *D. melanogaster*.

4 Hipótesis

Se espera que el Clomazone mantenga sus características genotóxicas, aún después de ser metabolizado por la planta, de forma que los cultivos expuestos al herbicida pueden tener un efecto se observará pérdida de heterocigosis en los tricomas de las alas de *D. melanogaster* de forma que presente una diferencia significativa respecto al control para las cruas estándar y de alta bioactivación.

5 Objetivos

5.6 General

Evaluar la genotoxicidad del extracto de raíz de calabacita germinada en Clomazone (2.5, 5 y 10%) a través del ensayo *SMART* en el modelo de la mosca de la fruta.

5.7 Particulares

- Determinar si el posible efecto genotóxico depende de un proceso de bioactivación empleando las cruas estándar y de alta bioactivación en el ensayo *SMART*.
- Comparar los efectos genotóxicos del extracto de raíces de calabacita expuestas a Clomazone con un control positivo y un control negativo.
- Evaluar si existe una relación dosis-respuesta del extracto de raíces de calabacita tratadas con Clomazone y la inducción células clonas en las alas de *D. melanogaster*.

6 Materiales y métodos

6.6 Compuestos químicos

Clomazone adquirido comercialmente (Command® FMC; Clomazone 36% p/v)
Medio Carolina® instantáneo

6.7 Determinación de la LC₅₀

En este ensayo se busca medir la genotoxicidad del Clomazone metabolizado presente en el extracto de raíz de *C. pepo*. La determinación de la LC₅₀ del Clomazone ha sido determinada por Flores-Loyola (2016), de forma que el ensayo se llevó a cabo tratando a *D. melanogaster* en las concentraciones de 2.5, 5 y 10%. Con base en esta información se utilizaron las mismas concentraciones para la germinación de *C. pepo*.

6.8 Método

6.8.1 Tratamientos

Extracto de raíces de calabacita: Los extractos acuosos de las raíces de calabacita tratados con Clomazone se llevaron a cabo de acuerdo con de Souza y colaboradores, (2013). Controles: Control negativo (agua destilada) y Control positivo (agente genotóxico conocido, como Mitomicina C o ciclofosfamida).

6.8.2 Cruzas progenitoras

Se seleccionaron 100 hembras vírgenes *flr³/ln(3LR)TM3,Bds* para la ST y 100 hembras *flr³/ln(3LR)TM3,Bds* para la craza HB y 50 machos *mwh* de no más de 72 horas de edad y se colocaron en frascos con medio de cultivo fresco y se permitió su apareamiento libre durante 3 días. Transcurrido este tiempo se retira a los progenitores y se permite el desarrollo de las larvas durante 72 ± 3 horas hasta el tercer estadio.

Las larvas de tercer estadio se extrajeron de los frascos con ayuda de una solución de sacarosa al 20% y se lavaron ligeramente con agua corriente y después con agua destilada. Se expusieron a un tratamiento y grupos control durante 48 h, empleando medio instantáneo Carolina® hidratado con los extractos obtenidos de los tratamientos. Después de la exposición se extrajeron 60 individuos adultos para la preparación de muestras fijas que serán realizadas por triplicado en cada concentración (Tabla 3).

Tabla 3. Tratamientos dados por concentración y número de individuos de *D. melanogaster* para la craza estándar y la craza de alta bioactivación.

Tratamiento	Concentración	Laminillas	Individuos	Tiempo de exposición
Control negativo (H ₂ O)	0%	3	60	48 horas
Clomazone	2.5%	3	60	48 horas
Clomazone	5%	3	60	48 horas
Clomazone	10%	3	60	48 horas
Control positivo (Mitomicina)	0.15 mM	3	60	48 horas

6.8.3 Preparación de muestras fijas

Una vez que los adultos se obtuvieron del tratamiento fueron sacrificados y fijados en alcohol, se disectaron las alas de las moscas transheterocigotas, caracterizadas por presentar un fenotipo silvestre de los adultos almacenados en alcohol. Se prepararon laminillas por triplicado para cada concentración y el testigo. Para la preparación de las laminillas se colocaron 20 alas de los adultos, 10 pares de alas de hembras y 10 pares de alas de machos, en un portaobjetos con solución fauré (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 ml de cloral hidratado y agua) (Graf y colaboradores, 1984). Después de colocadas las alas se dejó secar la solución durante 72 horas a 60°.

Pasado ese tiempo, se colocó una gota de Fauré y sobre ella un cubreobjetos y se ejerció presión sobre la muestra para expandir las alas durante 72 horas. Posteriormente, se retiró el excedente de Fauré con un pincel. Para finalizar con la preparación se colocó barniz de uñas en los bordes del cubreobjetos para fijar la muestra.

6.8.4 Lectura de muestras fijas

Finalizada la preparación las laminillas, las muestras fueron observadas al microscopio óptico a 40x, se evaluó cada una de las alas por el lado dorsal y ventral, se exploró detalladamente cada ala. El análisis se llevó a cabo de izquierda a derecha y de arriba abajo.

6.8.5 Análisis estadístico

Los datos de las lecturas de las preparaciones de las alas se evaluaron con el programa informático SMART 2.0 basado en la prueba de Kastenbaum-Bowman ($P < 0,05$) (Würgler, no publicado). Para el análisis estadístico, las manchas se agruparon en los siguientes tres tipos: 1) manchas individuales pequeñas de 1 o 2 células de tamaño (*mwh* o *flr*³), 2) manchas individuales grandes de 3 o más células, y 3) manchas gemelas con

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

un clon mwh y flr3 (FIG. 6). Estos tres tipos de manchas se evaluaron por separado. Para las frecuencias de cada tipo de mancha (pequeñas y grandes manchas simples o gemelas) y la frecuencia total de manchas por ala para cada tratamiento, se utilizaron un procedimiento de decisión múltiple para decidir si un resultado dependiendo de la comparación de clones. Se pueden alcanzar estadísticamente cuatro posibles resultados: positivo (+), el compuesto es genotóxico; negativo (-), el compuesto no es genotóxico; inconcluyente (i), cuando no se puede determinar si el compuesto es o no genotóxico; y débil positivo (d+), cuando se considera que el compuesto es un poco genotóxico, aunque la frecuencia de manchas de las condiciones experimentales es más baja que la frecuencia de los controles. A partir de los resultados obtenidos arrojados por el programa *SMART* se realizó la discusión de estos y se sacaron las conclusiones pertinentes. Se compararon por pares con frecuencias de controles mutágenos negativos o positivos, o inversamente, utilizando el programa informático *SMART*. Se utilizó la prueba U no paramétrica de Mann-Whitney y Wilcoxon ($\alpha = \beta = 0,05$, unilateral) para excluir diagnósticos falsos positivos o negativos. La prueba U considera los valores de rango en controles y tratamientos y considera la sobre dispersión en una distribución no normal. Los resultados no significativos indican una falta de sensibilidad o ausencia de genotoxicidad en la concentración probada en la prueba de la mancha en el ala, y los resultados significativos representan genotoxicidad cuando las frecuencias de tratamiento son mayores que las del control (Frei y Würigler 1988, 1995).

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de *Cucurbita pepo* tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

En la siguiente figura, se esquematiza el método realizado para esta investigación (FIG. 9).

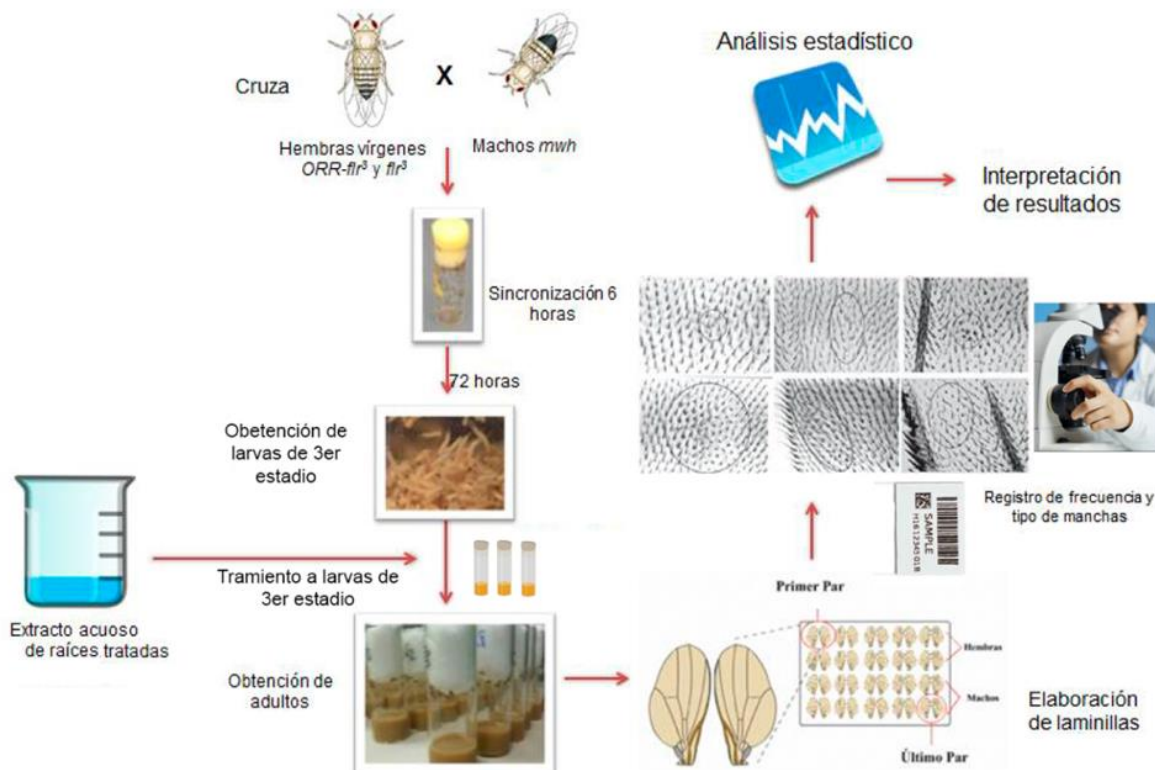


Figura 9. En el esquema se muestra la metodología general del ensayo SMART: realización de la cruce, tratamiento a larvas de 3er estadio (72 ± 3 h), obtención de los adultos, fijación de las alas, montaje de las alas, lectura de las preparaciones en el microscopio óptico, análisis estadístico e interpretación de los resultados.

7 Resultados

En la Tabla 4 podemos observar los datos arrojados por el software de SMART V2.0. al evaluar a la cruce estándar. Se resalta en negritas y color rojo las condiciones probadas en las cuales se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de las manchas respecto al control negativo, es decir que se obtuvo una respuesta positiva de genotoxicidad. En este caso, observamos que las concentraciones (2.5, 5, y 10% de Clomazone) utilizadas para evaluar el extracto de raíz de *C. pepo* dieron resultados positivos. Esto se ve reflejado en las manchas pequeñas de *mwh*, así como en el total de manchas registradas.

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

Tabla 4: Frecuencia y número de manchas obtenidas del análisis de alas de moscas expuestas al tratamiento con extracto de calabacita en la cruce estándar. Se observan en rojo las diferencias significativas; en negritas se resaltan las manchas presentes en el control positivo.

Resultados obtenidos en el ala de <i>Drosophila melanogaster</i> por el ensayo SMART. Cruza ST.						
Concentración y compuesto	Número de alas	Manchas pequeñas (1-2 células) M=2.00	Manchas grandes (>2 células) M=5.00	Manchas gemelas M=5.00	Total de manchas M=2.00	Media por ciclos de división celular
dH ₂ O (Control negativo)	60	0.27	0.05	0.02	0.33	1.58
Mitomycin C [0.15mM] Control positivo	6	45.50 +	18.17 +	4.17 +	67.83 +	2.14
Extracto de raíz + Clomazone [2.5%]	60	0.78 +	0.00 -	0.03 i	0.82 +	1.39
Extracto de raíz + Clomazone [5%]	59	0.90 +	0.05 i	0.05 i	1.00 +	1.69
Extracto de raíz + Clomazone [10%]	59	0.80 +	0.05 i	0.02 i	0.86 +	1.49
Diagnóstico estadístico según Frei & Wüergler (1988) Donde +=positivo, - = negativo, w=positivo débil, i=inconcluyente, m= factor de multiplicación. Nivel de probabilidad $\alpha=0.05$						

En la Tabla 5 podemos observar los datos arrojados por el software de SMART V2.0. al evaluar a la cruce de alta bioactivación. Se resalta en negritas y color rojo las condiciones probadas en las cuales se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de las manchas respecto al control negativo, la comparación contra el control demuestra diferencia significativa respecto al control en la concentración 10%.

Tabla 5. Frecuencia y número de manchas obtenidas del análisis de alas de moscas expuestas al compuesto con extracto de raíz de calabacita en la cruce de alta bioactivación. Se observan en rojo las diferencias significativas; en negritas se resaltan las manchas presentes en el control positivo.

Resultados obtenidos en el ala de <i>Drosophila melanogaster</i> por el ensayo SMART. Cruza HB.						
Concentración y compuesto	Número de alas	Manchas pequeñas (1-2 células) M=2.00	Manchas grandes (>2 células) M=5.00	Manchas gemelas M=5.00	Total de manchas M=2.00	Media por ciclos de división celular
dH ₂ O (Control negativo)	60	0.30	0.02	0.00	0.32	1.32
Mitomycin C [0.15mM] Control positivo	6	57.50 +	22.00 +	3.83 +	83.33 +	2.02
Extracto de raíz + Clomazone [2.5%]	60	0.33 i	0.05 i	0.00 i	0.38 i	1.57
Extracto de raíz + Clomazone [5%]	60	0.35 i	0.08 i	0.00 i	0.43 i	1.81
Extracto de raíz + Clomazone [10%]	40	0.62 +	0.08 i	0.03 i	0.73 +	1.89
Diagnóstico estadístico según Frei & Wüergler (1988) Donde +=positivo, - = negativo, w=positivo débil, i=inconcluyente, m= factor de multiplicación. Nivel de probabilidad $\alpha=0.05$						

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de *Cucurbita pepo* tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

En las Figuras 10 y 11 se observa el número de manchas registradas para ambas cruza realizadas teniendo en cuenta su frecuencia, tamaño y tipo por cada condición evaluada para las cruza. Según los resultados obtenidos, las manchas más abundantes fueron las manchas pequeñas en la cruza estándar (de 1 a 2 células) en las tres condiciones evaluadas con los extractos de raíz de *C. pepo* germinadas en Clomazone en la cruza estándar (FIG. 10).

Distribución del tamaño de las obtenidas por los extractos de raíz de calabacita tratados con Clomazone (2,5, 5 y 10%) en cruza estándar.

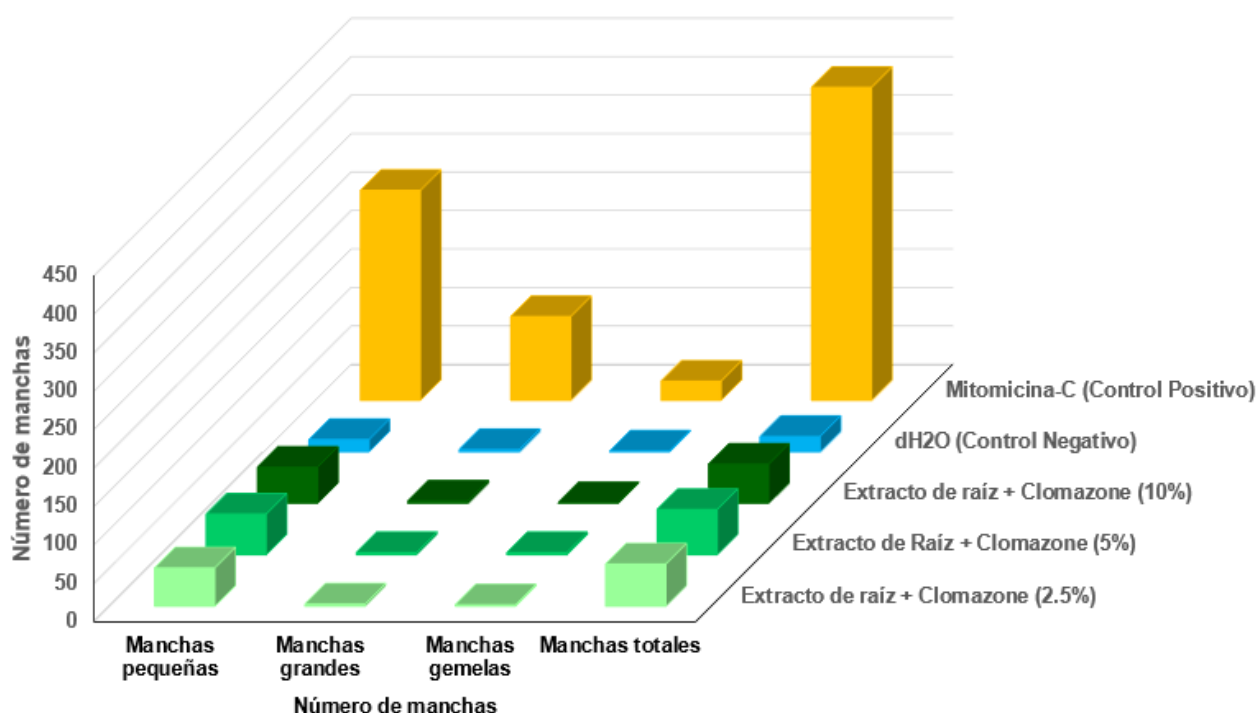


Figura 10. Gráfica de distribución del tamaño de manchas registradas del análisis de las alas por cada condición probada de los extractos de calabacita germinada en Clomazone (concentraciones [2.5, 5 y 10%]) en la Cruza ST.

Por otro lado, para la cruza de alta bioactivación (FIG. 11) se observa presencia de manchas principalmente pequeñas (1 a 2 células) sin presencia de manchas grandes ni gemelas, en las tres condiciones evaluadas con los extractos de raíz de *C. pepo* germinadas en Clomazone, sin embargo, no se aprecia una diferencia entre las manchas control y las obtenidas del tratamiento.

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

Distribución del tamaño de las obtenidas por los extractos de raíz de calabacita tratados con Clomazone (2,5, 5 y 10%) en cruza de alta bioactivación.

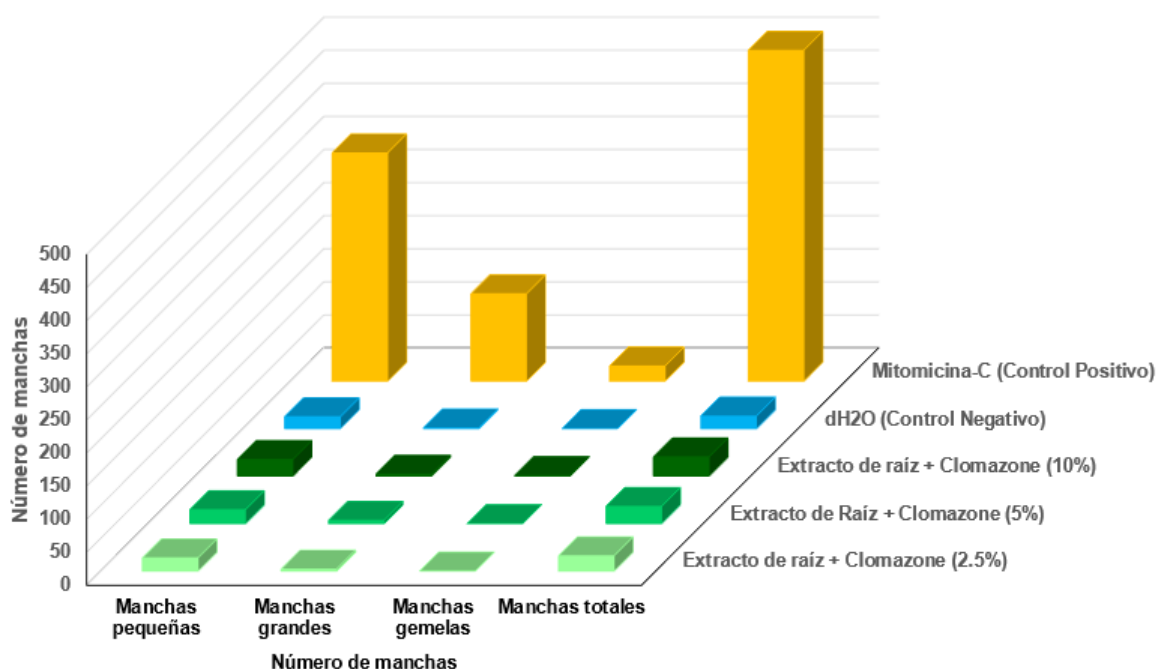


Figura 11. Gráfica de distribución del tamaño de manchas registradas del análisis de las alas por cada condición probada de los extractos de calabacita germinada en Clomazone (concentraciones [2.5, 5 y 10%]) en la Cruza HB.

8 Discusión

En México, el Clomazone está autorizado para su aplicación en una amplia variedad de cultivos, incluyendo algodón, arroz, calabacita, calabaza, caña de azúcar, chayote, chile, melón, pepino, sandía, soya y tabaco (Cofepris, 2013). Las dosis recomendadas pueden variar entre 480 y 960 g de ingrediente activo por hectárea, dependiendo de factores como el tipo de cultivo, la textura del suelo y el contenido de materia orgánica (INIFAP, 2010). Esta flexibilidad en la dosificación permite adaptar el tratamiento a las condiciones específicas de cada campo. Las variedades de calabacita presentan una tolerancia variable al Clomazone y, algunas muestran efectos transitorios como blanqueamiento foliar y retraso del crecimiento (Grey y colaboradores, 2000, Figueroa y Kogan, 2005).

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de *Cucurbita pepo* tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

En este estudio, se evaluó el potencial genotóxico de los extractos de raíces de *Cucurbita pepo* tratados con diferentes concentraciones de Clomazone mediante el ensayo SMART en *Drosophila melanogaster*. Estudios previos en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, utilizando la prueba de Ames, no reportaron mutagenicidad para este herbicida (EPA, 1988) se sugiere que el Clomazone podría inducir daño genético a través de mecanismos que no son detectados por la prueba de Ames, que la producción de mutagénesis puede presentarse o no dependiendo de la especie del organismo en el que se organismo observe o que diferentes especies presentan diferentes grados de susceptibilidad al compuesto.

Los resultados en obtenidos en la cruza ST, indican aumentos significativos principalmente en manchas pequeñas y totales, sin presencia de manchas gemelas. El efecto genotóxico puede estar relacionado con los resultados positivos obtenidos respecto a la genotoxicidad del Clomazone, sin evidencia de actividad recombinogénica (Castañeda-Sortibrán y colaboradores, 2019).

Por otro lado, en los resultados obtenidos de la cruza HB se observa una diferencia significativa respecto al control en la concentración del 10%, sin embargo, al comparar los resultados de las cruzas ST y HB no presentan diferencias significativas en la mutagénesis de ambas, por lo que no se considera promutagénica esta concentración. Respecto a la diferencia entre cruzas podemos comentar que el sistema del citocromo P450 es especialmente relevante en la bioactivación de xenobióticos, como el Clomazone. Las isoenzimas del citocromo P450 pueden catalizar reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, transformando el compuesto original en metabolitos más reactivos o bien a concentraciones bajas de Clomazone hacerlo más soluble para eliminarlo del cuerpo de la mosca por lo que no veríamos los efectos genotóxicos del mismo (Lu y colaboradores, 2021). Lo cual concuerda con la inexistencia de diferencias significativas en la cruza de alta bioactivación dado que el Clomazone se elimina con gran rapidez de las moscas.

9 Conclusión

- Los extractos de raíz de calabacita germinados en Clomazone (en las concentraciones 2.5, 5 y 10%) mostraron un efecto genotóxico gracias al ensayo *SMART* in vivo en el ala de *Drosophila melanogaster* de las cepas utilizadas, independientemente de la concentración.
- La ausencia de manchas gemelas sugiere que el efecto genotóxico del Clomazone metabolizado, al igual que por vía directa, no se asocia a actividad recombinogénica.
- La aparición exclusiva de manchas pequeñas indica que el efecto genotóxico ocurre en etapas diferentes del desarrollo, específicamente, a partir del tercer estadio larvario hasta la adultez.
- En la cruza de alta bioactivación no se observaron diferencias significativas al compararlas manchas con las de la cruza estándar y el control. Esto sugiere que el extracto de calabacita germinada en las tres concentraciones de Clomazone, carece de propiedades promutagénicas.
- El efecto genotóxico que se observa en el extracto de raíz de *C. pepo* tratado con Clomazone actúa de forma directa, ya que se observó en las tres concentraciones tratadas en la cruza estándar y se encontraron diferencias significativas al control.

10 Referencias

- Acosta, G., y Acosta, S. B. (2019). Xenobióticos. Ciencia y desarrollo, 6, 27-33.
<https://doi.org/10.33326/26176033.1999.6.108>
- Aguilar-Carpio, C., Cervantes-Adame, Y., Sorza-Aguilar, P., & Escalante-Estrada, J. (2022). Crecimiento, rendimiento y rentabilidad de calabacita (*Cucurbita pepo* L.)

Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida Clomazone en *Drosophila melanogaster*

fertilizada con fuentes químicas y biológicas. Scielo.

<https://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v40/2395-8030-tl-40-e1059.pdf>

- Benigni R., Bignami M., Camoni I., Carere A., Conti G., Iachetta R., Morpurgo G. and Ortali V.A. (1979). A new in vitro method for testing plant metabolism in mutagenicity studies. J. Toxicol. Environ. Health 5 (5), 809-819. DOI: [10.1080/15287397909529791](https://doi.org/10.1080/15287397909529791)
- Cairns, J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 255(5505), 197-200.
- Castañeda-Sortibrán, A.N., Flores-Loyola, C., Martínez-Martínez, V., Ramírez-Corchado, M.F., Rodríguez-Rodríguez-Arnaiz R. (2019). Herbicide genotoxicity revealed with the somatic wing spot assay of *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(2), 295–305.
- Castañeda-Sotibrán, A. N. C., Ordaz-Téllez, M. G., y Rodríguez-Arnaiz, R. (2011). Flavonoids and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(1), 60-65.
- de Souza Ribeiro, F. A., Tarley, C. R. T., Borges, K. B., y Pereira, A. C. (2013). Development of a square wave voltammetric method for dopamine determination using a biosensor based on multiwall carbon nanotubes paste and crude extract of *Cucurbita pepo* L. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185, 743-754.
- Donato, M. (2004). ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? https://www.uv.es/~jcastell/Citocromo_P450.pdf
- Dunkov, B., Rodríguez-Arnaiz, R., Pittendrigh, B., French-constant, F., y Feyereisen, R., (1996). Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 251 (3), 290-297. DOI: [10.1007/BF02172519](https://doi.org/10.1007/BF02172519)
- Elnaggar, S.F., Creekmore, R.W., Schocken, M.J., Rosen, R.T. y Robinson, R.A. (1991). Metabolism of Clomazone herbicide in soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (5), 880-883. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf00017a036>
- EPA (2007). EPA-HQ-OPP-2006-0113. Clomazone summary document registration review: Initial docket. Environmental Protection Agency. Registration Review. Washington, D.C., USA, 9-28 pp.
- EPA. United States Environmental Protection Agency. (1988). Command. Review of possible toxicological concerns of an impurity of Command.

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

- Figueroa, R., y Kogan, M., (2005, May). Selectividad de Clomazone en Seis Especies de Cucurbitáceas. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30239604.pdf>
- Flores Loyola, C. (2016). Evaluación genotóxica del herbicida Clomazone mediante el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) en las alas de *Drosophila melanogaster* [Tesis para obtener el título de bióloga, UNAM]. <http://132.248.9.195/ptd2016/septiembre/0750889/Index.html>
- 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 (2), 247-258. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90018-7)
- 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(4), 297- 308. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(88\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0165-1161(88)90019-2)
- Frölich, A., y Würgler, F.E. (1989). New tester strain with improved activation capacity for *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Research*, 216 (3), 179-187. DOI: 10.1016/0165-1161(89)90003-4
- Graf, U. y van Shaik N. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271 (1), 59-67. DOI: 10.1016/0165- 1161(92)90032-H
- Graf, U., Frei H., Kagi A., Katz A.J. y Würgler F.E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222 (4), 359-373. DOI: 10.1016/0165-1218(89)90112-2.
- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., y Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6(2), 153-188. <https://doi.org/10.1002/em.2860060206>
- Grey, T. L., Bridges, D. C., y NeSmith, D. S. (2000). Tolerance of cucurbits to the herbicides clomazone, ethalfluralin, and pendimethalin. I. Summer squash. *HortScience*, 35(4), 632-636.
- Hashimi, M. H., Hashimi, R., y Ryan, Q. (2020). Toxic effects of pesticides on humans, plants, animals, pollinators and beneficial organisms. *Asian plant research journal*, 5(4), 37-47.

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

- INIFAP. (2010, diciembre). Manejo de maleza en algodón en el norte de Tamaulipas. <https://www.compucampo.com/tecnicos/manejomaleza-algodon-tams.pdf>
- Jurado, A.S., Fernandes, M.A.S., Videira, R.A., Peixora, E.P., y Vicente, J.A.F. (2011). Herbicides: The face and the reverse of the coin. An in vitro approach to the toxicity of herbicides in non-target organisms. In A. Kortekamp (Ed.), *Herbicides and the environment* (pp. 3-44). DOI: <https://doi.org/10.5772/12976>
- Kale, P.G., Petty, B.T., Walker, J.B., Ford, N., Dehkordi, S., Tarasia, B.O., Tasie, R., Kale R., y Solni, Y.R. (1995). Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 25(2), 148-153. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.2850250208>
- Kaya, B., Creus, A., Yanikoğlu, A., Cabre, O., y Marcos, R. (2000a). Use of the *Drosophila* Wing Spot Test in the Genotoxicity Testing of Different Herbicides. En *Environmental and Molecular Mutagenesis* (pp. 40-46). [https://doi.org/10.1002/1098-2280\(2000\)36:1<40::AID-EM6>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1098-2280(2000)36:1<40::AID-EM6>3.0.CO;2-K)
- 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. *Mutat. Res.* 557 (1), 53-62. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2003.09.010
- Kogan, M., y Figueroa, R. (2005). Selectividad de Clomazone en seis especies de cucurbitáceas. *Agrociencia*, 39(6), 611-618.
- Krebs, J. E., Goldstein, E. S., y Kilpatrick, S. T. (2017). *Lewin's GENES XII*. Jones y Bartlett Learning.
- Lindsley, D.L., y Zimm, G.G., (1992). *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press. USA, 1133 pp.
- Lu, K., Song, Y., y Zeng, R. (2021). The role of cytochrome P450-mediated detoxification in insect adaptation to xenobiotics. *Current Opinion in Insect Science*, 43, 103-107.
- Luch, A. (2009). *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 1: Molecular Toxicology*. Birkhäuser.
- Marín-Insfrán, L. F., Gayozo-Melgarejo, E., Rivarola-Sena, C., y Núñez, C. (2022). Mutagenic evaluation of three glyphosate-based herbicides using somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Reportes Científicos de la FACEN*, 13(1), 41-50. <https://doi.org/10.18004/rcfacen.2022.13.1.41>

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

- Marín-Morales, M. A., Ventura-Camargo, B. D. C., y Hoshina, M. M. (2013). Toxicity of herbicides: impact on aquatic and soil biota and human health. *Herbicides—current research and case studies in use*, 399-443.
- Martincorena, I., y Campbell, P. J. (2015). Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, 349(6255), 1483-1489.
- McLennan, A., Bates, A., Turner, P., & White, M. (2014). Bios notas instantáneas de biología molecular (4.a ed.).
- Mervosh T.L., Sims G.K. and Stoller E.W. (1995). Clomazone fate in soil as affected by microbial 9 activity, temperature, and soil moisture. *J. Agric. Food Chem.* 43 (2), 537-543. DOI: 10.1021/jf00050a052
- Nowell, P. C. (1976). The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations: Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression. *Science*, 194(4260), 23-28.
- Panigrahi, K. K., Mohanty, A., Padhan, S. R., y Guru, R. K. S. (2021). Genotoxicity and DNA damage induced by herbicides and toxins in plants. *Induced genotoxicity and oxidative stress in plants*, 29- 63.
- Peraza-Vega R.I., Castañeda-Sortibrán A.N., Valverde M., Rojas E. and Rodríguez-Arnaiz R. (2016). Assessing genotoxicity of diuron on *Drosophila melanogaster* by the wing-spot test and the wing imaginal disk comet assay. *Toxicol. Ind. Health* 33 (5), 443-453. DOI: 0.1177/0748233716670536
- Phillips, D., y Arlt, V. (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. En *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Vol. Volumen 1* (pp. 87-110). Andreas Luch. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-7643-8340-4>
- Pitchakarn, P., Inthachai, W., Karinchai, J., y Temviriyankul, P. (2021). Human Hazard Assessment Using *Drosophila* Wing Spot Test as an Alternative In Vivo Model for Genotoxicity Testing—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9932. <https://doi.org/10.3390/ijms22189932>
- Plewa M.J. y Wagner E.D. (1993). Activation of promutagens by green plants. *Ann. Rev. Genet.* 27 (1), 93-113. DOI: 10.1146/annurev.ge.27.120193.000521

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

- Plewa M.J., Wagner E.D., Gentile G.J. y Gentile J.M. (1984). An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* 136 (3), 233-245. DOI: 10.1016/0165-1218(84)90057-0
- Rasquinha, I. A., Wildeman, A. G., y Nazar, R. N. (1988). Studies on the use of plant extracts in assessing the effects of plant metabolism on the mutagenicity and toxicity of pesticides. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 197(2), 261-272.
- Rodríguez de Andrade, H. H., Regulý, M. L., y Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. *Drosophila Cytogenetics Protocols*, 389-412.
- Rodríguez, J. C., y Rodeiro, I. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152014000300015
- Rodríguez-Arnaiz R., Castañeda-Sortibrán A. and Ordaz T.G. (2006). Biotransformación de xenobióticos mediada por los citocromos P450 en *Drosophila melanogaster*. En: Tópicos de genética (E. Pimentel, Ed.). Universidad Autónoma del Estado de México y Sociedad Mexicana de Genética, Estado de México, Mexico, pp. 77-94.
- Rodríguez-Arnaiz, R. R., y Ayala, F. J. (2016). *Una mirada a la genética desde el estudio de las moscas*.
- Rosales, E., y Esqueda, V. (2005). Clasificación y Uso de los Herbicidas por su Modo de Acción. SENASICA. <http://publico.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=19766&IdUrl=31595&objeto=Documento&IdObjetoBase=19766&down=true#:~:text=Los%20herbicidas%20son%20usados%20extensivamente,et%20al.%2C%202001>
- Salvagni J., Ternus R.Z. and Fuentefria A.M. (2011). Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the countryside of Santa Catarina State, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 34 (1), 122-126. DOI: 10.1590/S1415-47572010005000104
- Semren, T. Ž., Žunec, S., y Pizent, A. (2018). Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings. *Archives Of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69(2), 109-125. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3118>

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

- Torres C., Ribas G., Xamena N., Creus A. and Marcos R. (1992). Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test. Mutat. Res. 280 (4), 291-295. DOI: 10.1016/0165-1218(92)90060-D
- Van Scoy, A., y Tjeerdema, R. (2014). Environmental Fate and Toxicology of Clomazone. En Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (Vol. 229, pp. 35-49). David M. Whitacre. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03777-6>
- Yalcin, B., Güneş, M., Kurşun, A. Y., Tagorti, G., Golal, E., y Kaya, B. (2024). Investigation of Genotoxic and Development Effects of Tetramethrin on *Drosophila melanogaster*. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 27(2), 304-315.

11 Referencias electrónicas

- Caseley, J. C. (Recuperado 2024). Capítulo 10. Herbicidas. FAO. <https://www.fao.org/4/t1147s/t1147s0e.htm#nombres%20de%20herbicidas>
- COFEPRIS. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2013). Catálogo de Plaguicidas. Disponible: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>
- CONABIO. (2006). *Cucurbita pepo pepo*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Retrieved from http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20870_sg7.pdf
- Heres-Pulido, M. E., Lombera-Hernández, S., Dueñas-García, I., Perales-Canales, I., Castañeda-Partida, L., Rocha-Ortiz, C. Flores-Maya, A., Duran-Díaz, y Graf, U. (2008). Genotoxicity of triasulfuron in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is modulated by winter wheat seedlings. Mutation Research Genetic Toxicol. Environ. Mutagen. 653 (1), 70-75. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.03.005
- Homologene (2015). National Center of Biotechnology Information [online] <http://ncbi.nlm.nih.gov/homologene/11139116/01/2017>
- Labrada, R., y Parker, C. (Recuperado 2024). El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. FAO. <https://www.fao.org/4/t1147s/t1147s05.htm#:~:text=Estas%20plantas%20indeseables%20sirven%20de,los%20costos%20de%20tales%20operaciones.>

**Evaluación del efecto genotóxico del extracto de raíz de Cucurbita pepo tratada con el herbicida
Clomazone en *Drosophila melanogaster***

- NIH. Pérdida de heterocigosidad. Diccionario de Genética del NCI. Recuperado 20 de octubre de 2024. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-genetica/def/perdida-de-heterocigosidad>