



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“EVALUACION GENOTOXICA DEL AMBER 75 GS
(TRIASULFURON) CON EL ENSAYO SMART EN ALA
DE *Drosophila melanogaster* (CRUZA ESTANDAR)”

T E S I S

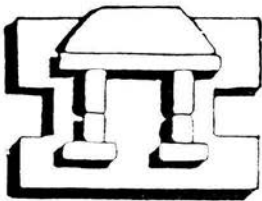
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

SONIA IVONNE PERALES CANALES

DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. MARIA EUGENIA HERES PULIDO



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA

JUNIO, 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**"EVALUACIÓN GENOTÓXICA DEL AMBER 75 GS (TRIASULFURON) CON EL
ENSAYO SMART EN ALA DE *Drosophila melanogaster* (CRUZA ESTÁNDAR)"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO

BIOLOGA

Presenta

SONIA IVONNE PERALES CANALES

Directora de Tesis

M. en C. MARÍA EUGENIA HERES PULIDO

Los Reyes Iztacala

Junio, 2003

Dedicatorias

A mis papás Jesús y María por todo el apoyo, la paciencia, la confianza y el cariño que me brindan día a día. Porque me han enseñado que hasta en los momentos difíciles hay que esforzarse y salir adelante tomando lo bueno y lo malo para crecer y madurar. Gracias por estar conmigo siempre y no dejar que me venzan las adversidades. Les agradezco los sacrificios que han hecho para que cumpliera mis metas y esto constituye el legado más grande que pudiera recibir. Los respeto y admiro profundamente. Muchas Gracias

A Roxana, porque siempre estas junto a mi apoyándome en todo lo que emprendo y regañándome cuando me equivoco. Te admiro porque eres una mujer fuerte, te quiero "mi bebe" y gracias por ser mi hermana.

A mi hermano Jorge, porque a pesar de que soy muy gruñona te quiero y te admiro, agradezco todo lo que haces por mí. Muchas Gracias.

A Jenny mi prima que formas parte importante de la familia, gracias por tu apoyo en los momentos difíciles.

A mis sobrinos Katia y Hernán, espero que esto les sirva de ejemplo en el futuro y se esfuercen por ser mejores cada día. Los Quiero.

A mis tíos Estela, Juan, Ramón y Eva, por su siempre interés en lo que hago y su felicidad cuando lo logro. Gracias

Y a ti abuelita que me has dejado una gran lección de vida, "vivir y disfrutar cada segundo que nos regala Dios". Se que te sentirías orgullosa de mi. TE QUIERO Y EXTRAÑO.

Agradecimientos

A mi directora de tesis la M. en C. María Eugenia Heres Pulido, por su tiempo, su gran paciencia, su comprensión y sus conocimientos invertidos para la terminación de esta tesis. Por confiar y creer en mí y por demostrarme con su ejemplo el gusto por enseñar y hacer investigación. Mil Gracias.

A la M. en C. Irma Elena Dueñas, por sus acertadas correcciones que enriquecieron mi tesis, pero sobre todo por su paciencia y por que ha sido una maestra de la cual he aprendido a encariñarme con la genética. Gracias.

A la M. en C. Laura Castañeda Partida, por revisar mi tesis haciendo comentarios positivos y por la aportación de imágenes que mejoraron muchísimo el trabajo. Sin olvidar las pláticas acerca de la vida, de la ciencia, del arte, de la música, etc. que tenía conmigo, por estar siempre con una sonrisa y apoyarme en los momentos de duda. Gracias.

A M. en C. Elías Piedra Ibarra, gracias por haber aceptado revisar mi tesis y mejorar la información haciendo las correcciones pertinentes.

A M. en C. Cesar Flores Ortiz, porque aunque tenía muchísimo trabajo tuvo el tiempo y la paciencia de revisar mi tesis y de hacer excelentes observaciones. Muchas gracias.

A M. en C. Ángel Duran, por orientarme y corregirme en los estadísticos utilizados en este trabajo. Muchas Gracias Profesor.

A las "chicas superpoderosas", Edaena, Tere, Maritza y Edith, por dejarme conocerlas no solamente como compañeras de equipo sino como amigas y grandes confidentes. Gracias por estar siempre conmigo, apoyándome, oyéndome y regañándome cuando es necesario. Saben que las quiero y que cuentan conmigo.

Y a todas las personas que me han ayudado de una u otra manera para pasar este enorme obstáculo.

GRACIAS A TODOS

ÍNDICE

RESUMEN	IZT.	1
INTRODUCCIÓN		2
Triasulfuron (Amber 75 GS®)		6
Concentración Letal Media (CL₅₀) y Dosis Letal Media (DL₅₀)		9
Detección de Agentes Genotóxicos		11
Estudios epidemiológicos		12
Experimentos naturales		12
Estudio con animales o bioensayos a largo plazo		13
Pruebas de laboratorio o bioensayos a corto plazo		13
<i>Drosophila melanogaster</i>		14
Ciclo de Vida		15
Ensayo SMART en Ala		18
Marcador <i>mwh</i> (<i>multiple wing hair</i>)		22
Marcador <i>flr³</i> (<i>flare</i>)		23
Marcador <i>Beaded Serratia</i> (<i>Bd^f</i>)		23
Inversión <i>TM3</i>		24
Ventajas		28
Citocromos P450		28
ANTECEDENTES		32
JUSTIFICACIÓN		33
OBJETIVO GENERAL		33
Objetivos Particulares		33
HIPÓTESIS		34
DISEÑO EXPERIMENTAL		35
MATERIALES		36
Químicos		36

Material Biológico	36
MÉTODOS	36
Propagación de las líneas parentales	36
Cruza	36
Colecta de huevos	37
CL₅₀	37
SMART	37
RESULTADOS	38
CL₅₀	38
SMART	40
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
REFERENCIAS	49

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Fig. 1: Rutas de translocación de los herbicidas en la planta</i>	4
<i>Fig. 2: Interacción de los procesos que conducen a la descomposición, inactivación y eliminación de los herbicidas</i>	5
<i>Fig. 4: Estructura química del Triasulfuron</i>	8
<i>Fig. 5: Macho y hembra de D. melanogaster</i>	14
<i>Fig. 7: Ciclo de vida de Drosophila melanogaster</i>	17
<i>Fig. 9: Tricomias silvestres</i>	21
<i>Fig. 10: (a), secciones del ala con fenotipo silvestre</i>	22
<i>Fig. 10: (b), mancha mwh de 2 células en la sección A</i>	22
<i>Fig. 11: Clon (mwh/mwh)</i>	23
<i>Fig. 12: Clon (flr³/flr³)</i>	23
<i>Fig. 13: Ala con borde Beaded Serratia (Bd^f/+)</i>	24
<i>Fig. 14: Cuadro de Punnet: se observan los marcadores utilizados para mantener la línea flare en heterocigosis</i>	24
<i>Fig. 15: Cuadro de Punnet: se muestran los marcadores de los individuos transheterocigotos y heterocigotos</i>	26
<i>Fig. 16: Diferentes tipos de manchas: a) mancha sencilla mwh b) mancha sencilla flare y c) mancha gemela</i>	27
<i>Fig. 17: Citocromo P450</i>	29
<i>Fig. 18: Molécula de protohemo IX</i>	30
<i>Fig. 19: CL₅₀ de la cruce E por regresión lineal</i>	39
<i>TABLA 1: Resumen de resultados obtenidos en el ensayo SMART en ala de Drosophila melanogaster</i> .	40
<i>Fig. 20: Proporción por mosca, de cada uno de los tipos de manchas</i>	42
<i>Fig. 21: Distribución de los clones mwh de acuerdo a su tamaño</i>	43

RESUMEN

El Triasulfuron (Amber 75 GS®) es un herbicida utilizado para eliminar maleza. Su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de la síntesis de aminoácidos, como valina, leucina o isoleucina por acción de la enzima acetolactato sintasa. Se ha relacionado con la inhibición del ciclo celular en células de mamíferos por interferencia directa en la síntesis del ADN. El ensayo SMART (*Somatic Mutation And Recombination Test*) evalúa la genotoxicidad de agentes, basándose en la pérdida de heterocigosis de genes marcadores. Para este trabajo se utilizó la craza estándar (E) que tiene niveles regulados de los citocromos P450. Basándose en la CL₅₀ (3.2 mg/ ml) para la craza E de *D. melanogaster*, se realizaron tres experimentos independientes, en concentraciones de 0.05, 0.5 y 4 mg/ ml del herbicida. La concentración de 0.05 mg/ ml que es utilizada en el campo no fue tóxica ni genotóxica. La concentración de 4 mg/ ml tampoco fue genotóxica y considerando un 40 % de sobrevivencia al administrar esta concentración se infiere una selección de los individuos resistentes. El herbicida es genotóxico porque la exposición a 10 veces la concentración usada en el campo (0.5 mg/ ml) resultó significativamente positiva por lo que la acumulación de este agente en mantos freáticos y la sobre exposición laboral, implica riesgos para las poblaciones.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de los peligros para la salud por productos químicos industriales, contaminantes del ambiente y otras sustancias representan un elemento importante en la protección a personas laboralmente expuestas y miembros de las comunidades o poblados (Loomis, 1994).

Los estudios de toxicidad tienen que ver con el uso de sustancias químicas en la medicina humana con fines de diagnóstico, preventivos y terapéuticos; en la industria de los alimentos como complementos o aditivos directos e indirectos; en la agricultura como herbicidas y pesticidas, reguladores del crecimiento, agentes polinizantes artificiales, complementos alimenticios para animales y en la industria química, como solventes y muchos otros tipos de sustancias químicas (Lu, 1992). La toxicidad de una sustancia se puede incrementar o disminuir por la exposición simultánea o consecutiva con otras sustancias como adyuvantes o surfactantes (Puricelli, 2000).

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos y/o recombinagénicos de agentes químicos y físicos, así como sus consecuencias. Se considera como mutágeno a cualquier agente que induzca cambio de uno o pocos pares de bases (mutaciones puntuales) y provoque aberraciones cromosómicas estructurales (deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones) o numéricas (aneuploidías y poliploidías) resultado de afectaciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico y alteraciones en el ADN por inhibición de los mecanismos de reparación (incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos) (Puertas, 1996).

La recombinación genética es un fenómeno de importancia universal para los sistemas biológicos, desde virus hasta eucariotas superiores. Contribuyendo a la variabilidad genética y siendo de gran importancia desde el punto de vista evolutivo. En 1936, Curt Stern (Spanó *et al.*, 2001) demostró que la recombinación también puede ocurrir en células somáticas,

durante la mitosis y no solamente en meiosis. Últimamente se ha demostrado que la recombinación es un fenómeno importante en otras funciones celulares, tales como la reparación del ADN y en la generación de variación en las inmunoglobulinas de mamíferos (Engler y Strob, 1988). También se han desarrollado pruebas para detectar recombinación mitótica, sobre todo en levaduras (Zimmermann *et al.*, 1966 en Spanó *et al.*, 2001).

Ha llegado a ser evidente que muchos agentes que causan daño al ADN, también tienen actividad recombinagénica (Hoffmann, 1994). Se ha visto que la recombinación puede ser responsable de la pérdida de heterocigosis en células germinales y somáticas, promoviendo la expresión de enfermedades hereditarias, causada por alelos recesivos o puede estar envuelta en la progresión de neoplasias. Este mecanismo ha mostrado ser la causa de la expresión de varios oncogenes y genes supresores de tumores (Bishop, 1991; Marshall, 1991; Sengstag, 1994; Happle, 1999).

Todos los días los seres vivos estamos rodeados de sustancias químicas potencialmente peligrosas y algunas de ellas están relacionadas con el inicio y la promoción del cáncer (LaGrega *et al.*, 1996). El ser humano puede quedar expuesto a cancerígenos químicos en su sitio de trabajo, a sus hábitos personales o por los alimentos que ingiere.

Los herbicidas son productos químicos fitotóxicos, utilizados para destruir plantas indeseables (maleza) para la agricultura, inhibir o alterar su crecimiento e interferir y malograr la germinación de sus semillas (Gómez, 1993).

El modo común de acción para la mayoría de los herbicidas es vía arraigue rápido (raíz) y vía follaje, donde el herbicida es trasladado al meristemo de la planta (Figura 1).

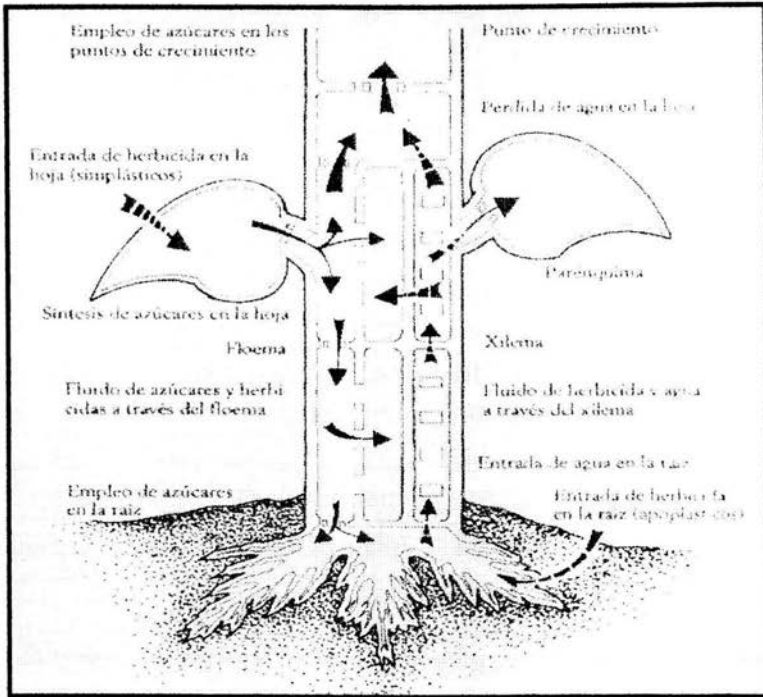


Fig. 1: Rutas de translocación de los herbicidas en la planta (tomado de Gómez, 1993)

Cuando el traslado del químico ocurre, las células de la planta experimentan un complejo proceso metabolizador, y después de un periodo de tiempo dependiente de las propiedades específicas del químico lo inactivan y eventualmente desintoxican a la célula (Figura 2).

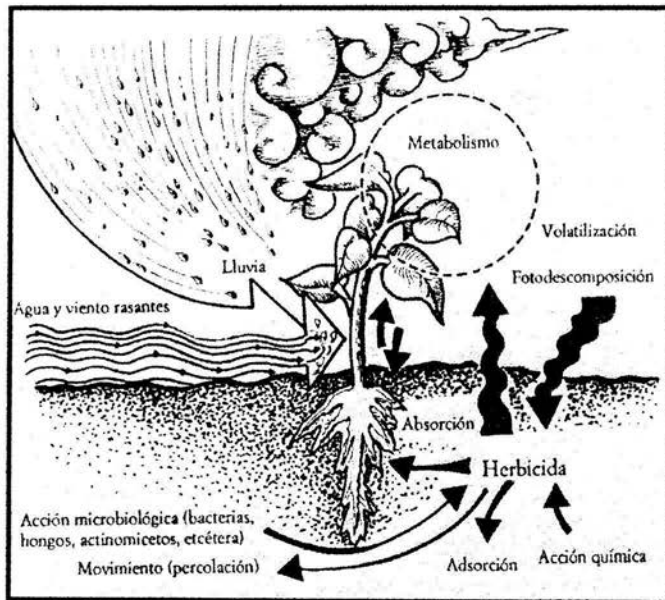


Fig. 2: Interacción de los procesos que conducen a la descomposición, inactivación y eliminación de los herbicidas (tomado de Gómez, 1993)

Aún son desconocidos los mecanismos precisos para el complejo proceso de biotransformación de herbicidas, sin embargo, este metabolismo puede dar como resultado una variedad de compuestos diferentes, derivados del material original, que pueden liberarse al ambiente. Esos metabolitos pueden o no, haber incrementado características genotóxicas o efectos sinérgicos negativos con otros químicos presentes en la biota (McEwen, 1979).

La penetración de cualquier herbicida en el cuerpo humano se puede efectuar a través de tres vías: oral, dérmica e inhalación (Figura 3) (Gómez, 1993). El riesgo profesional al utilizar los herbicidas radica en el operario que trabaja con ellos, pues permanece envuelto en una atmósfera contaminada por la pulverización o el espolvoreo del compuesto. Si no está protegido, respira esta atmósfera y su piel queda expuesta al contacto continuo, directo o a través de su vestimenta.

Con frecuencia los daños de los herbicidas a la salud humana no se traducen en alteraciones sensibles e inmediatas, sino que a la larga pueden producir síntomas tóxicos de diagnóstico difícil. Hay que tener en cuenta que incluso las materias inertes usadas en la formulación (talco, caolín, kieselghur, atapulgita, etc.) pueden causar enfermedades crónicas del sistema respiratorio (Barbera, 1976; Burroughs *et al.*, 1999).

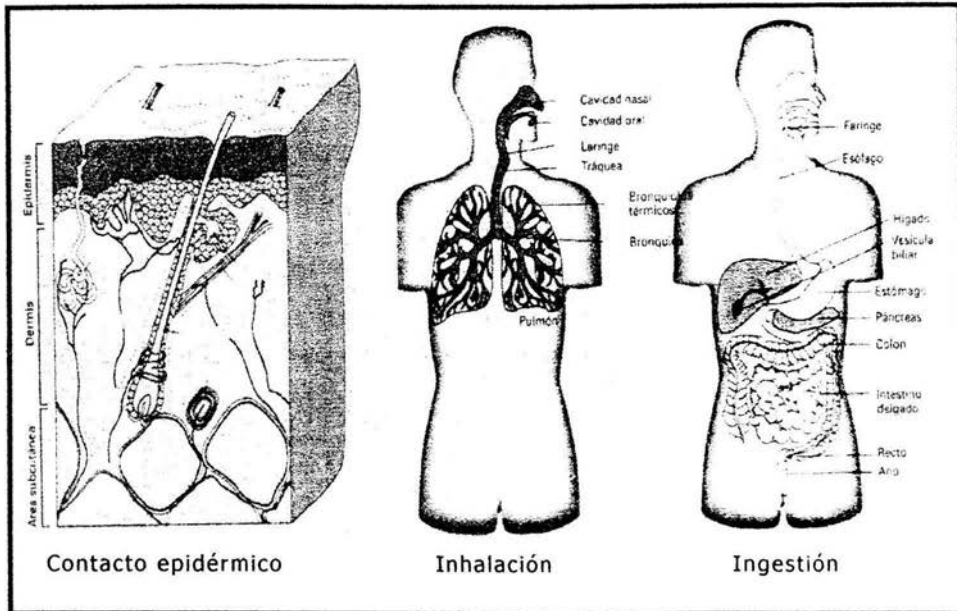


Fig. 3: Vías de exposición a sustancias químicas provenientes de tóxicos (tomado de LaGrega *et al.*, 1996)

Triasulfuron (Amber 75 GS®)

Lo anterior podría ser el caso del Triasulfuron (Amber 75 GS®) que es un herbicida que pertenece a la familia de las sulfonilureas. Éstas se descubrieron en la época de los 70s y para el año de 1989 representaban cerca de un billón de ventas y una gran cantidad en el mercado (Battaglin, 1998; Short y Colborn, 1999). Se ha observado que el Triasulfuron (Amber 75 GS®) puede eliminar malezas en huertos y viñedos. Su mecanismo de

acción está relacionado con la inhibición de la síntesis de aminoácidos (Stidham, 1991; Cobb, 1992).

Los componentes del herbicida Triasulfuron (Amber 75 GS®) son: 75% de ingredientes activos (la sulfonilurea Triasulfuron) y 25% de ingredientes inertes. La dosis que se utiliza es de 10 g/ ha. equivalente a 0.05 mg/ ml, para aplicaciones pre-emergente y post-emergente, selectivas a los cultivos de trigo y cebada, que ejercen control sobre un amplio espectro de especies de maleza de hoja ancha comunes en los cultivos (Novartis Agro, 2000). La fórmula química del Triasulfuron (CAS No. 82097-50-5) es:

2-(2-cloroetoxi)-N-[[[4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)amino]carbonil]bencensulfonamida.

La estructura del Triasulfuron se caracteriza por la presencia de un puente sulfonilurea conectando a dos anillos aromáticos. El anillo que sujeta al átomo sulfuro tiene un sustituto orto, pero por otro lado puede consistir en benceno o anillos no-aromáticos. El otro extremo del puente es un sustituto pirimidina o triacina en posición meta (Figura 4). El Triasulfuron es aplicado por dispersión en la superficie y horizontes altos de la tierra y se vende en gránulos solubles en agua.

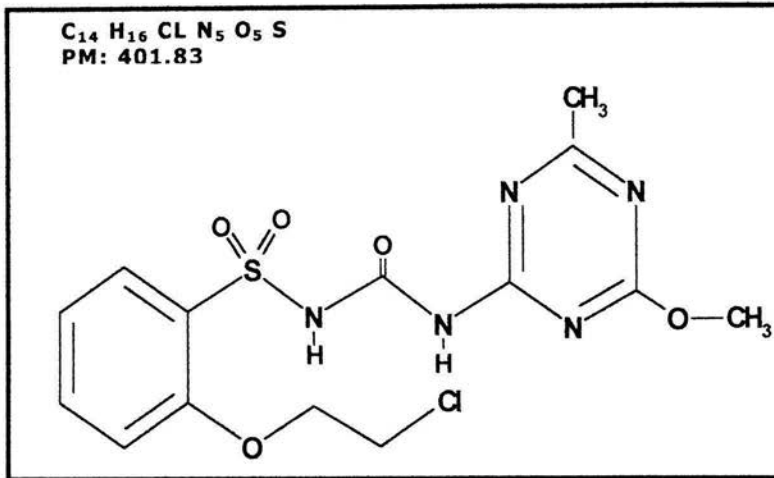


Fig. 4: Estructura química del Triasulfuron
 (tomada de Index Merck, 1996)

El Triasulfuron es uno de los inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS, conocida también como acetohidroxiácido sintasa, AHAS). Esta enzima está localizada en los cloroplastos de las plantas superiores y juegan un papel importante en la ruta biosintética para la ramificación de la cadena de aminoácidos como valina, leucina o isoleucina (Stidham, 1991; Cobb, 1992). El complejo enzima-herbicida que forma, da como resultado la inhibición de la cadena de estos aminoácidos (Stidham, 1991). Con el tiempo, esta asociación se convierte en un vínculo estrechamente complejo, incrementando la afinidad por el herbicida (aproximadamente 10 veces) y por lo tanto aumentando la eficiencia del químico (Percival y Baker, 1991). Así mismo, se ha detectado una relación entre la inhibición del ciclo celular en células de mamífero y la deficiencia de isoleucina que trae como consecuencia una interferencia directa en la síntesis del ADN (Stidham, 1991) por lo que se esperaría un posible efecto negativo para el ser humano que aplica y está expuesto a estos herbicidas.

Las instrucciones de aplicación establecen que todos los cultivos sin excepción pueden ser tratados con el herbicida (De Liñán, 1997; Novartis Agro, 2000). Los residuos pueden permanecer en el suelo de 3 a 24 meses después de su aplicación, dependiendo de las propiedades físicas del suelo. Se encontró que bajos niveles de pH prolongan la duración del Triasulfuron en el suelo como resultado del subsecuente esparcimiento del herbicida (Blacklow y Pheloung, 1995). Su débil naturaleza básica causa que el herbicida acepte un ión de hidrogeno para formar un catión, aumentando la afinidad por moléculas cargadas positivamente dentro del suelo (Werck-Reichhart *et al.*, 2000), como una sustancia orgánica o arcilla.

Esto incrementa la persistencia y efectividad del herbicida, pero afecta el sistema de rotación del cultivo. Las condiciones óptimas de crecimiento de los cultivos son resultado de la muerte de la hierba mala dentro de un periodo de diez días. Sin embargo, toma dos meses cuando la hierba mala crece lentamente, debido a factores ambientales como la alta precipitación pluvial y temperaturas bajas (Ciba-Geigy, 1997). Así mismo se han detectado trazas a niveles fitotóxicos (100 pg/ g) del herbicida en distintos suelos (Ghildyal y Kariofillis, 1995).

Este impacto en el ciclo del cultivo restringe la aplicación de otros herbicidas o retarda el crecimiento de otros cultivos, los posibles efectos negativos se verán reflejados en daños económicos (Beeby, 1993). No así en el número de microartropódos expuestos a éste (Rebecchi *et al.*, 2000).

Concentración Letal Media (CL₅₀) y Dosis Letal Media (DL₅₀)

Para valorar la genotoxicidad de un agente químico es necesario realizar previamente una serie de experimentos con el fin de conocer la concentración que tolera el organismo para asegurar que el número de individuos sobrevivientes sea estadísticamente representativo.

La mayoría de los estudios en insectos están diseñados para determinar la concentración media de la sustancia tóxica CL₅₀ que es la

concentración a la que muere 50 % de la población. Se utiliza la CL_{50} , debido a que los organismos para los que se aplica son muy pequeños y no se tiene un parámetro de la cantidad que ingieren del compuesto a probar, como sucede con la DL_{50} . En mamíferos y otros seres vivos la toxicidad de los agentes químicos está basada en la DL_{50} , que es la dosis a la que muere 50 % de la población. La DL_{50} para ratas con Triasulfuron vía oral, es mayor a 5 g/ kg ubicándose en la categoría de ligeramente tóxico y por vía cutánea es mayor a 2 g/ kg. Para otros organismos la DL_{50} es mayor que 100 mg/ l, pero no es tóxico para las abejas mieleras (Worthing y Raymond, 1991; De Liñán, 1997).

Se debe considerar que una dosis tóxica para un individuo puede ser inofensiva para otro. Un tratamiento es agudo, si una concentración grande es administrada a un tiempo corto, mientras que uno crónico es una concentración pequeña aplicada en un tiempo largo, de acuerdo al ciclo de vida del organismo. Un efecto tóxico agudo regularmente causa una rápida respuesta al compuesto, pero no siempre culmina con la muerte del individuo. Los efectos tóxicos crónicos son los que aparecen después de un tiempo largo de exposición y eventualmente terminan en muerte. Pero también este efecto puede no acarrear la muerte del individuo sino que puede traer problemas tales como, cambios fisiológicos y morfológicos, reducción en las tasas de reproducción de una especie y diferencias en el comportamiento (Beeby, 1993).

Tanto el hecho de que se produzca una respuesta tóxica como su severidad dependen no solamente de la dosis, sino también de la susceptibilidad del individuo expuesto. Dicha susceptibilidad está primordialmente en función de la edad, el sexo, el estado de salud, la genética y las exposiciones previas, a esa o a otras sustancias, por parte del individuo. Incluso el reducir estas variables clave, como en el caso de los animales de laboratorio, producirá otras diferencias en cada respuesta individual (LaGrega *et al.*, 1996).

Cuando se analizan los efectos sobre una sustancia tóxica concreta entre los individuos de una población (por ejemplo la proporción de animales con tumores o fallecidos) en función de la dosis, esta correlación se denomina relación entre dosis y respuesta. Un ejemplo clásico de esta relación se produce al aumentar el grado de exposición de una población de organismos vivientes a un determinado compuesto tóxico. La población expuesta no sufrirá por lo general muertes debido a la acción de pequeñas dosis, pero sí se producirán a medida que aumenta la dosis, hasta la desaparición de la población total (LaGrega *et al.*, 1996).

Un agente químico tóxico puede causar efectos negativos en la salud en dosis muy por debajo del nivel letal. En oposición a la incidencia de los efectos tóxicos sobre una población de individuos se encuentra la intensidad (o nivel) del efecto tóxico sobre cada individuo aislado en función de la dosis, denominada habitualmente relación entre dosis efecto (LaGrega *et al.*, 1996).

Detección de Agentes Genotóxicos

El conocimiento de los factores ambientales que pueden afectar a la salud, han tenido un fuerte impulso, sobre todo con respecto a los contaminantes del ambiente laboral y los medicamentos de uso prolongado. El riesgo de contraer cáncer por factores ambientales es más grande cuando se incrementa la exposición al agente químico o físico, ya sea en una dosis muy alta o en pequeñas dosis por largos periodos de tiempo. Para identificar y analizar la acción directa o indirecta de agentes que pudieran modificar los componentes hereditarios de los sistemas vivos y detectar las propiedades de un grupo de agentes que pudieran inducir cambios a los ácidos nucleicos y/o producir efectos deletéreos en las dos estirpes celulares (somáticas y germinales) es necesario recurrir a la utilización de algunas pruebas, no siendo posible o ético exponer a las personas a los posibles agentes cancerígenos ambientales. Los agentes genotóxicos, se pueden dividir en: indirectos o promutágenos, los cuales requieren ser

activados metabólicamente por medio de diferentes complejos enzimáticos, transformándose en genotoxinas, y en directos, porque no requieren activación metabólica para manifestar su acción. La información acerca de sus efectos se puede obtener de distintas maneras, tales como:

1. **Estudios epidemiológicos:** La incidencia de cierto tipo de cáncer se mide al comparar subgrupos, con diferentes niveles de exposición al cancerígeno, en una gran población. Por ejemplo, en cualquier población al comparar al grupo de fumadores con el grupo de no fumadores, los primeros tienen mayor probabilidad de contraer cáncer de pulmón. Los estudios epidemiológicos son la fuente más efectiva para establecer el riesgo de padecer algún tipo de cáncer en poblaciones expuestas a contaminantes ambientales, sin embargo, tienen limitaciones para descubrir nuevos cancerígenos entre los muchos agentes a los cuales estamos expuestos (Vogel y Zijlstra, 1987) y estos son:

- a) Tiempo prolongado de latencia entre exposición y manifestación clínica.
- b) Participación de muchos factores en el desarrollo de la enfermedad.
- c) No poder determinar la magnitud de una exposición de tiempo atrás.

2. **Experimentos naturales:** Si una población natural o grupo de individuos es accidentalmente expuesta a altos niveles de un potente cancerígeno ambiental es posible estudiarla más tarde y compararla con la población en general, para determinar si la exposición a este agente causó un incremento en el riesgo de contraer cierto tipo de cáncer. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que los niños que vivían cerca de Chernobyl, después del accidente nuclear han incrementado el riesgo de contraer cáncer de tiroides, debido a la exposición al yodo radioactivo.

3. **Estudio con animales o bioensayos a largo plazo:** Se realizan al exponer a mamíferos (generalmente ratas o ratones) a bajas dosis de un compuesto supuestamente cancerígeno durante un período de tiempo prolongado y medir los efectos. De esta forma los investigadores pueden asumir lo que podría ocurrir en humanos. Estas extrapolaciones, que podrían ser discutibles, pueden ser muy útiles cuando no hay otra forma de medir el efecto de cierto agente.

4. **Pruebas de laboratorio o bioensayos a corto plazo:** Existen un gran número de ensayos que involucran fagos, bacterias, insectos, vegetales o cultivo de células, que se exponen de forma controlada, a las sustancias sospechosas y son usados cuando se piensa que un compuesto puede alterar al ADN. Estos bioensayos son usados para tamizar los posibles cancerígenos.

En dichas pruebas se expone (*in vivo* o *in vitro*) al organismo, cultivo de células o bacteriófagos, en forma controlada, al agente con un supuesto efecto genotóxico. Para obtener el mayor beneficio de estas pruebas se requiere interpretar de manera cuidadosa los resultados, tomando en cuenta las diferencias de susceptibilidad entre las especies y las concentraciones aplicadas (Vogel, 1991).

Las pruebas a corto plazo deben cubrir los siguientes registros:

- a) La presencia de un sistema de activación (*in vivo* o *in vitro*) para la detección de promutágenos.
- b) El uso de un sistema indicador sensible con el cual se pueda medir el daño genético inducido por el agente genotóxico.
- c) Un efecto genético bien definido que indique daños primarios o secundarios al ADN.

Drosophila melanogaster

La mosca del vinagre *D. melanogaster* es un organismo eucarioto, pluricelular, con genes implicados en el metabolismo de xenobióticos y en la reparación de daños al ADN, homólogos a los de los humanos (Russell, 1998), del que se conoce todo su genoma (Adams *et al.*, 2000). Es ampliamente utilizada en pruebas de mutagénesis ya que reúne características favorables para detectar el impacto de agentes químicos y físicos en el ADN (Vogel, *et al.*, 1999): presenta un ciclo de vida muy corto, se distinguen claramente cada una de las fases del ciclo vital y produce mucha descendencia por generación (Figura 5).

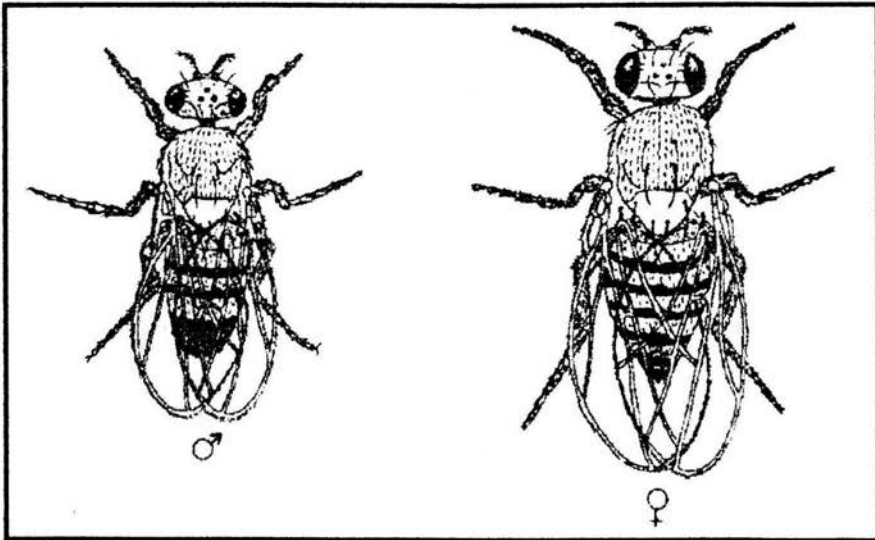


Fig. 5: Macho y hembra de *D. melanogaster*

En este díptero, los discos imagales constituyen un excelente material de estudio. Cada uno de ellos, es un saco epitelial que contiene de 20 a 50 células. Desde el primer estadio larvario, el número de células por cada disco se incrementa por mitosis hasta el final de la fase larvaria, en la que llegan a contener miles de células por disco (Figura 6). De tal manera que, si ocurriera daño genético en un célula de los discos imagales, éste se

expresará en el adulto, como un clon de células mutantes en el tejido correspondiente al disco (Mitchell y Combes, 1984).

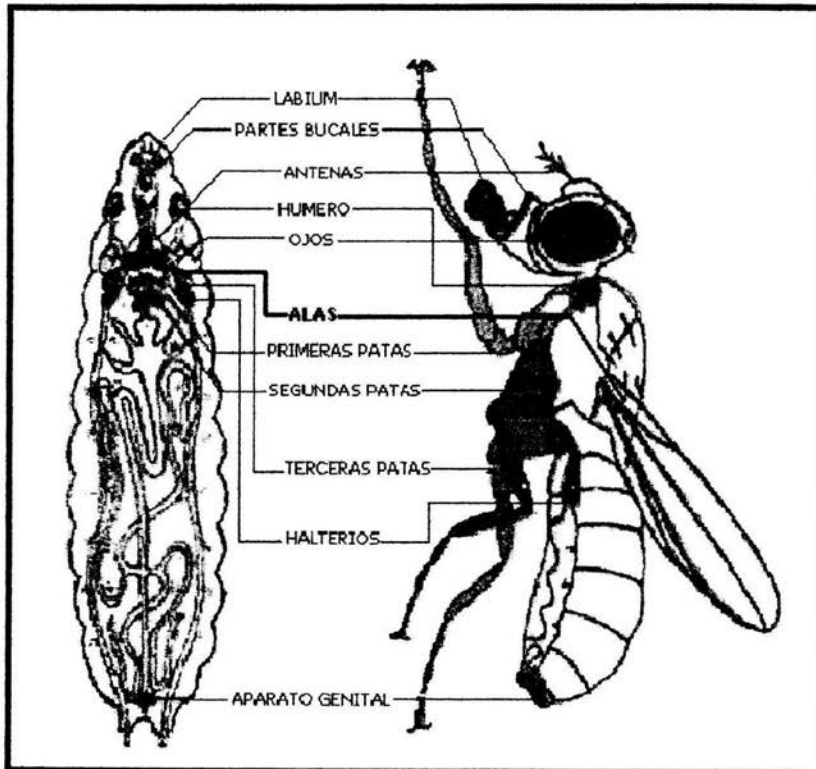


Fig. 6: Discos imagales de la larva que en la metamorfosis se estimulan y diferencian para formar las estructuras del cuerpo del adulto: antenas, ojos, patas, genitales externos, alas, etc. (Lawrence, 1992)

Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* incluye cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. La duración del ciclo varía con la temperatura de cultivo. A altas temperaturas las moscas pueden quedar estériles o morir y a bajas temperaturas reducen su viabilidad. Es así que la temperatura óptima de cultivo es de 25° C.

HUEVO (0.5 mm): El desarrollo embrionario del huevo tarda aproximadamente 1 día a 25° C.

LARVA (4 - 5 mm): La fase larvaria dura alrededor de 4 días a 25° C. Durante la fase larvaria la ingestión de alimento es continua, llegando a consumir de tres a cinco veces su peso, incrementándolo de 0.05 a 2.0 mg (Mitchell y Combes, 1984).

PUPA (3 mm): La fase de pupa es considerada la fase reorganizativa del ciclo de vida de *D. melanogaster*; las estructuras adultas se desarrollan a partir de los tejidos embrionarios llamados discos imagales. La fase de pupa tarda alrededor de 5 días a 25° C; el imago emerge del pupario.

ADULTO (2 mm): El adulto es considerado la fase reproductiva del ciclo. Los imagos de *D. melanogaster* pueden aparearse 6 horas después de haber emergido del pupario. La hembra empieza a ovopositar aproximadamente a los 2 días de haber emergido de 50 a 75 huevos, después la producción de huevos disminuye. El promedio de vida de las moscas adultas es de 37 días a 25° C (Figura 7).

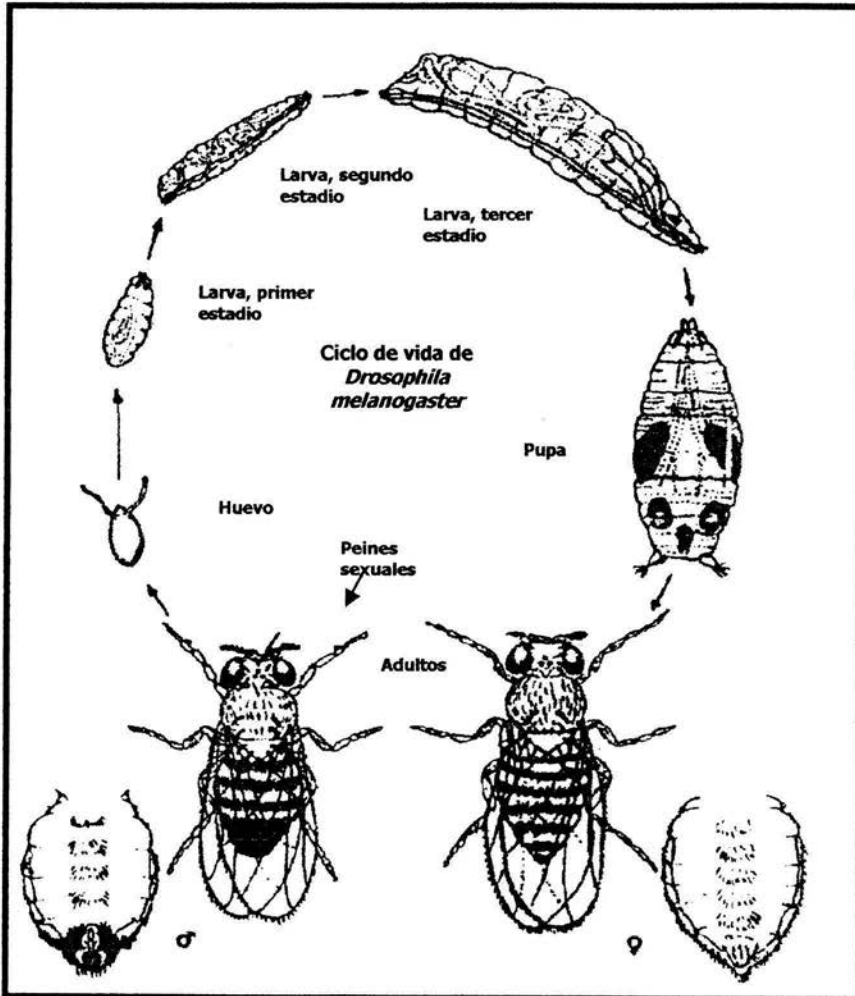


Fig. 7: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*
(Ramos, 1993)

Ensayo SMART en Ala

El ensayo SMART (por sus siglas en inglés: Somatic Mutation And Recombination Test) detecta mutación y recombinación somáticas originadas por la exposición a algún agente químico o físico, utilizando como modelo experimental a *D. melanogaster*. En este ensayo de genotoxicidad se utilizan marcadores recesivos para los tricomas de las alas.

El fundamento de este bioensayo es la pérdida de heterocigosis (Figura 8 a y b) de genes marcadores recesivos, que en el organismo adulto se expresarán en las alas.

Los organismos son expuestos durante la fase larvaria, preferentemente a las $72 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ de edad, al genotóxico de interés. Si durante el desarrollo ocurren eventos como mutación, recombinación, deleción o no-disyunción en las células somáticas de los discos imagales de las alas, pueden originarse clones mutantes que en el adulto se expresarán como manchas en un contexto silvestre. En ausencia de retraso o muerte celular, el tamaño de la mancha es indicativo del número de divisiones que transcurren a partir de la alteración original, y el tipo de mancha es indicativo de los eventos genéticos que le dieron origen (Graf *et al.*, 1984).

Se analizan las proporciones de los genes marcadores (*flr³* y *mwh*) y el tamaño del clon, obtenidos en los organismos testigo, contrastando con lo obtenido en los organismos tratados.

EVENTOS GENÉTICOS QUE LLEVAN A LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIS

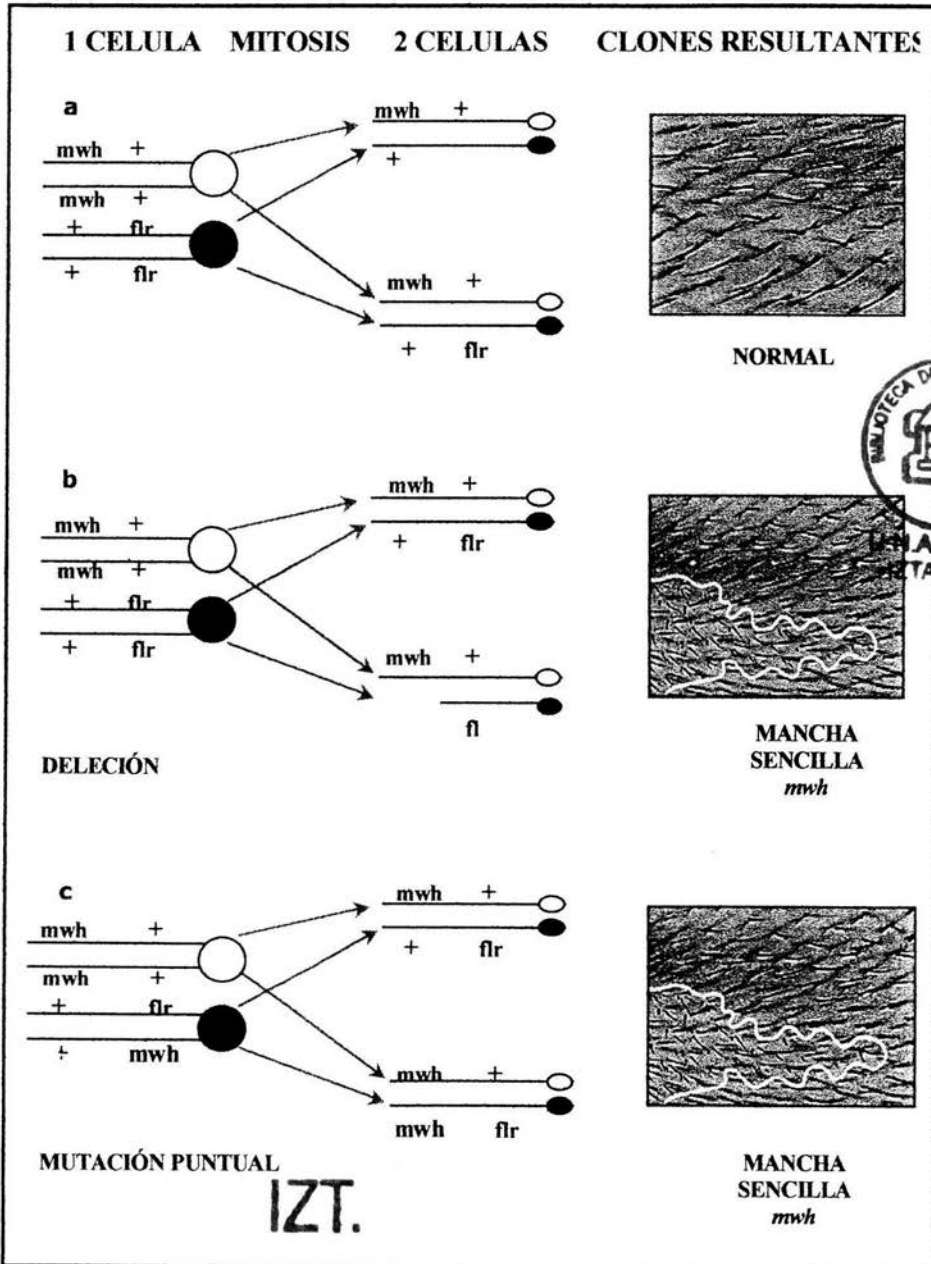


Fig. 8 a: Eventos genéticos que llevan a la pérdida de heterocigosis y la formación de manchas
(tomado de Guzmán-Rincón y Ramírez-Victoria, 2001. Modificado de Graf *et al.*, 1984)

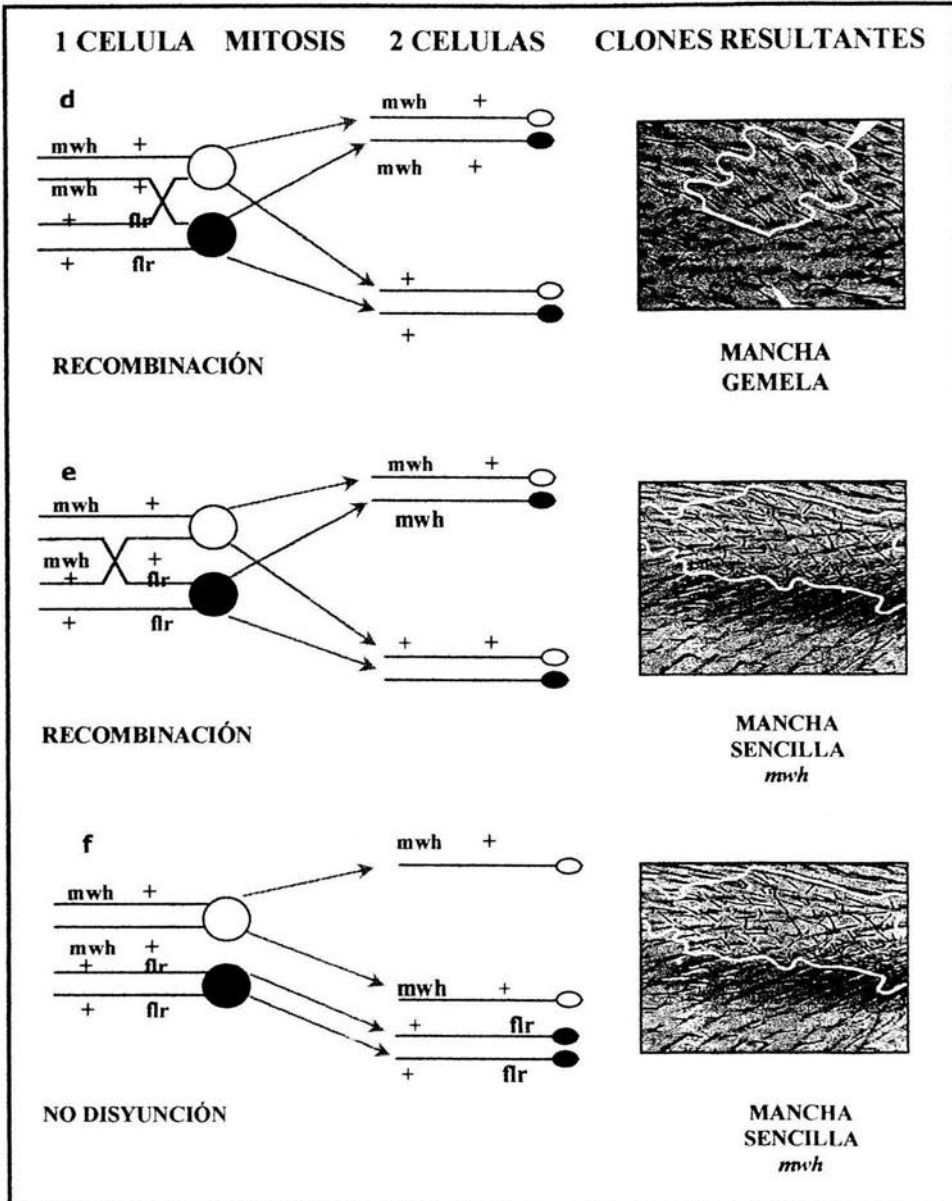


Fig. 8 b: Eventos genéticos que llevan a la pérdida de heterocigosis y la formación de manchas

(tomado de Guzmán-Rincón y Ramírez-Victoria, 2001. Modificado de Graf *et al.*, 1984)

Al utilizar el ensayo SMART, se tiene la posibilidad de exponer a tratamiento un gran número de células de los discos imagales de las larvas, las cuales, posteriormente darán origen a un número mayor de células en el estado adulto, por ala aproximadamente 25,000 células. Las alas de los adultos están formadas por dos capas celulares, una ventral y otra dorsal de manera que los eventos registrados en una capa son independientes de la otra. Al diferenciarse cada célula da origen a un tricoma (Figura 9), que se forma por la acumulación de fibras de actina en la célula. El tricoma crece durante la metamorfosis y posteriormente, la célula que le dio origen muere quedando éste en la superficie del ala. De esta manera puede establecerse el sitio de un clon en los distintos sectores del ala y el número de células que la forman (Figuras 10 a y b). Todo lo anterior permite obtener resultados en una generación (Graf *et al.*, 1984).

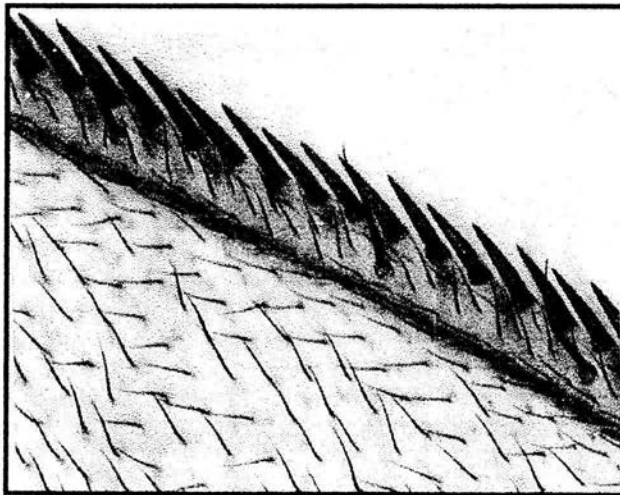


Fig. 9: Tricomas silvestres.

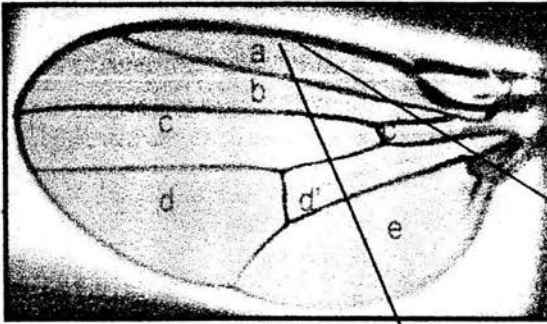


Fig. 10: (a), secciones del ala con fenotipo silvestre

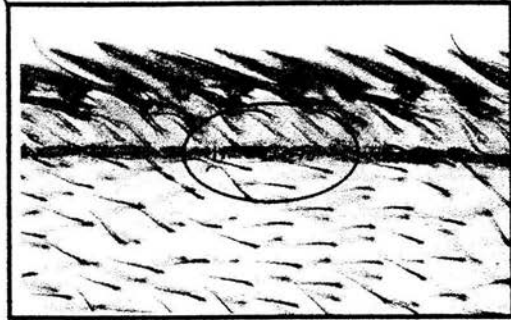
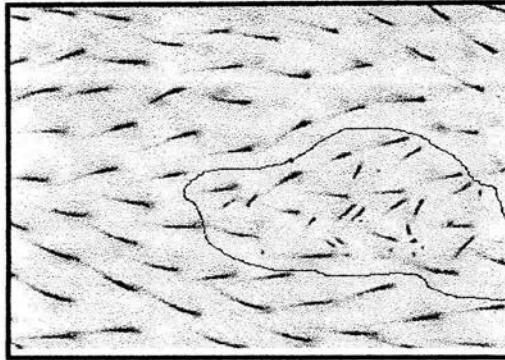


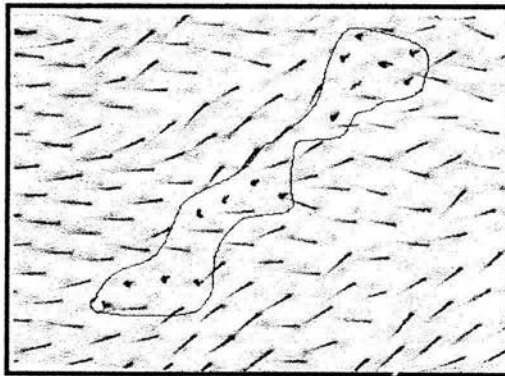
Fig. 10: (b), mancha *mwh* de 2 células en la sección A

La craza estándar (E), que tiene niveles regulados de los citocromos P450, se hace con dos líneas, hembras *flare* ($flr^3/TM3, Bd^e$) y machos *multiple wing hair* (*mwh/mwh*) que tienen los siguientes marcadores:

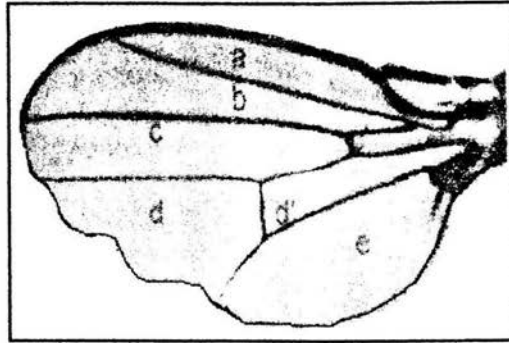
***mwh* (multiple wing hair):** Mutación recesiva localizada en el cromosoma 3 (3-0.3). Su expresión fenotípica se observa como un cambio en el número de tricomas por célula (2-5), mientras que en el fenotipo silvestre a cada célula le corresponde un solo tricoma (Figura 11).

Fig. 11: Clon (*mwh/mwh*)

flr³ (flare): Es una mutación recesiva que se expresa como tricomas mal formados y cortos, en forma de flama o roseta de maíz. Está localizada en el cromosoma 3 pero en una posición más proximal al centrómero (3-38.8). Esta mutación en homocigosis es letal, sin embargo, las células individuales homocigóticas en los discos imagales de las alas son viables y pueden producir clones mutantes en las células del ala del adulto (Graf *et al.*, 1996) (Figura 12).

Fig. 12: Clon (*flr³/flr³*)

Beaded Serratia (Bd^r): Para reconocer fenotípicamente a la línea *flare*, se utiliza este marcador dominante, que se manifiesta como muescas en los bordes de las alas. Este marcador en condiciones de homocigosis también es letal. Se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5) (Ramos, 1993) (Figura 13).

Fig. 13: Ala con borde *Beaded Serratia* ($Bd^f/+$)

Inversión *TM3*: Como los marcadores flr^3 y Bd^f son letales en homocigosis, la línea *flare* presenta un cromosoma balanceador con inversiones múltiples (*TM3*; por sus siglas en inglés, *Third Multiple 3*), que evita la recombinación en meiosis y permite mantener la línea (Figura 14). De esta forma se mantienen los marcadores letales en heterocigosis (Graf *et al.*, 1996).

Gametos Parentales: ♀ $flr^3 + , + TM3, Bd^f$ X ♂ $flr^3 + , + TM3, Bd^f$

F1

♀/♂	$flr^3 +$	$+ TM3, Bd^f$
$flr^3 +$	$flr^3 + flr^3 + \emptyset$	$flr^3 + + TM3, Bd^f \times$
$+ TM3, Bd^f$	$flr^3 + + TM3, Bd^f \times$	$+ TM3, Bd^f + TM3, Bd^f \emptyset$

Donde:

× Marcadores en heterocigosis Tricomas Alas
(se mantiene la línea) $flr^3 = flare$ $Bd^f = Beaded Serratia$

∅ Marcadores en homocigosis +=silvestre +=silvestre
(muerte de organismos)

Fig. 14: Cuadro de Punnet: se observan los marcadores utilizados para mantener la línea *flare* en heterocigosis

Al utilizar marcadores localizados en cromosomas homólogos, se permite discernir fenómenos de recombinación somática en la región delimitada por el marcador *flr³* y el centrómero o en la región entre los dos marcadores (Figura 8 a y b). Como resultado de eventos de recombinación somática pueden recobrase manchas sencillas y gemelas, este último evento es resultado de recombinación en el intervalo próximo al centrómero que es acotado por el marcador *flr³* (Figura 8 d), mientras que las manchas sencillas *flr³* o *mwh* pueden ser resultado de recombinación entre *flr³* y *mwh* en el intervalo distal pero por lo que en este caso no es distinguible su origen de otros (Fig 8 e). Esto es por que pueden obtenerse manchas sencillas *flr³* o *mwh* por eventos como mutación puntual, pérdida parcial o total del cromosoma 3 o por una no disyunción (Figura 8 c, b y f) (Graf *et al.*, 1984).

Se asume que en caso de la no disyunción la falta de un cromosoma homólogo provocaría que se detuviera el ciclo celular y sólo se encontrarían manchas pequeñas como resultado de ese evento.

Para esta prueba no se emplea la cruce recíproca ($\text{♂ } flr^3/TM3, Bd^{\delta} \times \text{♀ } mwh/mwh$) porque presenta desventajas como: un patrón irregular de manchas en la alas que dificulta la clasificación, resultados inconsistentes y se obtiene menor número de individuos por generación (Graf y Van Schaik, 1992).

Las larvas producto de esta cruce son transheterocigotas con un genotipo *mwh flr³+ / mwh+ flr³* o heterocigotas *mwh flr³+ / TM3, Bd^δ*, teóricamente en proporción 1:1. Ambas larvas son indistinguibles pero al recuperar los imagos, el primer genotipo genera moscas con alas de fenotipo silvestre y el segundo alas tipo *Beaded Serratia* (Figura 15). Los genotipos obtenidos proporcionan diferente información: el que presenta alas con fenotipo silvestre, permite observar manchas sencillas *mwh* (Figura 16 a), sencillas *flare* (Figura 16 b) y gemelas (Figura 16 c). Sin embargo, en los organismos que presentan el fenotipo *Beaded Serratia*, sólo se podrán observar manchas sencillas tipo *mwh* originadas por mutación, ya

que la presencia del balanceador *TM3* no permite la recombinación (Graf y Van Schaik, 1992; Delgado-Rodríguez *et al.*, 1994; Graf y Würigler, 1996).

Gametos Parentales: ♀ $\frac{flr^3 \ mwh^+ \ Bd^{\delta+}}{flr^{3+} \ mwh^+ \ TM3, \ Bd^{\delta}}$ X ♂ $\frac{flr^{3+} \ mwh \ Bd^{\delta+}}{flr^{3+} \ mwh \ Bd^{\delta+}}$

F1

♂ / ♀	$flr^3 \ mwh^+ \ Bd^{\delta+}$	$flr^{3+} \ mwh^+ \ TM3, \ Bd^{\delta}$
$flr^{3+} \ mwh \ Bd^{\delta+}$	$\frac{flr^3 \ mwh^+ \ Bd^{\delta+}}{flr^{3+} \ mwh \ Bd^{\delta+}}$ §	$\frac{flr^{3+} \ mwh^+ \ TM3, \ Bd^{\delta}}{flr^{3+} \ mwh \ Bd^{\delta+}}$ ¥

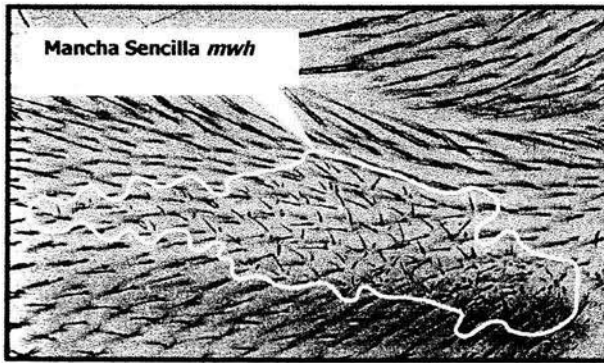
§ 50 % de individuos transheterocigotos (alas silvestres), para los marcadores *mwh* y *flr³*.

¥ 50 % de individuos heterocigotos (alas con borde *Beaded Serratia*), para el marcador *mwh*.

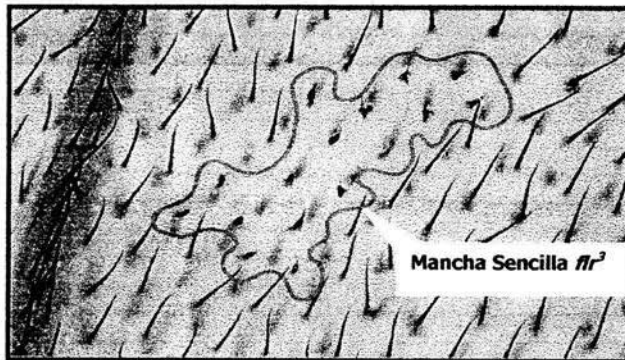
Donde:

Tricomas	Alas
$flr^3 = flare$	$Bd^{\delta} = Beaded Serratia$
$flr^{3+} = silvestre$	$Bd^{\delta+} = silvestre$
$mwh = mwh$	
$mwh^+ = silvestre$	

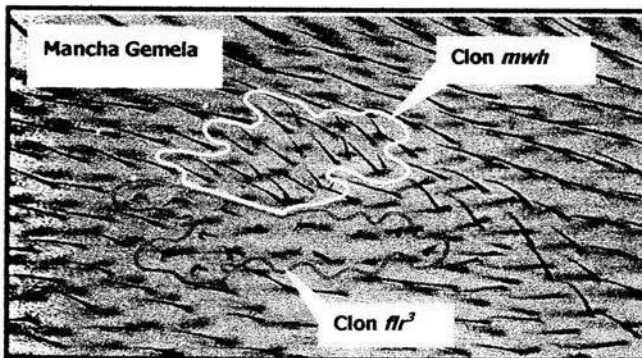
Fig. 15: Cuadro de Punnet: se muestran los marcadores de los individuos transheterocigotos y heterocigotos



(a)



(b)



(c)

Fig. 16: Diferentes tipos de manchas: a) mancha sencilla *mwh* b) mancha sencilla *flr*² y c) mancha gemela

Se contabilizan las manchas por tipo y tamaño en las dos alas de cada individuo, y se analizan por medio del programa estadístico (SMART), el cual está basado en la prueba χ^2 para proporciones. Esta prueba permite contrastar las proporciones de manchas por individuo entre dos tratamientos. El efecto genotóxico se denomina en esta prueba como: positivo (+), negativo (-), débil positivo (w) o indecisos (i) (Frei y Würigler, 1988). El análisis se realiza por individuo ya que es posible encontrar algunos organismos especialmente sensibles en los cuales el efecto se expresa de forma marcada, mientras que otros no muestran daño alguno, debido a la variabilidad individual (Frei y Würigler, 1995).

Ventajas

El ensayo SMART ha mostrado grandes ventajas, como son, su alta sensibilidad, ya que es uno de los pocos ensayos que detecta tanto mutación como actividad recombinogénica (Graf *et al.*, 1984), el modelo tan accesible que utiliza y el bajo costo de inversión que representa. Ha sido validada en más de 400 compuestos, incluyendo tanto mezclas como sustancias puras, es de gran utilidad por la enorme demanda de este tipo de estudios a diversos compuestos químicos que se introducen periódicamente a la vida cotidiana (Vogel *et al.*, 1999). Además se a validado en un estudio epidemiológico con antidepresivos (Sharpe, *et al.*, 2002).

Citocromos P450

El sistema de citocromos P450 se encarga de eliminar del organismo la máxima cantidad de moléculas extrañas, convirtiendo las moléculas no polares en polares. Los citocromos P450 son casi universales y conservados evolutivamente (González *et al.*, 1991). Fueron descubiertos en los años 60. Presentan un espectro de absorción de 450 nanómetros en el complejo que se genera con monóxido de carbono (Omura y Sato, 1964) (Figura 17).

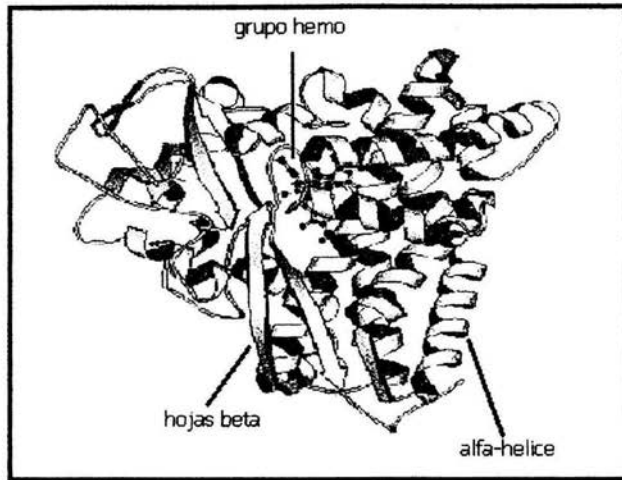


Fig. 17: Citocromo P450 (tomada de Guengerich, 1993)

Los citocromos P450 metabolizan compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos, aminas biogénicas, prostaglandinas y vitaminas, así como xenobióticos: metabolitos de la dieta, drogas, pesticidas o contaminantes ambientales (Nebert, 1994, González *et al.*, 1991), metabolitos de plantas y cancerígenos (Gandhi *et al.*, 1992), además de conferir resistencia a insecticidas en insectos, pero algunas veces activan a los metabolitos (Gunderson *et al.*, 1986; Neal y Wu, 1994; Scott *et al.*, 1998).

Los citocromos P450 están representados por 90 secuencias en el genoma de *Drosophila melanogaster*; 83 codifican para genes funcionales mientras que 7 son pseudogenes. La familia CYP6 es específica de insectos mientras que la familia CYP4 incluye secuencias de vertebrados (Adams *et al.*, 2000; Tijet *et al.*, 2001).

En insectos los citocromos P450s son conocidos por intervenir en la biosíntesis de ecdiesteroides y hormonas juveniles, las cuales están principalmente involucradas en el crecimiento, desarrollo y reproducción de los individuos (Amichot *et al.*, 1998; Tijet *et al.*, 2001).

Los citocromos P450 de insectos son en muchos aspectos similares a los de los vertebrados (Andersen *et al.*, 1993). En los organismos animales la mayoría de los tetrapirroles importantes están basados en un subgrupo de porfirinas (metaloporfirinas), los grupos hemo, en los que un átomo de hierro está simétricamente ligado por los átomos N de los cuatro pirroles de la protoporfirina IX, la principal porfirina biológica. En insectos, el grupo prostético de los citocromos a, b, c y P-450 y la hemoglobina, cuando ésta existe, es el protohemo IX (Rockstein, 1978) (Figura 18).

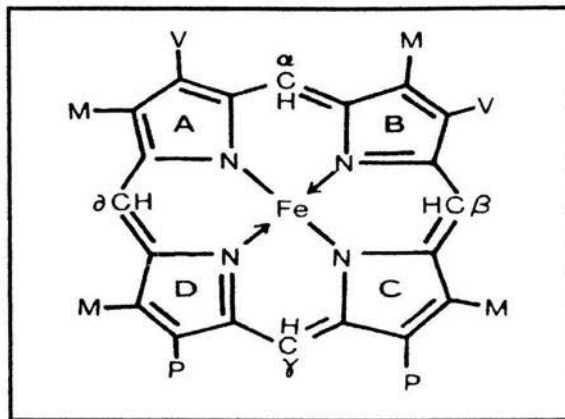


Fig. 18: Molécula de protohemo IX
(tomado de Rockstein, 1978)

En plantas los citocromos P450 están involucrados en la desintoxicación de xenobióticos químicos como los herbicidas (Werck-Reichhart *et al.*, 2000).

El fenómeno de inducción de los citocromos P450 por químicos (xenobióticos, químicos de plantas, metabolitos y hormonas) está documentado pero aún no es entendido. Una observación general es que los insectos herbívoros de diferentes plantas hospederas muestran una marcada diferencia en niveles de P450 (Yu, 1986), esto ha sugerido que la mezcla de químicos en la comida es también una mezcla de inductores (Feyereisen, 1999).

Se ha establecido que en muchos casos la resistencia metabólica a insecticidas, herbicidas, etc., son el resultado de elevados niveles de citocromos P450 (Hodgson, 1985; Taylor y Feyereisen, 1996). El metabolismo de herbicidas por biotransformación en las plantas, puede hacerlas resistentes a los mismos y reducir los residuos de estos.

Una vez que la participación de los citocromos P450 en el metabolismo de los herbicidas ha sido demostrada, el aislamiento de sus genes ha llegado a ser un objetivo comercial indispensable para el control de cultivos y malas hierbas ayudando a la optimización de nuevos compuestos activos (Werck-Reichhart *et al.*, 2000).

La activación o inactivación del potencial citotóxico o genotóxico de los herbicidas puede ser considerada como investigación biomédica y el uso de *Drosophila melanogaster* para estudios de genotoxicidad pueden ser un gran avance (Graf *et al.*, 1984).

ANTECEDENTES

	Autores	Resultados
Aislamiento y caracterización de mutantes con delección en <i>Streptomyces griseolus</i> , afectados en el metabolismo de sulfonilureas mediado por el citocromo P450	Harder <i>et al.</i> , 1991 Braatz <i>et al.</i> , 1994 Werck-Rechhart <i>et al.</i> , 2000	Identificación de citocromos P450 (P450su1 y P450 su2) inducidos por los herbicidas sulfonilureas.
Cultivos tolerantes a los herbicidas sulfonilurea y desintoxicación por medio de los citocromos P450.	Giardini y Carosi, 1990	Desintoxicación 4000 veces más rápida.
	Frear <i>et al.</i> , 1995	Dependencia a la enzima triasulfuron hidroxilasa para desintoxicar al triasulfuron.
	Werck-Rechhart <i>et al.</i> , 2000	Biotransformación del compuesto para su desintoxicación.
Purificación, caracterización y reconstrucción de un citocromo P450 inducible responsable de la hidroxilación del Triasulfuron en trigo.	Thalacker <i>et al.</i> , 2002	Un citocromo P450 monooxigenasa responsable de la hidroxilación del Triasulfuron.
Inhibición del ciclo celular por sulfonilureas (Clorsulfuron).	Rost, 1984	Afecta síntesis de ARN en raíces de cultivo de chícharo.
	Giardini y Carosi, 1990	Reducción de espermidina en raíces de <i>Zea mays</i> .
	Stidham, 1991	Relación de la falta de isoleucina con inhibición del ciclo celular de células de mamífero.
Pruebas para detectar la capacidad de inducción de retraso en la síntesis del ADN en hepatocitos de rata y fibroblastos de humanos.	EPA, 1998	No hay retraso en síntesis del ADN.
Estudio para detectar genotoxicidad del herbicida Triasulfuron (Amber 75 GS®), con pruebas en <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y células de linfoma de ratón.	EPA, 1998	No mutagénico y no clastogénico.
Ensayo de micronúcleos probando herbicidas y adyuvantes.	Burroughs <i>et al.</i> , 1999	Genotóxicos
	EPA, 1998	No genotóxicos
Estudio con herbicidas que inducen intercambio de cromátides hermanas utilizando el metabolismo de <i>Vicia faba</i> .	Calderón-Segura <i>et al.</i> , 1999	Daño al ADN en cultivos de linfocitos humanos.
Ensayo de citometría de flujo y proliferación celular, determinando la toxicidad de adyuvantes, herbicidas y funguicidas.	Lin y Garry, 2000	Proliferación celular, apoptosis y aneuploidía.
Ensayo Cometa. Evaluación del daño genético en trabajadores empleados en la producción de pesticidas.	Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 1999 Zeljezic y Garaj-Vrhovac, 2001 Grover <i>et al.</i> , 2003	Daño en ADN por presencia de aberraciones cromosómicas.
Pruebas previas realizadas con el Triasulfuron (Amber 75 GS®) a concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.3 mg/ml con el ensayo SMART en ala de <i>D. melanogaster</i> en la cruzas estándar (E) y bioactivación elevada (BE).	Jack, no publicado *	Genotóxico.

*Pruebas realizadas por Emma Jack (estudiante de intercambio de Inglaterra) en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES Iztacala, UNAM

JUSTIFICACIÓN

Los herbicidas químicos han sido utilizados extensivamente para propósitos agrícolas desde 1945 (Worthing y Raymond, 1991). El crecimiento exponencial en su uso ha mejorado en gran medida la eficiencia en la producción del cultivo y por lo tanto aumenta el valor financiero de la tierra marginal. Sin embargo, también han surgido algunos problemas en lo concerniente a la exposición de estos químicos y sus respectivas consecuencias ambientales dentro de un ecosistema cultivable. Debido a que la exposición humana a los químicos agrícolas ha llegado a ser una posible causa del incremento en la incidencia de cáncer, es necesaria la investigación de los químicos y sus metabolitos por medio de diferentes pruebas genotóxicas (Saftlas *et al.*, 1987, Brown *et al.*, 1990).

El Triasulfuron (Amber 75 GS®) es un herbicida utilizado actualmente en Guanajuato (Irapuato) y en el Estado de México (Texcoco), por tal motivo puede ser un problema importante a niveles de salud pública para las personas que lo utilizan y/o están expuestas a él. Por lo tanto, es necesario estudiar su acción sobre seres vivos, con el fin de contribuir a la detección oportuna y precisa de algunos efectos genotóxicos que pudiera causar este compuesto.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la genotoxicidad del Triasulfuron (Amber 75 GS®) en el ensayo a corto plazo SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos Particulares

- Determinar la CL₅₀ del Triasulfuron (Amber 75 GS®) en la cruz Estándar (E) de *Drosophila melanogaster*.

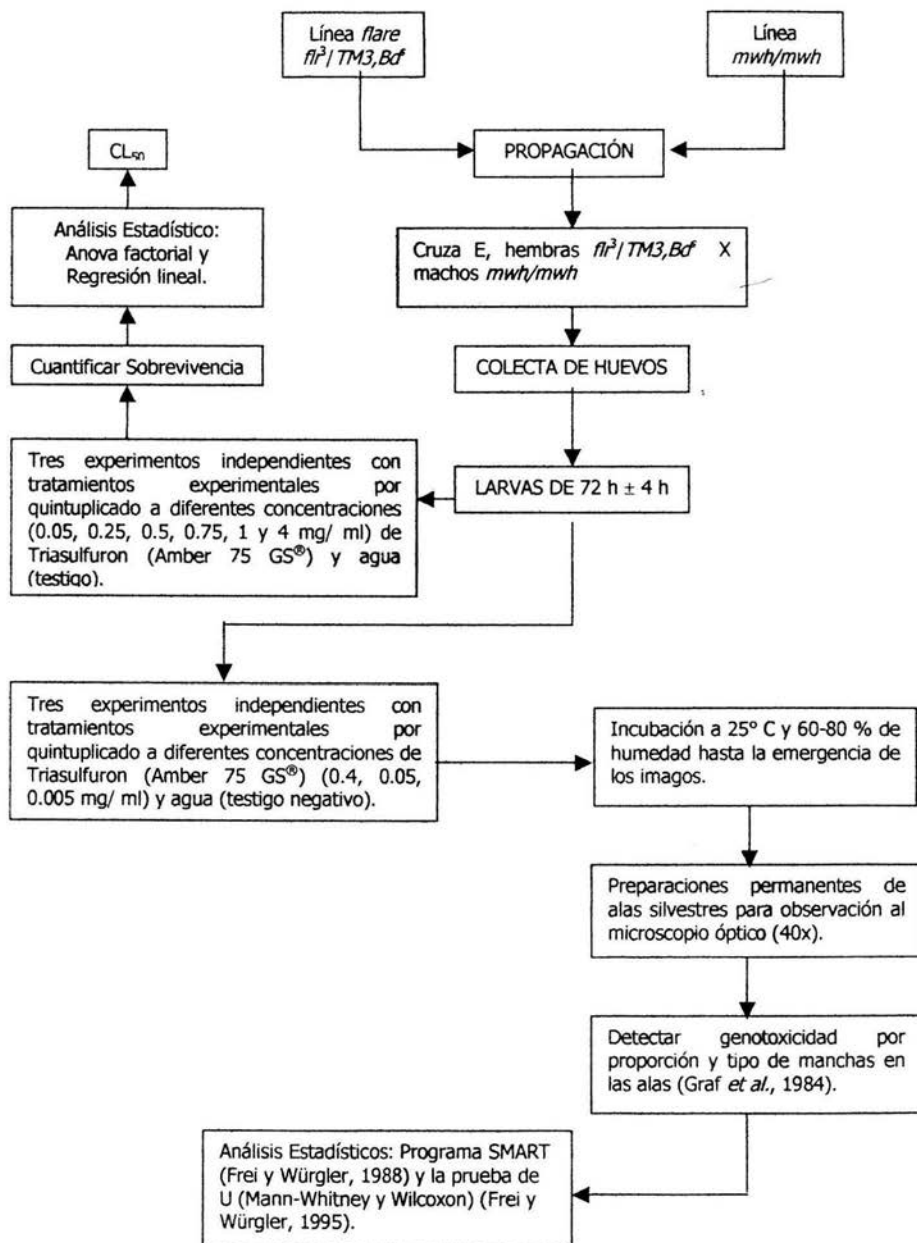
- Evaluar el efecto genotóxico del Triasulfuron (Amber 75 GS®) con SMART en ala de *Drosophila melanogaster* (Cruza Estándar).

HIPÓTESIS

Ho: No existe diferencia estadísticamente significativa entre el testigo negativo y las diferentes concentraciones (0.05, 0.5 y 4 mg/ ml) de Triasulfuron (Amber 75 GS®).

Ha: Existe diferencia estadísticamente significativa entre el testigo negativo y al menos una de las concentraciones (0.05, 0.5 y 4 mg/ ml) de Triasulfuron (Amber 75 GS®).

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES

Químicos

- Triasulfuron (Amber 75 GS®) CAS No. 82097-50-5 (Novartis Agro, Swiss).
- Medio Instantáneo Carolina (Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC, USA).
- Solución de Faure (30 g de goma arábiga, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 ml de agua de la llave).
- Solución A (5 ml de tegosept al 12 % (OH), 5 ml de ácido propiónico: ácido ortofósforico (1:10) y 1 l de agua) (Dueñas *et al.*, 2001).

Material Biológico

Línea *flare*: *flr³/TM3, Bd^f*

Línea *mwh*: *mwh/mwh*

Líneas donadas por el Dr. Ulrich Graf del Instituto de Toxicología (*Swiss Federal Institute of Technology*) y Universidad de Zurich, Schwerzenbach, Suiza y propagadas en el Laboratorio de Genética Toxicológica en la FES Iztacala, UNAM.

MÉTODOS

Propagación de las líneas parentales: La propagación de las líneas *flr³/TM3, Bd^f* y *mwh/mwh* de *Drosophila melanogaster* se efectuó colocando en una serie de frascos lecheros de vidrio de 250 ml, 5 g de puré de papa instantáneo más 20 ml de solución A (Dueñas *et al.*, 2001), manteniéndose en incubadora a 25° C y 60-80% de humedad.

Cruza: La crusa Estándar (E) se realizó con hembras vírgenes de la línea *flr³/TM3, Bd^f* y machos *mwh/mwh* (Graf *et al.*, 1989).

Colecta de huevos: En frascos lecheros de vidrio esterilizados se agregó una capa de levadura fresca de uso comercial previamente activada con sacarosa y agua. 24 h después se colocaron los progenitores de la crua en estos frascos, durante 8 h a 25° C a oscuridad. Se sacaron los progenitores de los frascos y estos se incubaron hasta completar 72 h \pm 4 h después del inicio de la colecta. Las larvas se obtuvieron lavando la levadura con agua corriente a temperatura ambiente, en una coladera de malla fina de acero.

CL₅₀

Para obtener la CL₅₀ de la crua (E) de *D. melanogaster* se realizaron tres experimentos independientes con cinco repeticiones por concentración. Se colocaron 20 larvas de 72 \pm 4 h en cada tubo de ensayo esterilizado con 0.5 g de puré de papa más 2 ml de la solución de Triasulfuron (Amber 75 GS®) diluido en agua desionizada a concentraciones: 0.05, 0.25, 0.5, 0.75, 1 y 4 mg/ ml y agua. Los resultados obtenidos se analizaron posteriormente con ANOVA factorial y regresión lineal.

SMART

Para el bioensayo SMART se realizaron tres experimentos independientes con cinco repeticiones por concentración. Se colocaron aproximadamente la misma cantidad de larvas de 72 \pm 4 h de edad en tubos de ensayo con 0.5 g de Medio Instantáneo Carolina (Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC, USA) y 2 ml de la solución de Triasulfuron (Amber 75 GS®) diluido en agua desionizada a las concentraciones: 0.05, 0.5, 4 mg/ ml y agua (obtenidas a partir de la CL₅₀ de la crua E). Los tubos se incubaron a una temperatura de 25° C, hasta que las larvas completaron su desarrollo y emergieron los imagos.

Se colectaron los adultos y almacenaron en frascos con alcohol al 70 %. Se separó la progenie transheterocigota (*mwh +/+ flr³*) con fenotipo de alas silvestre (Figura 10 a). Las alas de estos individuos se montaron en portaobjetos con solución de Faure. Se revisaron las dos superficies de cada ala con un microscopio óptico (40x) para registrar el número y tipo de

clones. Presentándose tres categorías para éstos: manchas *mwh* simples, *fir*³ simples y gemelas (Graf *et al.*, 1984).

La evaluación estadística se realizó con el programa SMART (Frei y Würgler, 1995), agrupándolas con base al tipo y tamaño. Con la prueba de U (Mann, Whitney y Wilcoxon) se ratificó la significancia de los resultados débiles positivos (w) o indecisos (i) que se obtuvieron con el programa SMART.

RESULTADOS

CL₅₀

En la figura 19 se representan los datos de sobrevivencia que se obtuvieron de tres experimentos independientes con la cruza (E). Observándose una relación dosis-respuesta. Con el agua se obtuvo 75% de sobrevivencia y con las concentraciones: 0.05, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/ ml la sobrevivencia fue mayor de 60%. La concentración de 4 mg/ ml arrojó valores de sobrevivencia menores de 50%. Con el análisis de varianza de un factor se comprobó que existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas. La concentración de 4 mg/ ml, con una sobrevivencia de 40 % fue significativamente diferente a todas las demás.

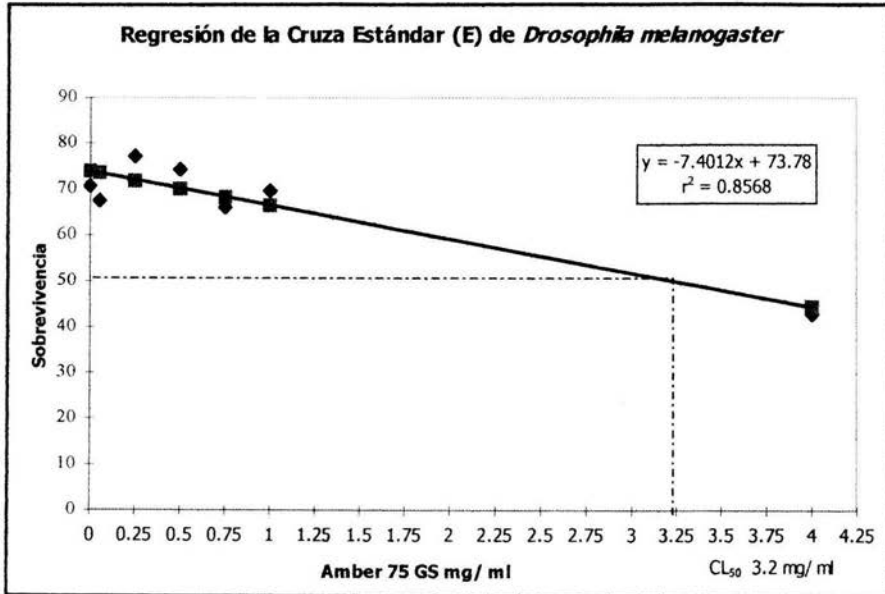


Fig. 19: CL₅₀ de la cruce E por regresión lineal.

Con la ecuación de regresión lineal se determinó la CL₅₀ de 3.2 mg/ ml en la cruce (E) (hembras *flr³/TM3, Bd^f* X machos *mwh/mwh*). La r^2 indicó un buen ajuste de los datos experimentales con 0.8568.

SMART

TABLA 1: RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO SMART EN ALA DE *Drosophila melanogaster*.

Compuesto Cruza ^b	Número de moscas	Manchas por mosca (número de manchas)				Manchas con clones mwh	Promedio de ciclos de división celular	Frecuencia de formación de clones x10 ⁽⁻⁵⁾		
		Manchas pequeñas (1-2 células)	Manchas grandes (> 2 células)	Manchas gemelas	Manchas totales			Obs- vado	Corre- gido	
Conc. (mg/ ml)		m = 2	m = 5	m = 5	m = 2					
Tratamiento (48 h) Testigo (agua)										
E	0.0	57	0.51 (29)	0.09 (5)	0.02 (1)	0.61 (35)	34	1.74	2.4	4
Tratamiento (48 h) Amber 75 GS										
E	0.05	63	0.49 (31)-/n	0.08 (4)i/n	0.06 (4)i/n	0.63 (40)-/n	40	1.87	2.6	0.2
Tratamiento (48 h) Amber 75 GS										
E	0.5	61	0.85 (52)+/s	0.13 (8)-/n	0.05 (3)i/n	1.03 (63)+/s	63	1.87	4.2	1.8
Tratamiento (48 h) Amber 75 GS										
E	4	60	0.40 (24)-/n	0.17 (10)-/n	0.03 (2)i/n	0.60 (36)-/n	36	2.11	2.5	0.0

^aDiagnostico estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (1988). Donde: m: factor de multiplicación; Prueba estadística de una cola. Niveles de probabilidad de α y β (0.05); positivos: +, negativos: -, indecisos: i. ^bE: Cruza Estándar. ^c Diagnostico estadístico con la prueba de U (Mann, Whitney y Wilcoxon) de acuerdo a Frei y Würgler (1995): n = no significativo; s = significativo con un 95 % de confianza.

En la tabla 1 se presentan los resultados que se obtuvieron del análisis SMART en ala de la cruza E donde las proporciones nos muestran las concentraciones que pudieran dar una genotoxicidad positiva, negativa, débil positiva o indecisa. El testigo agua se encuentra en los rangos establecidos para la cruza E (0.61) (de acuerdo a Frei y Würgler, 1995 y registro histórico del laboratorio de genética toxicológica de la FES Iztacala, UNAM). La concentración de 0.05 mg/ ml generó un resultado indeciso en manchas grandes y gemelas y negativo en los otros tipos de manchas. La concentración de 0.5 mg/ ml mostró genotoxicidad en manchas pequeñas y totales e indecisos en manchas gemelas. La concentración de 4 mg/ ml fue indecisa en manchas gemelas.

Se aplicó la prueba de U (Mann-Whitney y Wilcoxon) para discernir en los resultados indecisos. Con base a si la z ajustada es positiva (+) se emplea $1 - p/2$ o si z ajustada es negativa (-) se utiliza $p/2$. Con este estadístico se obtuvo que los resultados indecisos fueron negativos y se comprobó la genotoxicidad de la concentración de 0.5 mg/ ml para manchas totales y manchas pequeñas de una célula.

Por lo anterior se rechaza H_0 , ya que al menos una concentración produjo una proporción de manchas por mosca, significativamente diferente a la del testigo agua.

En la Figura 20 se muestran las proporciones que se obtuvieron para cada tipo de manchas. Las más abundantes fueron las pequeñas en todas las concentraciones, encontrándose un número significativamente mayor en la concentración de 0.5 mg/ ml.

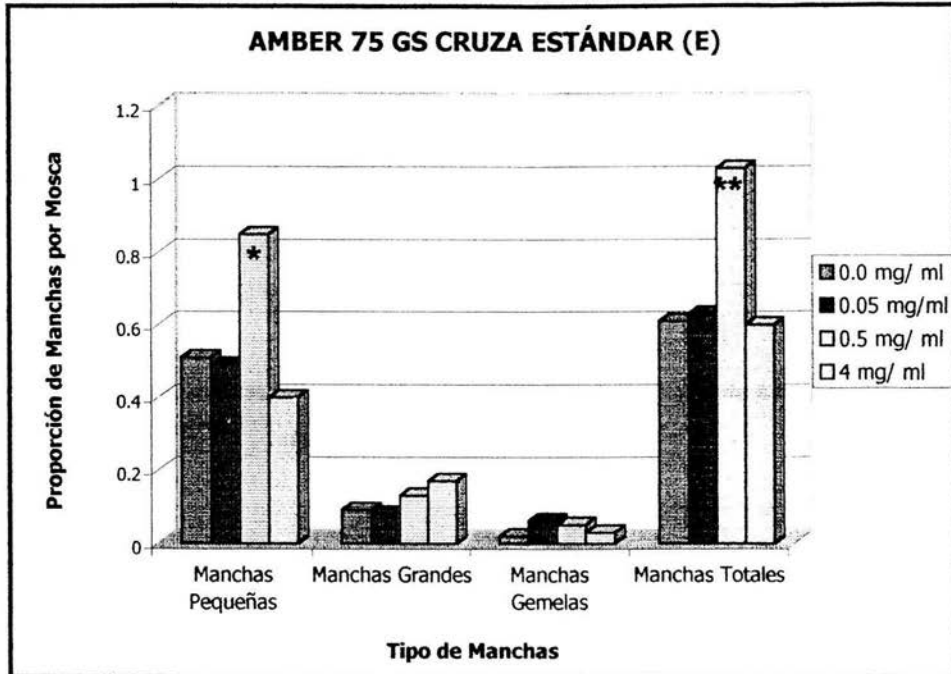


Fig. 20: Proporción por mosca, de cada uno de los tipos de manchas a las diferentes concentraciones probadas (* $P = 0.0157 < 0.05$; ** $P = 0.0105 < 0.05$)

En la Figura 21 se observa la distribución de las proporciones de clones *mwh* según su tamaño. Con la prueba de U (Mann, Whitney y Wilcoxon) se determinó que los clones de 1 célula obtenidos con la concentración de 0.5 mg/ ml fue significativamente positiva ($P = 0.0157 < 0.05$). Esto explica los resultados positivos obtenidos con el ensayo SMART. Las otras distribuciones de clones *mwh* no arrojaron resultados significativos.

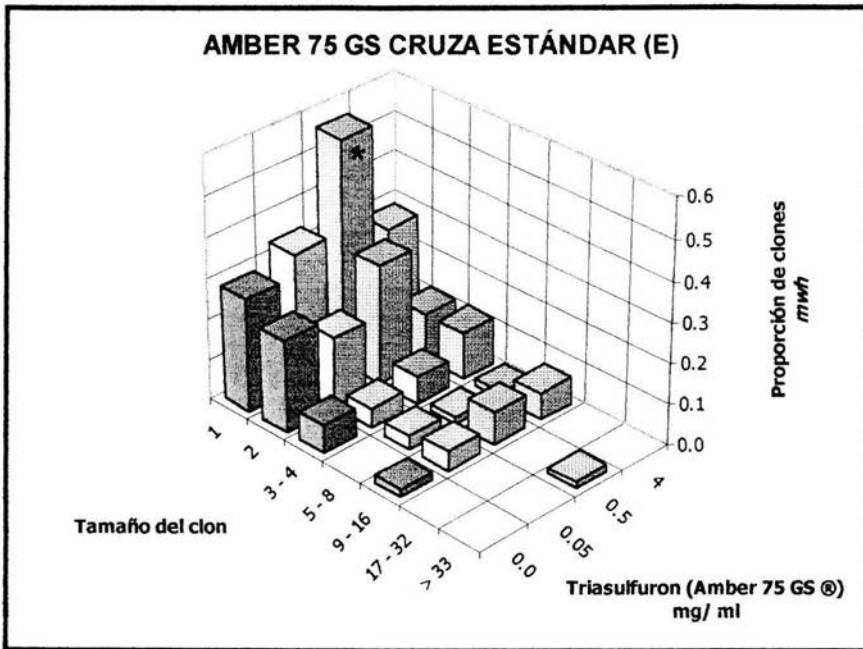


Fig. 21: Distribución de los clones *mwh* de acuerdo a su tamaño. Hay un mayor número de clones pequeños (de 1 a 2 células), siendo significativamente positiva la concentración de 0.5 mg/ ml (* $P = 0.0157 < 0.05$)

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Ciertos químicos son mutágenos al ser biotransformados por el metabolismo de las plantas o animales e inducen daño en el ADN (Plewa y Wagner, 1993).

Muchas plantas comestibles se exponen a herbicidas y a otros químicos (por ejemplo Triasulfuron (Amber 75 GS®) usados en la agricultura. Por lo tanto, las consecuencias de biotransformación deben ser tomadas en cuenta porque el efecto en las formas de activación pueden representar una amenaza a la salud pública al contribuir a la presencia de mutágenos en el medio ambiente (Gómez-Arroyo *et al.*, 1995).

En este trabajo la CL_{50} para *Drosophila melanogaster* cruza E fue 3.2 mg/ ml. A medida que se aumentó la concentración, la sobrevivencia disminuyó en un efecto dosis-respuesta. El testigo agua tuvo una sobrevivencia de 75 % y la concentración que se utiliza en el campo (0.05 mg/ ml) no mostró toxicidad, de acuerdo con Rebecchi *et al.*, (2000). Con las concentraciones 1, 0.75, 0.5 y 0.25 mg/ ml se observó la misma respuesta. Sin embargo, la concentración de 4 mg/ ml, tuvo una sobrevivencia de sólo 40%.

Con el bioensayo SMART en ala, el análisis de las proporciones de las manchas simples y gemelas de los descendientes transheterocigotos de la cruza E no mostraron un efecto genotóxico con la concentración de 0.05 mg/ ml, la cual presentó una sobrevivencia semejante al testigo agua.

Con la concentración de 0.5 mg/ ml (diez veces más que la concentración utilizada en el campo) si se presentó un efecto genotóxico. En cuanto a las proporciones de clones *mwh* que se obtuvieron con esta concentración, los más abundantes fueron para manchas pequeñas de una célula. Para explicar esto existen tres opciones: 1) con base en los resultados de Graf (1995) se podría inferir que el agente es un promutágeno que afectó a las células de los discos imagales hasta el final de la etapa larvaria, porque tuvo que ser activado por los citocromos P450 u otras vías metabólicas. 2) Un resultado similar (clones de 1-2 células) se presentará si el compuesto induce aneuploidía (no-disyunción) ya que hay poca capacidad de división celular y los daños detectados en el ADN pueden deberse a efectos citotóxicos y/o genotóxicos, esto podría ser apoyado en Frei y Würzler, (1996) donde discuten la capacidad que tienen los compuestos de interferir con el aparato mitótico induciendo pocas manchas, pero con proporciones estadísticamente significativas. 3) Por otro lado el herbicida podría ser clastogénico, es decir que los cromosomas se rompan antes de la división celular y por tal motivo se encuentren un

número mayor de clones pequeños (1-2 células), aunado a lo anterior se tendría que observar un gran número de manchas grandes y gemelas resultado de mutaciones (duplicación, delección, inversión y translocación) y recombinación somática respectivamente; las cuales en este estudio no arrojaron un resultado estadísticamente significativo (Ver tabla 1). Se sabe que la clastogenicidad puede deberse a los efectos acumulativos de algunos pesticidas o herbicidas, por lo cual no es posible que el daño pueda ser atribuido a un agente en particular. Estudios con sujetos expuestos a pesticidas sugiere que las mezclas de estos, en un período de exposición largo pueden actuar como clastogénicos en el ADN de células somáticas (Garaj-Vrhovac and Zeljezic, 2000).

Con la concentración de 4 mg/ ml no se presentó genotoxicidad. Basándonos en los resultados de la CL_{50} , para 4 mg/ ml que tuvo una sobrevivencia menor de 50 %, inferimos que de los individuos que estuvieron expuestos a esta concentración sólo sobrevivieron los resistentes.

Las concentraciones de 0.5 y 4 mg/ ml empleadas en este estudio de genotoxicidad se utilizaron para representar una acumulación del compuesto (10 veces más y 80 veces más respectivamente, a la que se aplica en el campo (0.05 mg/ ml)) ya sea en suelo, mantos freáticos, aire y seres vivos.

Esto es importante debido a que la permanencia de las sulfonilureas (Triasulfuron) en el suelo está determinada principalmente por las características edafológicas. Como se ha mencionado al haber mucha arcilla o materia orgánica en el mismo, se requiere aplicar una dosis mayor del herbicida, pero por otro lado tanto el agua como el pH son importantes para su eliminación. Se sabe además que el Triasulfuron se degrada bajo condiciones de campo (Rebecchi *et al.*, 2000) como son hidrólisis química, degradación microbial y foto degradación (Vulliet *et al.*, 2002), donde la

actividad microbial juega también un papel importante en su degradación o en su permanencia (Rebecchi *et al.*, 2000).

De igual manera la interacción del herbicida con las plantas superiores juega un papel importante pues se sabe, que los citocromos P450 metabolizan los componentes xenobióticos por medio de mecanismos que involucran oxidación, hidrólisis, conjugación y ocasionalmente la reducción, tanto en animales como en plantas; el último paso de la biotransformación molecular es la conjugación (Higashi, 1988). Los conjugados son excretados por los animales, pero como no existe un sistema excretorio en plantas, ellos polimerizan y/o incorporan estos componentes a la estructura de tal manera que los productos iniciales, la reacción de intermediarios y/o las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los productos finales pueden producir primero daño en la planta, segundo conjugados y/o reservas en la misma planta hasta que son liberados en el tracto gastrointestinal o en órganos cuando ellos son comidos por seres humanos o animales (Sandermann, 1988). El último evento específicamente puede ocurrir como una consecuencia de aplicaciones de pesticidas, herbicidas, insecticidas, etc., a plantas comestibles (Calderón-Segura *et al.*, 1999).

Es así que la exposición de compuestos genotóxicos conocidos puede inducir daño en el ADN no solo directamente sino a través de otros mecanismos tales como el estrés oxidativo o procesos inflamatorios. La variabilidad genética individual en las enzimas que metabolizan químicos agrícolas pueden también estar involucradas en estos procesos. Cuando estos no son eficientes en la desintoxicación, los subproductos metabólicos se acumulan, contribuyendo a los procesos tumorígenos (Hodgson *et al.*, 1991).

El daño genético demostrado en esta investigación indica que existe un riesgo para los trabajadores expuestos al Triasulfuron (Amber 75 GS®)

si no se toman las medidas adecuadas de protección. Estos resultados constituyen un avance y se fundamentan en la genotoxicidad que se ha reportado en estudios epidemiológicos donde los trabajadores expuestos a diversos pesticidas han usado muy pocas medidas de protección (Gómez-Arroyo *et al.*, 2000; Lucero *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

La concentración de 0.05 mg/ ml que se usa en el campo no mostró toxicidad mayor al 40 % y no fue genotóxica.

La concentración de 0.5 mg/ ml arrojó una toxicidad similar a la del testigo agua (menor a 60 %).

La concentración de 4 mg/ ml del herbicida mostró una toxicidad de 60 %, y no presentó efecto genotóxico, por lo que se infiere que los organismos presentes fueron resistentes al experimento crónico del herbicida.

La LC_{50} para la craza E de *Drosophila melanogaster* fue de 3.2 mg/ ml.

Con el ensayo SMART en ala la concentración de 0.5 mg/ ml fue genotóxica, presentando una diferencia significativa de manchas pequeñas con respecto al testigo agua y las demás concentraciones utilizadas.

La presencia de un mayor número de manchas pequeñas (1 célula) en la concentración de 0.5 mg/ ml pudiera deberse a que el compuesto haya actuado al final de la división celular en el organismo (promutágeno) o presentara un posible efecto aneuploidogénico.

RECOMENDACIONES

Para conocer si el herbicida Triasulfuron (Amber 75 GS®) es activado por los citocromos P450 es necesario determinarlo mediante el ensayo SMART en la cruz Bioactivación elevada (BE), que tiene niveles constitutivos altos de los mismos.

En el caso de que el Triasulfuron (Amber 75 GS®) se acumulara en las reservas de la planta, en mantos freáticos o suelos, la presencia de concentraciones de ± 0.5 mg/ ml podría significar un riesgo genotóxico para las personas u organismos que están expuestos al herbicida o consumen cultivos tratados con éste.

Por lo anterior se recomienda hacer pruebas y/o ensayos que detecten los niveles del herbicida en las plantas comestibles y en suelo para detectar tempranamente daños que pudieran originarse con este herbicida.

REFERENCIAS

Adams, M. D., Celniker, S.E., Holt, R. A. y Evans, C. A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**, 2185-2195.

Amichot, M., Brun, A., Cuany, A., DeSouza, G., LeMouél, T., Bride, J. M., Babault, M., Salaün, J. P., Rahmani, R. y Berge, J. B. (1998). Induction of cytochrome P450 activities in *Drosophila melanogaster* strains susceptible at resistant to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.*, **121C**, 311-319.

Andersen, J. F., Utermohlen, J. G. y Feyereisen, R. (1993). Expresion of house fly CYP6A1 y NADPH cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitucion of an insecticide metabolizing P450 system. *Science*, **24**, 411-428.

IZT.

Barbera, C. (1976). Pesticidas Agrícolas. 3ra ed. Omega, S.A. Barcelona España. pp 362-471.

Battaglin, W. A., Furlong, E. T., Burkhardt, M. y Peter, C. J. (1998). A Reconnaissance for New, Low-Application Rate Herbicides in Surface and Ground Water in the Midwestern United States: An example of collaboration between the public and private sectors. U.S. Geological Survey Fact Sheet, pp 1-14.

Beeby, A. (1993). Applying Ecology. Chapman and Hall. London England. pp 79-81.

Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**, 235-248.



Blacklow, W. M. y Pheloung, P. C. (1995). Soil leaching and degradation of soil applied herbicide in gradationally textured alkaline soil, Triasulfuron and Chlorosulfuron. *Austr. Jour. Agric. Res.*, **42**, 1205-1216.

Brown, L. M., Blair, A., Gibson, R., Everett, G. D., Cantor, K. P., Schuman, L. M., Burmeister, L. F., Van Lier, S. F. y Dick, F. (1990). Pesticide exposure and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.*, **50**, 6585-6591.

Burroughs, B., Tarone, R., Kesner, J. S. y Garry, V. F. (1999). Herbicides and adjuvants: an evolving view. *Toxicol. Indus. Health*, **15**, 160-168.

Calderón-Segura, M. E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R. y Espinosa-Ramírez, M. (1999). In vivo and in vitro promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, **423**, 81-88.

Ciba-Geigy. (1997). Al cuidado de la agricultura. Manual. México. No. 929, pp 719.

Cobb, A. (1992). Herbicides and plant physiology. Champan and Hall. Great Britain. pp 126-140.

De Liñán, C. (1997). Farmacología Vegetal, Compendium de las sustancias activas, insectos y ácaros utilizados en la prevención y control de plagas, enfermedades y plantas no deseadas así como la regulación de la fisiología de los vegetales cultivados. Ediciones Agrotécnicas. España. pp 10-15, 1077-1079.

Delgado, R. A. y Graf, U. (1994). Latin american workshop on genetic toxicology. I. *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **312**, 193-194.

Delgado-Rodríguez, A., Villalobos-Pietrini, R., Gómez-Arroyo, S y Graf, U. (1994). Meeting report. Latin american workshop on genetic toxicology. *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **312**, 193-194.

Dueñas, I. E., Heres, M. E., Castañeda, P. L. y Graf, U. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *D.I.S.* **88**, 166.

Engler, P. y Strob, U. (1988). Immunoglobulin gene rearrangement. In: Kucherlapati, R. and Smith, G. R. (eds). Genetic recombination. American Society for Microbiology. Washington. DC. pp 667-700.

EPA, (1998). Triasulfuron (Amber) pesticide tolerance 8/98. EPA Federal Register **63**, 44146-44152. PMEP Webmaster, Cornell University [On line] 1998 Aug 18 (access date 2003 May 01). Available in: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/herb-growthreg/sethoxydim-vernolate/triasulfuron/Triasulfuron tol 898.html>.

Feyereisen, R. (1999). Insect P450 Enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, **44**, 507-533.

Frear, D. S., Swanson, H. R. y Thalacker, F. W. (1995). Microsomal fraction from shot of etiolated wheat seedling catalysed by the oxidation of triasulfuron. *Pestic. Biochem. Physiol.* **41**, 274-287.

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. *Mutat. Res.*, **203**, 297-308.

Frei, H. y Würigler, F. E. (1996). Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, **11**, 315-325.

Frei, H. y Würigler, F.E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* **334**, 247-258.

Gandhi, R., Varak, E. y Goldbeerg, M. L. (1992). Molecular analysis of a cytochrome P450 gene of family 4 on the *Drosophila* X chromosome. *ADN Cell Biol.*, **11**, 397-404.

Garaj-Vrhovac, V. y Zeljezic, D. (1999). Chromosomal aberrations and frequency of micronuclei in workers employed in pesticide production. *Biologia*, **54**, 707-712.

Ghildyal, R. Y Kariofillis, M. (1995). Determination of Triasulfuron in soil: affinity chromatography as a soil extract cleanup procedure. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **30**, 207-215.

Giardini, M. C. y Carosi, S. (1990). Effects of cholorsulfuron on polyamine contene in maize seedlings. *Pest. Biochem. Physiol.*, **36**, 229-239.

Gómez, B. J. (1993). Control Químico de la Maleza. Trillas, México. pp 15-35.

Gómez-Arroyo, S., Calderón-Segura, M. E. y Villalobos-Pietrini, R. (1995). Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutagen.*, **26**, 324-330.

Gómez-Arroyo, S., Díaz-Sánchez, Y., Meneses-Pérez, M. A., Villalobos-Pietrini, R. y DeLeon-Rodríguez, J. D. (2000). Cytogenetic biomonitoring in a mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat. Res.*, **466**, 117-124.

González, F., Crespi, Ch. y Gelboin, H. (1991). cADN-expressed human cytochrome P450's: a new age of molecular toxicology and human risk assessment. *Mutat. Res.*, **247**, 113-127.

Graf, U y Van Schaik, N. (1992). Improved high bioactivation cross for the Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **271**, 59-67.

Graf, U y Würgler, F. E. (1996). The Somatic white-ivory eye test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, **27**, 219-226.

Graf, U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing Somatic Mutation And Recombination Test of *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, **51**, 168-173.

Graf, U., Frei, H., Hägi, A., Katz A. J. y Würgler, F. E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, **222**, 359-373.

Graf, U., Spanó, M. A., Guzmán-Rincon, J., Abraham, S. K. y Andrade, H. (1996). The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds and complex mixtures as well as

for studies on antigenotoxicity. Second Conference of PanAfrican Environmental Mutagen Society (PAEMS). 23-25 Jan. Manuscript for the African Newsletter on Occupational Health and Safety.

Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H. Huon, H., Hall, C.B. y Kale, P.G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, **6**, 153-188.

Grover, P., Danadevi, K., Mahboob. M., Rozati, R., Saleha Banu, B. y Rahman, M. F. (2003). Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. *Mutagenesis*, **18**, 201-205.

Guengerich, P. F. (1993). Cytochrome P450 Enzymes. *American Scientist*. **81**, 440-447.

Gunderson, C. A., Brattsten, L. B. y Fleming, J. T. (1986). Microsomal oxidase and glutathione transferase as factors influencing the effects of pulegone in southern and fall armyworm larvae. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **26**, 238-49.

Guzmán-Rincón, J., Ramírez-Victoria, P., y Benítez, L. (2001). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster* used for biomonitoring of Environmental Pollutants. In Butterworth, F.M, Gonatilaka, A. y Gonsebatt, M.E. (eds). *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change. A handbook. Vol 2.* Kluwer Academic / Plenum Press Publishers. New York, NY. pp 221-237.

Happle, R. (1999). Loss of heterozygosity in the human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **41**, 143-161.

Harder, P. A., O'Keefe, D. P., Romesser, J. A., Leto, K. L. y Omer, C. A. (1991). Isolation and characterization of *Streptomyces griseolus* deletion mutants affected in cytochrome P-450-mediated herbicide metabolism. *Mol. Gen. Genet.*, **227**, 238-244.

Higashi, H. (1998). Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutat. Res.*, **197**, 273-278.

Hodgson, E. (1985). Microsomal mono-oxygenases. In: , Kerdt, G. A. and Rein, H.(eds), *Comprehensive Insect physiology Biochemistry and Pharmacology, III*. Pergamon Press, New York. pp 225-2331.

Hodgson, E., Silver, I. S., Butler, L. E., Lawton, M. P. y Levi, P. E. (1991). Metabolism. In: Hayes, W. J. and Laws, E. R. (eds), *Handbook of pesticides Toxicology*, **1**. Academic Press, San Diego, CA, pp 106-167.

Hoffmann, G. R. (1994). Induction of genetic recombination: consequences and model systems. *Environ. Mol. Mutagen.*, **24**, 59-66.

Index Merck. Budavari, S., O'Neil, M. J., Heckelman, P. F. y Kinneary, J. F. (1996). An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Twenty edition. Merck Research Laboratories, New Jersey. pp 1638.

LaGrega, M. D., Buckingham, P. L. y Evans, J. C. (1996). Gestión de residuos tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. McGraw-Hill Interamericana, México, **1**, pp 642.

Lawrence, P.A. (1992). The marking of fly, the genetics of animal design. Blacwell Scientific Publications. U.S.A.

Lin, N. y Garry, V. F. (2000.) In vitro studies of cellular and molecular developmental toxicity of adjuvants, herbicides, and fungicides

commonly used in Red River Valley, Minnesota. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, **60**, 423-439.

Loomis, T. A. (1994). Fundamentos de toxicología. 3ra ed. ACRIBIA, España, pp 33-35.

Lu, F. C. (1992). Toxicología básica. Harla. México, pp 3-4.

Lucero, L., Pastor, S., Suárez, S., Durhan, R., Gómez, C., Parron, T., Creus, A. y Marcos, R. (2000). Cytogenetic biomonitoring of spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and bucal epithelial cells. *Mutat. Res.* **464**, 255-262.

Marshall, C. J. (1991). Tumor suppressor genes. *Cell*, **64**, 313-326.

McEwen, R. (1979). The comparative cell cycle and metabolic effects of chemical Treatments on root tip meristems III. Cholorosulfuron. *J. Plant. Growth. Reg.* **3**, 52-63.

Mitchell, I y Combes, R. (1984). Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Mutagenicity testing: a practical approach. Venintt, J. M. Parry, I. R. L y Pres. U. K. (eds.), pp 149-155.

Neal, J. J. y Wu, D. (1994). Inhibition of insect cytochromes P450 by furanocoumarins. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **50**, 43-50.

Nebert, D. W. (1994). Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 25-37.

Novartis Agro, (2000). Amber® 75 GS, Agrositio [On line] 1999 sep 05 (access date 2003 Jun 02). Available in: http://www.agrositio.com.mx/plm/mostrar_contenido.asp?pagina=1076.

Omura, T. y Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biolo. Chem.*, **239**, 2370-2377.

Percival, M. P. y Baker, N. R. (1991). Herbicides and photosynthesis. In: Baker, N. R. and Percival, M. P. (eds.). *Herbicides. Topics in photosynthesis*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam **10**, 1-26.

Plewa, W. J. y Wagner, E. D. (1993). Activation of promutagens by green plants. *Annu. Rev. Genet.*, **27**, 93-113.

Puertas, J. M. (1996). Genética, Fundamentos y Perspectivas. Interamericana McGraw Hill. México, pp 741.

Puricelli, E. C. M. (2000). Cátedra de malezas. Departamento de Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias, Zavalla, Santa Fe, pp 67-90.

Ramos, P., Abundis, H. M., Gaytán, J. C., Ordaz, M. G., Orozco, P. G., Maldonado, J., Hernández, J., González, E., Reyes, P. Galicia, E, M, y Muñoz, J. A. (1993). Manual de laboratorios de genética para *Drosophila melanogaster*. McGraw-Hill. México. pp 131.

Rebecchi, L., Sabatini, M. A., Cappi, C., Grazioso, P., Vicari, A., Danelli, G. y Bertolani, R. (2000). Effects of sulfonylurea herbicide on soil microartropods. *Biol. Fert. Soils*, **30**, 312-317.

Rockstein, M. (1978). Biochemistry of insects. Academic Press, New York, pp 649.

Rost, T. (1984). The comparative cell cycle and metabolic effect of chemical treatment on root tip meristems III. Chlorosulfuron. *J. Plant. Growth. Reg.*, **3**, 52-63.

Russell, P. (1998). Genetics. 5a ed. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. pp 805.

Saflas, A. F., Blair, A., Cantor, K. P., Hanrahan, L. y Anderson, H. A. (1987). Cancer and other causes of death among Wisconsin farmers. *Am. J. Ind. Med.*, **11**, 119-129.

Sandermann, H. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutat. Res.*, **197**, 183-194.

Scott, J. G., Liu, N. y Wen, Z. (1998). Insect cytochrome P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **121**, 147-155.

Sengstag, C. (1994). The role of mitotic recombination in carcinogenesis. *Crit. Rev. Toxicol.*, **24**, 323-353.

Sharpe, C. R., Collet, J. P., Belzile, E., Hanley, J. A. y Boivin, J. F. (2002). The effects of tricyclic antidepressants on breast cancer risk. *British Journal of Cancer.* **86**, 92-97.

Short, P. y Colborn, T. (1999). Pesticide use in U. S. and policy implications: a focus on herbicides. *Toxicol. Ind. Health*, **15**, 240-275.

Spanó, M. A., Frei, H., Würigler, F. E. y Graf, U. (2001). Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation

crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, **16**, 385-394.

Stidham, M. A. (1991). Herbicide inhibitors of branched chain amino acid biosynthesis. In: Baker, N. R. and Percival, M. P. (eds). *Herbicides. Topics in photosynthesis.* Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 10, 247-266.

Taylor M, y Feyereisen R. (1996). Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. *Mol. Biol. Evol.*, **13**, 719-34.

Thalacker, F. W., Swanson, H. R. y Frear, D. S. (2002). Characterization, purification and reconstitution of an inducible cytochrome P450-dependent triasulfuron hydroxylase from wheat. *Pest. Biochem. Phys.*, **49**, 209-223.

Tijet, N., Helvig, C. y Feyereisen, R. (2001). The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, **262**, 189-198.

Vogel, E. W. (1991). Genotoxic chemical. An introduction into basic principle of genetic toxicology. Primer taller latinoamericano en genética toxicológica en *Drosophila melanogaster*. Tlaxcala, México, Sin publicar.

Vogel, E. W. y Zijlstra, J. A. (1987). Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination *D. melanogaster*. *Mutat. Res.*, **182**, 243-264.

Vogel, E. W., Graf, U., Frei, H. J. y Nirvard, J. M. M. (1999). The results of assays in *D. melanogaster* as indicator of exposure to carcinogens. *IARC*, Lyon, **146**, 427-470.

Vulliet, E., Emmelin, C., Chovelon, J. M., Guillard, C. y Herrmann, J. M. (2002). Photocatalytic degradation of sulfonylurea herbicides in aqueous TiO₂. *Applied. Catal. B: Environmental*, **38**, 127-137.

Werck-Reichhart, D., Hehn, A. y Didierjean, L. (2000). Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant. Science*, **5**, 116-123.

Worthing, C.H. y Raymond, H. (1991). The Pesticides Manual. 9a ed, British Crop Protection Council, Great Britain, pp 8377.

Yu, S. J. (1986). Consequences of induction of foreign compound-metabolizing enzymes in insects. In: Bransten, L. B. and Ahmad, S. (eds.), *Molecular Aspects (I) Insect-Plant Interactions*, New York. pp 211-55.

Zeljezic, D. y Garaj-Vrhovac, V. (2001). Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational to pesticides. *Mutagenesis*, **16**, 359-363.

Zimmermann, F., Schwaier, R. y Laer, U. (1996). Mitotic recombination induced in *Saccharomyces cerevisiae* with nitrous acid, diethylsulfate and carcinogenic, alkylating nitrodamides. *Z. Vererbungsl.*, **98**, 230-246.