



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN GENOTÓXICA DEL HERBICIDA  
CLOMAZONE MEDIANTE EL ENSAYO DE  
MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA  
(SMART) EN LAS ALAS DE *DROSOPHILA  
MELANOGASTER***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**CLAUDIA MÓNICA FLORES LOYOLA**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNAIZ**

**2016**

**Ciudad Universitaria, CDMX**



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.

## DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

Flores

Loyola

Claudia Mónica

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

308037812

### 2. Datos del tutor

Dra.

Rosario

Rodríguez

Arnaiz

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.

María Eugenia

Gonsebatt

Bonaparte

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.

Mario Agustín

Altamirano

Lozano

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.

María Elena

Calderón

Segura

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.

María Guadalupe

Ordaz

Téllez

### 7. Evaluación genotóxica del herbicida clomazone mediante el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) en las alas de *Drosophila melanogaster*

53 p.

2016

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Genética y Evolución coordinado por la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz (Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias, UNAM), durante el taller “Genes y Ambiente” de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**A mis papás y hermanos.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México**

**A la Facultad de Ciencias**

**A la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz por compartirme su tiempo, paciencia y conocimiento para la realización de este trabajo.**

**A la Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Genética y Evolución.**

**Al M. en C. Ricardo Iván Peraza Vega por su valiosa ayuda durante la realización de este trabajo y por todas las lecciones académicas y de vida que me enseñó durante mi estancia en el laboratorio de Genética y Evolución.**

**A la M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Genética y Evolución.**

**A los miembros del jurado evaluador de este trabajo:**

**Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz**

**Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte**

**Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano**

**Dra. María Elena Calderón Segura**

**M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez**

## **Agradecimientos personales**

A mi mamá, gracias infinitas por todo lo que me has enseñado, por acompañarme siempre, por ayudarme ante los fracasos, por tanto amor. Te amo con mi vida mamá.

A mi papá, por enseñarme que la vida es dura y que para tener logros hay que trabajar con fuerza, pasión, motivación y sobre todo con mucho valor y dignidad. Te amo papá.

A mi herma, mi eterna princesa. Eri, gracias por estar conmigo todas esas largas noches de tareas interminables, disculpa por interrumpir infinitas veces tus horas de sueño, pero sobre todo gracias por llegar a compartir la vida conmigo y poder decir con orgullo que soy tu hermana, te amo con todo el corazón y espero que siempre estés junto a mí.

A mi hermano Carlitos, sabes que te amo con todo mi corazón, te agradezco por defenderme de todo lo malo que llegó a mi vida. Sin tu apoyo este trabajo no hubiera sido posible. Saber que cuento contigo por siempre me hace muy feliz y afortunada. Gracias por todo Carlos.

A mi novio Ricardo, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, de verdad agradezco tu presencia en mi vida pues eres realmente increíble. Gracias por ser mi maestro en toda la extensión de la palabra, pues la enseñanza que me has brindado no se trata solo de la difusión del conocimiento académico ya que también me has mostrado la vida a través de tu experiencia y tu amor. Te amo Ric, gracias totales.

A mi gran familia, gracias por preocuparse por mí y contribuir con sonrisas, abrazos y mucho cariño a la realización de este trabajo. Pamela, te quiero.

A todos mis amigos, por hacer de mi estancia escolar una experiencia inolvidable llena de risas y buenos momentos. Gracias Karen por estar conmigo en todo momento, por las risas infinitas y por ser mi mejor amiga, te quiero hermana.

A mis compañeros del laboratorio de Genética y Evolución por su ayuda.

**¡GRACIAS A TODOS!**

## Contenido

Resumen.....	1
Introducción .....	2
Plaguicidas .....	2
Clasificación y toxicidad de Plaguicidas .....	3
Herbicidas.....	5
Clomazone.....	6
Datos de identificación del clomazone.....	8
Metabolismo del clomazone .....	9
Ensayo SMART .....	12
<i>Drosophila melanogaster</i> .....	15
Metabolismo de xenobióticos .....	18
Citocromos P450 .....	19
Los citocromos P450 en los insectos.....	20
Justificación .....	22
Objetivos .....	22
Objetivo general:.....	22
Objetivos particulares: .....	22
Hipótesis .....	22
Materiales y Métodos.....	23
Compuestos químicos .....	23
Concentración letal media CL <sub>50</sub> .....	23
Cruzas .....	23
El ensayo SMART .....	24
Resultados.....	25
Resultados de la Concentración Letal Media (CL <sub>50</sub> ) para el herbicida clomazone.....	25
Resultados del ensayo SMART .....	28
Cruza estándar (standar ST) .....	28
Cruza de alta bioactivación (High bioactivation HB).....	33
Discusión de Resultados:.....	38
Concentración Letal Media (CL <sub>50</sub> ).....	38
Ensayo SMART .....	39



Conclusiones.....	45
Bibliografía:.....	46

## Resumen

El clomazone es un herbicida de uso agrícola destinado a eliminar malezas de hoja ancha y algunas gramíneas de cultivos como el algodón, arroz, calabacita, calabaza, caña de azúcar, chayote, chile, melón, pepino, sandía, soya y tabaco. Es catalogado como un herbicida perteneciente al grupo químico de las isoxazolidinonas. Con base en su mecanismo de acción sobre los pigmentos, se sabe que inhibe a la enzima licopeno ciclasa que interviene en la biosíntesis de carotenos. Es selectivo y se absorbe por las raíces y brotes de plantas. Su aplicación generalmente es pre-emergente y es un compuesto moderadamente persistente en suelos y altamente soluble en agua. En este estudio se evaluó la genotoxicidad de dicho herbicida mediante la prueba de mutación y recombinación somática en las alas de *Drosophila melanogaster* donde se utilizaron dos cruza: la estándar (ST) y la de alta bioactivación (HB). Para la obtención de individuos (larvas) transheterocigotos para los marcadores *mwh* y *flr* se realizó una cruza entre hembras vírgenes de la cepa *flr<sup>3</sup>* y de la cepa *ORR-flr<sup>3</sup>/TM3*, dichas hembras se cruzaron con machos de la cepa *mwh* para obtener la cruza ST y HB respectivamente. Dicho herbicida fue administrado de manera directa en el medio de cultivo de las larvas de *Drosophila melanogaster* en 3 concentraciones las cuales son 2.5%, 5% y 10% con un control negativo (solvente del herbicida) y un control positivo (mitomicina C [0.15 mM]) concurrentes.

El clomazone resultó ser genotóxico para las moscas en las concentraciones de 5% y 10% para las categorías de manchas totales y manchas simples pequeñas con la cruza ST, mientras que para la cruza HB es positivo en la categoría de manchas simples pequeñas para la concentración de 10%, en la categoría de manchas grandes para la concentración 5% y manchas totales para ambas concentraciones.

## Introducción

### Plaguicidas

Se habla de plaga cuando un animal, una planta o un microorganismo, aumenta su densidad hasta niveles anormales y como consecuencia de ello, afecta directa o indirectamente a la especie humana, ya sea porque perjudique su salud, su comodidad, dañe las construcciones o los predios agrícolas, forestales o ganaderos, de los que el ser humano obtiene alimentos, forrajes, textiles, madera, entre otros (Brechelt, 2004).

Entre los factores que limitan la producción agrícola y la calidad de las cosechas están las enfermedades y las plagas, las cuales pueden atacar a los cultivos desde que las plantas inician su crecimiento, hasta la cosecha y aun en el almacenamiento (Cofepris, 2013). Por otra parte, las enfermedades transmitidas por vectores son un problema importante de salud pública en algunos países.

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) en 2002, se define como plaga a cualquier especie, raza, biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales. Cualquier organismo molesto y dañino para el ser humano y sus intereses puede ser considerado como plaga. Algunos ejemplos de tipos de plagas son las malezas que compiten con las plantas cultivadas y los organismos que perjudican el bienestar y la salud del ser humano (Stainer *et al.*, 1986).

El Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de la FAO (FAO,1986; Al-Saleh, 1994) establece que un plaguicida es la sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o animal; las especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan un daño duradero u otras que interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos; los artículos agrícolas de consumo, la madera y sus productos, el forraje para animales o los productos que pueden administrárseles para el control de insectos, arácnidos u otras plagas corporales. Por lo tanto, la finalidad de los plaguicidas es destruir ciertos organismos vivos, constituyéndose así como un grupo particular de los biocidas que puede alcanzar una capacidad letal amplia (Briggs y Carson, 1992). Los plaguicidas permiten controlar la proliferación de plagas y enfermedades de los cultivos y del ganado, así como reducir o evitar las pérdidas en la producción de alimentos y contribuir al control de los vectores de diversas enfermedades (Cofepris, 2013).

Los plaguicidas son el resultado de un proceso industrial de síntesis química y se han convertido en la forma dominante para el combate de plagas después de la Segunda Guerra Mundial gracias al desarrollo de la industria química y al tipo de agricultura dependiente de estos insumos (Karam, 2004).

No obstante la importancia económica de estos productos, es necesario destacar que su aplicación indiscriminada y sin control puede ocasionar daños al ambiente; por ejemplo, el deterioro de la flora y la fauna silvestres, la contaminación de suelo, de mantos freáticos, aguas continentales y costeras. Así como la generación de plagas resistentes (Klaassen *et al.*, 1999).

### **Clasificación y toxicidad de Plaguicidas**

Los plaguicidas se pueden clasificar en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso (López, 1993). Por su vida media los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (López, 1993).

En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto (OMS/OPS, 1993).

La toxicidad se mide a través de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) o de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ). Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto a evaluar (sólido, líquido, gas, polvo, gel, etc.), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo del modelo biológico etc. (FAO, 1986; OMS/OPS, 1990; Briggs y Carson, 1992; Ramírez y Lacasaña, 2001; Cofepris, 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha elaborado una recomendación de clasificación basada primordialmente en la toxicidad oral y dérmica en ratas de laboratorio, procesos empleados en las pruebas de toxicidad aguda de sustancias químicas (Programa Internacional sobre Seguridad Química, IPCS, 2010) (Tabla 1).

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

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

Las pruebas de toxicidad crónica se realizan para valorar la toxicidad acumulativa de sustancias químicas, evaluándose diversos efectos entre los más importantes se encuentran: el potencial carcinógeno, efectos sobre el desarrollo, efectos teratogénicos y efectos en la reproducción (Klaassen, 2002). El uso y manejo incorrecto de los plaguicidas es peligroso para el ser humano, lo cual se puede manifestar por intoxicaciones de grado diverso y por efectos nocivos que pueden presentarse a mediano o largo plazo, tales como carcinogénesis, teratogénesis, esterilidad y mutagénesis, entre otros (Cofepris, 2013). La Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) de México publicó el Catálogo Oficial de Plaguicidas. Dentro de este catálogo, dichos compuestos se clasifican de acuerdo a su concentración, organismos que controlan, modo de acción, composición química, persistencia, uso y toxicidad entre otros aspectos.

Lo anterior está sustentado en la clasificación de la toxicidad con base en la DL<sub>50</sub> expresada en mg/kg, que fue recomendada por la OMS. En este caso la DL<sub>50</sub> hace referencia a la obtenida en ratas cuando el plaguicida se administra por vía oral o dérmica, en forma aguda. Un concepto paralelo es la CL<sub>50</sub> aguda, que es la concentración de una sustancia en el aire que causa la muerte del 50% de la población de las ratas de prueba; se expresa en mg/m<sup>3</sup> o en partes por millón (ppm) (IPCS, 2002) La clasificación según estos criterios se presentan en la tabla 2.

En dicha clasificación también se encuentra un apartado referente a los organismos que controlan los diversos plaguicidas y este grupo está integrado por

los insecticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, bactericidas, antibióticos y molusquicidas (Cofepris, 2013).

De acuerdo a la clasificación del INECC en 2013 los plaguicidas se agrupan en organoclorados, piretroides, carbamatos, organofosforados, triazinas, derivados de la urea, dinitrofenoles, guaninas y naftoquinonas por mencionar algunos.

Dicha clasificación es de acuerdo a su composición o familia química.

Tabla 2. Clasificación de plaguicidas de acuerdo a su toxicidad aguda al catálogo de plaguicidas publicado por la CICOPALAFEST en 2004.

Categoría	DL <sub>50</sub> en mg/kg								CL <sub>50</sub> por Inhalación Vapor mg/l Exposición: 1 h	
	Oral				Dérmica					
	Sólido		Líquido		Sólido		Líquido		Más de	Hasta
	Más de	Hasta	Más de	Hasta	Más de	Hasta	Más de	Hasta		
I Extremadamente tóxicos	-	5.0	-	20.0	-	10.0	-	40.0	-	0.5
II Altamente tóxicos	5.0	50.0	20.0	200.0	10.0	100.0	40.0	400.0	0.5	2.0
III Moderadamente tóxicos	50.0	500.0	200.0	2000.0	100.0	1000.0	400.0	4000.0	2.0	10.0
IV Ligeramente tóxicos	500.0	-	2000.0	-	1000.0	-	4000.0	-	10.0	-

## Herbicidas

Un herbicida es una sustancia o mezcla de sustancias utilizadas para matar o inhibir el crecimiento de plantas consideradas como indeseables (malezas o malas hierbas) (INECC, 2011).

Las sales inorgánicas, tales como sulfato de cobre, se usaron para el control de malezas de hoja ancha en cereales hacia fines del siglo XIX, pero el primer herbicida orgánico: DNOC (dinitro-ortocresol), no fue introducido hasta 1932. El uso extensivo de herbicidas de dosis relativamente bajas (1-2 kg i.a./ ha) comenzó en 1945 con el lanzamiento de los herbicidas reguladores de crecimiento 2, 4-D y MCPA. El éxito de éstos condujo a una intensificación de la investigación y las inversiones, lo cual a su vez produjo nuevos grupos de herbicidas y compuestos. A lo largo del tiempo se han descubierto nuevos grupos de herbicidas mediante la selección al azar en el invernadero y la subsiguiente modificación química (FAO,

1996), a la fecha entre el 85% y 100% de los cultivos en los países industrializados son tratados con herbicidas (INECC, 2011).

Los herbicidas de contacto son los que se aplican al follaje y afectan solamente la parte tratada, éstos pueden aplicarse también al suelo. Aquellos que se trasladan del follaje hacia otro punto de acción en algún otro lugar de la planta se denominan herbicidas sistémicos. Los herbicidas que se aplican sobre el suelo generalmente afectan la germinación de malezas y tienen que persistir por algún tiempo para ser efectivos, tales compuestos se denominan herbicidas residuales (FAO, 1996).

Tanto el tratamiento foliar como el tratamiento al suelo se describen en función del momento de aplicación y del desarrollo del cultivo, por tal motivo los tratamientos se clasifican en los siguientes: pre-plantación, que hace referencia a la aplicación previa a la plantación del cultivo, pre-emergencia, se realiza siempre antes de la emergencia de las malezas y post-emergencia que se aplican después que el cultivo y (generalmente) las malezas han emergido (FAO, 1996).

### **Clomazone**

El clomazone es un herbicida que fue aprobado para su uso en Estados Unidos en el año de 1986 (EPA, 2007) es producido principalmente bajo los nombres comerciales de Command® y Cerano® (TenBrook *et al.*, 2006). Es un herbicida de tipo isoxazol (Tabla 3) y se usa para el control de malezas de hoja ancha, herbáceas, gramíneas como el garranchuelo (*Digitaria spp.*) hierbas de corral (*Echinochloa cruz-galli*), colas de zorro (*Setaria spp.*) y otras malezas que infestan los cultivos de soja, tabaco, arroz, entre otros (Scott *et al.*, 1995; Schoken, 1997; Lee *et al.*, 2004). Este herbicida es formulado como concentrado emulsificable, en micro cápsulas y gránulos hidratables. Es aplicado en pre y post emergencia de cultivo (CDPR, 2003; EPA, 2007), es altamente soluble en agua, moderadamente persistente en suelos y su vida media oscila entre los 5 y 60 días (Van Scoy *et al.*, 2014).

El herbicida clomazone fue sometido a un análisis extensivo durante la reunión PRAPeR 14 de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA (por sus siglas en inglés: European Food Safety Authority) donde los expertos en toxicología de mamíferos presentes concluyeron que este herbicida posee una toxicidad moderada y actúa generalmente por inhalación y por ingestión, no es irritante para los ojos y tampoco causa sensibilidad en la piel. Además el clomazone se absorbe rápida y extensamente por administración oral (87-100% basado en el monitoreo de la excreción urinaria de ratas y ratones durante 48h). Después de 4h de administrar la dosis del clomazone todavía se observan picos

de concentración en sangre. En los tejidos se detectan niveles insignificantes de residuos después de 7 días de la administración oral de la dosis baja (5mg/ kg de peso corporal). Dicho herbicida se metaboliza casi totalmente por hidroxilación y oxidación debido a la apertura del anillo 3- isoxazolidinona. La excreción en su mayoría, ocurre dentro de los primeros 2 días y la eliminación del 100% del herbicida está cerca de los 7 días (EFSA, 2007).

Para el clomazone existen varios índices sobre el nivel de efectos adversos no observables NOAEL (por sus siglas en inglés: No observed adverse effect level). En estudios de 2 años con ratas el NOAEL es de 41 mg/kg peso corporal/día, en estudios con ratones el NOAEL es de 142 (hembras) 89 (machos) mg/kg peso corporal/ día. En ambas especies no hubo indicios de algún tipo de potencial carcinógeno (EFSA, 2007).

Este herbicida ha sido evaluado en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* mediante la prueba de Ames donde resultó ser no mutagénico (EPA, 1988). Por medio de la prueba de micronúcleos (MN) en eritrocitos de peces se detectó un resultado positivo (Salvagni *et al.*, 2011). De acuerdo a un estudio con biomarcadores en eritrocitos humanos se encontró que dicho herbicida induce estrés oxidante e inhibe el mecanismo de acción de la enzima acetilcolinesterasa (ACh E) (Santi *et al.*, 2011).

La exposición a múltiples plaguicidas es un hecho evidente y ocurre a nivel mundial. Por ejemplo, el herbicida clomazone es usado en la agricultura en su mayoría para cultivos de arroz, debido a que es un compuesto moderadamente persistente en suelos y altamente soluble en agua, lo que potencia su capacidad de contaminación (Gunasekara *et al.*, 2009; Menezes *et al.*, 2014).

La permanencia de este herbicida en organismos vivos se ha reportado a través de varios estudios realizados, por ejemplo, con base a un estudio realizado en el suelo, la captación del clomazone muestra una buena correlación con la concentración de la exposición, ya que para el día 14, el clomazone declinó a su valor mínimo de concentración en el suelo. Alrededor del 74 % a 80 % de clomazone acumulado en el suelo se eliminó. Sin embargo, una cantidad importante de clomazone persistió durante un tiempo relativamente largo y esto se monitoreó en las lombrices de tierra (*Eisenia fetida*) pues se registraron residuos del herbicida en el sistema digestivo de dichas lombrices (Cao *et al.*, 2015).

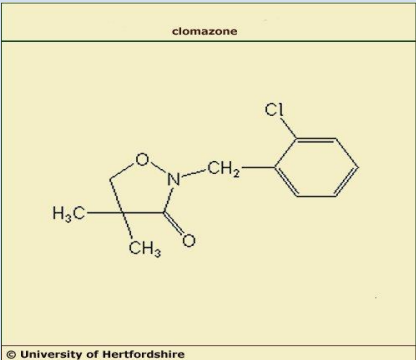
En México el clomazone está aprobado para ser aplicado en cultivos de algodón, arroz, calabacita, calabaza, caña de azúcar, chayote, chile, melón, pepino, sandía, soya y tabaco (Cofepris, 2013). Para el caso de nuestro país la cantidad



de ingrediente activo registrada en la aplicación del clomazone en sus diferentes presentaciones comerciales (Command, Gamit, Gramer), en cultivos pre-emergentes de algodón y sorgo es de 480 a 960g i.a./ha aunque puede variar de acuerdo a la textura del suelo y la cantidad de materia orgánica presente (INIFAP, 2010).

### Datos de identificación del clomazone

Tabla 3. Ficha de identificación del herbicida clomazone (INECC, 2013).

<p>Nombre IUPAC: 2-(2-Clorobencil)-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona ; 2-(2-clorobencil)-4,4-dimetilisoxazolodin-3-ona</p>	<p>Fórmula química: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>2</sub></p>
<p>No. CAS: 81777-89-1</p>	<p>Peso molecular: 239.70 g/mol</p>
<p>Sinónimos: Command, Commence, Gamit, Magíster, Meirt, Dimetazona.</p>	<p>Clasificación: Sal orgánica</p>
<p>Nombre comercial, Formulación (%), Presentación: Gamit 480 C.E./ Command 480 CE (concentrado emulsionante), 46.700. Líquido Viscoso Técnico.</p>	<p>Persistencia: Poco persistente (hasta 17 semanas)</p>
<p>Estructura química:</p>  <p>© University of Hertfordshire</p>	<p>Propiedades físicas y químicas: Líquido viscoso que va de incoloro a café claro a temperatura ambiente. Cuando se congela forma sólidos cristalinos blancos. Su punto de fusión es de 25°C. Solubilidad en agua es de 1100mg/L. Es soluble en tolueno y muy soluble en acetona, cloroformo, ciclohexanona y metanol. Su presión a vapor es de 19.2 mPa a 25°C.</p>
<p>Tipo de plaguicida: Herbicida</p>	<p>Destino en el ambiente: Es moderadamente persistente en el suelo y depende de la textura y estructura del mismo, además del contenido de materia orgánica existente.</p>
<p>Uso: Agrícola</p>	<p>Presentaciones comerciales: Agrícola para control de malezas como concentrado emulsionable en equivalentes gramos de ingrediente activo (I.A/kg o L). Para uso exclusivo en plantas formuladoras de plaguicidas agrícolas como líquido viscoso técnico (I.A./kg o L).</p>

Modificado de INECC, 2013. <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/clomazone.pdf>

## Metabolismo del clomazone

El herbicida clomazone pertenece al grupo de los inhibidores de la biosíntesis de carotenoides (tabla 4). La inhibición de la síntesis de carotenos se puede producir por bloqueo de varias rutas biosintéticas, tales como la inhibición de la enzima fitoeno desaturasa (PDS), inhibición de la enzima 4 hidroxifenil piruvato dioxigenasa (HPPD), e inhibición de la enzima licopeno ciclasa, entre otras (Oliveira, 2011).

Los carotenoides son pigmentos que están asociados con la clorofila y la protegen de la fotooxidación, al disipar el exceso de energía en las reacciones luminosas de la fotosíntesis (Devine, 2002). Sin la presencia de carotenoides la clorofila excitada a estado de triplete se degrada y las plantas mueren por no poder realizar fotosíntesis (Oliveira, 2011). Estos herbicidas pueden tener alta residualidad en el suelo y causar daños a cultivos sembrados en la rotación (Ferhatoglu *et al.*, 2005).

Este grupo de herbicidas incluye a las familias químicas:

- difenileteres
- isoxazoles
- isoxazolidinonas
- piridazinonas
- pirazoles
- piridincarboxamidas
- triazoles
- triketonas

Hasta la fecha el metabolismo del clomazone solo se ha estudiado en plantas y bacterias del suelo. En plantas se realizaron estudios en cultivos de tabaco, papa, soja, frijol, algodón y alfafa, donde se aplicó el herbicida en pre-emergencia, después se colectaron plantas inmaduras y plantas maduras. En dichas plantas se evaluaron los residuos del clomazone y sus metabolitos, encontrando así que en el caso de las plantas inmaduras el metabolito más abundante fue el alcohol 2-clorobencilo, mientras que en las plantas maduras de la soja los residuos de clomazone y sus metabolitos fueron insignificantes. En total fueron encontrados 6 metabolitos a partir de la fracción química extraída de raíces, plantas y semillas de los cultivos mencionados y son: alcohol 2-clorobencilo, 5-ceto-clomazona, hidroxiclomazona, hidrometil-clomazona, alcohol hidroxil 2-clorobencilo y ácido 2-clorobenzoico (EFSA, 2007).

El clomazone se ha utilizado para controlar las malas hierbas en los cultivos de arroz (*Oryza sativa*). Para que el clomazone se active metabólicamente debe pasar a su forma activa metabólica 5-keto-clomazone o 5-ceto-clomazona, que inhibe la desoxixilulosa 5 fosfato sintasa (DXP) lo que resulta en el primer paso del metabolismo del clomazone en plantas, donde dicho herbicida se ve

comprometido en la vía de los isoprenoides, lo que conduce a la biosíntesis del pirofosfato isopentil en los plástidos (Ferhatoglu y Barrett, 2006).

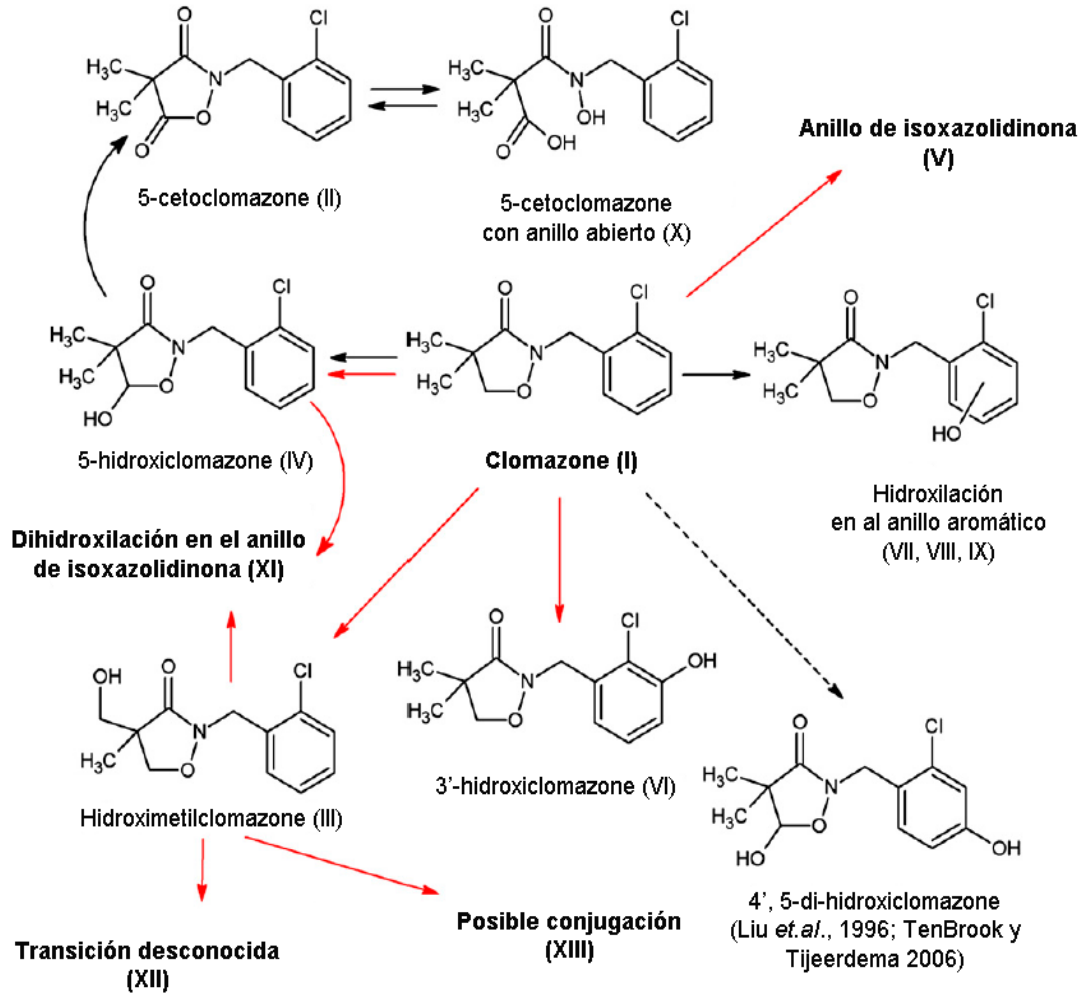
Lo anterior se traduce en problemas del desarrollo del cloroplasto y la pérdida de pigmento en las plantas susceptibles (Duke y Paul, 1986). Cuando los carotenoides están ausentes en las plantas y se exponen a la luz, el oxígeno degrada la clorofila e inicia la peroxidación de los lípidos de membrana (Hess, 2000). El clomazone se absorbe por raíces y brotes emergentes para transportarse por la corriente de transpiración en el xilema (Senseman, 2007).

Existen plantas resistentes a este herbicida, por ejemplo *Echinochloa phyllogon*, que es una maleza abundante en los cultivos de arroz. Dicha maleza se empleó para la realización de un estudio donde se explica el metabolismo del clomazone en plantas resistentes a herbicidas. Al igual que en los estudios anteriores uno de los metabolitos presentes es el 5-ceto-clomazone, que es la forma activa del clomazone. En el trabajo mencionado se encontró que la resistencia de *E. phyllogon* no ha sido causada por la absorción diferencial, traslocación o bioactivación del clomazone inactivo a activo, más bien se sugiere que la degradación de los herbicidas es mediada por las enzimas monooxigenasas conocidas como citocromos P450, ya que se demostró que los biotipos con resistencia a múltiples herbicidas como *E. phyllogon* tienen mayor cantidad o expresión de citocromos P450 que los biotipos sensibles (Yun *et al.*, 2005).

Tabla 4. Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de carotenoides.

Familia química	Nombre común	Nombre comercial	Cultivos
<b>Isoxazolidinonas</b>	Clomazone	Gamit, Command	Soya, algodón
<b>Triazoles</b>	Amitrole	Amitrol	Áreas industriales
<b>Isoxasoles</b>	Isoxaflutole	Balance	Maíz
<b>Tricetonas</b>	Mesotrione Tembotrione	Callisto Laudis	Maíz
<b>Benzolipirazoles</b>	Topramezone	Convey	Maíz
<b>Piridazinonas</b>	Norflurazon	Zorial, solicam	Algodón, soya
<b>Pirrolidona</b>	Flurocloridona	Flurochloridone Racer	Algodón, trigo, papa y girasol

Modificado de INIFAP, 2006



Modificado de Yasour *et al.*, 2010.

Fig.1. Ruta propuesta para la biotransformación del clomazone en *E. phyllogon*. Los números romanos corresponden a los compuestos detectados en el ensayo, las flechas en rojo y negro señalan la acumulación preferencial de los metabolitos en plantas resistentes y susceptibles respectivamente y la flecha punteada indica una transformación del clomazone propuesta por otros autores. Los compuestos VII, VIII y IX son el resultado de la hidroxilación del anillo de aromático. De acuerdo a ElNaggar, 1996; Liu *et al.*, 1996 y TenBrook y Tjeerdema, 2006, todas las transformaciones a excepción de la conversión hidrolítica del compuesto II a X, se presume que son mediadas por los citocromos P450.

## Ensayo SMART

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

El ensayo SMART (por las siglas en inglés: Somatic Mutation and Recombination Test) es una prueba *in vivo* que permite detectar daño genotóxico en las células somáticas de *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.*, 1984).

Este bioensayo hace uso de los marcadores recesivos “multiple wing hairs” (*mwh*) y “flare” (*flr*<sup>3</sup>) ubicados en el cromosoma 3 (3-0.3 y 3-38.8 respectivamente) en individuos transheterocigotos (Graf y Van Schaik, 1992). La mutación *mwh* en condición homocigota produce un cambio en el fenotipo normal de los tricomas del ala que se traduce en la presencia de más de un tricoma por célula (generalmente tres) mientras que la mutación *flr* se caracteriza por la formación de tricomas en forma de “flama” (Lindsley y Zimm, 1992). Dicha prueba mide el potencial de un compuesto químico para inducir la pérdida de la heterocigosis, como resultado de una mutación somática, rearrreglo, ruptura, recombinación mitótica o pérdida cromosómica (Graf *et al.*, 1984).

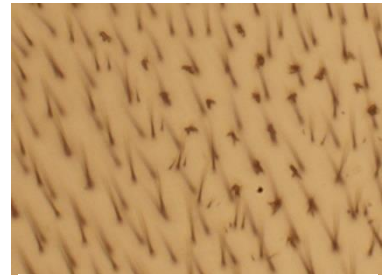
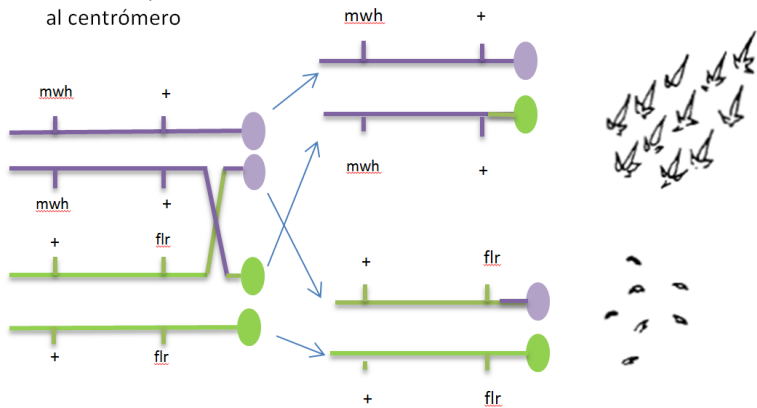
En la versión del ensayo SMART en alas, las larvas transheterocigotas de *Drosophila melanogaster* son expuestas a un tratamiento durante períodos de tiempo diversos que pueden ir de las 96 horas hasta 1 hora, (Graf *et al.*, 1984). De existir un efecto mutagénico y/o recombinogénico por parte del compuesto que se desea evaluar, éste puede producir la pérdida de la heterocigosis y la consecuente expresión de los marcadores *mwh* y *flr*. El resultado es la presencia de clones celulares o “manchas” sobre la superficie de las alas (Graf *et al.*, 1984).

El sistema utilizado en tejido de las alas de *Drosophila* es ventajoso y el objetivo de exponer a las larvas de mosca es determinar si dicho compuesto es capaz de interactuar con el material genético de las mismas, alterando su genotipo mediante los eventos conocidos como mutación puntual, delección, no disyunción y recombinaciones mitóticas como se observa en la tabla 5. La evidencia de dicha interacción se manifiesta fenotípicamente en el cuerpo de moscas adultas con la presencia de clones o células afectadas las cuáles se pueden detectar mediante el uso de marcadores genéticos (Graf *et al.*, 1984).

Tabla 5. Eventos genéticos encontrados en el ensayo SMART empleando los marcadores *flr* y *mwh*

Eventos genéticos presentes en el ensayo SMART		Resultado (Forma de los tricomas)	
Evento			
Normal	<p>Fenotipo normal</p>	<p>Fotografía tomada a 40X</p>	
Delección	<p>Mancha sencilla</p>	<p>Tipo de mancha</p> <p>Fotografía tomada a 40X</p>	
Mutación Puntual	<p>Mancha sencilla</p>	<p>Fotografía tomada a 40X</p>	

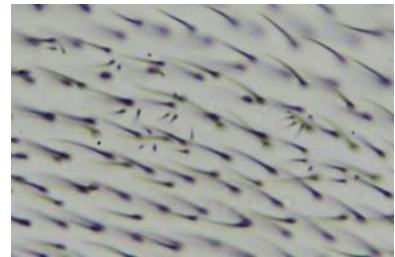
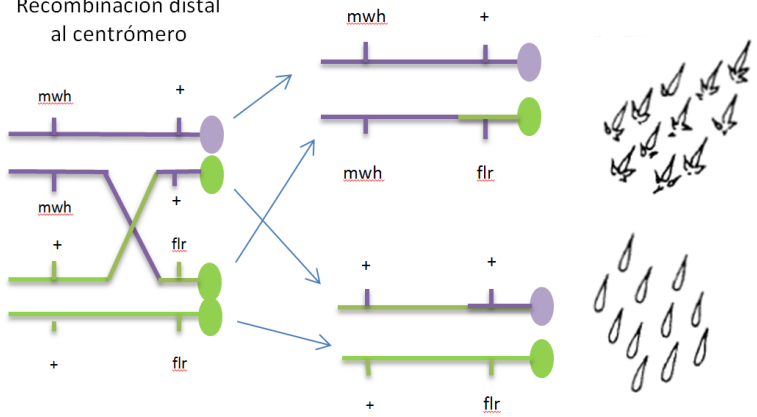
Recombinación proximal al centrómero



Mancha gemela

Fotografía tomada a 40X

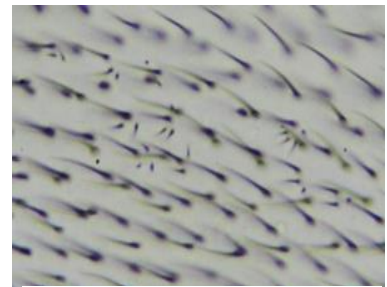
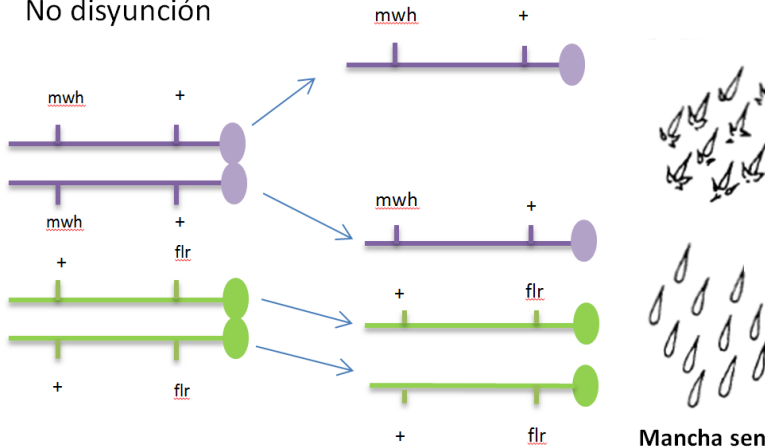
Recombinación distal al centrómero



Mancha sencilla

Fotografía tomada a 40X

No disyunción



Mancha sencilla

Fotografía tomada a 40X

Para el ensayo se emplean cepas de *Drosophila melanogaster*, *flr<sup>3</sup>* (flare), *mwh* (multiple wings hairs) y ORR; *flr<sup>3</sup>*. Los individuos de la cepa *flr<sup>3</sup>* y ORR; *flr<sup>3</sup>* se caracterizan por ser heterocigotos (*flr<sup>3</sup>* / TM3, Bd<sup>s</sup> y ORR /ORR; *flr<sup>3</sup>* / TM3, Bd<sup>s</sup> respectivamente), pues la mutación *flr* en condición homocigota es letal para el individuo. Por esta razón se emplea el balanceador TM3 el cual presenta múltiples inversiones que impiden la recombinación con su cromosoma homólogo. El balanceador TM3 cuenta además con el marcador Bd<sup>ser</sup>, el cual produce un fenotipo de alas con borde aserrado, esto permite seleccionar las moscas que presentan el TM3 (Lindsley y Zimm, 1992).

El ensayo SMART requiere la utilización de la craza estándar (ST) con niveles normales de citocromos P450 (CYPs) (Graf *et al.*, 1989) y la craza de alta bioactivación (HB) con sobreexpresión constitutiva de los citocromos P450 (Frölich y Würigler, 1989; Graf y Van Schaik, 1992). La craza ST se obtiene de cruzar hembras *flr<sup>3</sup>* con machos *mwh*, mientras que la craza HB es el resultado de la craza entre hembras ORR; *flr<sup>3</sup>* con machos *mwh*. Esta última craza es altamente sensible a procarcinógenos y promutágenos debido a que la cepa empleada (ORR /ORR; *flr<sup>3</sup>* / TM3, Bd<sup>s</sup>) tiene los cromosomas 1 y 2 de una línea Oregon R (R) resistente a DDT y presenta una sobreexpresión de CYP6A2 que es debida a una mutación en el gen regulador de citocromos P450 Rst(2)DDT (Graf y Van Schaik, 1992; Lindsley y Zimm, 1992; Saner *et al.*, 1996). La actividad de CYP6A2 en la craza HB es siempre mayor que en la craza ST y puede estar sujeto a variación dependiendo de la presencia de distintos xenobióticos (Vázquez-Gómez *et al.*, 2010). La craza HB mejora la sensibilidad del ensayo SMART para el caso de promutágenos que requieren ser activados por los citocromos P450.

### ***Drosophila melanogaster***

La comprensión de los mecanismos tóxicos se basa en la identificación de genes y sus productos (por ejemplo, ADN genómico, transcripciones, proteínas, ARNm, entre otros) que en ocasiones experimentan la interrupción de sus funciones por los xenobióticos los cuales se encuentran altamente distribuidos en nuestro mundo. Igualmente es indispensable la caracterización de los mismos genes y sus productos, que actúan en defensa de diversos compuestos tóxicos, por lo tanto, la comprensión y desarrollo de los modelos animales simples no mamíferos es indispensable.

El nematodo (*Caenorhabditis elegans*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y el pez cebra (*Danio rerio*) son los modelos alternativos predominantes que se han mantenido a través de la revolución genómica y post-genómica ya que cuentan con muchas ventajas sobre otros modelos biológicos (Rand, 2010).



El uso de *Drosophila melanogaster* en el régimen moderno de las pruebas toxicológicas es amplio debido a sus atributos únicos y destacados los cuales son: su fácil manipulación genética, facilidad para detectar fenotipos, bajos costos de laboratorio y su alta eficiencia cuando se emplea en métodos de detección y conservación de organismos (Rand, 2010).

*Drosophila melanogaster* es un organismo holometábolo, éste pasa por todos los estadios de desarrollo de un insecto, los cuales consisten en: huevo, larva, pupa y adulto o imago como se muestra en la Fig. 2 (Rodríguez-Arnaíz *et al.*, 2005).

Al ser un insecto, *Drosophila melanogaster* presenta tres tagmas, que son: cabeza, tórax y abdomen; los cuales están cubiertos por un exoesqueleto. También presenta un par de antenas, tres patas y un solo par de alas funcionales, halterios y balancines que representan órganos de equilibrio y éstos se han transformado a partir de su segundo par de alas. Sus alas son distintivas puesto que cuentan con cerdas y venaciones características (Meigen, 1930). El tamaño del adulto es aproximadamente de 3mm (Ruiz-Esparza, 2006) y presenta dimorfismo sexual (Demerec y Kaufman, 1962).

Bajo condiciones de cultivo estándar a 25°C el tiempo de generación desde huevo a adulto es de 12 a 14 días y su ciclo de vida se compone de 4 etapas distintas. Cada una de estas etapas representa una oportunidad para evaluar la susceptibilidad a los xenobióticos (Rand, 2010).

El embrión se desarrolla en un periodo aproximado de 24 horas a 25°C, durante este tiempo se da la neurogénesis y la diferenciación dentro de las regiones discretas del neuroectodermo ventral que dan lugar a un sistema nervioso que funcione plenamente y es capaz de ejecutar las conductas motoras y sensoriales incluyendo el forrajeo, la quimio y fototaxis que son vitales para el siguiente estadio que es, la larva. La etapa larval progresa durante cuatro días y se caracteriza por un periodo de crecimiento marcado por dos mudas que resulta en el aumento de 10 veces el tamaño corporal (Rand, 2010). Este periodo consta de 3 estadios L1 (larvas de primer estadio), L2 (larvas de segundo estadio) y L3 (larvas de tercer estadio). Después de 48 h en la L3 se da paso a la pupa, en este periodo las moscas invierten 120h para finalmente eclosionar y transformarse en una mosca adulta o imago (Demerec y Kaufman, 1962).

La mosca adulta recién eclosionada adquirirá rápidamente conductas características de vuelo, quimio, foto y geotaxis, forrajeo y apareamiento. El adulto se compone de grandes lóbulos ópticos bilaterales, un cerebro central que consiste en ganglios supra y subfageal, un gran nervio conectivo cervical (Truman *et al.*, 1993), circuitos de control visual (Ting y Lee, 2007), sistema olfativo (Hallen

y Carlson, 2004), sistema mecanosensorial (Kernan, 2007), órganos periféricos (ojos, antenas, cerdas y palpos maxilares) (Stocker, 1994).

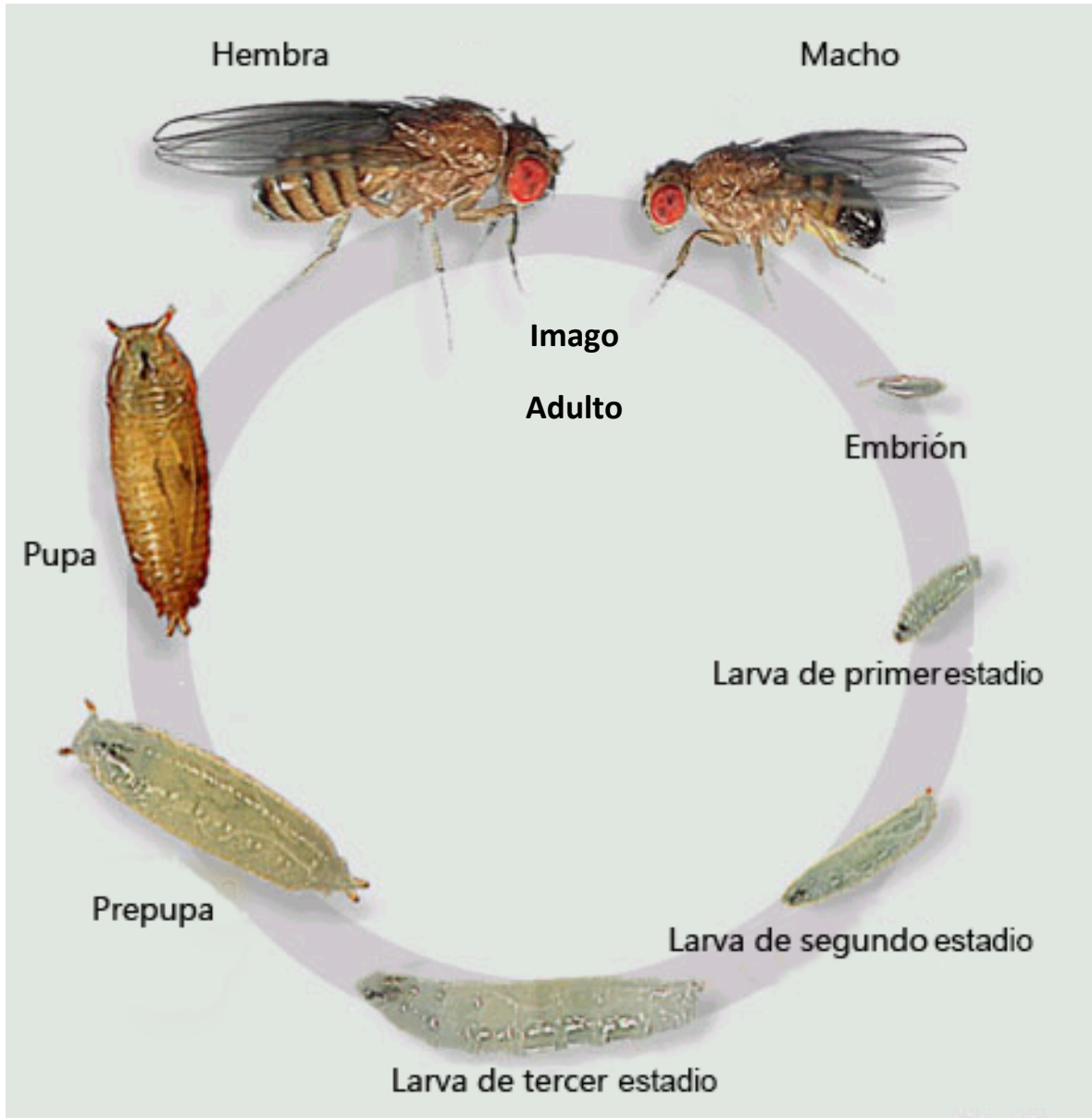


Fig. 2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

## Metabolismo de xenobióticos

Un xenobiótico (compuesto extraño al metabolismo) es cualquier compuesto químico que puede ser hallado en un organismo sin que sea producido por este último (por ejemplo: plaguicidas y medicamentos). Un xenobiótico pasa por una serie de procesos químicos y fisiológicos al interior de un organismo a través de la absorción, distribución, biotransformación y finalmente la excreción del compuesto. La mayoría de los xenobióticos que ingresan al organismo son lipofílicos. Por otro lado, el sistema excretor de los organismos requiere cierto grado de hidrofiliidad del compuesto para una excreción eficiente de éste, por lo tanto. Los organismos han desarrollado ciertos procesos bioquímicos que convierten los compuestos lipofílicos en una versión hidrofílica que permita su excreción (Dekant, 2009).

Las consecuencias biológicas producidas por un xenobiótico como son la intensidad y duración de los efectos tóxicos dependerán de las características particulares del sistema biológico al que se le administró la dosis. Estos efectos tienen una fuerte relación con el sitio activo con el cuál interactúa el xenobiótico y la misma dosis del químico administrada por diferentes rutas puede causar diferentes efectos tóxicos, los cuales involucran una serie de pasos complejos que pueden ser explicados por la toxicocinética (Dekant, 2009).

La mayoría de los xenobióticos que ingresan al organismo son lipofílicos, dicha propiedad les permite penetrar más fácilmente las membranas celulares lipídicas además de ser transportados y absorbidos por el órgano blanco (Dekant, 2009).

La estructura química de una sustancia y su actividad biológica se encuentran relacionadas, es decir, la relación estructura-actividad determina directamente las propiedades fisicoquímicas, algunas de las cuales son responsables de la actividad biológica (Djuric', 1998).

La absorción de tóxicos o rutas de exposición tiene 4 principales vías de entrada al organismo y son:

1. Inhalación.
2. Ingestión.
3. Penetración dérmica o percutánea
4. Contacto sanguíneo o linfa.

La retención de un tóxico en un determinado compartimento es por lo general temporal, y puede redistribuirse a otros tejidos. La retención y la acumulación se basan en la diferencia entre las velocidades de absorción y eliminación. La

duración de la retención en un compartimento se expresa mediante la vida media biológica, que es el tiempo que tarda en reducirse a un 50% la cantidad de tóxico presente en el tejido u órgano. Durante la distribución y la retención en diversos órganos y tejidos tienen lugar procesos de biotransformación. Ésta produce metabolitos más polares y más hidrofílicos, que se eliminan con más facilidad, una velocidad de biotransformación baja de un tóxico por lo general tiene como consecuencia su acumulación en un compartimento (Djuric', 1998).

La disposición de un xenobiótico consiste en su absorción, distribución, biotransformación y excreción. Un mecanismo de excreción eficiente requiere de un cierto grado de hidrofiliidad, por consiguiente los organismos desarrollan numerosos procesos químicos para convertir químicos lipófilos a químicos hidrófilos, este proceso enzimático en términos biológicos es conocido como biotransformación (Dekant, 2009).

R. Williams en 1959 introdujo la clasificación del metabolismo de xenobióticos en su libro titulado "Mecanismos de desintoxicación" donde nombró la fase I y la fase II como base de dicha clasificación (Macherey y Danset, 2008).

La biotransformación de xenobióticos es catalizada por varios sistemas enzimáticos y éstos pueden ser divididos en 4 categorías, basados en la reacción que catalizan: 1) hidrólisis (carboxilesterasas), 2) reducción (carbonil reductasa), 3) oxidación (citocromos P450) 4) conjugación (UDP-glucuroniltransferasa). Las reacciones de conjugación incluyen la glucoronidación, sulfonación, acetilación, metilación, conjugación con glutatión y conjugación con aminoácidos (Parkinson y Ogilvie, 2008).

## **Citocromos P450**

El sistema de monooxigenasas conocido como citocromo P450 (CYP450) es un grupo de proteínas que presentan un grupo hemo, se caracterizan por utilizar el NADPH o NADP<sup>+</sup> para reducir el oxígeno molecular, hasta H<sub>2</sub>O y la incorporación de un átomo de O<sub>2</sub> al sustrato. Los CYP450 poseen una masa molecular entre 45 y 62 kD y tiene a la hemo-ferritoproteoporfirina IX como grupo prostético. Estas proteínas se caracterizan por tener un espectro de absorbancia máxima de 450 nm debido a la reducción de los enlaces de la hemoproteína (Fe<sup>+2</sup>) y la unión con una molécula de monóxido de carbono (Omura y Sato, 1964; González-Mendoza, 2007).

La diversidad de los citocromos P450 está muy bien establecida en términos tanto de las reacciones que catalizan, como de la diversidad de sustratos sobre los cuales actúan. Estas enzimas también se requieren para la supervivencia de los organismos ya que contribuyen a la inactivación de muchos compuestos tóxicos. Un efecto dual en el metabolismo de los compuesto xenobióticos es la activación de diversos promutágenos (Jimenez y Merchat, 2003).

El ciclo catalítico general mediado por estas enzimas, es el siguiente: 1) Formación del complejo P450-sustrato. 2) Formación del complejo P450-reductasa. 3) Unión de un átomo de oxígeno molecular. 4) Reducción del complejo oxidoferroso. 5) Rearreglo intramolecular. 6) Oxidación del sustrato. 7) Disociación del complejo citocromo P450-sustrato (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

El sistema P450 interviene en diferentes rutas metabólicas y tiene al menos tres tipos de actividad: 1) Actividad de monooxigenasa, 2) Actividad de oxidasa y 3) Actividad de reductasa.

Los citocromos P450 se localizan tanto en retículo endoplásmico como en las mitocondrias. En los vertebrados se encuentran en cantidades más elevadas en el hígado, intestino, pulmones, riñón, ovarios, testículos, glándulas suprarrenales y placenta. En los insectos, las monooxigenasas se encuentran en los cuerpos grasos pericuticulares, en el intestino medio y en los tubos de Malpigi (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

Los sustratos con los cuales interaccionan los citocromos pueden modificar las propiedades espectrales de los mismos: Tipo I picos entre 390 y 420 nm. Tipo II entre los 410 y 430 nm y Tipo III entre los 430 y 455 nm. Se ha demostrado que esta magnitud en los picos de absorción es dependiente de pH. La enzima P450 puede catalizar diferentes tipos de reacciones, su función es altamente específica y su expresión está regulada durante el desarrollo. Los citocromos que pertenecen a la familia 4 hidroxilan los ácidos grasos y prostaglandinas. Por otro lado los citocromos P450 son clave en la desintoxicación de sustratos exógenos (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

## **Los citocromos P450 en los insectos**

En los insectos, los citocromos P450 están involucrados en el crecimiento y en el desarrollo a través del procesamiento de ácidos grasos, hormonas y feromonas; catalizan también un amplio rango de reacciones enzimáticas de una gran diversidad de compuestos exógenos, tales como la biotransformación de productos químicos sintéticos como los insecticidas (Feyereisen, 1995). Los citocromos P450 se expresan en las larvas en el tubo digestivo, en los cuerpos

grasos pericuticulares, en el aparato reproductor y en los tubos de Malpighi en los adultos.

En los insectos se han identificado diversas secuencias que codifican para los citocromos P450. Los genes P450 pertenecen a 25 familias, cinco de las cuales están presentes en lepidópteros, coleópteros, himenópteros, ortópteros e isópteros. Se han identificado 90 genes de la superfamilia de los citocromos p450 en el genoma de *Drosophila melanogaster* de los cuales 7 son pseudogenes (Tijet *et al.*, 2001).

El número de CYPs entre especies de insectos puede variar, por ejemplo, se conoce que existen aproximadamente 56 genes en *Apis mellifera*, 183 en *Aedes aegypti* (Pfam: EBI, 2015) y 90-113 en *Drosophila melanogaster* (Ffrench-Constant, 2004 y Pfam: EBI, 2015)

Se ha demostrado que ciertos mecanismos de resistencia a insecticidas están asociados con uno o más enzimas involucradas con la desintoxicación de xenobióticos tales como los CYPs, esterasas y glutatión-S-transferasas (Niu *et al.*, 2011). Un ejemplo de lo anterior es la línea RDDT<sup>R</sup> de *Drosophila melanogaster*, la cual es resistente a DDT y presenta 40 veces más cantidad de CYP6A2 que la cepa susceptible (Burn *et al.*, 1996).

## Justificación

En vista de que numerosos herbicidas son ampliamente utilizados en la industria agrícola y de que éstos pueden actuar como agentes genotóxicos en sistemas animales incluyendo al ser humano, dichos herbicidas representan una gran amenaza para la salud de la población. El clomazone es un herbicida autorizado en México para su uso en cultivos de arroz, calabaza, calabacita, pepino, sandía, melón, chile, caña de azúcar entre otros, sin embargo, los estudios sobre su genotoxicidad son escasos y no se cuenta con información suficiente al respecto. Teniendo como referencia los pocos estudios sobre la genotoxicidad del clomazone en este trabajo se evaluará su potencial genotóxico.

## Objetivos

### Objetivo general:

-Valorar el efecto genotóxico del herbicida clomazone mediante el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) en las alas de *Drosophila melanogaster*.

### Objetivos particulares:

-Determinar la toxicidad del clomazone y establecer la  $CL_{50}$  para *Drosophila melanogaster*.

-Determinar si el posible efecto genotóxico del clomazone es dependiente de un proceso de bioactivación empleando las cruces ST y HB en el ensayo SMART.

## Hipótesis

Si el herbicida clomazone (en su versión comercial) es un agente genotóxico ocasionará la pérdida de la heterocigosis y como resultado producirá un aumento en la frecuencia y tipo de manchas observadas en el ensayo de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en las alas de *Drosophila melanogaster* en una proporción significativamente distinta a la del testigo negativo.

## **Materiales y Métodos**

### **Compuestos químicos**

Clomazone (Command® 3ME 36% No. CAS: 81777-89-1) obtenido de la tienda de agroquímicos “Agroinsumos el Galeón” ubicada en Xochimilco, México D.F. Mitomicina C (Sigma-Aldrich No. CAS: 50-07-7).

### **Concentración letal media CL<sub>50</sub>**

Se determinó la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) en *Drosophila melanogaster* para el herbicida clomazone y posteriormente se establecieron las concentraciones que serían utilizadas en el ensayo SMARTI. Inicialmente se probaron seis concentraciones para encontrar la CL<sub>50</sub> del herbicida clomazone en su versión comercial (Command® 3ME). Dichas concentraciones fueron: 1%, 3%, 6%, 10% y 20% incluyendo al solvente como control negativo (agua destilada). Se prepararon soluciones de cada concentración.

A cada vial se le añadió 0.5 g de medio instantáneo Carolina® y 2ml de cada solución. Se hicieron 5 réplicas por cada concentración.

Se aislaron machos jóvenes de la cepa *flr*<sup>3</sup> y se colocaron 10 de ellos en cada uno de los viales.

Se realizó un conteo de mortalidad (cuantas moscas muertas hubo en cada vial) a las 24, 48 y 72 horas, después se obtuvieron los promedios de mortalidad por cada concentración y finalmente se calculó la CL<sub>50</sub> usando una regresión polinómica.

### **Cruzas**

Para la obtención de individuos transheterocigotos para los marcadores *mwh* y *flr* se realizó una cruce entre hembras vírgenes de la cepa *flr*<sup>3</sup> y la cepa *ORR-flr*<sup>3</sup>/*TM3*, dichas hembras se cruzaron con machos de la cepa *mwh* para obtener la cruce ST y HB respectivamente. Las moscas se mantuvieron en medio de cultivo a base de sacarosa y levadura durante 6 horas para obtener los huevos que se producen de ambas cruces. Se retiró a los progenitores de los frascos quedando solamente los huevos y tres días después, las larvas de tercer estadio (72 ± 3 horas) se extrajeron de los viales con ayuda de una solución de sacarosa al 20% y se lavaron con agua corriente empleando una malla fina de nylon.



## El ensayo SMART

Las concentraciones de clomazone usadas para el ensayo SMART fueron 2.5%, 5% y 10%. Se prepararon 5 viales por cada concentración con 0.5 g de medio instantáneo Carolina® y 2 ml de cada solución. Se empleó agua destilada para el testigo negativo y mitomicina C [0.15 mM] para el testigo positivo. Posteriormente se añadieron las larvas provenientes de ambas cruzas en proporciones iguales en cada vial. Los viales fueron guardados a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  y 60 – 80% de humedad relativa hasta que emergieron los adultos. Las moscas adultas se colectaron y se almacenaron en una solución de alcohol etílico al 70%.

Las alas de las moscas trans-heterocigotas *mwh + / + flr<sup>3</sup>* con fenotipo silvestre fueron dispuestas en proporción 1:1 (10 hembras y 10 machos, 3 laminillas por concentración) sobre un portaobjetos y observadas en el microscopio óptico a 40x de aumento. Se registró la frecuencia de cada tipo de mancha y la frecuencia total de manchas/clones por concentración, estos datos fueron ingresados en el software SMART v2.1 basado en la prueba Kastenbaum – Bowman ( $p = 0.05$ ) (Frei y Würgler, 1988), además se realizaron comparaciones por parejas contra el control negativo mediante pruebas no paramétricas de U de Mann – Whitney (Frei y Würgler, 1995).

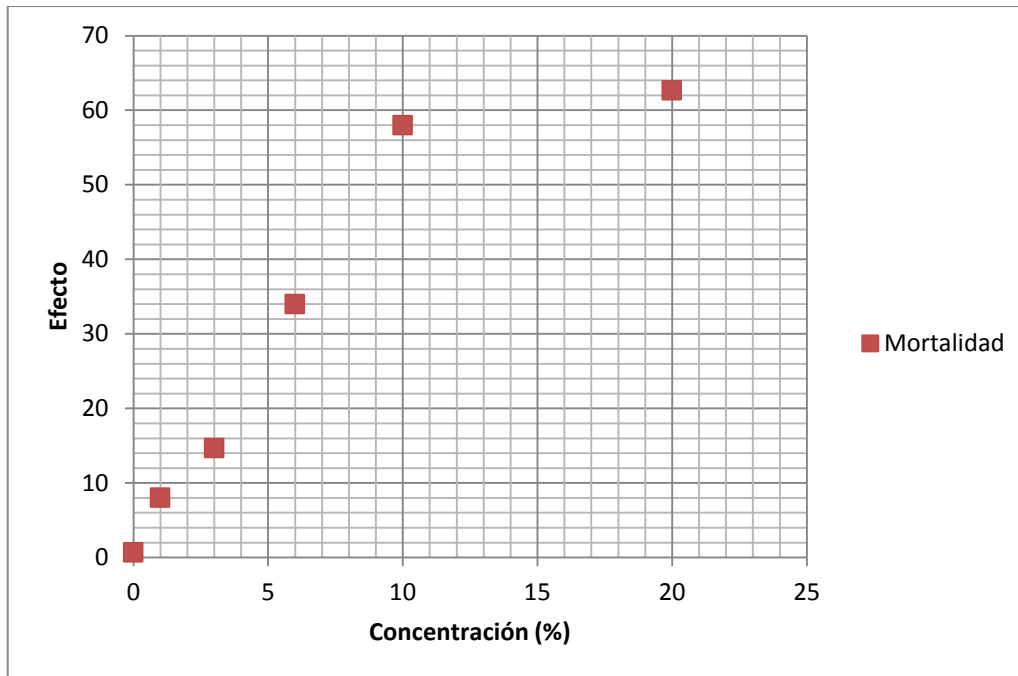
## Resultados

### Resultados de la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) para el herbicida clomazone.

En la tabla 6 y gráfica 1 se muestran los datos de mortalidad de las moscas durante las 72 horas que fueron sometidas al tratamiento con clomazone para determinar la CL<sub>50</sub>, también se muestran los promedios de mortalidad generales por cada concentración.

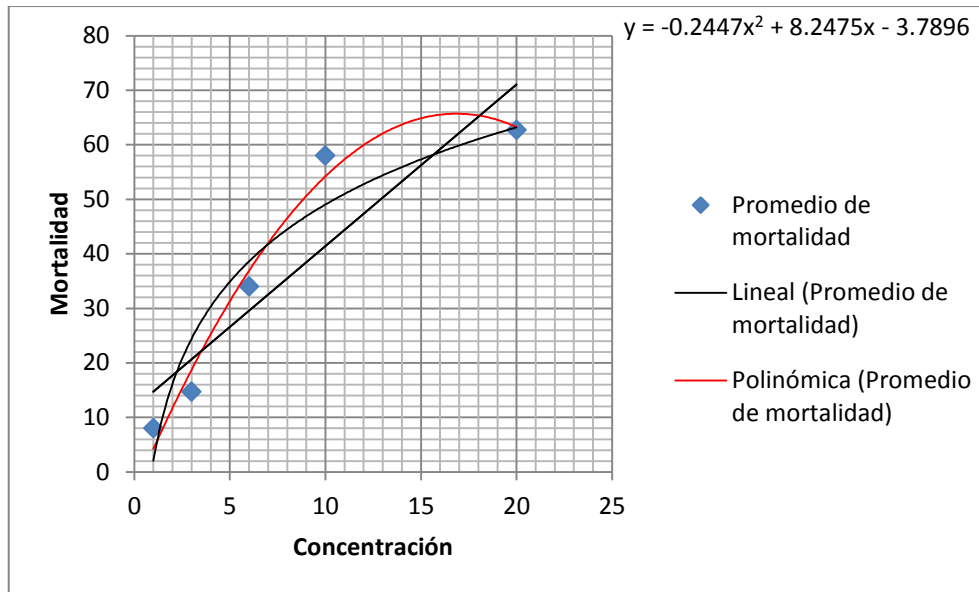
Tabla 6. Mortalidad de moscas para cada concentración.

Concentración (%)	Mortalidad 24 h	Mortalidad 48 h	Mortalidad 72 h	Promedio General de Mortalidad (%)
0	0	0	2	0.6666
1	0	2	22	8
3	0	10	34	14.6667
6	2	30	70	34
10	8	68	98	58
20	0	94	94	62.6667

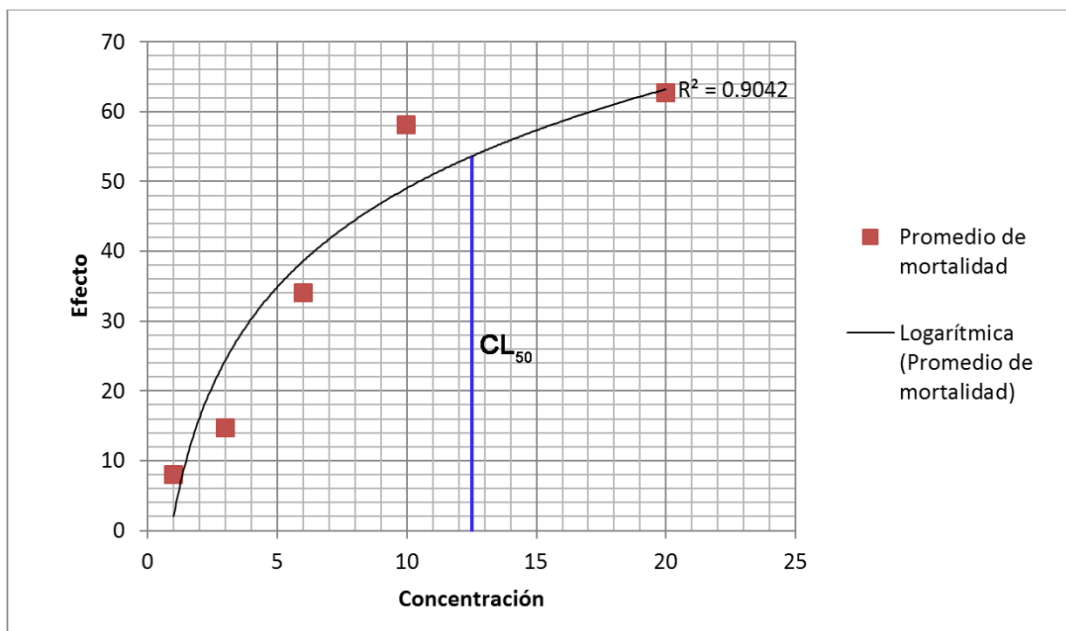


Gráfica 1. Concentración efecto. Se muestra graficado el promedio de mortalidad correspondiente para cada una de las concentraciones utilizadas (0%,1%, 3%, 6%, 10% y 20%).

De acuerdo al promedio de mortalidad de las moscas se obtuvo la  $CL_{50}$ . En las gráficas 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos mediante el método lineal donde la concentración letal media fue de 13% con un coeficiente de correlación  $R=0.8465$ , mediante el método logarítmico se obtuvo un valor de 10.5% y un coeficiente de correlación  $R=0.9042$ , por el método polinómico el valor fue de 9% y coeficiente de correlación de  $R= 0.9816$ , dichos valores se observan en las gráficas siguientes:



Gráfica 2. Regresión lineal y polinómica. Los puntos en azul muestran los promedios generales de mortalidad en las moscas por cada concentración establecida. La línea continua en negro muestra la regresión lineal mientras que la línea continua en rojo muestra la regresión polinómica. Ambas regresiones están calculadas en base a los promedios generales de mortalidad para su concentración correspondiente.



Gráfica 3. Regresión logarítmica. Los puntos en azul muestran los promedios generales de mortalidad en las moscas por cada concentración establecida y la línea en color negro muestra la regresión logarítmica.

A partir de la  $CL_{50}$  del herbicida Clomazone se establecieron 3 concentraciones que son 2.5%, 5% y 10%, dichas concentraciones se emplearon para la evaluación genotóxica mediante el ensayo SMART.

## **Resultados del ensayo SMART**

### **Cruza estándar (standar ST)**

Para la cruza ST encontramos que el clomazone resultó positivo para manchas pequeñas y manchas totales en las concentraciones 5% y 10%. Dichos resultados se muestran en la tabla 7.

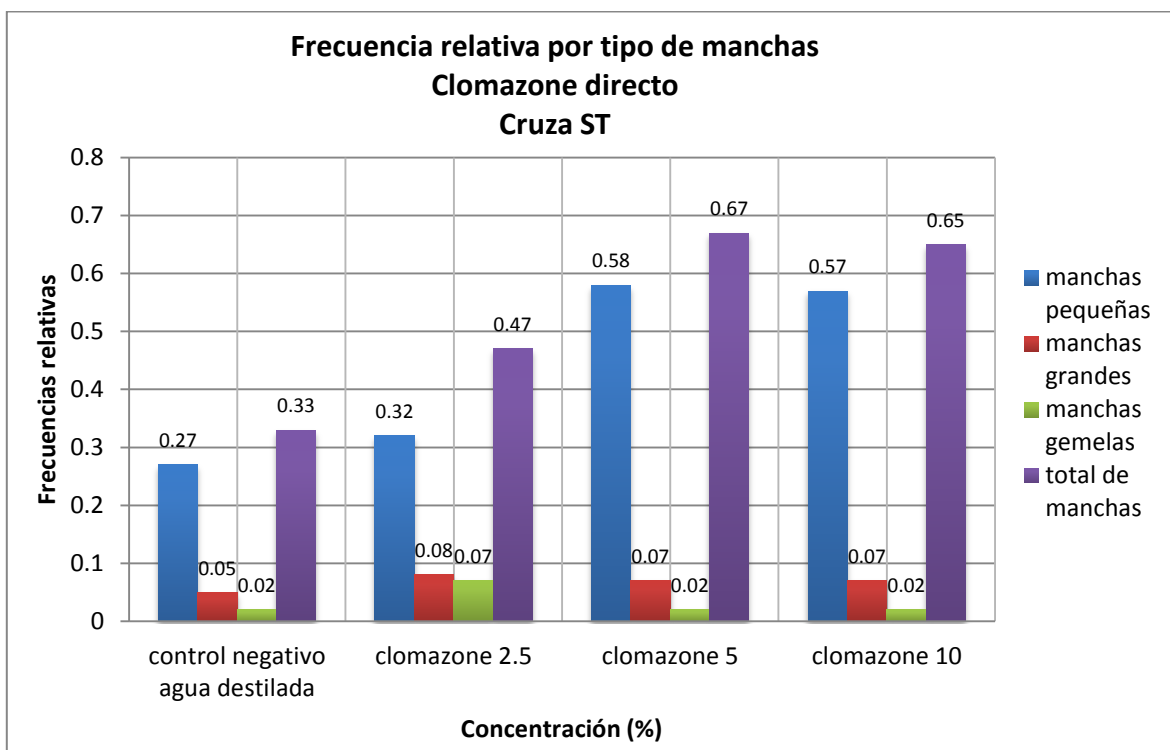
En la evaluación de la frecuencia de manchas por mosca se muestran resultados inconcluyentes, que corresponden a los grupos de manchas pequeñas simples, manchas totales y manchas grandes simples para la concentración 2.5% del tratamiento con clomazone.

En las concentraciones 5% y 10% del tratamiento con clomazone los resultados inconcluyentes corresponden al grupo de manchas grandes simples. De igual manera se encontró inconcluyente el resultado en el grupo de manchas gemelas para todas las concentraciones (2.5%, 5% y 10%) del tratamiento con clomazone para la cruza ST (tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia y número de manchas por mosca obtenidas en el ensayo SMART en las alas de *Drosophila melanogaster* para la cruza ST.

Compuesto/ concentración	Número de moscas	Frecuencia de manchas por mosca (Número de manchas)			Total de manchas	Manchas Con clon mwh	Media por Ciclo de División celular
		Manchas Pequeñas simples (1-2 células) m=2	Manchas Grandes Simples (> 2 células) m=5	Manchas Gemelas m=5			
Control Negativo H <sub>2</sub> O	60	0.27(16)	0.05(3)	0.02(1)	0.33(20)	19	1.58
Control Positivo MMC 0.15mM	6	45.50(273)+	18.17(109)+	4.17(25)+	67.83(407)+	405	2.14
Clomazone 2.5%	60	0.32(19)i	0.08(4)i	0.07(4)i	0.47(28)i	28	2.00
Clomazone 5%	60	0.58(35)+	0.07(4)i	0.02(1)i	0.67(40)+	38	1.63
Clomazone 10%	60	0.57(34)+	0.07(4)i	0.02(1)i	0.65(39)+	39	1.64

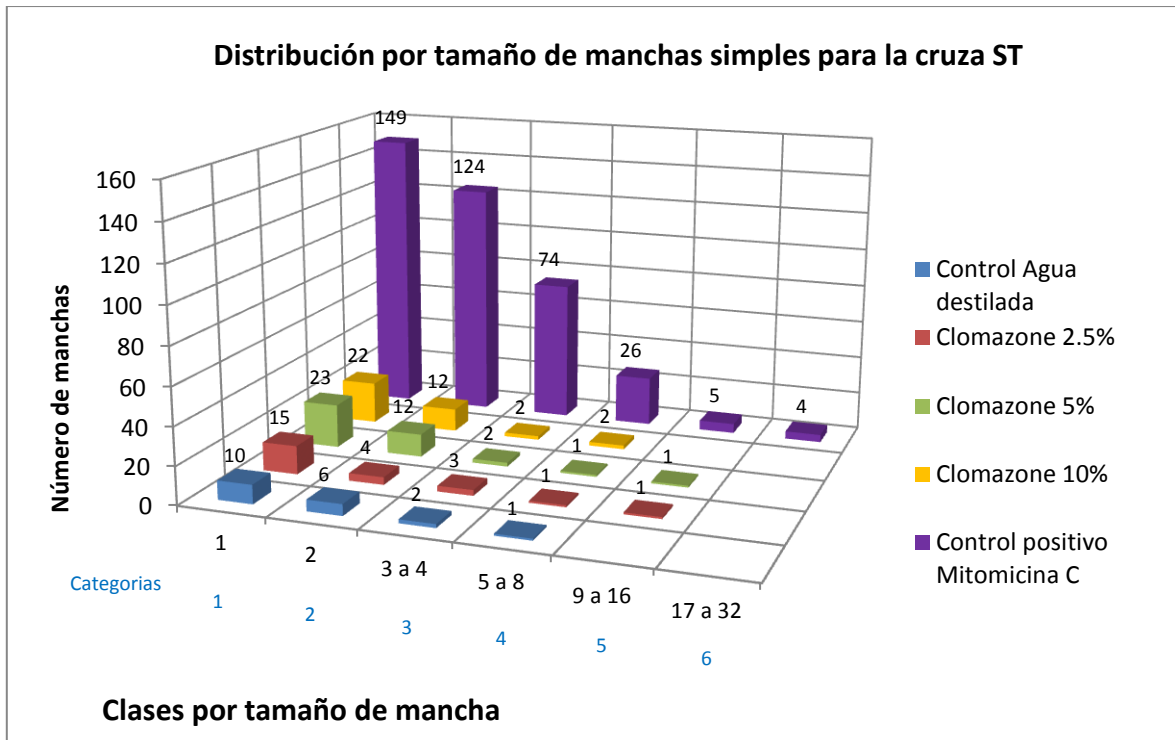
Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler (1988): (+) positivo, (-) negativo, (i) inconcluyente. Nivel de probabilidad  $\alpha=0.05$ .



Gráfica 4. Frecuencias relativas de manchas por tipo obtenidas del ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster* administrado de manera directa utilizando la cruza estándar ST.

El número total de manchas registrado indica que hay diferencias estadísticamente significativas puesto que los resultados son positivos para las concentraciones 5% y 10%. Esto indica que el clomazone presenta un efecto genotóxico en ambas concentraciones para la cruza estándar. En la gráfica 4 se observan las frecuencias relativas por tipo de manchas (manchas pequeñas, manchas grandes, manchas gemelas, total de manchas) para cada una de las concentraciones evaluadas donde se puede ver el comportamiento ascendente de las frecuencias de manchas pequeñas y total de manchas con respecto al aumento de concentración, es decir, entre más elevada sea la concentración mayor es la frecuencia reportada por categoría de manchas.

En la siguiente gráfica (gráfica 5) se muestra la distribución de manchas por tamaño donde el mayor número de manchas recae en las categorías 1 y 2 para todas las concentraciones.

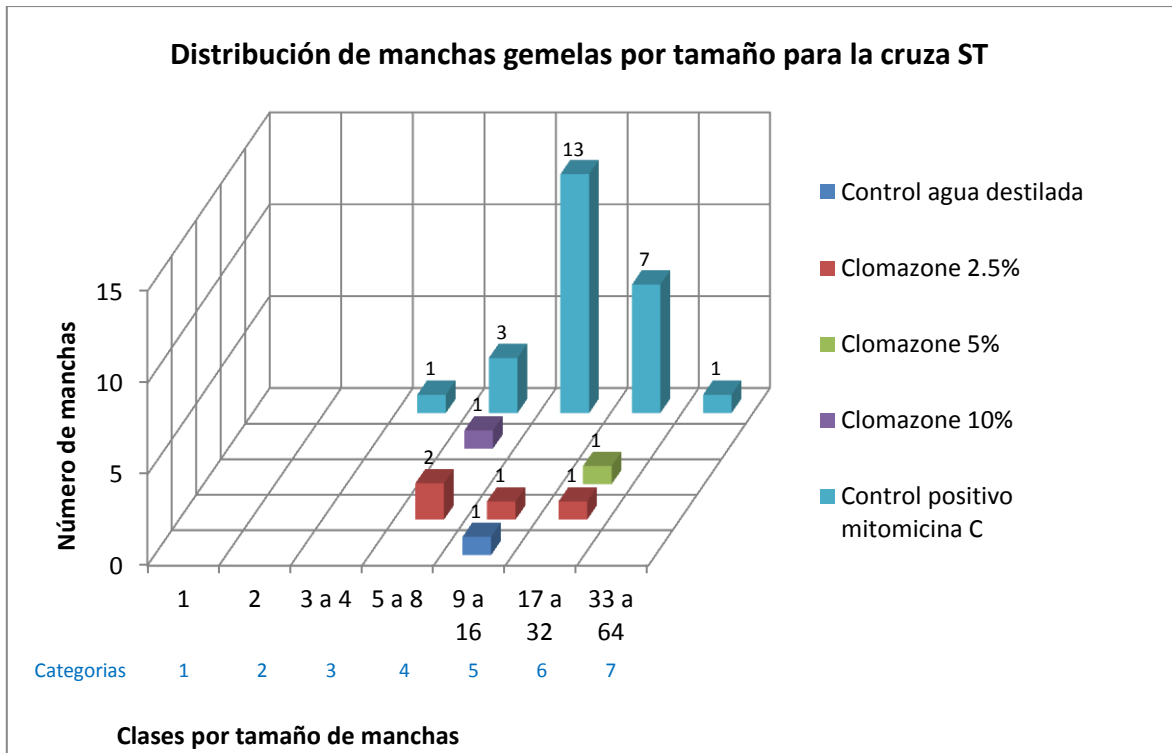


Grafica 5. Distribución de manchas en clases por tamaño para las diferentes concentraciones empleando la cruz ST.

En la gráfica 5 se muestra la distribución de manchas *mwh* observadas para cada concentración dependiendo de su tamaño. Para la cruz ST se contemplan 6 categorías (1=1 célula afectada, 2=2 células afectadas, 3=3-4 células afectadas, 4=5-8 células afectadas, 5=9-16 células afectadas y 6=17-32 células afectadas) basadas en el número de divisiones celulares ( $2^n$ ) y designadas por el número de células que expresan la mutación *mwh*.

Para todas las concentraciones del tratamiento con clomazone (2.5%, 5%, y 10%) incluyendo los controles, negativo (agua destilada, H<sub>2</sub>O) y positivo (MMC, [0.15 mM]); la mayor presencia de manchas se encuentra en las categorías 1 y 2 que de acuerdo al número de divisiones celulares corresponde a 1 o 2 células afectadas. En cuanto a las concentraciones del tratamiento con clomazone correspondiente a la concentración 2.5% tenemos que en la categoría 1 hay un total de 15 manchas *mwh*, en la 2 hay 4 manchas *mwh*, en la 3 hay 3 manchas *mwh*, en la 4 y 5 hay solo 1 mancha y finalmente en la categoría 6 no hay clones *mwh*.





Gráfica 6. Distribución de manchas gemelas por tamaño para la cruz ST.

Para la distribución de manchas gemelas en la cruz ST se contemplan 7 basadas en el número de divisiones celulares ( $2^n$ ) y designadas por el número de células que expresan la mutación *mwh* y *flr*<sup>3</sup>.

En la gráfica 6 se muestra la distribución de las manchas gemelas para todas las concentraciones del tratamiento con clomazone incluyendo los controles negativo y positivo, utilizando la cruz ST. En dicha gráfica se observa que en el caso del control negativo y las concentraciones 5% y 10% solo se registró una mancha gemela, en las categorías 5, 6 y 7; mientras que para la concentración 2.5% tenemos un total de 4 manchas gemelas registradas en las categorías 4, 5 y 6. Todo lo anterior en comparación con el control positivo (MMC [0.15 Mm]) no es significativo ya que para este control encontramos un total de 25 manchas gemelas distribuidas en las categorías de 3 a 7.

### **Cruza de alta bioactivación (High bioactivation HB).**

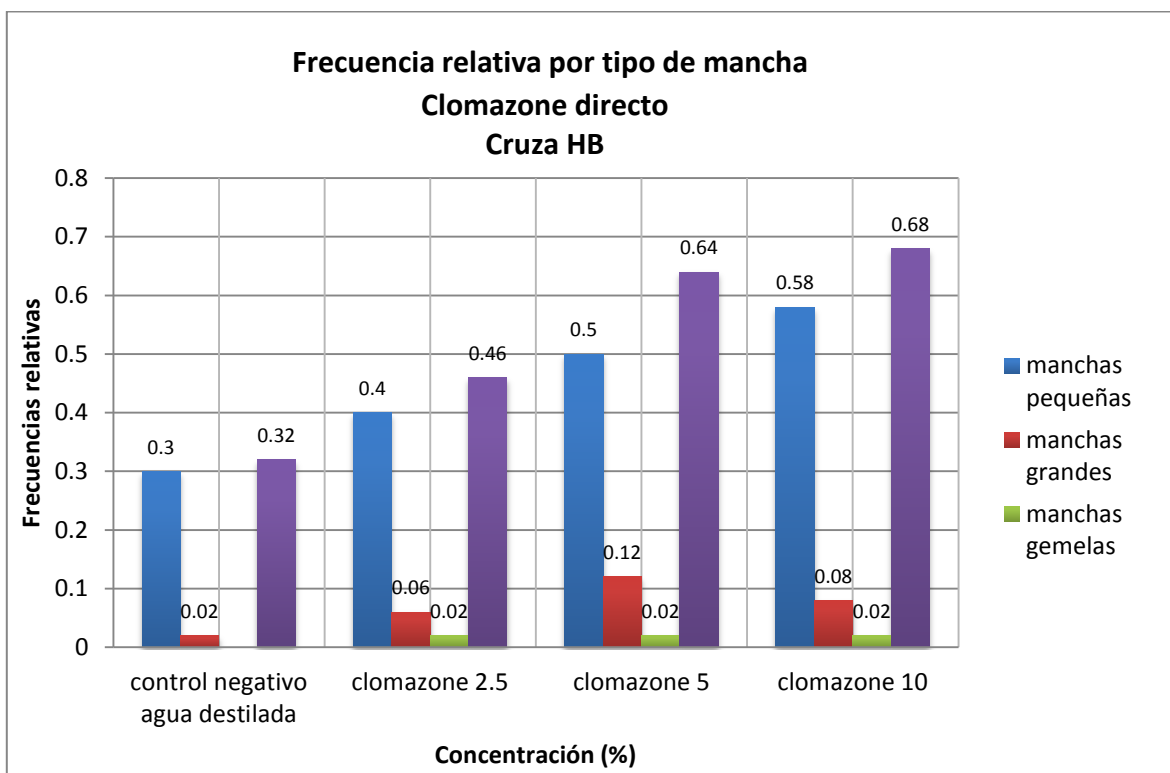
Para la cruce HB encontramos que el clomazone es positivo en la categoría de manchas pequeñas para la concentración de 10%, en la categoría de manchas grandes para la concentración 5% y manchas totales para ambas concentraciones. Dichos resultados se muestran en la tabla 8, las frecuencias de manchas fueron obtenidas a partir del ensayo SMART en las alas de moscas transheterocigotas adultas.

En cuanto a la frecuencia de manchas por mosca en todas sus categorías se muestran resultados inconcluyentes los cuales corresponde a: Manchas pequeñas simples en la concentración 2.5% y 5%, manchas grandes simples para las concentraciones 2.5% y 10%, manchas gemelas para todas las concentraciones y por último para manchas totales en la concentración 2.5%.

Tabla 8. Frecuencia y número de manchas por mosca obtenidas en el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster* para la cruce HB.

Compuesto/ concentración	Número De moscas	Frecuencia de manchas por mosca (Número de manchas)			Total de manchas	Manchas con clon <i>mwh</i>	Media por Ciclo de División celular
		Manchas Pequeñas simples (1-2 células) m=2	Manchas Grandes Simples (> 2 células) m=5	Manchas Gemelas m=5			
Control Negativo H <sub>2</sub> O	60	0.30(18)	0.02(1)	0.00(0)	0.32(19)	19	1.32
Control Positivo MMC 0.15mM	6	57.50(345)+	22.00(132)+	3.83(123)+	83.33(500)+	490	2.02
Clomazone 2.5%	60	0.40(24)i	0.06(3)i	0.02(1)i	0.46(28)i	28	1.82
Clomazone 5%	60	0.50(30)i	0.12(7)+	0.02(1)i	0.64(38)+	38	1.92
Clomazone 10%	60	0.58(35)+	0.08(5)i	0.02(1)i	0.68(41)+	39	1.67

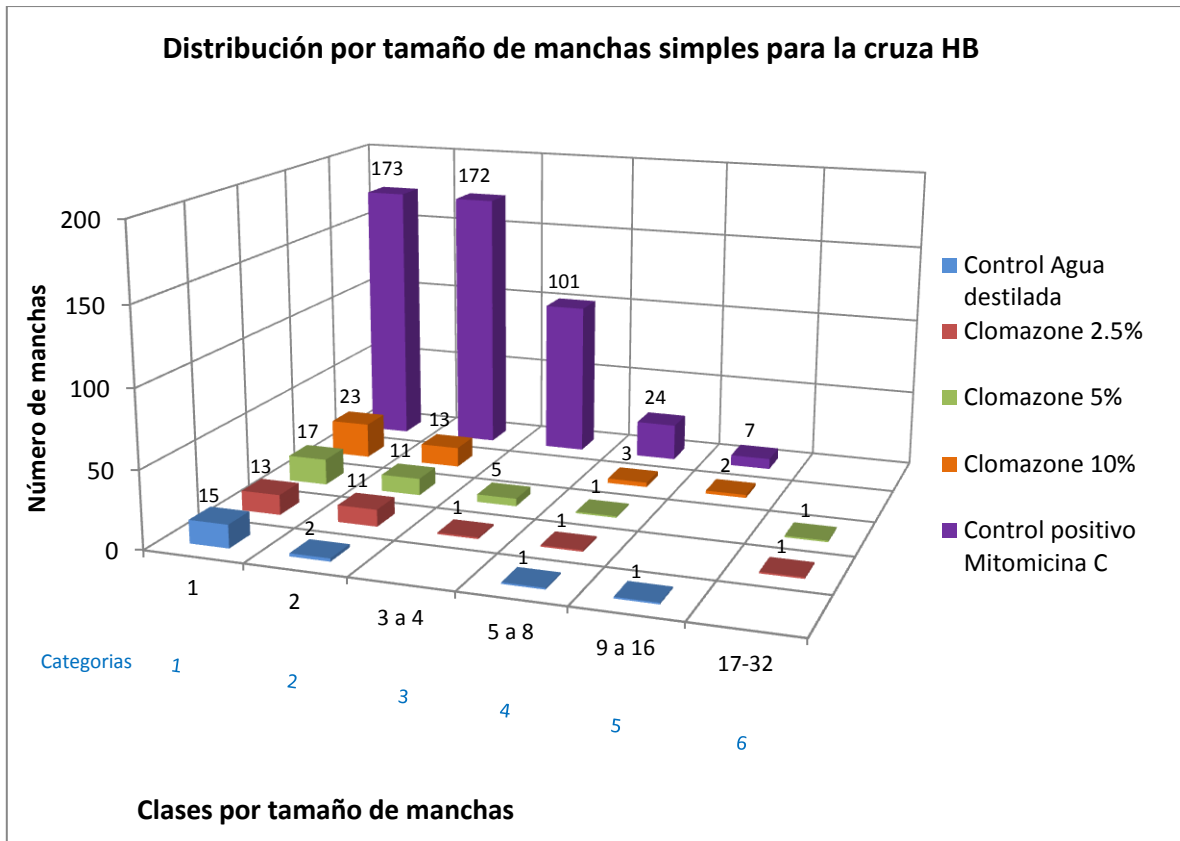
Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wüergler (1988): (+) positivo, (-) negativo, (i) inconcluyente. Nivel de probabilidad  $\alpha=0.05$ .



Gráfica 7. Frecuencia de manchas por tipo resultantes del ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster* administrado de manera directa utilizando la cruza HB.

El número total de manchas registrado indica que hay diferencias estadísticamente significativas ya que los resultados son positivos para las concentraciones 5% y 10%. Esto indica que el clomazone presenta un efecto genotóxico en ambas concentraciones para la cruza HB.

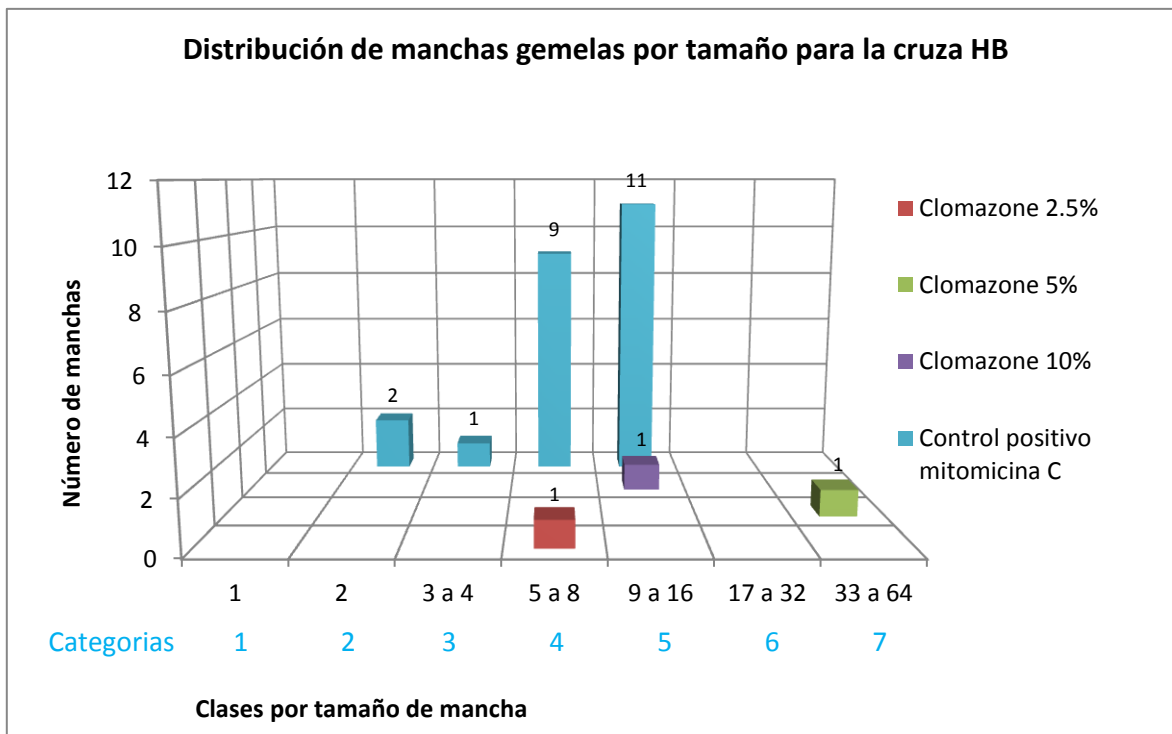
En la gráfica 7 se observan las frecuencias relativas por tipo de manchas para cada una de las concentraciones evaluadas donde se puede ver el comportamiento ascendente de las frecuencias en las categorías manchas pequeñas y total de manchas con respecto al aumento de concentración, es decir, entre más elevada sea la concentración mayor es la frecuencia reportada por categoría de manchas.



Gráfica 8. Distribución de manchas en clases por tamaño para las diferentes concentraciones empleando la cruz HB.

En la gráfica 8 se muestra la distribución de manchas *mwh* observadas para cada concentración dependiendo de su tamaño. Para la cruz HB se contemplan 6 categorías (1=1 célula afectada, 2=2 células afectadas, 3=3-4 células afectadas, 4=5-8 células afectadas, 5=9-16 células afectadas y 6=17-32 células afectadas) basadas en el número de divisiones celulares ( $2^n$ ) y designadas por el número de células que expresan la mutación *mwh*.

Para todas las concentraciones del tratamiento (2.5%, 5%, y 10%) incluyendo los controles, negativo ( $H_2O$ ) y positivo (MMC, [0.15 mM]), la mayor presencia de manchas se encuentra en las categorías 1 y 2 que de acuerdo al número de divisiones celulares corresponde a 1 o 2 células afectadas. En cuanto a las categorías posteriores (3, 4, 5 y 6) se observa una distribución irregular de las manchas en las concentraciones del tratamiento con clomazone incluyendo el control positivo. Para el control negativo se observa que en dichas categorías disminuye el número de manchas.



Gráfica 9. Distribución de manchas gemelas por tamaño para la craza HB.

En la gráfica 9 se muestra la distribución de manchas gemelas para las concentraciones del tratamiento con clomazone, (2.5%, 5% y 10%) para la craza HB incluyendo el control positivo (MMC [0.15 mM]). Para esta craza se contemplan 7 categorías, basadas en el número de divisiones celulares ( $2^n$ ) y designadas por el número de células que expresan la mutación *mwh* y *flr*<sup>3</sup>.

Para el ensayo SMART en las alas de *Drosophila melanogaster* no se observó una diferencia significativa en la respuesta de las cruza ST Y HB (de acuerdo a la prueba ANOVA con los valores  $p=0.0614$ ).

## Discusión de Resultados:

El clomazone en su versión comercial (Command® 3ME) no resultó ser muy genotóxico, por lo cual fue posible realizar los siguientes ensayos en concentraciones porcentuales.

### Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>)

En las pruebas de toxicidad se evalúan distintos parámetros como son la concentración letal media CL<sub>50</sub>, la dosis letal media DL<sub>50</sub>, la concentración letal de setenta CL<sub>70</sub>, la concentración letal de noventa CL<sub>90</sub>, entre otras (Alcaraz *et al.*, 1993). En las evaluaciones de toxicidad el empleo de una CL<sub>50</sub> o una DL<sub>50</sub> dependerá de los objetivos y objetos de estudio.

Con base en lo anterior, para nuestra prueba de toxicidad del herbicida clomazone se realizó la determinación de la CL<sub>50</sub> porque al objeto de estudio, que en este caso es *Drosophila melanogaster*, no se le puede administrar una dosis individual conocida ya que dentro de la población de moscas es difícil saber, cuánta cantidad de compuesto (en este caso el herbicida clomazone) ingirió cada mosca, como ocurriría empleando una DL<sub>50</sub> donde las dosis administradas si son conocidas. Lo que se mantiene constante en cada una de las pruebas de toxicidad es el periodo de exposición, es decir, el tiempo en el cual los organismos son expuestos al tratamiento siempre será conocido.

Anjum y colaboradores (2010) reportaron que para la determinación del valor de la CL<sub>50</sub> es necesario realizar una curva de mortalidad, de tal manera que se llevó a cabo una regresión lineal considerando los porcentajes de concentración y mortalidad de las larvas de *Drosophila melanogaster* expuestas al compuesto. Con base en este proceso matemático se obtuvo el valor de la CL<sub>50</sub> del clomazone en *Drosophila*.

Al respecto, se observó que los datos obtenidos de mortalidad no se ajustan de forma satisfactoria al modelo de regresión lineal, si bien cualquier conjunto de datos puede ser ajustable a distintos modelos matemáticos, al hacerlo estaríamos reajustando dichos datos a cualquier modelo de nuestra preferencia cayendo en un error, pues el modelo matemático que se aplica para el análisis debe ajustarse a los datos y no de manera contraria. En base a esto se probaron dos métodos más, la regresión logarítmica y la regresión polinómica.

En este contexto, Alcaraz y Espina (1993) reportaron una CL<sub>50</sub>, CL<sub>70</sub> y CL<sub>90</sub> del nitrito en peces, específicamente en una carpa herbívora de la especie

*Ctenopharyngodon idella* mediante una regresión polinomial. En 2010 Vargas realizó un protocolo para calcular la  $CL_{50}$  por diferentes métodos entre ellos la regresión logarítmica. En base a este protocolo se realizó el análisis de los datos por medio de dicha regresión pero al momento de observar los resultados (gráfica 3) no fueron del todo satisfactorios.

De acuerdo a los datos obtenidos ( $CL_{50}$  por regresión lineal= 13% y  $R=0.8465$ ,  $CL_{50}$  por regresión logarítmica= 10.5% y  $R=0.9042$ ,  $CL_{50}$  por regresión polinomial= 9% y  $R= 0.9816$ ) y teniendo en cuenta que no se puede hacer un promedio de los tres métodos aplicados por las diferencias en sus bases matemáticas, puede decirse que la  $CL_{50}$  del clomazone se encuentra entre 13 y 9%, ya que se observan resultados muy parecidos independientemente del método matemático empleado.

Retomando lo anterior como antecedente de que las pruebas de toxicidad pueden ser determinadas por diferentes métodos dependiendo del objeto y objetivo de estudio, la  $CL_{50}$  para este estudio en particular se determinó por medio de una regresión polinomial o polinómica ya que como se observa en la gráfica 2 del apartado de resultados, los datos obtenidos de la mortalidad de las moscas tienen un comportamiento que les permite ser analizados por dicho modelo además de que su coeficiente de correlación ( $R= 0.9816$ ) es el que muestra un ajuste más preciso, tomando en cuenta lo anterior, la concentración letal media  $CL_{50}$  para el clomazone se estableció en 9%.

## **Ensayo SMART**

En este estudio se evaluó el herbicida clomazone mediante el ensayo SMART en las alas de *Drosophila melanogaster*, dicho herbicida fue administrado de manera crónica (48h) a las larvas provenientes de las cruzas ST y HB. Se observó un efecto genotóxico para ambas cruzas en las concentraciones 5% y 10%. Este herbicida ha sido estudiado previamente en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* mediante la prueba de Ames donde resultó no ser mutagénico (EPA, 1988). De acuerdo con los resultados de este trabajo y en comparación con los antecedentes sobre la interacción del clomazone con el ADN de diversos modelos biológicos, es evidente que los resultados presentados en el presente estudio difieren con los resultados del ensayo de Ames realizado por la EPA, pues en el caso de *D. melanogaster* la valoración de este herbicida dio como resultado un efecto genotóxico.



El clomazone fue evaluado por medio de la prueba de micronúcleos (MN) en eritrocitos de peces donde se detectó un resultado positivo (Salvagni *et al.*, 2011). Se sabe que los dos fenómenos básicos que conducen a la formación de MN en células mitóticas son las rupturas cromosómicas, las cuales conducen a la formación de fragmentos cromosómicos acéntricos, y disfunciones en la segregación de los cromosomas (Falck *et al.*, 2002). Los fragmentos acéntricos se originan de distintas maneras, una de ellas es por la reparación inadecuada de rompimientos en las cadenas de ADN, además de reparaciones por escisión de bases que ocurren de manera simultánea en sitios muy próximos y en ambas cadenas del ADN, lo cual ocasiona una ruptura de doble cadena (Fenech *et al.*, 2011).

En comparación con el ensayo de MN, el ensayo SMART es capaz de detectar las alteraciones al ADN mediante los eventos genéticos conocidos como mutación puntual, delección, no disyunción y recombinaciones mitóticas (Tabla 4) (Graf *et al.*, 1984). En ambos estudios el clomazone resultó ser un agente genotóxico, lo cual sugiere que el clomazone es un agente que produce rompimientos de cadena en el ADN, los cuales a su vez pueden generar mutaciones y recombinaciones

Con respecto a lo observado en el ensayo SMART, para el caso del clomazone es notable que en las concentraciones más altas, con las dos cruzas, se registrara mayor daño que en las concentraciones más bajas, por lo que se puede hablar de un efecto dosis-respuesta, lo anterior, indica una correlación entre la dosis y la frecuencia de manchas, es decir, mientras más alta sea la concentración de exposición mayor será el daño registrado. El número de manchas en las concentraciones 5 y 10%, de ambas cruzas, casi duplica al número de manchas encontradas en el control negativo, sin embargo, el número de manchas totales para el clomazone se ve ampliamente rebasado por el control positivo (MMC, [0.15 mM]) en ambas cruzas.

Con base en los resultados obtenidos, en el caso de las concentraciones 5% y 10% se observó que para la cruz a estándar, en las categorías de manchas pequeñas y manchas totales, se produjo un efecto genotóxico con respecto al control negativo (Tabla 6), mientras que para la cruz HB encontramos que el clomazone fue positivo para manchas pequeñas en la concentración de 10%, para manchas grandes en la concentración 5% y manchas totales para ambas concentraciones (Tabla 7).

La distribución del tamaño de manchas, en ambos tipos de cruzas, fue muy similar para el tratamiento con clomazone, pues predominan las manchas pequeñas. Asimismo, se observa una respuesta similar con el tratamiento de MMC. Sin embargo, a diferencia del clomazone, la MMC es un agente con un poder

genotóxico muy elevado (Rodríguez-Arnaíz, 1996) el cual se ve reflejado en la cantidad y el tamaño de manchas producidas, pues el daño que ocasionó el clomazone es comparable en sólo un 14% con el daño que provocó la MMC en las larvas de *Drosophila melanogaster*. Además, la MMC es capaz de inducir eventos de recombinación (Rodríguez-Arnaiz, 1996) y basado en lo anterior podemos explicar la aparición de numerosas manchas gemelas en el control positivo.

La mayoría de las manchas sencillas observadas en este estudio fueron pequeñas y su frecuencia resultó ser significativamente distinta a la del control negativo en ambas cepas. Lo anterior tiene relación con el número de divisiones celulares y la cantidad de células somáticas dañadas mientras transcurre el tiempo de exposición. Generalmente las manchas pequeñas son inducidas durante las últimas rondas de división celular, las cuales ocurren en el estadio de pupa (Graf *et al.*, 1984). Esto habla de la posibilidad de que el efecto genotóxico del clomazone ocurriera en las últimas horas de la exposición de las larvas al compuesto, pues de lo contrario observaríamos mayor cantidad de manchas grandes las cuales se generan en momentos más tempranos de la exposición. Lo anterior sugiere que la elevada frecuencia de manchas pequeñas es el resultado de un efecto genotóxico ocurrido durante las últimas horas del tratamiento debido a una probable acumulación del compuesto. El clomazone fue capaz de inducir la expresión únicamente de manchas sencillas, éstas pueden deberse a distintos eventos genéticos, por ejemplo, una mutación, una delección o la no disyunción de los cromosomas (Fig.1). Debido a que la categoría de manchas gemelas tuvo un resultado negativo es posible que el clomazone no fuera capaz de inducir una cantidad significativa de eventos de recombinación (Graf *et al.*, 1984).

La craza HB presenta niveles elevados de citocromos P450 (Graf y van Schaik, 1992). La presencia de una mayor cantidad de dichas enzimas en la craza HB, con respecto a la craza ST, puede permitir una biotransformación más eficiente de ciertos xenobióticos y evidenciar un efecto genotóxico que no sería visible en la craza ST (Graf y Singer, 1992). El uso de ambas cruzas, por lo tanto, permite estudiar de mejor manera la relación que puede existir entre la biotransformación de un compuesto y su posible genotoxicidad.

En este estudio se usaron ambas cruzas, la craza ST y la craza HB, sin embargo no se observó una diferencia significativa al comparar la frecuencia de manchas registradas en cada concentración de clomazone entre las cruzas (de acuerdo a la prueba ANOVA  $p=0.0614$ ) (Tabla 6 y 7). Lo anterior sugiere que el clomazone es un agente que no requiere pasar por un proceso de bioactivación para generar su efecto genotóxico.

Existen diversos ejemplos que demuestran que de acuerdo a las características químicas del compuesto, ciertos pesticidas pueden requerir una bioactivación para producir un efecto genotóxico, mientras que otros no lo requieren. Kaya y colaboradores (2003) evaluaron los herbicidas bentazon, tiobencarbo, molinato y trifluralina con la misma prueba en *D. melanogaster*. Para el caso del bentazon se registró un efecto positivo solamente para la craza HB. Para el molinato los resultados fueron inconcluyentes, mientras que el otro tiocarbamato, el tiobencarbo, dio resultados positivos solamente en la craza ST en su concentración más alta. Finalmente la trifluralina dio resultados positivos en ambas cruza.

Esta investigación sobre el clomazone muestra que para las cruza ST y HB, se observó que el efecto genotóxico producido por éste herbicida no es debido a una bioactivación del compuesto ya que se presenta el mismo efecto en las mismas concentraciones y en ambas cruza. El clomazone a diferencia de los herbicidas mencionados anteriormente, no ha sido probado en *Drosophila melanogaster* por lo que los resultados obtenidos en este trabajo son importantes ya que aportan información sobre la genotoxicidad de dicho herbicida y además queda como antecedente su evaluación con *D. melanogaster*, puesto que este compuesto está destinado a controlar al menos 3 tipos diferentes de malezas en cultivos de algodón, arroz, calabacita, calabaza, caña de azúcar, chayote, chile, melón, pepino, sandía, soya y tabaco tan solo en nuestro país.

La última revisión realizada por Heap (2009) señala que hay al menos 331 biotipos de malezas resistentes pertenecientes a 189 especies, distribuidas en más de 300 000 campos en el mundo. Hasta la fecha el metabolismo del clomazone ha sido estudiado en plantas y bacterias del suelo, por ejemplo, Yasuor y colaboradores (2010) propusieron una ruta para la biotransformación del clomazone en *E. phyllogon*, una maleza presente en cultivos de arroz (*Oryza sativa*) (Fig. 1) y anteriormente Yun y colaboradores (2005) realizaron un estudio donde se explica su metabolismo en plantas resistentes a herbicidas y encontraron que el metabolito activo de éste es el 5-ceto-clomazone, también se menciona que la resistencia de las plantas no ha sido causada por la bioactivación, traslocación o absorción diferencial del herbicida inactivo a activo, más bien sugieren que la degradación de los herbicidas es mediada por las enzimas conocidas como citocromos P450 (CYP).

Los citocromos P450 inhiben la acción de los herbicidas insertando un átomo de oxígeno en moléculas hidrofóbicas (en este caso los herbicidas) transformándolos en moléculas hidrosolubles y por lo tanto de más fácil degradación (Werck-Reichart, 2000).

Al respecto, algunas enzimas de las familias CYP71, CYP73, CYP76 y CYP81 en plantas están implicadas en el metabolismo de herbicidas y posiblemente también estén implicadas en el metabolismo del clomazone, pues la subfamilia CYP81A está implicada directamente con la resistencia a herbicidas (incluyendo al clomazone) de la planta *E.phyllopogon* (Iwakami *et al.*, 2014). A partir de todo lo anterior es importante mencionar que los CYPs participan activamente en el metabolismo de los herbicidas tanto en plantas como en animales.

Como se mencionó anteriormente, las diferencias metabólicas que hay entre las cruzas ST y HB nos podrían dar una idea de lo que está ocurriendo con el herbicida clomazone, durante el proceso de su metabolismo en la mosca de la fruta, pero al momento de visualizar los resultados no obtenemos ninguna diferencia significativa entre las cruzas por lo que se proponen algunas explicaciones, la primera y ya mencionada es que el clomazone es un compuesto que no requiere una bioactivación metabólica para generar un efecto genotóxico, en el caso particular de *Drosophila melanogaster*.

Al respecto, sabemos que la mayoría de las reacciones implicadas en el metabolismo de xenobióticos (incluidos los plaguicidas) están mediadas por los citocromos P450, pero la actividad de estas monooxigenasas y el ciclaje redox de los xenobióticos puede desencadenar especies reactivas de oxígeno (EROS) (Venereo-Gutierrez, 2002).

El daño por estrés oxidante en los organismos a partir de la exposición a plaguicidas está bien documentada (Venereo-Gutiérrez, 2002; Darwish *et al.*, 2015), por ejemplo, en el caso del clomazone se sabe que puede causar estrés oxidante y EROS en peces como *Leporinus obtusidens* (Moraes *et al.*, 2009), *Cyprinus carpio* (Cattaneo *et al.*, 2012), *Rhamdia sp.* (Menezes *et al.*, 2013) y *Prochilodus lineatus* (Pereira *et al.*, 2013) por mencionar algunos. También se ha observado daño por estrés oxidante en plantas, como ejemplo tenemos a *Nicotiana tabacum L. cv. Virginie* (Darwish *et al.*, 2014; Darwish *et al.*, 2015). La información antes citada demuestra que dicho herbicida puede causar estrés oxidante y EROS en diversos organismos, en su mayoría peces. Con base en lo anterior y en los resultados obtenidos mediante el ensayo SMART, no es posible saber si hay una inducción de estrés oxidante, pues para esto se requeriría incorporar una metodología apropiada para evaluar dicho efecto. El empleo de las cruzas de *Drosophila melanogaster* con capacidades metabólicas diferenciadas permitieron establecer en este trabajo que no hubo diferencias sustanciales en el metabolismo del clomazone.

Aun así, la posible conexión del estrés oxidante y el ensayo SMART recae en que el daño celular producido por las especies reactivas de oxígeno ocurre sobre

diferentes macromoléculas (Venereo-Gutiérrez, 2002). En el caso del ADN encontramos que a causa de las EROS pueden ocurrir mutaciones, pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones a las bases, deleciones, fragmentaciones, reordenamientos cromosómicos y desmetilación del ADN (Venereo-Gutiérrez, 2002). Por lo anterior y bajo el supuesto de que el estrés oxidante y las EROS son factores que podrían estar involucrados en la respuesta observada en la evaluación del clomazone mediante el ensayo SMART, se propone que algunas de las mutaciones detectadas en este bioensayo podrían deberse al estrés oxidante lo que refuerza los resultados obtenidos en este trabajo. Hipótesis que deberá someterse a prueba con la metodología apropiada. Por ejemplo, Castañeda-Sortibrán y colaboradores en 2011, examinaron la determinación del estado antioxidante de larvas en *Drosophila melanogaster*. Dicho estado antioxidante fue medido a través de la capacidad de la catalasa para metabolizar al peróxido de hidrógeno, demostrándose así un mecanismo de defensa celular en contra del estrés oxidante en las larvas.

## Conclusiones

El herbicida clomazone es un compuesto genotóxico, que no depende del proceso de bioactivación para causar daño al ADN y esto se ve evidenciado en los resultados del ensayo SMART donde tanto para la cruza ST como para la cruza HB dicho herbicida induce un daño genotóxico similar por lo que el metabolismo del clomazone no influye de manera directa al daño que ocasiona en el caso particular de *Drosophila melanogaster*.

Dado que la presencia de manchas en el ensayo SMART es el resultado de eventos de mutación y recombinación somática, y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, sobre la distribución del tipo y tamaño de manchas observadas, es posible concluir que el daño inducido al ADN por parte del clomazone se traduce en eventos de mutación principalmente.

## Bibliografía:

- Alcaraz, G. y S. Espina. (1993). Efecto de la temperatura y del cloruro sobre la toxicidad del nitrito en la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* (Pices, Cyprinidae). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 9 (1), 21-28.
- Al Saleh, I. A. (1994). Pesticides: a review article. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology* 13 (3), 151-161.
- Anjum, S.I., Yousf M. J., Ayanz S. y Siddiqui B.S. (2010). Toxicological Evaluation of Chlorpyrifos and Neem Extrac (Biosal B) against 3<sup>RD</sup> instars larvae of *Drosophila melanogaster*.
- Brechelt, A. (2004). Manual de Manejo Ecológico de Plagas y Enfermedades. Pp. 4-7.  
[http://www.rap-al.org/articulos\\_files/Manejo\\_Ecologico\\_de\\_Plagas\\_A.Bretchel.pdf](http://www.rap-al.org/articulos_files/Manejo_Ecologico_de_Plagas_A.Bretchel.pdf)
- Briggs, S.A. y R. Carson. (1992). Basic guide to pesticides. Their characteristics and hazards. Washington: Taylor y Francis publishers.
- Brun, A., A. Cuanyl, T. Mouel, Le, J. Berget. y Amichot, M. (1996). Inducibility of the *Drosophila melanogaster* P450 Gene, CY6A2, by Phenobarbital in Insecticide Susceptible or Resistant Strains. *Insect Biochem. Molec. Biol*, 26, 697-703.
- Cao, J., P. Li, Q. Li, P. Zheng, y X. Diao. (2015). Bioaccumulation and elimination of the herbicide clomazone in the earthworms *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 95, No. 5, pp. 606-610.
- Cattaneo, R., B. S. S. Moraes, V. L. L. Loro, A. Pretto, C. Menezes, G. M. S. M. Sartori, B. Clasen, L. A. A. de Avila, E. Marchesan y R. Zanella (2012). Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. *Archives of environmental contamination and toxicology* 62 (1), 97-106.
- Castañeda Sortibrán, A. N. N., M. G. G. Ordaz Téllez, A. Andrade-Cetto, C. S. S. Kischinevzky y R. Rodríguez-Arnaiz (2011). Antimutagenic activity of two medicinal phytoextracts in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Pharmaceutical biology* 49 (6), 640-647.
- CDPR. California Department of Pesticide Regulation, Sacramento. (2003). Public Report 2003-01, Clomazone.
- CICOPLAFEST. (2004) Catálogo de Plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas Fertilizantes y Sustancias Tóxicas.
- Cofepris. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2013). Catálogo de Plaguicidas. Disponible en:  
<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>,
- Darwish, M., F. Lopez-Lauri, V. Vidal, M. El Maâtaoui, y H. Sallanon (2015). Alternation of light/dark period priming enhances clomazone tolerance by increasing the levels of ascorbate and phenolic

compounds and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) plantlets. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148, 9-20.

- Darwish, M., V. Vidal, F. Lopez-Lauri, O. Alnaser, S. Junglee, M. El Maataoui, y H. Sallanon (2015). Tolerance to clomazone herbicide is linked to the state of LHC, PQ-pool and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*). *Journal of plant physiology*, 175, 122-130.
- Dekant, W. (2009). The role of biotransformation and bioactivation in toxicity. *Exs*, 99, 57-86.
- Demerec, M. y Kaufmann, B.P. (1962). Introducción a la Genética y Citología de *Drosophila melanogaster*. Comisión Nacional de Energía Nuclear (Programa de Genética). México. 4-10 pp.
- Devine, M. (2002). Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors. Pp 103-113. In: *Herbicide Classes in Development. Mode of Action, Targets, Genetic Engineering, Chemistry*. Böger, Peter; Wakabayashi, Ko; Hirai, Kenji (Eds.). 364 p.
- Djuric´D. (1998). Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo: Toxicocinética. Tomo 1. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. España. <http://www.srt.gob.ar/index.php/bibliografia-buena-quimica> última consulta: 9 de noviembre de 2015.
- Duke, S. y Paul, R. (1986). Effects of dimethazone (FMC 57020) on chloroplast development. I. Ultrastructural effects in cowpea (*Vigna unguiculata L.*) primary leaves. *Pestic Biochem Physiol* 25: 1–10.
- EFSA. European Food Safety Authority. (2007). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance: clomazone. *Efsa Journal*. 109, 1-73. [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)
- EFSA. European Food Safety Authority. (2011). Review of the existing maximum residue levels (MRLs) for clomazone according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005<sup>1</sup>. Parma Italia. [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal).
- EINaggar, S., Creekmore, R., Schocken, M., Rosen, R., Robinson, R. (1992). Metabolism of clomazone herbicide in soybean. *J Agric Food Chem* 40: 880–883.
- EPA. United States Environmental Protection Agency. (1988). Command. Review of possible toxicological concerns of an impurity of Command.
- EPA. United States Environmental Protection Agency. (2007). Clomazone summary document: Registration review. [http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration\\_review/clomazone/clomazone\\_summary.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/clomazone/clomazone_summary.pdf).
- Falck, G. C.-M. C., J. Catalán, y H. Norppa. (2002). Nature of anaphase laggards and micronuclei in female cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutagenesis* 17 (2), 111-117.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1986). International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Roma: FAO,; 28.



- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2002). Normas internacionales para medidas fitosanitarias. Convención Internacional de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. NIMF No. 16.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura, Labrada, R., J. C. Caseley y C. Parker. (1996). Manejo de maleza para países en desarrollo. FAO, 1996.
- Fenech, M., M. Kirsch-Volders, A. T. Natarajan, J. Surralles, J. W. Crott, J. Parry, H. Norppa, D. A. Eastmond, J. D. Tucker, y P. Thomas. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26 (1), 125-132.
- Ferhatoglu, Y., Avdiushko, S. y Barret, M. (2005). The basis for the safening of clomazone by phorate insecticide in cotton and inhibitors of cytochrome P450s. *Pestic Biochem Physiol* 81(12):59-70.
- Ferhatoglu, Y. y Barrett, M. (2006). Studies of clomazone mode of action. *Pestic. Biochem Physiol* 85: 7–14.
- Feyereisen, R. (1995). Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology letters* 82-83, 83-90.
- Frei, H. y F. E. Würigler. (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.
- Frei, H. y F. E. Würigler. (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.
- Ffrench- Constant, R. H., P. J. Daborn, y G. L. Goff. (2004). The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics* 20 (3), 163-170.
- Frölich, a y F. E. Würigler. (1989). New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation research*, 216, 179-187.
- González-Mendoza, D. (2007). El complejo enzimático citocromo P450 en plantas. *Rev. Int. Contam. Ambient* 23 (4) 177-183.
- Graf, U., F. E. Würigler, A. J. Katz, H. Frei, H. Juon, C. B. Hall, y P. G. Kale. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis* 6 (2), 153-188.
- Graf, U., Frei, H., Kägi, a, Katz, a J. y F. E. Würigler. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mution Research*., 222, 359-373.
- Graf, U. y Schaik, N. Van. (1992). Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research - Environmental Mutagenesis and Related Subjects Including Methodology*, 271, 59-67.

- Graf, U. y D. Singer. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 271: 59-67.
- Gunasekara, A. S., I. D. de la Cruz, M. J. Curtis, V. P. Claassen, y R. S. Tjeerdema. (2009). The behavior of clomazone in the soil environment. *Pest Management Science* 65 (6), 711-716.
- Hallem, E.A y J. R. Carlson. (2004). The odor coding system of *Drosophila*. *Trends Genetics* ;20:453–459.
- Heap, I. (2009). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponible en : [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com).
- Hess, F. (2000). Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Sci* 48: Pp. 160–17.
- INECC. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2011). Información general sobre los herbicidas. Disponible en: [http://www.inecc.gob.mx/descargas/bioseguridad/2011\\_simp\\_ogm\\_tolerancia\\_pres1.pdf](http://www.inecc.gob.mx/descargas/bioseguridad/2011_simp_ogm_tolerancia_pres1.pdf)
- INECC. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2013). Plaguicidas. Disponible en: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/768-sqre-plaguicidas>
- INIFAP. Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (2006). Clasificación y uso de los herbicidas por su modo de acción. Disponible en: <https://hortintl.cals.ncsu.edu/es/articulos/clasificaci-n-y-uso-de-los-herbicidas-por-su-modo-de-acci-n>
- INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (2010). Manejo de maleza en algodón en el norte de Tamaulipas. Disponible en: <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/860.pdf>
- IPCS. International Programme on Chemical Safety. (2002). The Who Recommended Classification of Pesticides By Hazard and Guidelines To Classification 2000-2002.
- IPCS. International Programme on Chemical Safety. (2010). The Who Recommended Classification of Pesticides By Hazard and Guidelines To Classification 2009.
- Iwakami, S., Endo M., Saika H., Okuno J., Nakamura N., Yokoyama M., Watanabe H., Toki S., Uchino A. y T. Inamura. (2014). Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 Are Associated with Resistance to Two Acetolactate Synthase Inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Physiol.* Vol. 165 no. 2 618-629.
- Jimenez, L. y H. Merchat. (2003). Biología celular y molecular. Primera edición. Pearson Educación de México. Pp. 780-786.
- Kahn, R. y F.Durst. (2000). Function and evolution of plant cytochrome P450. *In Evolution of metabolic pathways* (eds JT Romeo, R Ibrahim, L Varin, V de Luca). *Recent Advances in Phytochemistry*, vol 34, pp. 151–189. Rotterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Karam, M. (2004). Plaguicidas y salud de la población. Universidad Nacional del Estado de México. *Ciencia Ergo Sum*. Vol. 11,003. pp. 246-254.

- Kaya, B., Creus A., Yanikoglu A., Cabre o., Y. y R. Marcos. (2000). Use of the *Drosophila* wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides, *Environ. Mol. Mutagen.* PP 40–46.
- Kaya, B., Marcos R., Yanikořglu A. y A. Creus. (2003). Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains, *Mutation Research.* 557. Pp. 53–62.
- Kernan, M. (2007). Mechanotransduction and auditory transduction in *Drosophila*. *Pflugers Arch.* 454:703–720.
- Klaassen, C., Watkins J.B III. Cassarett y Doull. (1999). Manual de Toxicología. Ed Mc Graw-Hill Interamericana. 5ª edición. México. Pp. 394-395.
- Klaassen, C. (2002). Xenobiotic transporters: another protective mechanism for chemicals. *International journal of toxicology* 21 (1), 7-12.
- Lee, D., Senseman S., O'Barr J., Chandler J., Krutz L., McCauley G. y Y. Kuk. (2004). Soil characteristics and water potential effects on plant-available clomazone in rice. *Sciense* 52: 310-318.
- Lindsley, D. y Zimm, G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Genomics and Human Genetics.*
- Liu, S., Shocken M., J. Rosazza. (1996) Microbial transformations of clomazone. *J Agric Food Chem* 44: 313–319.
- López, C. (1993). Exposición a plaguicidas organofosforados. Perspectivas en Salud Pública N.o 18. México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Macherey, A. Dansette P. (2008). Biotransformations Leading to Toxic Metabolites: Chemical Aspect. *Elsevier.* 674-696 pp.
- Meigen, J. (1930). Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zeiflügeligen Insekten. Schulz-Wndermann. Vol. 6. Pp. 85.
- Menezes, C., J. Leitemperger, C. Toni, A. Santi, T. Lópes, N. B. V. B. Barbosa, J. R. R. Neto, y V. L. L. Loro (2013). Comparative study on effects of dietary with diphenyl diselenide on oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia sp.*) exposed to herbicide clomazone. *Environmental toxicology and pharmacology* 36 (2), 706-714.
- Menezes, C., Leitemperger J., Murussi C., Toni C., Araujo M., Farias I. y V. Loro. (2014). Herbicide clomazone effects on d-Aminolevulinic acid activity and metabolic parameters in *Cyprinus carpio*. *Bull Enviromental Contamination and Toxicology* 92:393–398.
- Moraes, B. S., V. L. Loro, A. Pretto, M. B. da Fonseca, C. Menezes, E. Marchesan, G. B. Reimche, y L. A. de Avila (2009). Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95 (2), 57-62.

- Niu, G., Rupasinghe, S.G., Zangerl, A.R., Siegel, J.P., Schuler, M. a. y Berenbaum, M.R. (2011) A substrate-specific cytochrome P450 monooxygenase, CYP6AB11, from the polyphagous navel orangeworm (*Amyelois transitella*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 244-253.
- Oliveira, R., Constantin J. y M. Inoue. (2011). *Biología e Manejo de Plantas Daninhas*. Omnipax (Ed.). Curitiba. 348 p
- Omura, T. y R. Sato. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: II. Solubilization, purification and properties. *Journal of Biology. Chem.* 239, 2379-2385.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. OPS, Organización Panamericana de la Salud. (1990). Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Serie Vigilancia, 9. Plaguicidas organoclorados. México: OMS/OPS.
- OMS. Organización Mundial de la Salud (1993). Organización Panamericana de la Salud (OPS), División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas, Washington: OMS/OPS.
- Parkinson, A. y B. Ogilvie. (2008). Biotransformation of xenobiotics. En Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons (ed. Klaassen, C.). McGraw-Hill, pp. 883-930.
- Pereira, L., M. N. Fernandes, and C. B. R. Martinez (2013). Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36 (1), 1-8.
- Pfam: EBI. (2015) Family P450. *European Molecular Biology Laboratory. The European Bioinformatics Institute*. URL <http://pfam.xfam.org/family/P450#tabview=tab7> [último acceso 2016].
- Plewa, M. (1978). Activation of chemical into mutagen by green plants. A preliminary discussion. *Environ. Health Perspect.* 27,45-50.
- Ramírez, J. y M. Lacasaña. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivo de Prevención de Riesgos Labor*, 4(2): 67-75.
- Rand, M. (2010). Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicology and Teratology* 32 (1), 74-83.
- Rodríguez-Arnaiz, R. (2004). *Metabolismo de las toxinas ambientales*. Fondo de Cultura Económica.
- Rodríguez-Arnaiz, R., P. O. Soto, J. C. Oyarzún, y U. Graf. (1996). Analysis of mitotic recombination induced by several mono- and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 351 (2), 133-145
- Rodríguez-Arnaiz, R. y A. Becerra. (2005). *Manual de prácticas de genética y cuaderno de trabajo*. Las presas de Ciencias.UNAM, Facultad de Ciencias. Pp. 13-15, 292.
- Ruiz-Esparza, R. (2006). Determinación del efecto genotóxico de *Malmea depressa* mediante el empleo de células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. 55 pp.

- Salvagni, J., Zeni R., A. Meneghello. (2011). Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the countryside of Santa Catarina State, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 122-126.
- Saner, C., Weibel, B., Würzler, F.E. y C. Sengstag. (1996). Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27, 46-58.
- Santi, A., Menezes C., Duarte m., Leitemperger J., López T. y V. Loro. (2001). Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (*in vivo*). *Interdisciplinary Toxicology*.
- Schocken, M. (1997). Review: Microbial synthesis of agrochemical metabolites. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*. 19: 392-400
- Scott, J., Weston LA, R. Jones. (1995). Clomazone for weed control in transplanted cole crops (*Brassica oleracea*). *Weed Sci* 43: 121-127
- Senseman, S. (2007) *Herbicide Handbook*, Ed 9. Weed Science Society of America, Lawrence, KS, pp 224–226.
- Stainer, R. Y., E. A. A de Iberg y J. L. Ingraham. (1986). *Microbiología*. 3ª Ed.Repla. México. 836 pp.
- Stocker R. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell and tissue research*; 275:3–26.
- TenBrook, P. y R. Tjeerdema. (2006) Biotransformation of clomazone in rice (*Oryza sativa*) and early watergrass (*Echinochloa oryzoides*). *Pesticide Biochemistry Physiology* 85(1): 38-45.
- Ting, C. y C. Lee. (2007). Visual circuit development in *Drosophila*. *Current opinion in neurobiology*; 17:65–72.
- Tijet, N., C. Helvig, y R. Feyereisen. (2001). The cytochrome p450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262 (1-2), 189-198.
- Torres, C., Ribas G., Xamena N., Creus A. y R. Marcos. (1992). Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test, *Mutat. Res.* 280 pp. 291–295.
- Truman, J. y B. Taylor. (1993). Awad, TA. Formation of the Adult Nervous System. In: Bate, M.; Martinez Arias, A., editors. *Development of Drosophila Melanogaster*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1245-1275 pp.
- Van Scoy, A. y R. Tjeerdema. (2014). Environmental fate and toxicology of clomazone. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 229, 35-49.
- Vargas, M. (2010). Cell Biology Protocols. How to calculate IC50. *Science*. <http://www.sciencegateway.org/protocols/cellbio/drug/hcic50.htm>

- Vázquez-Gómez, G., Sánchez-Santos, A., Vázquez-Medrano, J., Quintanar-Zúñiga, R., Monsalvo-Reyes, A.C., Piedra-Ibarra, E., et al. (2010). Sulforaphane modulates the expression of Cyp6a2 and Cyp6g1 in larvae of the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test and is genotoxic in the ST cross. Food and chemical toxicology .*British Industrial Biological Research Association*, 48, 3333-9.
- Venereo-Gutierrez , J.C.(2002). Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Revista Cubana Med.Milit.*; 31(2):126:33.
- Vogel, E., J. A. Zijlstra, W. G. H. Blijleven, y D. Breimer. (1983). Metabolic activation and mutagenic properties of procarcinogens in *Drosophila*. En A. Kolber, T. Wong, L. Grant, R. DeWoskin, y T. Hughes (Eds.), *In Vitro Toxicity Testing of Environmental Agents*, pp. 215-231. Springer US.
- Werck-Reichhart, D., Hehn A. y L. Didierjean. (2000). Cytochrome P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Pharmacol. Sci.* 5, 116-123.
- Yasuor, H., W. Zou, V. V. Tolstikov, R. S. Tjeerdema, y A. J. Fischer. (2010). Differential oxidative metabolism and 5-Ketoclorazone accumulation are involved in *Echinochloa phyllopogon* resistance to clomazone. *Plant Physiology* 153 (1), 319-326.
- Yun M., Yogo Y., Miura R., Yamasue Y. y A.Fischer. (2005). Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). *Pestic Biochem Physiol* 83: 107–114