



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Evaluación genotóxica del linuron a través del ensayo  
somático en ala de *Drosophila melanogaster***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**VIRIDIANA MARTÍNEZ MARTÍNEZ**



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

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE  
MÉXICO. 2016**



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.

1. Datos de la alumna  
Martínez Martínez Viridiana  
58 51 08 19  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
308124334
  
2. Datos de la asesora  
Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz
  
3. Datos del sinodal 1  
Dr. Javier Andrés Juárez Díaz
  
4. Datos del sinodal 2  
Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán
  
5. Datos del sinodal 3  
Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco
  
6. Datos del sinodal 4  
M. en C. Marco Antonio Carballo Ontiveros
  
7. Datos de la tesis  
Evaluación genotóxica del linuron a  
través del ensayo somático en ala  
de *Drosophila melanogaster*  
49 p.  
2016

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Ciencias por ser mi segunda casa y ofrecerme un espacio de aprendizaje, así como valores y conocimientos necesarios para formarme como profesionista.

A mi asesora la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz por brindarme su apoyo, tiempo y conocimiento indispensable para la culminación de este trabajo de investigación.

A los integrantes del jurado evaluador, el Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, la Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco y el M. en C. Marco Antonio Carballo Ontiveros, por los comentarios y consejos para el mejoramiento de este trabajo, así como por otorgarme el tiempo necesario para cumplir con el objetivo del mismo.

A la Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán integrante del jurado evaluador, pero también una gran académica de quien he recibido apoyo constante en los últimos tres años de mi estancia en el Laboratorio de Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias.

A la M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez por sus observaciones y comentarios en el proceso de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética y Evolución Fernanda, Claudia, Paola y el Biol. Ricardo, pero en especial a las Biólogas Ana y Jovana por sus comentarios, consejos, apoyo y amistad que me han mostrado siempre.

A mis amigos Nancy, Diana, Carmen, Yareli, Claudia, Isela, Sandy y Sofía por alentarme en todo momento a mejorar en distintos aspectos de mi vida y por compartir momentos de ella haciéndola más feliz y a veces un poco más loca y lo más importante por seguir en ella.

Y a todos aquellos que creyeron en la culminación de este sueño y me dieron fortaleza en el camino recorrido.

¡Mil gracias!

## **DEDICATORIAS**

A mi padre Francisco quien me ha brindado su total apoyo, amor y comprensión incondicional en todo momento y me ha enseñado con el ejemplo a dar el mejor esfuerzo en cualquier tarea. Por hacer de mí una persona fuerte ante las limitantes. Esto solo es una pequeñísima recompensa por todo el esfuerzo que hace para la familia. Apa lo quiero.

A mi mamá Flora de quien tengo recuerdos, enseñanzas y valores que me han guiado hasta aquí, y sé que lo seguirán haciendo siempre. Por su eterno amor a mí y a la familia.

A mis hermanas Vianney y Cinthia quienes han sido el soporte fundamental de mi vida. Por su total apoyo, cariño y cuidado que siempre tienen hacia mí. Gracias por compartir siempre las tristezas, alegrías, éxitos y hasta enojos, las quiero mil.

A mis tíos Benito, Cecilia y Agustina quienes han sido parte fundamental de mi formación a pesar de la distancia, y me han dado consejos y mucho cariño, son realmente importantes.

***“La ciencia no tiene patria, porque el saber es patrimonio  
de la humanidad”***

***Louis Pasteur***

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>Plaguicidas</b> .....	<b>2</b>
<b>Toxicidad de plaguicidas</b> .....	<b>3</b>
<b>Herbicidas</b> .....	<b>4</b>
<b>Linuron</b> .....	<b>6</b>
<b>Genotoxicidad y toxicidad del linuron</b> .....	<b>8</b>
<b>Metabolismo de xenobióticos</b> .....	<b>10</b>
<b>Citocromos P450</b> .....	<b>11</b>
<b>Drosophila melanogaster</b> .....	<b>13</b>
<b>Taxonomía</b> .....	<b>14</b>
<b>Descripción</b> .....	<b>14</b>
<b>Ciclo de vida</b> .....	<b>15</b>
<b>Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y dosis letal media (DL<sub>50</sub>)</b> .....	<b>17</b>
<b>Ensayo de mutación y recombinación somática (SMART)</b> .....	<b>18</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>General</b> .....	<b>23</b>
<b>Particulares</b> .....	<b>23</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>Compuestos químicos</b> .....	<b>25</b>
<b>Determinación de la CL<sub>50</sub>: prueba de toxicidad</b> .....	<b>25</b>
<b>Ensayo de mutación y recombinación somática SMART en ala</b> .....	<b>25</b>
<b>Cruzas</b> .....	<b>25</b>
<b>Sincronización</b> .....	<b>26</b>

<i>Tratamientos</i> .....	26
<i>Elaboración de laminillas</i> .....	27
<i>Análisis de las preparaciones</i> .....	27
<i>Análisis estadístico</i> .....	28
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<i>Determinación de la CL<sub>50</sub>: prueba de toxicidad</i> .....	30
<i>Ensayo de mutación y recombinación somática SMART en ala.</i> ....	31
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>39</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>41</b>

## RESUMEN

El linuron es un herbicida derivado de la urea que posee dos átomos de cloro, se emplea para combatir las malas hierbas que crecen en cultivos agrícolas, tales como: la cebada, el cempasuchitl, el espárrago, la gladiola, el jacinto y el maíz, entre otros más. Se asperja de manera pre-emergente y post-emergente temprano. Su mecanismo de acción es por medio de la inhibición de la fotosíntesis, impidiendo la transferencia fotodependiente de electrones mediante su unión a la proteína D1 del fotosistema II. En este trabajo se evaluó el efecto genotóxico del linuron comercial en *Drosophila melanogaster* mediante el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) en ala, además de determinar la CL<sub>50</sub> mediante pruebas de letalidad.

Para la CL<sub>50</sub> se realizó una prueba de letalidad de 48 h, empleando larvas de 72 ± 3 h provenientes de la craza *flr<sup>3</sup> X mwh*. En el ensayo SMART se utilizó como control negativo al etanol al 5% y como control positivo a la mitomicina-C 0.15 mM y se evaluaron las concentraciones de 10, 20 y 40 mM de linuron utilizando larvas de tercer estadio de las cruza estándar (ST): *flr<sup>3</sup> X mwh* y de alta bioactivación (HB): *ORR-flr<sup>3</sup> X mwh*.

Se determinó la CL<sub>50</sub> en 37.15 mM, siendo un dato nuevo de la toxicidad del linuron. Se encontró mediante el ensayo SMART que el linuron tiene un efecto genotóxico. En la craza ST, el efecto genotóxico se observó en todas las concentraciones, mientras que en la craza HB el efecto se dio solamente en la concentración más alta (40 mM), por lo que se plantea que el metabolismo del linuron y por tanto su desintoxicación, es dependiente de los niveles de citocromos P450 que se expresan de forma elevada en la craza HB, por lo que esta craza fue más eficiente en disminuir su efecto genotóxico.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Plaguicidas**

Varios sectores productivos primarios tales como la ganadería y la agricultura son susceptibles a perder ingresos por plagas. Ante este problema es importante hacer uso de distintos plaguicidas para su control. En México, la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) define a estos como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten las enfermedades humanas y de animales; las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal. Por ejemplo, las que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como a las que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales. También se incluyen en esta definición a las sustancias defoliantes y las desecantes (CICOPLAFEST, 2004).

Los plaguicidas pueden clasificarse por su concentración, modo de acción, composición química, uso al que se destinan, organismos que controlan y por su toxicidad aguda (Tabla 1) (CICOPLAFEST, 2004).

Tabla 1. Clasificación de plaguicidas de acuerdo a la CICOPAFEST (2004)

Característica	Tipo de plaguicida
Concentración	Plaguicida técnico Plaguicida formulado
Modo de acción	De contacto De ingestión Sistémico Fumigante Repelente Defoliante
Composición química	Compuestos inorgánicos Compuestos orgánicos Plaguicidas biológicos
Uso al que se destinan	Agrícolas Forestales Jardinería Pecuarios Domésticos Industriales Urbanos
Organismos que controlan	Insecticida Acaricida Fungicida Bactericida Antibiótico Herbicida Rodenticida Molusquicida
Toxicidad aguda	I) Extremadamente tóxicos II) Altamente tóxicos III) Moderadamente tóxicos IV) Ligeramente tóxicos

### Toxicidad de plaguicidas

Los plaguicidas pueden llegar a acumularse en los organismos blanco y no blanco, dependiendo de su velocidad de absorción con respecto a la de eliminación, así como la afinidad del plaguicida a ciertos tejidos. Los efectos tóxicos o adversos de un agente químico sobre un sistema biológico no se producen a menos que el agente o los productos de su metabolismo alcancen el sitio apropiado del organismo, a una concentración y por un tiempo suficiente que les permita

producir las manifestaciones tóxicas. El que un efecto tóxico ocurra o no dependerá de las características del agente, del ambiente y del organismo. Los efectos a la exposición de plaguicidas son muy variados, desde efectos agudos a crónicos, como carcinogenicidad, teratogenicidad y mutagenicidad, o incluso provocando la muerte inmediata. La toxicología de los plaguicidas es un fenómeno complejo en el que interviene su estructura molecular, es decir, la relación estructura-actividad, sus propiedades fisicoquímicas, de las que depende su afinidad por sistemas biológicos específicos (lo que sería una toxicidad selectiva) y, de manera preponderante, la dosis en que los organismos se exponen a los mismos con una relación dosis-tiempo-respuesta (Labrada y Caseley, 1996).

## **Herbicidas**

Un herbicida es un tipo de plaguicida que inhibe o interrumpe el crecimiento de una planta, por lo que son de gran uso e importancia en el control de malezas o malas hierbas que compiten con los cultivos de interés económico, disminuyendo su rendimiento y su calidad. Las malezas compiten con el cultivo por espacio, luz, agua y nutrientes, así como también pueden favorecer la incidencia de plagas de insectos, ácaros y nemátodos, ya que pueden ser hospederos de éstos (INIFAP, s. f.).

El control de la maleza puede realizarse por varios métodos previos al empleo químico de los herbicidas que llegan a controlarlas o a eliminarlas. Tales métodos son físicos, culturales y biológicos, como lo es el empleo de semillas genéticamente mejoradas competitivamente en crecimiento (Cruz y Merayo, 1989; Bridges, 1995; Labrada y Caseley, 1996).

La aplicación de los herbicidas debe seguir especificaciones precisas sobre su selectividad, el tipo de suelo en el que se aplique, las especies susceptibles a él y su modo de empleo, además de consideraciones de carácter ecológico y ambiental (Cruz y Merayo, 1989).

La clasificación de los herbicidas se hace de acuerdo con distintos parámetros (Tabla 2), tales como: la época de aplicación, la selectividad, el tipo de acción, la familia química y el mecanismo de acción (Cruz y Merayo, 1989; CICLOPLAFEST, 2004).

Tabla 2. Clasificación de herbicidas.

Característica	Tipo de herbicida
Época de aplicación	Pre-emergente (PRE) Post-emergente (POS)
Selectividad	Selectivos No selectivos
Tipo de acción	De contacto Sistémicos
Familia química	Bipiridilos Anilidas Nitrilos Triazinas Uracilos Difenil éteres Piridazinonas Ésteres de ácido ariloxifenoxialcanoico Ácidos haloalifáticos Triazinones Derivados de las ureas Oximas Tiocarbamatos Amidas Carbamatos Cloroacetanilidas Dinitroanilinas Ácidos aricarboxílicos Imidazolinonas Sulfonilureas Compuestos organofosforados Compuestos misceláneos Ácidos ariloxialcanoicos
Mecanismo de acción	Reguladores del crecimiento Inhibidores del crecimiento de plántulas Inhibidores de la fotosíntesis Inhibidores de la síntesis de pigmentos Inhibidores de la síntesis de lípidos Inhibidores de la síntesis de aminoácidos Destruyores de membranas celulares

Algunos de los herbicidas autorizados por la CICLOPLAFEST son el linuron, el clomazon, el alaclor, el bentazon y el glifosato, entre otros (CICLOPLAFEST, 2004).

## Linuron

El linuron es un herbicida derivado de la urea (Figura 1) que consiste de un anillo de benceno con dos átomos de cloro (diclorofenil) y un grupo metoxi, cuyo nombre químico es 3-(3,4-Diclorofenil)-1-metoxi-1-metilurea. Este herbicida tiene un uso selectivo para cultivos de cebada, cempasuchitl, espárrago, gladiola, jacinto, maíz, papa, sorgo, soya, tabaco, trigo, tulipán, zanahoria y plantas ornamentales (CICLOPLAFEST, 2004). El herbicida con compuesto activo de linuron tiene un uso pre-emergente y post-emergente temprano en contra de las dicotiledóneas tales como la verdolaga (*Portulaca oleracea*), el bledo (*Amaranthus sp*), el cadillo (*Cechrus braunii*), la malva (*Malva neglecta*) y la yerba mora (*Solanum nigrum*), entre otras; como también con las monocotiledóneas específicamente de algunas gramíneas tales como: la paja (*Leptochloa sp*), la paja de burro (*Eleusine indica*) y la grama (*Paspalum conjugatum*), entre otras (Delgado, 2012; Chen, 2014).

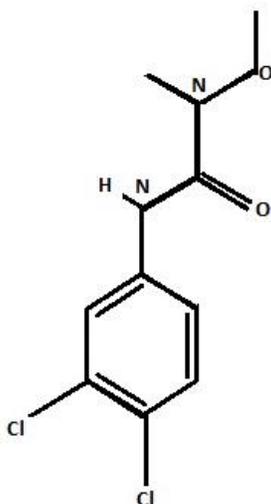


Figura 1. Estructura molecular del linuron.

El tipo de acción del linuron es sistémico. Se absorbe por las raíces de las malezas en germinación y luego se transloca hacia la parte foliar de la planta. Asimismo, también se absorbe directamente por la hoja de las malezas cuando se usa como post-emergente temprano. Su mecanismo de acción es por medio de la inhibición de la fotosíntesis, en concreto, el centro de reacción del fotosistema II en donde impide la transferencia de electrones fotodependientes mediante la unión a

la proteína D1 (Arnaud *et al.*, 1994); produciendo clorosis con una posterior muerte de la maleza, iniciando por las regiones terminales de los brotes y los bordes de las hojas (Jurado *et al.*, 2011; Delgado, 2012; Gupta y Crissman, 2013).

De acuerdo a las características físicas, químicas (Tabla 3), de destino y transporte del linuron sugieren que este herbicida es persistente, moderadamente móvil y semi-volátil en el ambiente (EPA, 2010).

Tabla 3. Características físicas y químicas del linuron.

Formula química	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Nombre químico (IUPAC)	3-(3,4-Diclorofenil)-1-metoxi-1-metilurea
No. CAS.	330-55-2
Masa molecular.	249.09 g/mol
Estado	Sólido. Polvo cristalino blanco.
Punto de fusión	93 – 95°C
Densidad relativa	1.49 g/cm <sup>3</sup>
Presión de vapor	5.1 x 10 <sup>-3</sup> Pa a 20°C
Solubilidad en agua	52.7 mg/L a un pH 5 a 20°C 63.8 mg/L a un pH 7 a 20°C 74.5 mg/L a un pH 9 a 20°C
Solubilidad en disolventes orgánicos	Acetonitrilo 152 g/L a 20°C Diclorometano 463 g/L a 20°C Acetato de etilo 292 g/L a 20°C Hexano 2. 3 g/L a 20°C Metanol 170 g/L a 20°C 2-propanol 18 g/L a 20°C C Tolueno 75 g/L a 20°C
Estabilidad hidrolítica (DT50)	pH 5 (1220 días) pH 7 (1460 días) pH 9 (1080 días)
Descomposición	Al calentarse produce gases tóxicos que incluyen al cloruro de hidrógeno y a los óxidos de nitrógeno.

Modificado de European commission, 2002.

El linuron se fija en las capas superficiales del suelo de 3 a 5 cm, por lo que actúa en la zona en que se desarrolla la mayoría de las semillas de las malezas. Su acción perdura de 1 a 4 meses, dependiendo de la dosis y de la concentración aplicada, además de las características propias del suelo, como la textura y la porosidad (Manual fitosanitario, s. f).

La vida media del linuron es de 30 a 150 días (Wauchope *et al.*, 1992). En su degradación se desprenden el 3,4-dicloroanilina, el N'-(3,4-diclorofenil)-N-metoxiurea, el N'-(3,4-diclorofenil) urea, el N'-(6-hidroxi-3,4-diclorofenil) urea, además, también se libera CO<sub>2</sub> (Chen, 2014; Horemans *et al.*, 2016). Se ha encontrado que los metabolitos 3,4-dicloroanilina y el CO<sub>2</sub> son menos tóxicos que el mismo linuron (EPA, 1987). Ninguno de estos metabolitos se han probado en algún sistema de prueba para valorar su posible genotoxicidad.

Con la biodegradación de la edafofauna, el linuron incrementa su disipación en el suelo (Caux *et al.*, 1998; Dejonghe *et al.*, 2003; Bers *et al.*, 2013), llegando así a encontrarse en aguas superficiales y subterráneas (Caux *et al.*, 1998); por lo que el estudio de su genotóxicidad es un tema de investigación de gran importancia para conocer su posible efecto sobre los organismos y comunidades que pudieran tener contacto con él.

### **Genotoxicidad y toxicidad del linuron**

Los ensayos de genotoxicidad y de toxicidad en un modelo biológico son herramientas útiles para contar con una evaluación preliminar cuantitativa y cualitativa de los efectos de este tipo que ejercen una gran variedad de xenobióticos.

De acuerdo con la EPA (1988) el linuron tiene una nula toxicidad en células de ovario de criceto chino (CHO) y en *Salmonella typhimurim*. Sin embargo, por medio de la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se demostró la producción de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana (Papapaulou *et al.*, 2001).

El linuron en diferentes ensayos murinos mostró ser un carcinógeno (Gupta y Crissman, 2013), además de producir hiperplasia y adenoma testicular en ratas, así como adenoma hepatocelular en ratones hembras (EPA, 1988; Gupta y Crissman, 2013). También se detectaron efectos teratogénicos en animales de experimentación (Gupta y Crissman, 2013; Gupta, 2014). La EPA (2010) lo

clasifica como un carcinógeno del grupo C, siendo el sistema hematopoyético el principal órgano afectado por su toxicidad.

En 2014, Santos y colaboradores probaron el efecto citotóxico del linuron en dos modelos *in vitro*. El primero fue un procarionte, la bacteria gram positiva *Bacillus stearothermophilus*, el cual es ventajoso por el crecimiento rápido a altas temperaturas, evitando la contaminación con otros microorganismos. El efecto citotóxico se valoró mediante la sensibilidad al estrés químico notándose una disminución de la viabilidad celular, así como la disminución y/o inhibición progresiva del crecimiento bacteriano (IC) dependiente de la concentración (IC<sub>50</sub> de 74 M). Así mismo, se encontró una modificación de la composición de lípidos de la membrana y en la actividad respiratoria valorada a través de la disminución en la tasa de consumo del oxígeno (IC<sub>50</sub> de 98 nmol/mg) (Santos *et al.*, 2014).

El otro modelo fue un eucarionte, del cual se utilizaron las mitocondrias de hígado de rata, metodología que permite una evaluación precisa de una gran cantidad de contaminantes del medio ambiente que promueven la interrupción de la bioenergética mitocondrial, es decir, de la inhibición de la respiración. En este ensayo se encontró un deterioro de la actividad respiratoria así como de la tasa de repolarización, una disminución de la proporción del control respiratorio (RCR) y de la eficiencia de la fosforilación, una mayor permeabilidad a protones y una alteración en la membrana mitocondrial (Santos *et al.*, 2014).

En el jilguero *Carduelis tristis*, el linuron retrasa la progresión de la “muda” pre-alterna dependiendo de la dosis y altera la función tiroidea (Sughrue *et al.*, 2008). En *Pimephales promelas* es un perturbador endócrino, afectando su reproducción por acción antiandrogénica (Marlatt *et al.*, 2013). En rata y en humanos inhibe la competitividad de unión de los andrógenos a los receptores en estudios *in vitro* (Bauer *et al.*, 2000).

De acuerdo a la tercera edición de Patología toxicológica, el linuron tiene una DL<sub>50</sub> oral de 1500 mg/Kg en rata (Gupta y Crissman, 2013), y por la CICOPALFEST (2004) la DL<sub>50</sub> dérmica en conejo es de 5000 mg/Kg.

## **Metabolismo de xenobióticos**

Todos los organismos se encuentran expuestos a que ingresen a su interior compuestos que no son parte del metabolismo habitual, estos compuestos extraños se denominan “xenobióticos”. Algunos xenobióticos tienen una naturaleza liposoluble, por lo que son capaces de unirse a membranas, además de acceder al citoplasma siendo capaces de afectar el metabolismo celular, o bien, teniendo un efecto nocivo en el DNA (Rodríguez y Rodeiro, 2014).

Los xenobióticos son metabolizados a compuestos hidrofílicos mediante diversos mecanismos de biotransformación y de bioactivación que implican la hidrólisis, reducción, oxidación y conjugación para convertirlos en formas solubles y permitir su eliminación, neutralización o su activación (Calderón *et al.*, 1999; Vuppalanchi, 2011).

El metabolismo de xenobióticos está compuesto por dos fases: fase I, de transformación; y fase II, de conjugación (Vuppalanchi, 2011; Rodríguez y Rodeiro, 2014).

En la fase I, los xenobióticos se transforman a través de modificaciones que aumentan su polaridad, esto al integrar grupos funcionales mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y acetilación por medio de enzimas tales como los citocromos P450, principalmente, flavin-monooxigenasas y peroxidasas. En esta etapa, en algunos casos el xenobiotico se convierte a otro metabolito más reactivo, por lo que hay una activación tóxica o bioactivación, en otros, lo que ocurre es una inactivación del xenobiótico reactivo (Plewa y Wagner, 1993; Vuppalanchi, 2011; Anzalone, 2010; Rodríguez y Rodeiro, 2014).

En la fase II se da la conjugación o la combinación de los sustratos resultantes de la fase I con compuestos endógenos del organismo, aumentando así su solubilidad, disminuyendo su actividad. También puede ocurrir una bioactivación de los xenobióticos, pero en menor medida que en la fase I. El objetivo primordial

de la fase II es aumentar la solubilidad para que los metabolitos secundarios se eliminen o se excreten (Plewa y Wagner, 1993).

En la fase II ocurren reacciones de adición de aminoácidos, de glutatión, de sulfato y de carbohidratos por enzimas tales como la glutatión S-transferasa, la sulfotransferasa, la gluconil transferasa, la uridina-5-difosfato, la metiltransferasa y la N-acetiltransferasa (Vuppalanchi, 2011).

Un xenobiótico puede pasar o no por alguna fase del metabolismo, por ejemplo, algunos de ellos son muy estables ante modificaciones, por lo que se pueden llegar a acumular al no ser metabolizadas (Vulppalanchi, 2011; Rodríguez y Rodeiro, 2014). El metabolismo de xenobióticos se muestra en la Figura 2.

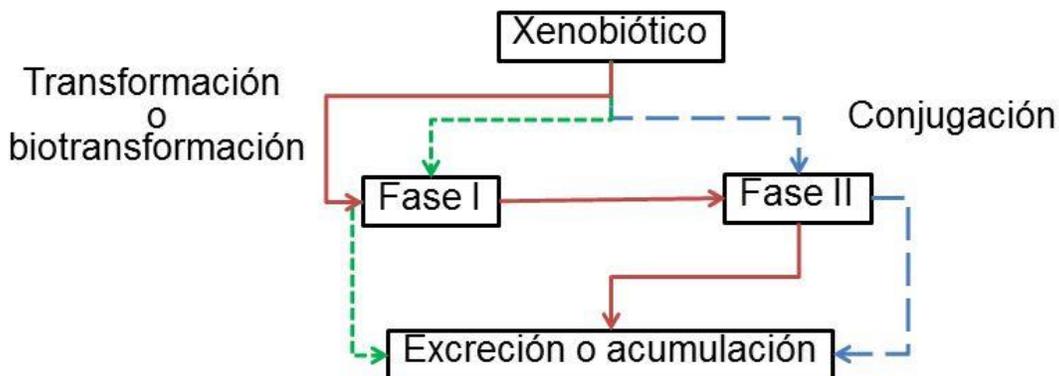


Figura 2. Metabolismo de los xenobióticos. En flechas rojas se muestra el camino general de algunos xenobióticos pasando por la fase I y fase II hasta su excreción o acumulación. En flechas verdes se muestra el camino de otros xenobióticos que solo pasan por la fase I y posteriormente son excretados o acumulados. En flechas azules se muestra el camino de xenobióticos que saltan la fase I y solo pasan por la fase II y finalmente son excretados o acumulados.

### Citocromos P450

Los citocromos P450 son una superfamilia de enzimas hemoproteicas con una masa molecular que varía de 50 a 60 kDa, también llamadas monooxigenasas, ya que dependen de oxígeno molecular y de NADPH facilitado por la citocromo P450 reductasa (flavoproteína); pero también pueden llegar a depender de una proteína sulfoférrica (redoxina) o del citocromo b5. Generalmente, los citocromos P450

tienen una baja especificidad a los sustratos, por lo que son capaces de identificar un número casi ilimitado de éstos (Feyereisen, 1999; Hamberger y Bak, 2013).

Estas enzimas se encuentran en animales, en plantas, en hongos y en bacterias unidas a membranas, principalmente del retículo endoplasmático liso, pero también se encuentran en las mitocondrias unidas a la membrana por el extremo amino (Gonzalez, 1990; Hamberger y Bak, 2013).

Los citocromos P450 fueron caracterizados y denominados por Omura y Sato (1964), quienes al estudiar los pigmentos presentes en microsomas hepáticos encontraron que éste al ser reducido por NADPH se unía a monóxido de carbono, teniendo un pico de absorbancia de 450 nm.

Los integrantes de la superfamilia de los citocromos P450 tienen secuencias muy conservadas, especialmente en la región cercana al C-terminal, la cual contiene la cisteína hemo vinculante. Tienen un dominio FAD que contiene NADH o FAD dependiente de NADPH, un dominio hemo, en donde se encuentra el átomo de hierro en estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y un dominio tiol (-SH) de una cisteína y una molécula de agua Figura 3 (Hamberger y Bak, 2013).

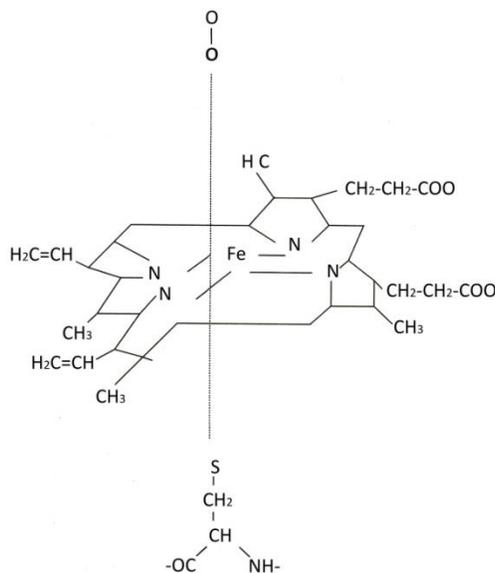


Figura 3. Citocromo P450 con su grupo hemo (modificado de Rodríguez-Arnaiz, 2004).

Los citocromos P450 están involucrados en la síntesis de compuestos endógenos, y en la biotransformación tanto de compuestos endógenos y exógenos, además de una posible bioactivación de estos últimos, por lo que se dice tienen una función mixta. Algunos sustratos metabolizados por estos citocromos se muestran en la Tabla 4. Los citocromos P450 participan en una gran cantidad de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis principalmente; pero también participan en reacciones de enlaces C-C de escisión, de desalquilación de N, O y S, de desaminación, de formación de sulfóxidos y en la deshalogenación (Feyereisen, 1999; Mizutani y Sato, 2011; Hamberger y Bak, 2013).

Tabla 4. Ejemplo de algunos sustratos metabolizados por los citocromos P450.

ENDÓGENOS	EXÓGENOS (XENOBIÓTICOS)
Enzimas	Insecticidas
Ácidos grasos	Herbicidas
Esteroides	Drogas
Lípidos	Medicamentos
Aminoácidos	Cosméticos
Terpenos	
Alcaloides	

Existen numerosas isoformas de citocromos P450, las cuales se denominan bajo un criterio homogenizador en el cual todos los genes que codifican citocromos P450 tienen un prefijo CYP que designa a toda la superfamilia. Los CYP se encuentran en una misma familia si tienen más del 40% de identidad en la secuencia de aminoácidos, y a una misma subfamilia cuando es más del 55% (Deng y Hatzios, 2003). La nomenclatura de los citocromos P450 se muestra en la Figura 4.

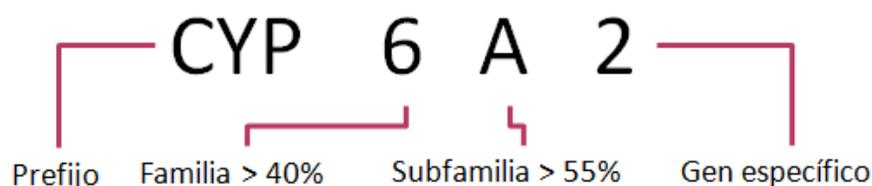


Figura 4. Nomenclatura de citocromos P450.

### ***Drosophila melanogaster***

*Drosophila melanogaster* es un modelo biológico eucarionte de gran importancia para distintas disciplinas de la biología, como lo son la toxicología, la genética, la

embriología y la neurología, entre otras. Esto se debe a las ventajas que representan su corto ciclo de vida, la gran cantidad de descendencia que se obtiene, los pocos requerimientos para su mantenimiento, su fácil manejo, además del hecho de que su biología y genética son bien conocidas.

A través de distintos ensayos en *D. melanogaster* como el de letales recesivos ligados al sexo, el ensayo de letales dominantes, el ensayo de mutación y recombinación somática en ojo y ala, y otros más, es que se pueden estudiar diversos compuestos mutagénicos como los promutagénos, carcinogénos y teratogénos, a distintas dosis y exposición (Graf *et al.*, 1984).

## Taxonomía

La clasificación de *D. melanogaster* es:

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Hexapoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Drosophilidae

Género: *Drosophila*

Especie: *Drosophila  
melanogaster*

(Meigen, 1830)

## Descripción

El plan corporal de *D. melanogaster* consiste en tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen. Tiene dos pares de alas, uno funciona para el vuelo y el otro forma los halterios, estructuras que les permite mantener el equilibrio. Presentan tres pares de patas y un par de antenas. El organismo silvestre tiene un color amarillo pálido a marrón rojizo o negro y ojos rojos (Ravi y Kar, 2014).

*D. melanogaster* presenta dimorfismo sexual (Figura 5). Los machos son fácilmente distinguibles debido a la presencia de ciertas características ausentes en las hembras, por ejemplo, la región negra distinta en el abdomen, los peines sexuales, que son una fila de cerdas oscuras en el tarso del primer par de patas, así como por un grupo de pelos de punta (llamados *claspers*) que rodean el ano y

los genitales. Los *claspers* los utilizan para unirse a la hembra durante el apareamiento (Ravi y Kar, 2014).



Figura 5. Adultos de *D. melanogaster*, del lado izquierdo se muestra al macho (♂) y del lado derecho a la hembra (♀).

*D. melanogaster* presenta cuatro pares de cromosomas, tres somáticos y uno sexual, los cuales están mapeados en su totalidad (Bridges, 1935; Gilbert, 2007), así como también se cuenta ya con el genoma completamente secuenciado (Adams *et al.*, 2000).

### Ciclo de vida

El ciclo de vida inicia con la ovoposición tras la fecundación. El huevo tiene forma ovoide, liso dorsoventralmente, bilateralmente simétrico, con 500  $\mu\text{m}$  de largo y un diámetro aproximado de 180  $\mu\text{m}$ . Éste eclosiona 24 h después en una larva de primer estadio, que muda a un segundo estadio tras 24 h, y ésta a un tercer estadio tras un día (Weigmann *et al.*, 2003; Ravi y Kar, 2014).

Después de dos a tres días en el tercer estadio, la larva da inicio a la metamorfosis como pupa, de la cual, tras cuatro días emerge un adulto; el cual es fértil 8 h después. Un ciclo dura aproximadamente de 10 a 12 días a 25°C con una humedad relativa de 60%, por lo que se le considera relativamente corto y muy conveniente para diversos estudios en los que se requiera observar un efecto tras muchas generaciones (Weigmann *et al.*, 2003; Rodríguez-Arnaiz, 2003). En la Figura 6 se muestra un esquema representando el ciclo de vida de *D. melanogaster*.

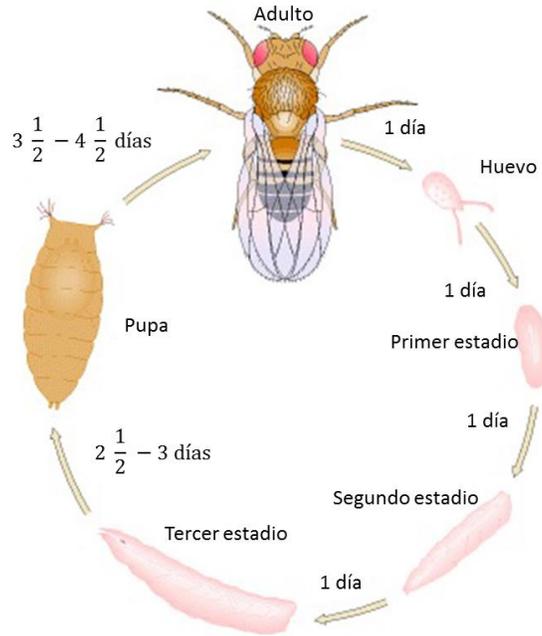


Figura 6. Ciclo de vida de *D. melanogaster* (modificado de Griffiths *et al.*, 2000).

En la fase larvaria hay dos conjuntos de células: las larvarias y la imaginales. Las primeras se degradan durante la metamorfosis, y las segundas constituyen a los discos imaginales, cuerpos de 20 a 50 células, que se diferenciarán a las distintas estructuras del organismo adulto como antenas, patas, ojos y alas, entre otras (Figura 7). Por ello se puede rastrear si ocurrió una mutación en algún disco imaginal específico, por el efecto observable en la estructura formada. El primordio del ala es de origen ectodérmico, formado por un grupo de 40 células que proliferan hasta alcanzar en la pupa las 25,000 células por ala, aproximadamente (Russell, 1998).

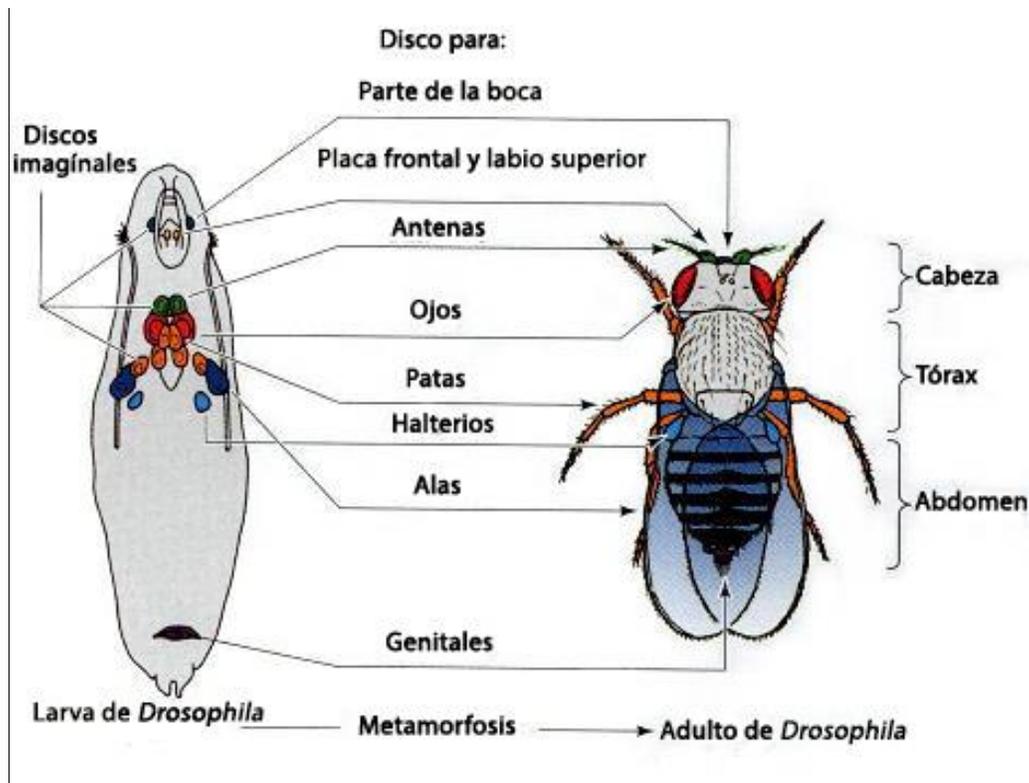


Figura 7. Discos imaginales de la larva de *D. melanogaster* y las estructuras en las que se diferencian para formar parte de la mosca adulta (modificado de Gilbert, 2000).

La expresión de los citocromos P450 en *D. melanogaster* es mayor durante las fases larvianas, en particular en el tercer estadio. El gen *CYP6A2*, ubicado en el cromosoma 2 (Feyereisen, 1999), es el responsable del metabolismo de la aflatoxina B1, del dimetilbenzoantraceno y del 3 amino-piridol-indol (Saner *et al.*, 1996).

### Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y dosis letal media (DL<sub>50</sub>)

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) son las concentraciones y dosis, respectivamente, del agente a probar a las cuales se muere el 50% de la población de estudio al estar expuestas a éste. Son medidas recurrentemente empleadas para evaluar la toxicidad de diversos xenobióticos (Gad, 2014).

La CL<sub>50</sub> y la DL<sub>50</sub> son datos estadísticos que se calculan ya sea gráficamente por medio del logaritmo de los porcentajes de letalidad, dando una curva con

pendiente sigmoideal, que representan la dosis-respuesta para la especie y sustancia estudiada, o bien, por el método Probit, ayudado por algún software como SigmaPlot (Gad, 2014; Park *et al.*, 2012; Charpentier *et al.*, 2014).

Las pruebas de letalidad pueden afectarse por varios factores intrínsecos y extrínsecos, los cuales se deben de considerar para el planteamiento del protocolo a seguir. Algunos de estos factores son la raza, la subcepa, el peso, el sexo, las condiciones ambientales, el tipo de exposición y la vía de administración, entre otros (Gad, 2014).

### **Ensayo de mutación y recombinación somática (SMART)**

El ensayo de mutación y recombinación somática, conocido como SMART por sus siglas en inglés (Somatic Mutation and Recombination Test), es un ensayo *in vivo* en el que se emplea tanto a los ojos como a las alas de *Drosophila melanogaster*. En particular, el ensayo que emplea a las alas puede detectar la actividad genotóxica de un xenobiótico en células somáticas, ya sea de tipo mutagénica o recombinogénica (Vogel, 1992; Rodrigues *et al.*, 2004).

En el ensayo, las larvas de tercer estadio de  $72 \pm 3$  h de edad se exponen al xenobiótico. Se puede emplear una cruce estándar ST ( $flr^3 \times mwh$ ) de expresión normal de citocromos P450, o bien, la cruce de alta bioactivación HB ( $ORR-flr^3 \times mwh$ ) que tiene una sobreexpresión constitutiva de citocromos P450 (Rodrigues *et al.*, 2004).

Los marcadores de las cepas son recesivos. El marcador tipo *mwh* se encuentra en el cromosoma 3-0.3, éste produce un fenotipo de tricomas múltiples por célula (más de dos). Por otro lado el marcador *flr<sup>3</sup>* se localiza en el cromosoma 3-38.8, produce un fenotipo de tricomas en forma de flama o mal formados, del mismo modo que el marcador *ORR-flr<sup>3</sup>* (Vogel, 1992; Rodrigues *et al.*, 2004).

La cepa *flr<sup>3</sup>* y *ORR-flr<sup>3</sup>* presentan los marcadores en estado heterocigoto, ya que en su estado homocigoto son letales, el primero *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>ser</sup>* y el segundo *ORR/ORR-flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>ser</sup>*. Ambas cepas presentan el balanceador TM3 que al

contener inversiones impide la recombinación con su cromosoma homólogo, además del marcador *Ba<sup>ser</sup>* que produce un fenotipo de borde de alas aserradas (Vogel, 1992; Rodrigues *et al.*, 2004).

El fundamento de la prueba en ala es "la pérdida de heterocigosis de los marcadores que se expresan como clones o manchas de tricomas múltiples (*mwh*) o mal formados (*flr<sup>3</sup>*), derivados de células mutantes en las alas de los organismos adultos, que debieron de presentar la mutación en el estado imaginal" (Graf *et al.*, 1984).

La cepa *ORR-flr<sup>3</sup>* es una mutante que tiene los cromosomas 1 y 2 de la línea resistente al DDT Oregon R (R), presentando un alto nivel de expresión constitutiva del CYP6A2 (Rodrigues *et al.*, 2004).

El que haya o no genotoxicidad se determinara por la correlación del número de células afectadas, así como por la frecuencia de manchas. El tipo de marcador expresado (Figura 8) puede revelar los mecanismos de mutación que participan en la producción de un clon (Rodrigues *et al.*, 2004).

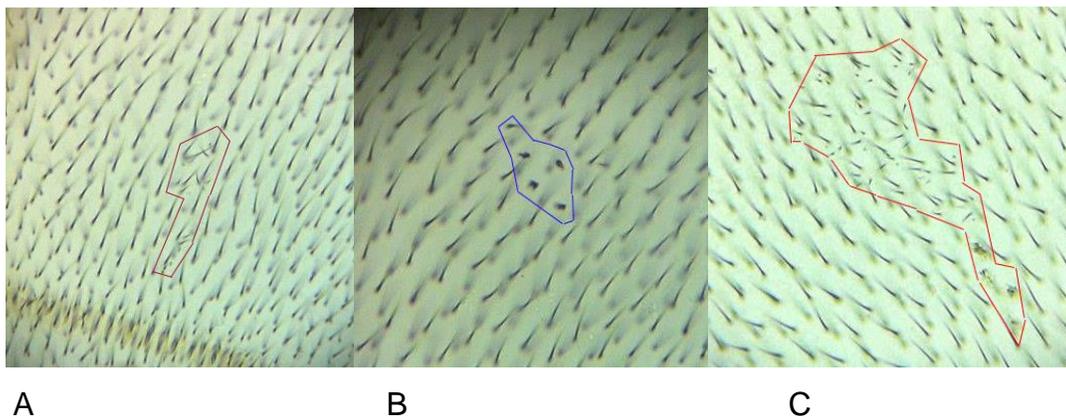


Figura 8. Manchas causadas por los marcadores *mwh* y *flr<sup>3</sup>*. A) Mancha sencilla con la expresión del marcador *mwh*. B) Mancha sencilla con la expresión del marcador *flr<sup>3</sup>*. C) Mancha gemela con la expresión de ambos marcadores.

En la formación de manchas participan varios eventos genéticos como mutaciones puntuales, deleciones, recombinaciones somáticas, ruptura y/o pérdida de un cromosoma por una no disyunción (Vogel, 1992; Rodrigues *et al.*, 2004). La formación de éstos se muestra en la Figura 9.

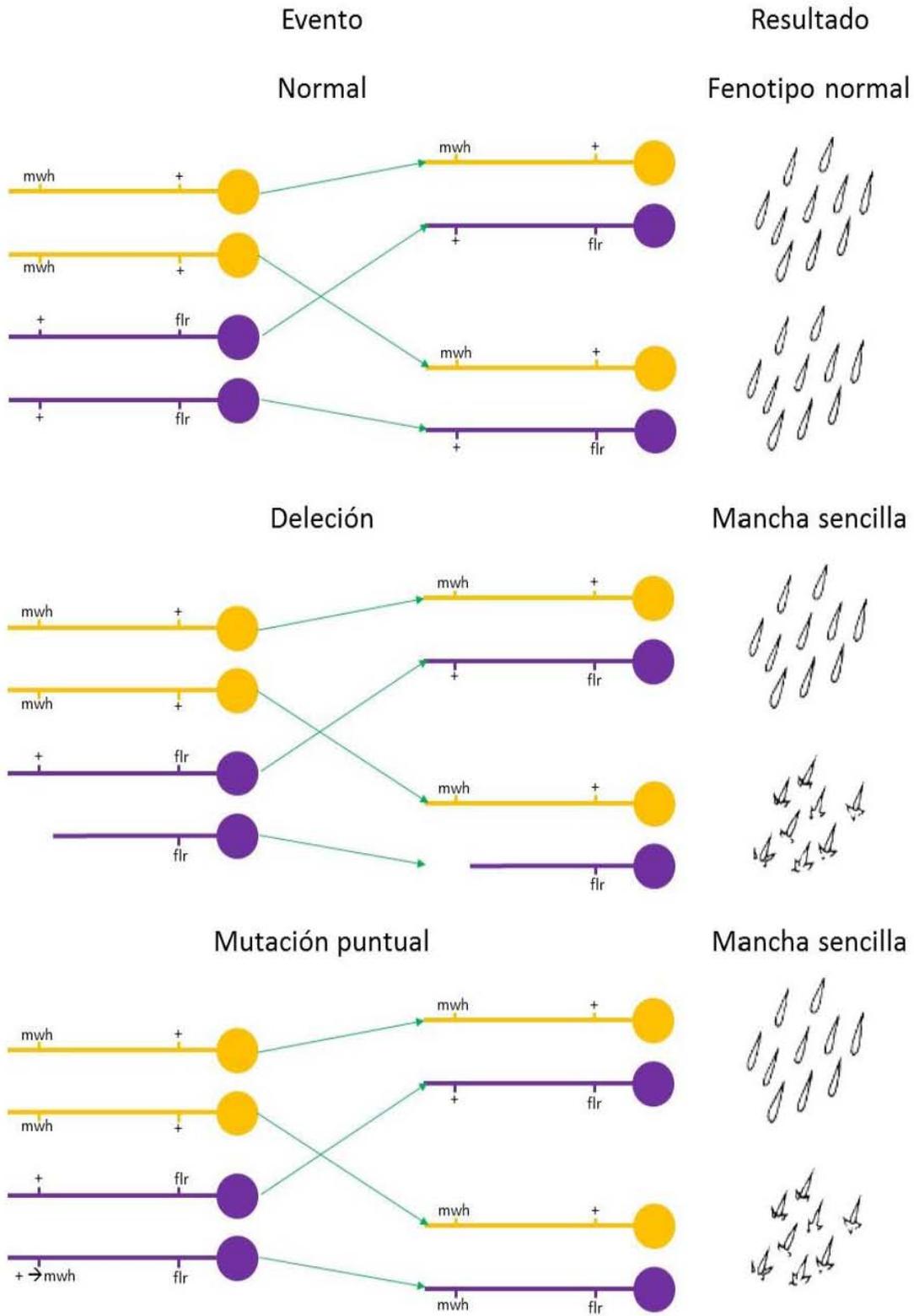


Figura 9. Eventos genéticos detectables en el ensayo SMART en la formación de manchas (modificado de Graf *et al.*, 1984).

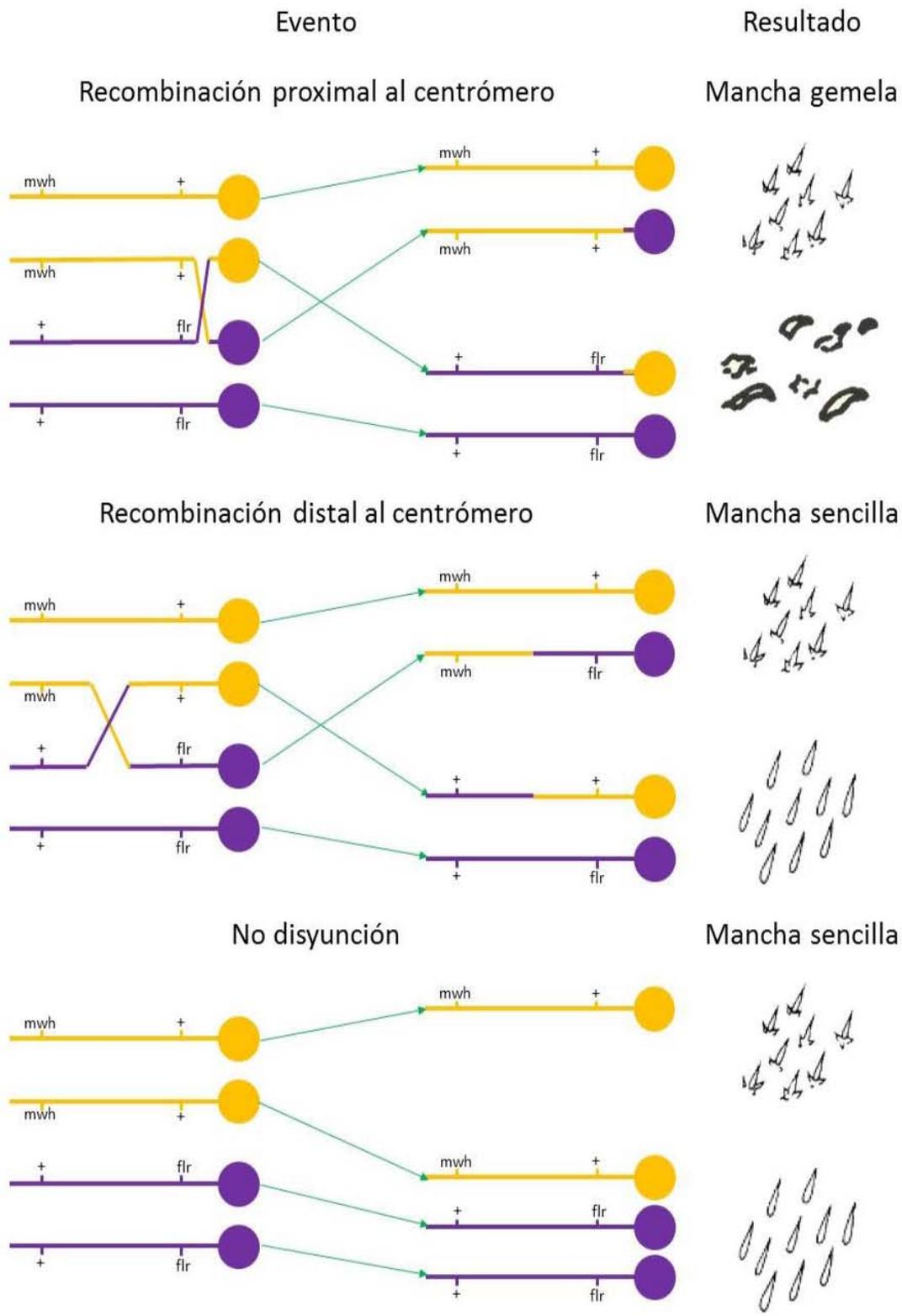


Figura 9. Eventos genéticos detectables en el ensayo SMART en la formación de manchas (modificado de Graf *et al.*, 1984).

## JUSTIFICACIÓN

Existen distintos estudios que demuestran que los pesticidas pueden tener un efecto genotóxico. Los herbicidas representan el grupo de pesticidas de mayor uso en el sector agrícola mexicano, teniendo un efecto amplio en el ambiente con respecto a los organismos expuestos a ellos. El linuron es un herbicida de uso autorizado en México, del cual se tiene poca información sobre su genotoxicidad, debido a esto, se requieren mayor cantidad de estudios referentes al tema. *D. melanogaster* representa un modelo biológico *in vivo* ventajoso para el estudio de la genotoxicidad de xenobióticos como lo es el linuron comercial (Linurex 50WP), puesto que puede aportar información del metabolismo de éste, así como su posible acción mutagénica o recombinogénica esto por medio del ensayo SMART.

## OBJETIVOS

### General

- Evaluar el efecto genotóxico del linuron en su versión comercial (Linurex 50WP) en *D. melanogaster*, mediante el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) en ala.

### Particulares

- Determinar la  $CL_{50}$  del linuron comercial (Linurex 50WP) para *D. melanogaster* mediante pruebas de letalidad.
- Determinar si el linuron comercial (Linurex 50WP) tiene un proceso de bioactivación en el metabolismo de *D. melanogaster* usando las cruces ST y HB.

## **HIPÓTESIS**

Si el linuron comercial (Linurex 50WP) induce algún tipo de daño que resulte en la modificación del DNA, éste se verá reflejado en la frecuencia y en el tipo de mancha que se observe en el ensayo SMART en células del ala de *D. melanogaster*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Compuestos químicos**

El herbicida comercial Linurex 50WP se obtuvo de la casa de agroinsumos Agroinova, Xochimilco, Cd. de México, en una presentación de 1 Kg con 50% de linuron y 50% de adherentes, agentes estabilizadores y diluyentes.

Mitomomicina-C No. CAS: 50-07-7 Sigma-Aldrich

Medio Carolina instantáneo: formula 4-24® instant Drosophila Medium, Plain adquirido de Carolina Biological Supply Company.

### **Determinación de la CL<sub>50</sub>: prueba de toxicidad**

Para la selección de las concentraciones a usar para el ensayo SMART en ala se requirió determinar la CL<sub>50</sub> del linuron en su presentación comercial para larvas de *D. melanogaster*, por lo que se realizó una prueba de letalidad en larvas de tercer estadio ( $72 \pm 3$  h) de la craza *flr<sup>3</sup>X mwh*, utilizando las concentraciones de 3, 6, 12 y 25 mM de linuron comercial y, como control negativo, al etanol al 5% (Anexo). La prueba de letalidad consistió en colocar 25 larvas en un vial con 0.5 g de medio Carolina instantáneo y 2.5 ml de la solución con la concentración correspondiente, registrando la letalidad en cuanto al número de adultos que emergieron después de 6 días. Todos los experimentos se hicieron por quintuplicado.

Con los valores obtenidos de la prueba de letalidad, se calculó la CL<sub>50</sub> mediante una regresión logarítmica con el Software Excel.

### **Ensayo de mutación y recombinación somática SMART en ala**

#### **Cruzas**

Para el ensayo se usaron las cruzas estándar (ST): *flr<sup>3</sup>X mwh* y la craza de alta bioactivación (HB): *ORR-flr<sup>3</sup>X mwh*.

La cruce estándar (ST) se realizó con hembras vírgenes *flr<sup>3</sup>* y machos jóvenes *mwh* mientras que en la cruce de alta bioactivación (HB) se requirieron hembras vírgenes *ORR-flr<sup>3</sup>* y machos jóvenes *mwh*. Las cruces se realizaron en frascos de vidrio con medio de cultivo estándar (Anexo) en donde se colocaron las hembras vírgenes y se vertieron los machos jóvenes en una relación 2:1 para cada cruce respectiva. Los frascos se mantuvieron a temperatura ambiente.

### **Sincronización**

Transcurridos tres días después de realizar las cruces se llevó a cabo la sincronización de cada una. Para ésta se requirió que en frascos con medio de cultivo estándar suplementado con levadura fresca y sacarosa, se transvasará cada frasco de cruce y se mantuviera a temperatura ambiente por 6 h, esto con el fin de promover la ovoposición y asegurar que las larvas resultantes tengan la misma edad con una diferencia de 3 h. Transcurrido el tiempo se regresaron las cruces a los frascos originales.

### **Tratamientos**

Se decidió usar a la mitomicina-C (MMC) como control positivo, ya que es un agente genotóxico y, generalmente, se emplea como mutágeno de referencia (Szybalski y Lyer, 1964; Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 1996; Tomasz y Palom, 1997). Se empleó etanol al 5% como control negativo.

Después de tres días de la sincronización, se realizaron tratamientos crónicos para cada cruce, en donde las larvas de  $72 \pm 3$  h se obtuvieron de los frascos sincronizados por un gradiente de concentración dado por el empleo de sacarosa al 20% (Anexo) y el uso de una malla fina de nylon.

En viales de vidrio con 0.5 g de medio Carolina instantáneo y 2.5 ml de la solución con la concentración a evaluar, se colocaron las larvas. Estos viales se mantuvieron a temperatura ambiente  $24 \pm 2$  °C a 60 – 70% de humedad relativa hasta que emergieron los adultos, los cuales se fijaron en etanol al 70%.

## Elaboración de laminillas

De la descendencia obtenida de cada uno de los tratamientos, se tenían dos tipos de adultos de fenotipo diferente en cuanto al ala: (a) tipo silvestre; y (b) con borde aserrado. Para la elaboración de laminillas se emplearon las moscas con ala silvestre que son trans-heterocigotas  $mwh+ / +flr^3$  o  $mwh+ / +ORR-flr^3$ .

De cada tratamiento se elaboraron 3 laminillas, cada una con dos filas de 5 pares de alas de hembras y otras dos filas de 5 pares de alas de machos. Para pegar las alas al portaobjetos se requirió que éstas se retiraran de las moscas y se enjuagaran con agua para posteriormente sumergirlas en la solución de Fauré (Anexo) y así, finalmente, pegarlas al portaobjetos. Se dejó secar la laminilla por tres días a temperatura ambiente para poder colocarle un cubreobjetos con una gota de solución de Fauré. A la laminilla se le colocó una pesa por 2 h con el fin de que las alas se extendieran correctamente. Posteriormente, se limpió la laminilla y se selló con esmalte para uñas transparente.

## Análisis de las preparaciones

Las preparaciones se analizaron en un microscopio óptico a 40X, con una norma de lectura de izquierda-derecha, del ala 1 a la 10, abajo ala 11, de derecha-izquierda 11-20 y así sucesivamente (Figura 10). La lectura en cada una de las alas, se realizó en los siete sectores del ala tanto en la vista dorsal como ventral, siguiendo una norma de lectura que se muestra en la Figura 11.

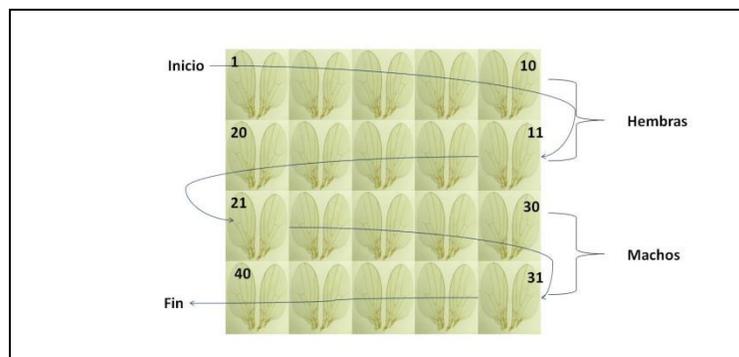


Figura 10. Preparación de alas y lectura de la misma.

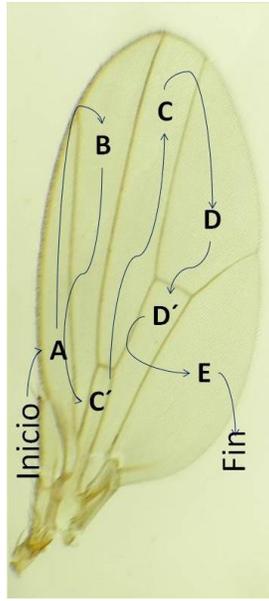


Figura 11. Sectores del ala de *D. melanogaster* y norma de lectura de la misma.

En el análisis se registró el tipo, la ubicación y la cantidad de manchas observadas en cada ala por laminilla de cada concentración evaluada.

Algunas consideraciones que se tomaron en cuenta al analizar las preparaciones fueron: considerar una mancha tipo *mwh* sólo a aquella célula que tenga más de dos tricomas o grupo de células *mwh* cuando por lo menos una de ellas tenga más de dos tricomas y que una célula se incluirá en una misma mancha si ésta no se encuentra separada por tres tricomas normales.

### **Análisis estadístico**

Las frecuencias del tipo de mancha (simples o gemelas), el tamaño de mancha (pequeña si presenta una a dos células afectadas; grande si tiene más de dos células afectadas) y la frecuencia total de manchas por mosca obtenidas para cada concentración fueron comparadas con las frecuencias del control negativo en el programa SMART PC-versión 2.1 basado en la prueba no paramétrica de ji cuadrada para proporciones con un nivel de significancia de 0.05 (Frei y Würigler, 1988).

El efecto genotóxico se determinó en base a las diferencias en las frecuencias de los tratamientos con respecto al control negativo. Esta diferencia se denomina

factor de multiplicación “m”. Se tiene una  $m=2$  para manchas simples pequeñas y manchas totales, y una  $m=5$  para manchas simples grandes y manchas gemelas (Frei y Würigler, 1988).

Para realizar una conclusión de los resultados se requirió la formulación de las siguientes hipótesis:

- $H_0$  o hipótesis nula: no hay diferencia significativa en la frecuencia de mutación entre el grupo control y el grupo tratado.
- $H_1$  o hipótesis alternativa: sí hay diferencia significativa en la frecuencia de mutación entre el grupo control y el grupo tratado.

De acuerdo a los datos procesados se pueden tener cuatro posibles resultados (Frei y Würigler, 1988), que son:

1. Aceptar la  $H_0$  y la  $H_1$ : inconcluyente.
2. Aceptar la  $H_0$  y rechazar  $H_1$ : negativo.
3. Rechazar la  $H_0$  y aceptar la  $H_1$ : positivo.
4. Rechazar la  $H_0$  y la  $H_1$ : débil positivo.

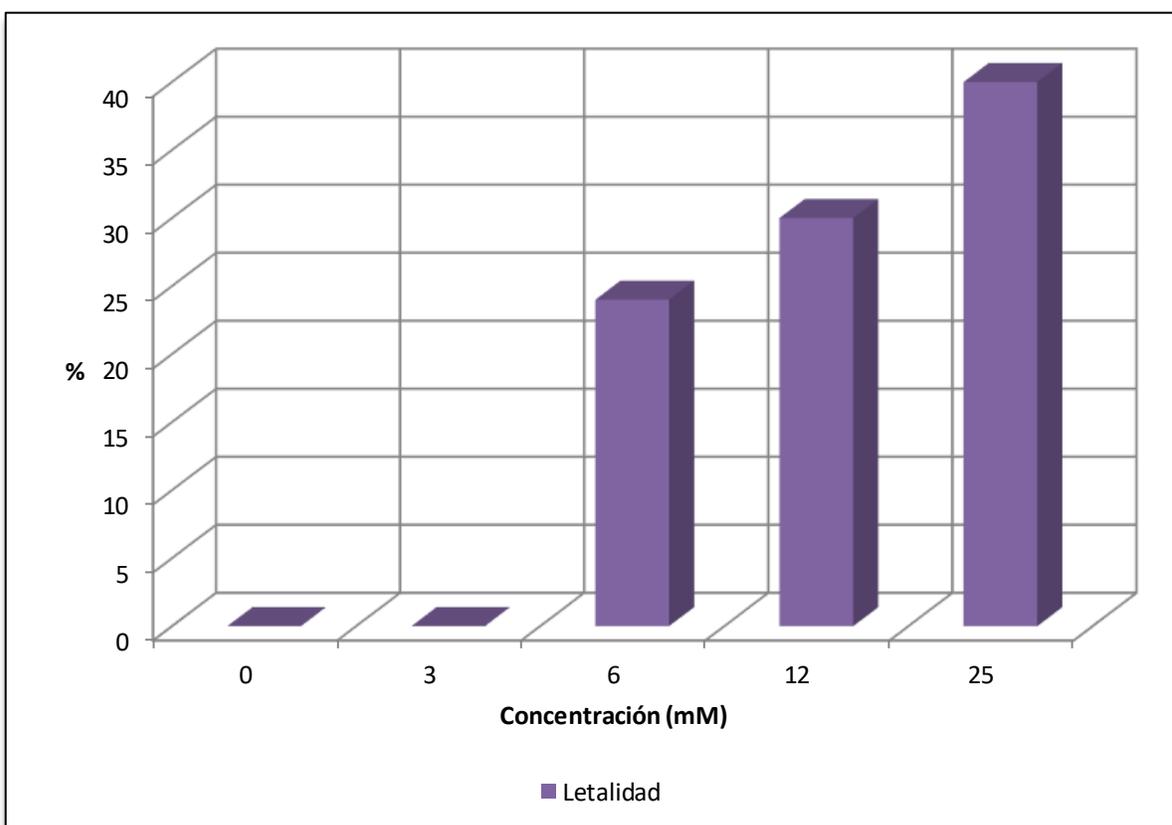
## RESULTADOS

### Determinación de la $CL_{50}$ : prueba de toxicidad

El porcentaje de letalidad para las concentraciones evaluadas 3, 6, 12 y 25 mM de linuron comercial (Tabla 5) muestra una tendencia proporcional a las dosis empleadas (Gráfica 1).

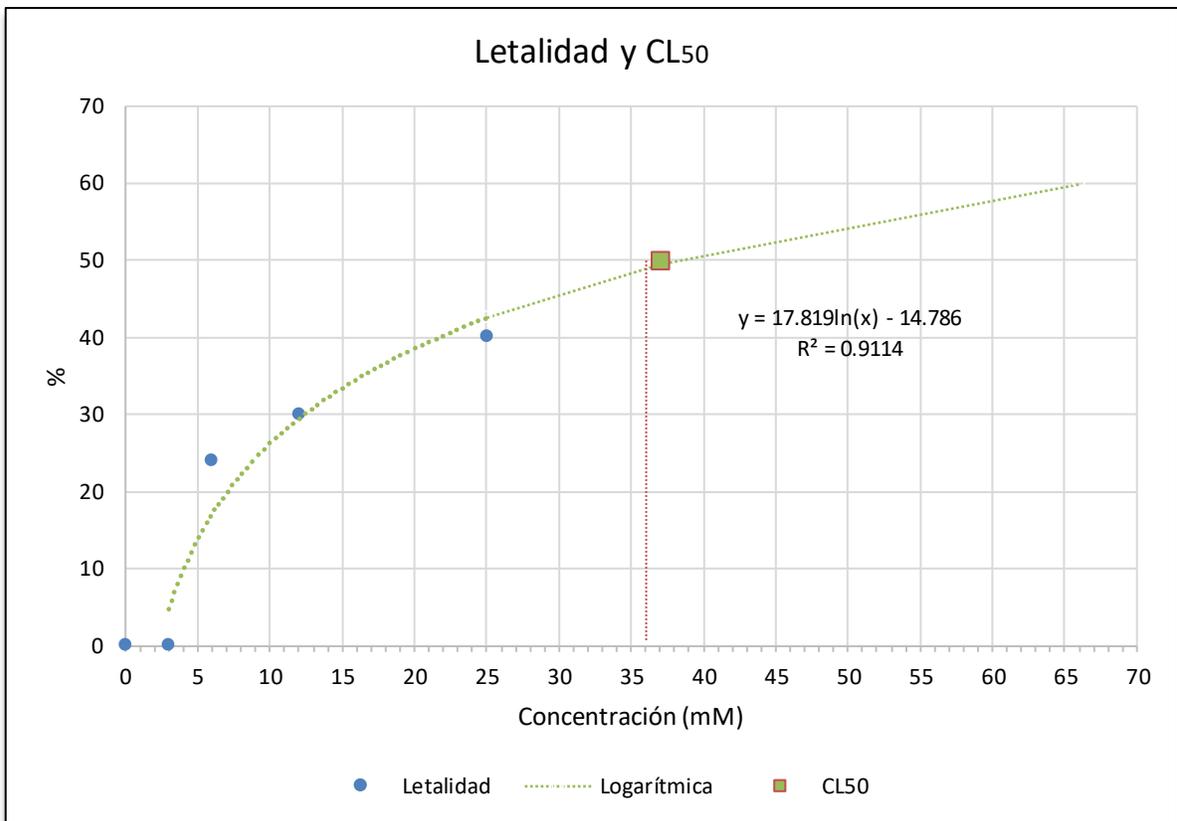
Tabla 5. Porcentajes de letalidad del linuron comercial en la prueba de toxicidad

Concentración [mM]	Letalidad %
0	0
3	0
6	24
12	30
25	40



Gráfica 1. Respuesta del linuron comercial, porcentaje de letalidad.

Con los porcentajes de letalidad se obtuvo la  $CL_{50}$ , a partir de una regresión logarítmica obteniendo un valor de 37.15 mM (Gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentajes de letalidad y línea logarítmica para la CL<sub>50</sub> del linuron comercial.

### Ensayo de mutación y recombinación somática SMART en ala.

Con base en el valor obtenido de 37.15 mM como CL<sub>50</sub>, se decidió utilizar para el ensayo SMART en ala las concentraciones de 10, 20 y 40 mM de linuron comercial, siendo ésta última el valor máximo.

En el ensayo SMART para la craza ST comparando con el control negativo (etanol al 5%), se observó que para la concentración de 10 mM se obtuvieron valores inconclusos de manchas simples pequeñas, manchas simples grandes y manchas gemelas; pero se obtuvo un valor positivo para manchas totales. Para la concentración de 20mM y 40 mM se tuvo un valor positivo de manchas totales sólo con valores positivos de manchas simples pequeñas (Tabla 6).

La frecuencia de manchas simples pequeñas fue mayor que las manchas simples grandes, mientras que no hubo inducción de manchas gemelas (Gráfica 3). Para la frecuencia de manchas totales en esta craza se observó una tendencia

proporcional a la concentración, aunque la concentración de 40 mM mostró una respuesta similar a la de 20 mM (Gráfica 3).

Las manchas simples en su mayoría se encuentran en las categorías de pequeñas (de una a dos células por mancha) (Gráfica 4).

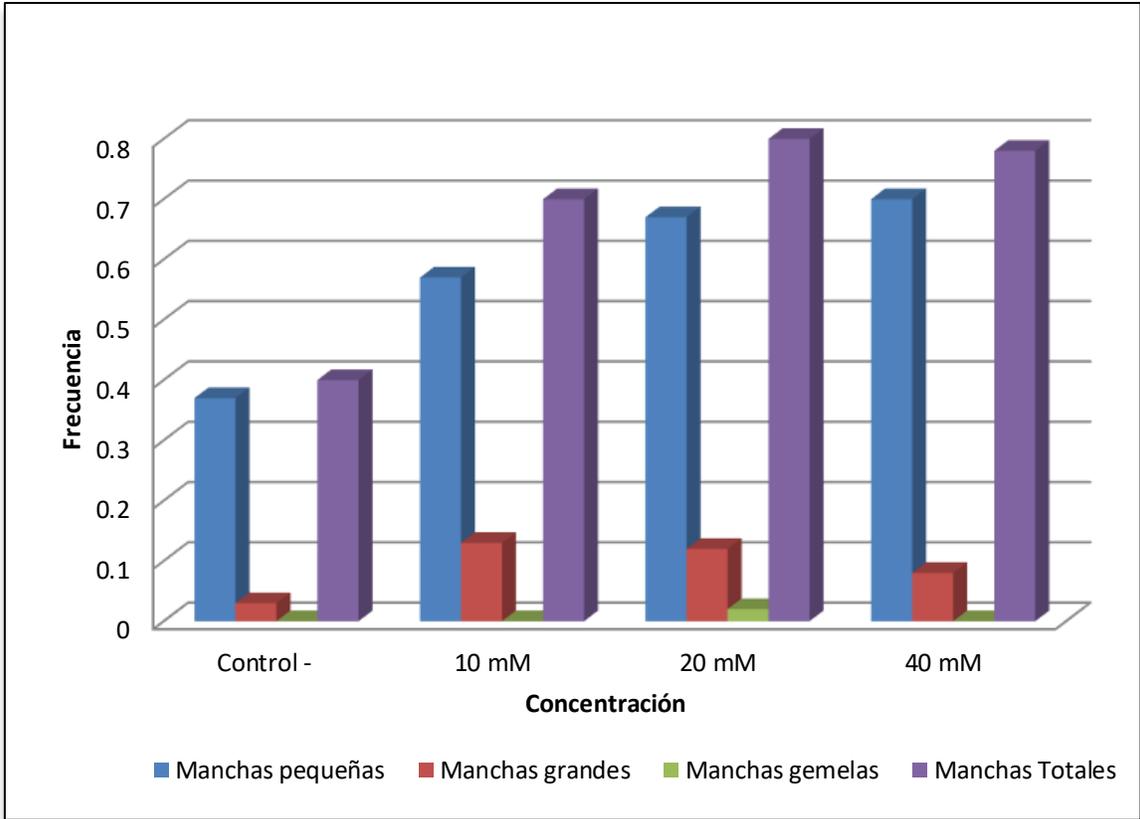
Tabla 6. Ensayo de mutación y recombinación somática SMART en ala, cruza *ST flr<sup>3</sup> X mwh*.

Concentración	Núm. de alas	Manchas simples pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas simples grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2	Clones con manchas mwh	Promedios de ciclos de división celular
Control negativo Etanol 5%	60	0,37 (22)	0,03 (2)	0,00 (0)	0,40 (24)	23	1,52
Control positivo MMC 0.15 mM	6	45,50 (273) +	18,17 (109) +	4,17 (25) +	67,83 (407) +	405	2,14
10 mM	60	0,57 (34) i	0,13 (8) i	0,00 (0)	0,70 (42) +	41	1,8
20 mM	60	0,67 (40) +	0,12 (7) i	0,02 (1) i	0,80 (48) +	46	1,72
40 mM	60	0,70 (42) +	0,08 (5) i	0,00 (0) i	0,78 (47) +	46	1,67

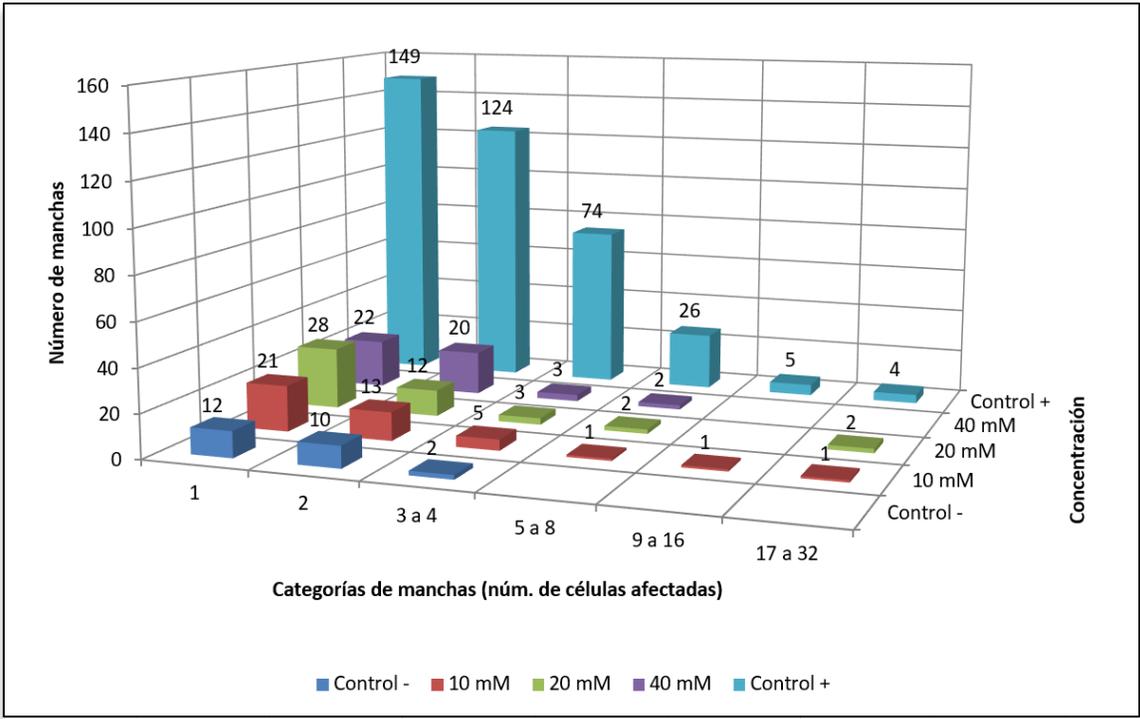
Los datos se presentan de acuerdo con Frei y Würigler (1988):

+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = inconcluyente. m = factor multiplicador.

Niveles de Probabilidad: alfa = beta = 0.05.



Gráfica 3. Frecuencia de manchas por tipo obtenidos en la cruz ST.



Gráfica 4. Distribución de manchas simples por categoría de tamaño para la cruz ST.

Al comparar los resultados con el control negativo, en la cruce HB, se observó que en las concentraciones 10 mM y 20 mM se tiene un valor negativo para manchas simples grandes y manchas totales; e inconcluyente para manchas simples pequeñas, mientras que para 40 mM se tiene un valor positivo para manchas simples pequeñas, un valor negativo para manchas simples grandes y un valor positivo para manchas totales. En esta cruce se observó un incremento en la frecuencia de manchas totales con una tendencia proporcional a la concentración (Tabla 7).

Para todas las concentraciones que se probaron, la frecuencia por tipo de mancha fue mayor para las manchas simples pequeñas a comparación de las manchas simples grandes; mientras que no se detectó ninguna mancha gemela (Gráfica 5).

Como se muestra en la Gráfica 6, en la cruce HB, las manchas simples en su mayoría se encuentran en las categorías de pequeñas de una a dos células por mancha.

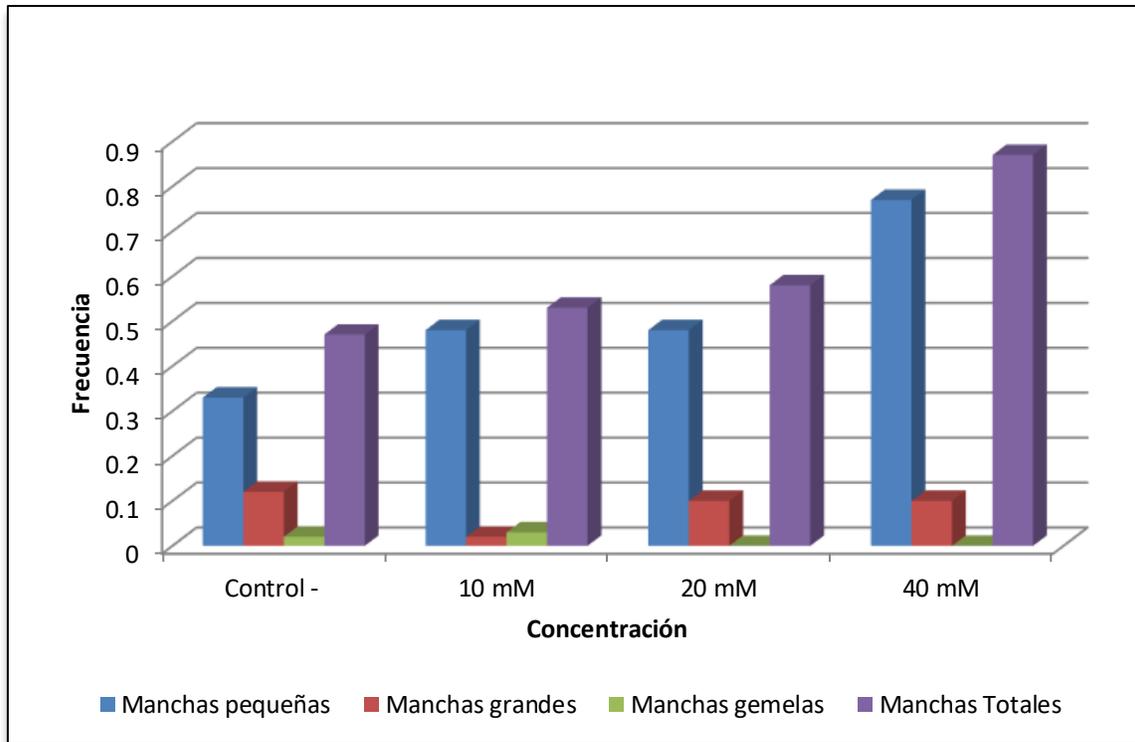
Tabla 7. Ensayo de mutación y recombinación somática SMART en ala, cruce HB *ORR-flr<sup>3</sup>X mwh*.

Concentración	Núm. de alas	Manchas simples pequeñas (1-2 células) m=2	Manchas simples grandes (> 2 células) m=5	Manchas gemelas m=5	Manchas totales m=2	Clones con manchas mwh	Promedios de ciclos de división celular
Control negativo Etanol 5%	60	0.33 (20)	0.12 (7)	0.02 (1)	0.47 (28)	26	1.92
Control positivo MMC 0.15 mM	6	57,50 (345) +	22,00 (132) +	3,83 (23) +	83,33 (500) +	490	2,02
10 mM	60	0,48 (29) i	0,02 (1) -	0,03 (2) i	0,53 (32) -	31	1,68
20 mM	60	0,48 (29) i	0,10 (6) -	0,00 (0) i	0,58 (35) -	33	1,7
40 mM	60	0,77 (46) +	0,10 (6) -	0,00 (0) i	0,87 (52) +	51	1,61

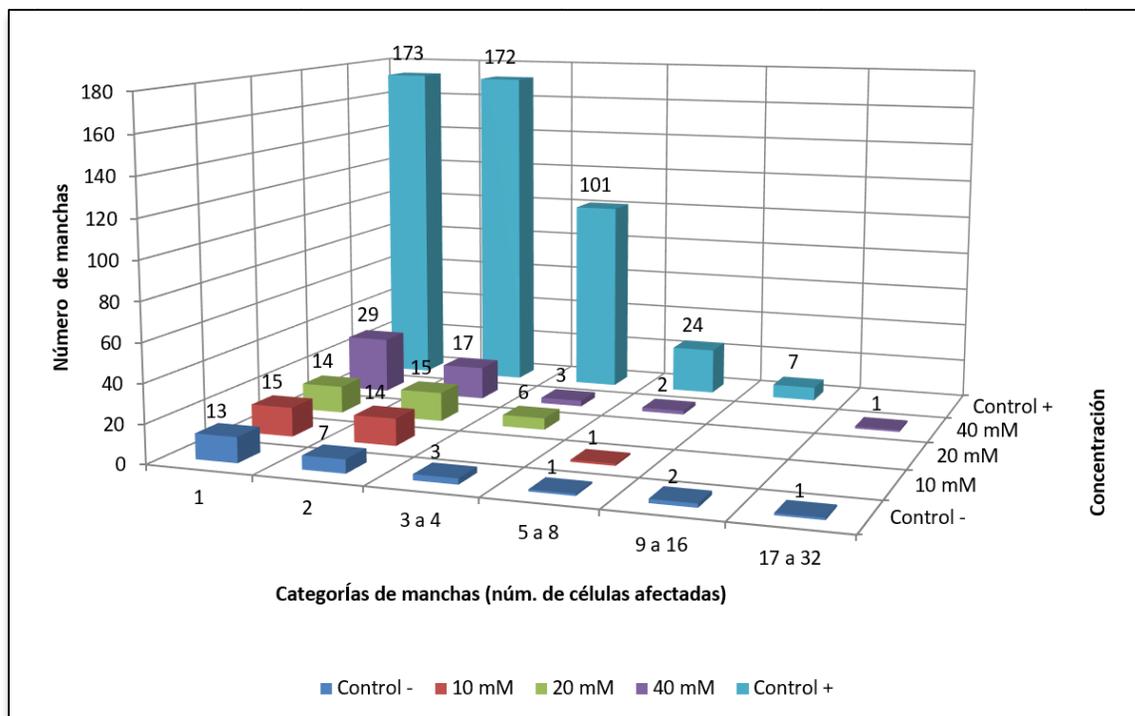
Los datos se presentan de acuerdo con Frei y Würigler (1988):

+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; i = inconcluyente. m = factor multiplicador.

Niveles de Probabilidad: alfa = beta = 0.05.



Gráfica 5. Frecuencia de manchas por tipo obtenidos en la cruz HB.



Gráfica 6. Distribución de manchas simples por categoría de tamaño para la cruz HB.

## DISCUSIÓN

El linuron comercial (Linurex 50WP) en *D. melanogaster* no mostró ser muy tóxico, ya que fue posible evaluar concentraciones relativamente elevadas en larvas de tercer estadio, siendo la de 40 mM la mayor, de modo que el rango de concentraciones probadas garantizan los resultados obtenidos, puesto que el intervalo de concentraciones es amplio entre ellas.

Las frecuencias de manchas totales para el control negativo (etanol al 5%) en la cruza ST (0.40) (Tabla 6) y en la cruza HB (0.47) (Tabla 7) son comparables a los obtenidos en nuestro laboratorio al emplear otros solventes, tales como: agua destilada y dimetilsulfóxido, como control negativos (Téllez *et al.*, 2007; Dueñas-García *et al.*, 2012; Sortibrán *et al.*, 2015).

*D. melanogaster* tolera y utiliza altos niveles de etanol que se encuentran en el nicho de frutas en descomposición de las que se alimenta naturalmente (David y Van Herrewege, 1983; Geer *et al.*, 1993). La información publicada acerca del potencial genotóxico del etanol muestra que no es un mutágeno ni en bacterias ni en células de mamífero, además, se ha demostrado para los ensayos *in vivo* en los que se evalúa la inducción de aberraciones cromosómicas, no tiene ningún efecto (Obe *et al.*, 1986; Phillips y Jenkinson, 2001). Existe además, una clara evidencia, obtenida de las investigaciones en las cuales se emplea al etanol como vehículo solvente, acerca de la falta de respuesta del etanol como compuesto genotóxico y clastogénico en diversos ensayos *in vitro* (Phillips y Jenkinson, 2001).

La frecuencia de manchas totales inducidas por la mitomicina-C (MMC), promutágeno empleado para asegurar que el ensayo funciona, fue tal como se esperaba, es decir, mayor en la cruza HB (83) que en la cruza ST (68). Fue posible detectar la capacidad recombinogénica de la MMC a través de la inducción de manchas gemelas a pesar de que el número de manchas de este tipo fue similar en ambas cruzas.

En este estudio, el linuron comercial resultó ser genotóxico en ambas cruzas. En la cruz ST, se mostró una clara relación dosis-respuesta, mientras que en la cruz HB, solamente la concentración más alta (40 mM) resultó ser estadísticamente positiva. Estas diferencias pueden deberse a la capacidad metabólica de cada una de las cruzas. En la cruz ST, la actividad metabólica es basal, mientras que en la cruz HB, al sobreexpresarse constitutivamente los citocromos P450, es capaz de desintoxicar al herbicida. Cuando el sistema enzimático se saturó, lo cual pudo ocurrir en la concentración más alta, entonces se produjo un resultado positivo.

El tipo de mancha puede indicar si el compuesto es mutagénico o recombinogénico. En esta investigación no se encontraron resultados positivos para manchas gemelas en ninguna de las concentraciones empleadas ni tampoco en las cruzas, por lo cual el herbicida no mostró actividad recombinogénica, solamente actividad mutagénica.

El tamaño de la mancha fue otro parámetro que se consideró. Éste permite establecer si el compuesto es de acción directa o si requiere ser biotransformado. El linuron indujo en todas las concentraciones ensayadas manchas pequeñas, de una a dos células, las cuales sugieren que se produjeron durante la última división mitótica de las células del disco imaginal, antes de la metamorfosis y por tanto, de la formación de la pupa. Por ello, se sugiere que el linuron se clasifique como un promutágeno.

La literatura sobre la genotoxicidad del linuron es escasa y contradictoria. En algunos estudios se concluye que no es genotóxico, por ejemplo, en las células de ovario de criceto chino (CHO) y en *Salmonella typhimurim* (EPA, 1988); sin embargo, también existe el reporte en el que se demuestra que el herbicida induce la producción de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana (Papapaulou *et al.*, 2001). El trabajo de Scassellati y colaboradores (1997) proporciona datos de la genotoxicidad del linuron puro y comercial que fueron probados en el ensayo de reversión de la histidina en *Salmonella typhimurium*, en las cepas TA97, TA98, TA100 y TA1535, inclusive en los ensayos en los cuales se

empleó la fracción S9 obtenida de ratas no se observó ninguna actividad mutagénica. En otro estudio fue posible detectar la actividad genotóxica del herbicida mediante daño inducido por rompimiento de una hebra del DNA en el ensayo de elución alcalina en células de hígado de rata. En general, la genotoxicidad del linuron difiere de acuerdo al modelo de estudio elegido, el tipo de ensayo que se emplea, las concentraciones y las dosis evaluadas.

Con el ensayo SMART en ala se han evaluado distintos herbicidas, tales como la hidrazida maleica, el alaclor, la atrazina y el paraquat (Torres *et al.*, 1992), así como el amitrol y la terbutrina (Kaya *et al.*, 2000) los cuales resultaron genotóxicos en la cruza ST, mientras que el metribuzin, el prometrin y el dibromuro de diquat no resultaron ser genotóxicos en esta misma cruza.

Al emplear la cruza de HB, se obtiene mayor información acerca de la capacidad de un xenobiótico para inducir daño genético. Al analizar los efectos genotóxicos del bentazon, se encontró que es negativo para la cruza ST y positivo para la HB, aludiendo así a una bioactivación del herbicida, mientras que tiobercan se comportó de manera similar que el linuron puesto que fue genotóxico para la cruza ST y no para la HB (Kaya *et al.*, 2004). Es posible que este efecto se deba a que la desintoxicación por parte de la actividad de los citocromos P450 sea eficiente.

Las formulaciones comerciales de los plaguicidas contienen algunos compuestos químicos azarosos, por lo que es importante identificarlos con el propósito de establecer si son o no inocuos. El linuron comercial contiene alquil-aril poliglicol éter como adherente, agua como diluyente y estabilizadores inertes que se emplean como impermeabilizantes. Por lo tanto, la validez de los resultados obtenidos en este trabajo estriba en que las formulaciones comerciales son las que se emplean cotidianamente en la agricultura y a la que están expuestos los trabajadores del campo.

## CONCLUSIONES

El linuron comercial resulto ser ligeramente tóxico para las larvas de tercer estadio de *D. melanogaster*, por lo que fue posible analizar sus efectos a concentraciones de hasta 40 mM.

El linuron comercial resultó ser genotóxico mostrando una relación dosis-respuesta en la craza estándar (ST). En la craza de alta bioactivación (HB) solamente mostró inducir daño genético en la concentración más alta (40mM), efecto que sugiere que a bajas concentraciones las larvas lo metabolizan de manera eficiente, mientras que en la más alta es probable que el sistema de biotransformación generara metabolitos intermedios reactivos que no pudieron ser conjugados o que el sistema enzimático simplemente se saturó. El herbicida puede clasificarse como mutagénico debido a que no se encontró la inducción de manchas gemelas en ninguna de las concentraciones evaluadas en ambas cruza, sólo se encontraron manchas simples productos de eventos mutagenicos.

El ensayo SMART en ala de *D. melanogaster* permitió la evaluar *in vivo* los efectos genotóxicos inducidos por la formulación comercial del linuron, que es la misma a la cual los trabajadores del campo están expuestos.

Al ser el linuron un herbicida de uso autorizado en México, representa una fuente potencial de riesgo a la salud por lo que es necesario que se realicen más trabajos sobre su genotoxicidad. Este trabajo aporta datos de letalidad y de genotoxicidad que permitirán futuros estudios para el linuron.

## **ANEXO**

### Etanol al 5%

7.5 ml de etanol absoluto se aforaron con agua destilada a un volumen total de 150ml.

### Medio de cultivo estándar

Se preparó con 105 g de harina de maíz, 70 g de azúcar, 66 g de levadura de cerveza seca en polvo, 15 g de carregenina, 5 g de grenetina, 4 ml de ácido propiónico, 4 ml Nipagín y 1250 ml agua para 24 frascos de vidrio siguiendo la metodología de Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 2005.

### Solución de sacarosa al 20%

Se preparó 1 l de solución de sacarosa al 20%, con la dilución de 200 g de sacarosa en 1 l de agua.

### Solución Fauré

Se prepara con 30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral y 50 ml agua (Graf *et al.*, 1984).

## REFERENCIAS

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., ... y Venter, J. C. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185–2195.
- Anzalone, A. (2010). Detoxificación de herbicidas en plantas. En Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado (Ed.), *XIII Congreso de la Sociedad Venezolana para el Combate de Malezas*. (pp. 13-24). Barquisimeto, Venezuela.
- Arnaud, L., Taillandier, G., Kaouadji, M., Ravanel, P., y Tissut, M. (1994). Photosynthesis Inhibition by Phenylureas: A QSAR Approach. *Ecotoxicol Environ Saf*, 28(2), 121-133.
- Bauer, E.R.S., Daxenberger, A., Petri, T., Sauerwein, H., y Meyer, H.H.D. (2000). Characterisation of the affinity of different anabolic and synthetic hormones to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progestin receptor. *APMIS*, 108(12), 838–846.
- Bers, K., Batisson, I., Proost, P., Wattiez, R., De Mot, R., y Springael, D. (2013). HylA, an alternative hydrolase for initiation of catabolism of the phenylurea herbicide linuron in *Variovorax sp.* strains. *Appl Environ Microbiol*, 79(17), 5258-5263.
- Bridges, C.B. (1935). Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J Hered*, 26(2), 60-64.
- Bridges, D. C. (1995). Weed interference and weed ecology. En *Herbicide Action Course*. (pp. 417-422). West Lafayette, Indiana: Purdue University.
- Calderón, S. M. E., Gómez, A. S., Villalobos, P. R., y Espinosa R. M. M. (1999). *In vivo* and *in vitro* promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Mutat Res*, 438(2), 81-88.

- Caux, P. Y., Kent, R. A., Fan, G. T., y Grande, C. (1998). Canadian water quality guidelines for linuron. *Environ Toxicol Water Qual*, 13(1), 1-41.
- Charpentier, G., Louat, F., Bonmatin, J. M., Marchand, P. A., Vanier, F., Locker, D., y Decoville, M. (2014). Lethal and sublethal effects of imidacloprid, after chronic exposure, on the insect model *Drosophila melanogaster*. *Environ. Sci. Technol*, 48 (7), 4096-4102.
- Chen, G. (2014). Linuron, En P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology*. (3a. Ed, pp 83-84). Oxford: Academic Press.
- CICOPLAFEST. (2004). Catálogo de Plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control de Proceso y Uso de Plaguicidas Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. Recuperado el 18 de septiembre de 2015, de <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>
- Cruz, R. y Merayo, A. (1989). Manejo de malezas en el cultivo de frijol en Centroamérica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 13: 49-64.
- David, J. R. y Van Herrewege, J. (1983). Adaptation to alcoholic fermentation in *Drosophila* species: relationship between alcohol tolerance and larval habitat. *Comp Biochem Physiol*, 74(2), 283-288.
- Dejonghe, W., Berteloot, I., Goris, J., Boon, N., Crul, K., Maertens, S., ... y Top, E. M. (2003). Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading variovorax strain. *Appl Environ Microbiol*, 69 (3), 1532-1541.
- Delgado, Y. L. (2012). "Control de malezas en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.)" utilizando tres herbicidas pre-emergentes, en la granja de "la pradera" Chaltura-Imbabura". (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Técnica del Norte. Ibarra, Ecuador.

- Deng, F. y Hatzios, K. K. (2003). Characterization of cytochrome P450-mediated bensulfuron-methyl O-demethylation in rice. *Pestic Biochem Physiol*, 74(2), 102-115.
- Dueñas-García, I. E., Santos-Cruz, L. F., Castaneda-Partida, L., Castaneda-Sortibrán, A. N., Ordaz-Tellez, M. G., Sanchez-Santos, A., ... y Heres-Pulido, M. E. (2012). Interactions of sulforaphane and dimethyl sulfoxide with methyl methanesulfonate, urethane, 4-nitroquinoline-1-oxide and hydrogen peroxide in the *Drosophila melanogaster* wing spot test. *Food Chem Toxicol*, 50(12), 4479-4486.
- EPA, Environmental Protection Agency. (1987). Chlorothalonil Health Advisory. Draft Report. Office of Drinking Water. Washington, D. C.
- EPA, Environmental Protection Agency. (1988). Pesticide Fact Handbook, Noys Data, Park Ridge. New York: 484–490.
- EPA, Environmental Protection Agency. (2010). Linuron Summary Document Registration Review: Initial Docket (EPA-HQ-OPP-2010-0228). Washington, D. C.
- European commission. (2002). Linuron. Recuperado el 5 de abril de 2016 de: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1522>
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol*, 44(1), 507-533.
- Frei, H. y F. E. Würgler. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res*, 203(4), 297-308.
- Gad, S. C. (2014). LD50/LC50 (Lethal Dosage 50/Lethal Concentration 50). En P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology*. (3a. Ed, pp 58-60). Oxford: Academic Press.

- Geer, B. W., Heinstra, P. W., y McKechnie, S. W. (1993). The biological basis of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Comp Biochem Physiol B*, 105(2), 203-29.
- Gilbert, D. G. (2007). DroSpeGe: rapid access database for new *Drosophila* species genomes. *Nucleic Acids Res*, 35(1), D480-D485.
- Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology*. (6a. Ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. pp. 566.
- Gonzalez, F. J. (1990). Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmac. Ther*, 45(1), 1-38.
- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., y Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen*, 6(2), 153-188.
- Griffiths, A. J. F., Miller J. H., Suzuki D. T., Lewontin, R. C., y Gelbart, W. M. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis*. (7a. Ed.). New York: W. H. Freeman.
- Gupta, P. K. (2014). Chapter 24 Herbicides and fungicides. En R. C. Gupta (Ed.), *Biomarkers in Toxicology*. (pp. 409–431). Boston: Academic Press.
- Gupta, R. C. y Crissman, J. W. (2013). Chapter 42 Agricultural Chemicals. En W. M. Haschek., C. G. Rousseaux., y M. A. Wallig (Eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. (3a. Ed, pp. 1349–1372). Boston: Academic Press.
- Hamberger, B. y Bak, S. (2013). Plant P450 as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1612), 1-16.
- Horemans, B., Bers, K., Ruiz-Romero, E., Pose, J. E., Dunon, V., De Mot, R., y Springael, D. (2016). Functional redundancy of linuron degradation in

microbial communities of agricultural soil and biopurification systems. *Appl Environ Microbiol*, 82(9), 2843-2853.

INIFAP. (s.f). Guía para la asistencia técnica agrícola de Nayarit. Recuperado el 29 de septiembre de 2016, de: <http://www.cesix.inifap.gob.mx/guias/FRIJOL.pdf>

Jurado, A. S., Fernandes, M. A. S., Videira, R. A., Peixoto, F. P., y Vicente, J. A. F. (2011). Herbicides: the face and the reverse of the coin. An in vitro approach to the toxicity of herbicides in non-target organisms. En A. Kortekamp (Ed.), *Herbicides and Environment*. (pp. 3-44). InTech.

Kaya, B., Marcos, R., Yanikoglu, A., y Creus, A. (2004). Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutat Res*, 557(1), 53–62.

Kaya, B., Yanikoglu, A., Creus, A., y Marcos, R. (2000). Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res*, 465, 77–84.

Labrada, R. J. C. y Caseley, C. P. (Eds.). (1996). *Manejo de Malezas para Países en Desarrollo. (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal - 120)*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Manual fitosanitario. (s.f). Principio activo linuron. Recuperado el 1 de octubre de 2016, de: [http://www.manualfitosanitario.com/principio\\_activo.php?id=289](http://www.manualfitosanitario.com/principio_activo.php?id=289)

Marlatt, V. L., Bonnie, P. L., Ornostay, A., Hogan, O., Kennedy, H. J., Elphick, J., y Martyniuk, C. (2013). The effects of the urea-based herbicide linuron on reproductive endpoints in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 157(1), 24–32.

Meigen, J. W. (1830). Systemtische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. *Schulz-Wundermann*, 6(1), 85.

- Mizutani, M. y Sato, F. (2011). Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 507(1), 194-203.
- Obe, G., Jonas, R., y Schmidt, S. (1986). Metabolism of ethanol *in vitro* produces a compound which induces sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes *in vitro*: acetaldehyde not ethanol is mutagenic. *Mutat Res*, 174(1), 47-51.
- Omura, T. y Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 239(7), 2370-2385.
- Papapoulou, P., Vlastos, D., Stephanou, G., y Demopoulos, N. A. (2001). Linuron cytogenetic activity on human lymphocytes treated *in vitro*. Evaluation of clastogenic and aneugenic potential using cytokinesis block micronucleus assay in combination with fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Fresenius Environ Bull*, 10(5), 431-437.
- Park, J. H., Jung, J. W., Ahn, Y. J., y Kwon, H W. (2012). Neuroprotective properties of phytochemicals against paraquat-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Pest Biochem Physiol*, 104 (2), 118-125.
- Phillips, B. J. y Jenkinson P. (2001). Is ethanol genotoxic? A review of the published data. *Mutagenesis*, 16(2), 91-101.
- Plewa, M. J. y Wagner, E. D. (1993). Activation of promutagens by green plants. *Annu Rev Genet*, 27:93-113.
- Ravi, K. R. y Kar, D. (2014), Chapter 1 *Drosophila*: A Model for Biotechnologists. En A. S. Verma y A. Singh (Eds.), *Animal Biotechnology*. (pp. 3-9). San Diego: Academic Press.
- Rodrigues, H. H., Reguly, M. L., y Lehmann, M. (2004). Wing Somatic Mutation and Recombination Test. En D. S. Henderson (Ed.), *Vol. 247 Drosophila*

*Cytogenetics Protocols, Methods in Molecular Biology*. (pp. 389-412). Totowa, New Jersey: Human Press Inc.

Rodríguez, G. J. C. y Rodeiro, G. I. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Rev Cubana Farm*, 48(3), 495-507.

Rodríguez-Arnaiz, R. (2003). *Drosophila* como organismo modelo en la Biología Experimental. En L. F. Jiménez y H. Merchant (Eds.), *Biología celular y molecular*. (pp. 761-791). México: Pearson Education.

Rodríguez-Arnaiz, R. (2004). *Metabolismo de las toxinas ambientales*. México: Serie La Ciencia para todos, Fondo de cultura económica, Secretaría de Educación Pública y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. pp. 31.

Rodríguez-Arnaiz, R. (2005). *Manual de Prácticas de Genética y Cuaderno de Trabajo*. México: Las prensas de Ciencias (UNAM). pp. 16.

Rodríguez-Arnaiz, R., Soto, P. O., Oyarzún, J. C., y Graf, U. (1996). Analysis of the mitotic recombination induced by several mono- and bifunctional alkylating agents in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 351(2), 133-145.

Russell, P. J. (1998). *Genetics*. (5a. Ed.). California: Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. pp. 805.

Saner, C., Weibel, B., Würigler, F. E., y Sengstag, C. (1996). Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen*, 27(1), 46-58.

Santos, M. A., Videira, R. A., Fernandes, M. A., Santos, M. S., Moreno, A. J. Vicente J. A., y Jurado, A. S. (2014). Toxicity of the herbicide linuron as assessed by bacterial and mitochondrial model systems. *Toxicol in Vitro*, 28(5), 932–939.

- Scassellati, S., Pasquini, R., Moretti, M., Villarini, M., Fatigoni, C., Dolara, P., ... y Pool-Zobel, B.L. (1997). *In vivo* studies on genotoxicity of pure and commercial linuron. *Mutat Res*, 390(3), 207-221.
- Sortibrán, A. N. C., Téllez, M. G. O., y Arnaiz, R. R. (2015). Assessment of the genotoxic and antioxidant activities of several vegetables, spices and herbs in combination with cyclophosphamide and 4-Nitroquinoline n-Oxide in *Drosophila melanogaster*. *Adv Tech Biol Med*, 1(2), 2379-1764.
- Sughrue, K. M., Brittingham, M. C., y French, J. B. (2008). Endocrine effects of the herbicide linuron on the American Goldfinch (*Carduelis tristis*). *The Auk*, 125(2), 411-419.
- Szybalski, W. y Lyer, V. N. (1964). Cross-linking of DNA by enzymatically or chemically activated mitomycins and porfiromycins, bifunctionally "alkylating" antibiotics. *Fed Proc*, 23, 946-957.
- Téllez, M. G. O., Rodríguez, H. B., Olivares, G. Q., Sortibrán, A. N. C., Cetto, A. A., y Rodríguez-Arnaiz, R. (2007). A phytotherapeutic extract of *Equisetum myriochaetum* is not genotoxic either in the *in vivo* wing somatic test of *Drosophila* or in the *in vitro* human micronucleus test. *J Ethnopharmacol*, 111(1), 182-189.
- Tomasz, M. y Palom, Y. (1997). The mitomycion bioreactive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol Ther*, 76, 1-3.
- Torres, C., Ribas, G., Xamena, N., Creus, A., y Marcos, R. (1992). Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res*, 280(4), 291–295.
- Vogel, E. W. (1992). Tests for recombinogens in somatic cell of *Drosophila*. *Mutat Res Fund Mol Mech Mut*, 284(1), 159-175.

- Vuppalanchi, R. (2011). Chapter 4 Metabolism of Drugs and Xenobiotics. En R. Saxena (Ed.), *Practical Hepatic Pathology: A Diagnostic Approach*. (pp. 45-52). Saint Louis: Saunders Elsevier.
- Wauchope, R. D., Buttler, T. M., Hornsby, A. G., Augustijn-Beckers, P. W. M., y Burt, J. P. (1992). The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev Environ Contam Toxicol*, 123(1), 1-155.
- Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G., Jäckle, H., ... y Klämbt, C. (2003). FlyMove – a new way to look at development of *Drosophila*. *Trend Genet*, 19(6), 310-311.