



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE GELOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DEL DAÑO EN EL ADN Y DE ESTRÉS OXIDANTE DE LOS
INSECTICIDAS COMERCIALES CETOENOL MOVENTO® Y
ENVIDOR®, EN EL OVARIO DE DROSOPHILA MELANOGASTER:
IMPACTO EN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS
CÉLULAS GERMINALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BERENYCE GONZÁLEZ MARÍN

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA, INSTITUTO
DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA Y CAMBIO CLIMÁTICO, UNAM**

COMITÉ TUTOR: DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ, FACULTAD DE CIENCIAS, UAM

**COMITÉ TUTOR: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO, FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, DICIEMBRE, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE GELOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DEL DAÑO EN EL ADN Y DE ESTRÉS OXIDANTE DE LOS
INSECTICIDAS COMERCIALES CETOENOL MOVENTO® Y
ENVIDOR®, EN EL OVARIO DE DROSOPHILA MELANOGASTER:
IMPACTO EN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS
CÉLULAS GERMINALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BERENYCE GONZÁLEZ MARÍN

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA, INSTITUTO
DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA Y CAMBIO CLIMÁTICO, UNAM**

COMITÉ TUTOR: DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ, FACULTAD DE CIENCIAS, UAM

**COMITÉ TUTOR: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO, FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, DICIEMBRE, 2023

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD INSTITUTO DE GEOLOGÍA
OFICIO: CGEP/CPCB/IGEL/0848/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria (Virtual) del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **02 de octubre de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **GONZÁLEZ MARÍN BERENYCE** con número de cuenta **308082317** con la tesis titulada “**Análisis del daño en el ADN y de estrés oxidante de los insecticidas comerciales cetoenoles Movento® y Envidor®, en el ovario de *Drosophila melanogaster*: impacto en la proliferación y diferenciación de las células germinales**”, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Vocal: DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRÁN
Vocal: DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ
Vocal: DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA
Secretario: DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de octubre de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/MJR/EARR/mjr

Agradecimientos Institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas por otorgarme el privilegio de recibir una educación de máxima excelencia académica, y permitir mi desarrollo profesional, y adquirir conocimiento invaluable bajo la tutoría de excelentes Investigadores.

Agradezco a Conacyt por la beca otorgada (**CVU 778808**), la cual me proporcionó los recursos para desarrollar exitosamente mis estudios de doctorado.

Agradezco a mi Comité tutor

Tutora principal Dra. María Elena Calderón Segura por su tutoría durante el desarrollo de mi proyecto doctoral.

Dr. Edmundo Bonilla González por su asesoría durante el desarrollo de mi proyecto doctoral.

Dr. Juan José Rodríguez Mercado por su asesoría durante el desarrollo de mi proyecto doctoral.

Agradecimientos a título personal

Agradezco a los miembros del jurado por sus valiosas observaciones en mi manuscrito, mismas que lo enriquecieron favorablemente.

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dra. América Nixtin Castañeda Sortibrán

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

Dr. Francisco Javier Espinosa García

Agradezco al **Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático** por proporcionar la infraestructura necesaria para el desarrollo del proyecto experimental.

Agradezco al laboratorio del **Dr. José Pedraza Chaverri** del Instituto de Química, UNAM, por su valiosa colaboración en el desarrollo experimental del proyecto.

Agradezco al técnico **Omar Noel Medina Campos** del Instituto de Química, UNAM, por su valiosa colaboración en el desarrollo experimental del proyecto.

Agradezco al **Dr. Jeff Sekelsky** de la Universidad de Carolina del Norte, USA, y a todo su equipo por su valiosa colaboración en el desarrollo experimental del proyecto.

Agradezco de una manera muy especial y con mucho cariño a la **Dra. María Elena Calderón Segura**, quien ha sido un pilar en mi formación y me ha brindado su apoyo a nivel académico y personal. Dra. Para mí ha sido un gran honor poder aprender a su lado.

Finalmente, agradezco con todo mi amor **a mi amada familia**, por todo su apoyo, por acompañarme en este largo viaje, por reconfortarme en los momentos más difíciles, por brindarme siempre su amor incondicional, por escucharme, aconsejarme y por ayudarme a lograr que mi sueño se hiciera realidad.

¡GRACIAS!

Dedicatoria

A mí amado padre.....

A quien en esta ocasión de forma exclusiva quiero dedicarle este trabajo.

¡Papá!, no sabes el orgullo que siento cuando te llamo papá, quiero agradecerte todos los sacrificios que hiciste por mí, y quiero decirte que nada de esto hubiera sido posible, sin tu ayuda, sin tus enseñanzas.

No hay persona en el mundo a la cual admire y respete más que a ti.

Gracias por haberme impulsado a llegar tan lejos y enseñarme que si trabajas duro todo se puede cumplir.

Gracias por haberme hecho el mejor regalo que me pudiste dar, fue aprender a luchar por lo que amo y por mis sueños, me regalaste algo invaluable, me regalaste libertad.....

Espero algún día ser como tú.....

Te ama con todo su corazón...

Tu hija Bere.....

*Gracias a la vida, que me ha dado tanto
Me dio dos luceros, que cuando los abro
perfecto distingo lo negro del blanco
y en el alto cielo, su fondo estrellado
y en las multitudes, a mi **padre amado**...*

*Gracias a la vida, que me ha dado tanto
me ha dado el oído, que en todo su ancho
graba noche y días, grillos y canarios
martillos, turbinas, ladridos, chubascos
y la voz tan tierna de mi **padre amado**.....*

*Gracias a la vida, que me ha dado tanto
me ha dado el sonido y el abecedario
con él, las palabras que pienso y declaro
padre, amigo, hermana, y luz alumbrando
la ruta del alma del que estoy amando.....*

*Gracias a la vida, que me ha dado tanto
me ha dado la marcha de mis pies cansados
con ellos, anduve ciudades y charcos
playas y desiertos, montañas y llanos
y la casa tuya, tu calle y tu patio*

*Gracias a la vida, que me ha dado tanto
me dio el corazón, que agita su marco
cuando miro el fruto del cerebro humano
cuando miro el bueno tan lejos del malo
cuando miro el fondo de tus ojos claros*

*Gracias a la vida, que me ha dado tanto
Me ha dado la risa y me ha dado el llanto
Así yo distingo dicha de quebranto
los dos materiales que forman mi canto
y el canto de ustedes que es el mismo canto
y el canto de todos que es mi propio canto*

Gracias a la vida, por todo lo que me ha dado y por el papá que me regalo.....



Nib'oolala Kukulcán

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
I INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Plaguicidas.....	4
1.1.1 Clasificación de los insecticidas.....	5
1.2 Efectos tóxicos de los plaguicidas en organismo no blanco.....	5
1.3 Efectos en sistemas reproductores en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas.....	7
1.4 Mecanismos moleculares de toxicidad de plaguicidas	8
1.4.1 Inducción de estrés oxidante	8
1.4.1.1 Inducción de estrés oxidante por plaguicidas en modelos animales.....	9
1.4.2 Inducción de daño en el ADN.....	11
1.4.2.1 Inducción de daño en el ADN por plaguicidas en modelos animales.....	12
1.5 Estrés oxidante.....	13
1.5.1 Radicales libres.....	14
1.5.2 Especies reactivas del oxígeno (ERO)	15
1.5.3 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)	18
1.5.4 Fuentes de producción de radicales libres.....	18
1.5.5 Funciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno.....	20
1.5.6 Defensa antioxidante.....	20
1.5.6.1 Sistema antioxidante enzimático.....	21
1.5.6.2 Sistema antioxidante no enzimático.....	24
1.5.7 Daño oxidante a moléculas biológicas.....	24
1.5.7.1 Daño oxidante a carbohidratos o azúcares.....	25
1.5.7.2 Daño oxidante a lípidos.....	25
1.5.7.3 Daño oxidante a proteínas.....	26
1.5.7.4 Daño oxidante en el ADN.....	27
1.6 Mecanismos de respuesta al daño en el ADN.....	28
1.6.1 ATM (Ataxia Telangiectasia Mutado)	28
1.6.2 ATR (Ataxia Telangiectasia-proteína relacionada con Rad3)	29
1.6.3 Checkpoint kinasas 1 y 2	29
1.6.4 p53	30
1.7 Mecanismos de reparación del ADN	31
1.7.1 Reparación por Escisión de Bases (BER)	32
1.7.2 Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)	32
1.7.3 Reparación de Emparejamientos Erróneos (MMR)	32
1.7.4 Recombinación Homóloga (HR)	32
1.7.5 Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ)	33
1.8 Biomarcadores.....	34
II ANTECEDENTES.....	37
2.1 Insecticidas cetoenoles.....	37
2.1.1 Mecanismo de acción de los insecticidas cetoenoles	38
2.1.2 Envidor® 240SC (Spirodiclofen)	39
2.1.2.1 Rutas de exposición de Envidor® 240SC (Spirodiclofen)	40
2.1.2.2 Metabolismo de Envidor® 240SC (Spirodiclofen) en animales y plantas	40

2.1.3 Movento® 240SC (Spirotetramat)	43
2.1.3.1 Rutas de Exposición Movento® 240SC (Spirotetramat)	44
2.1.3.2 Metabolismo de Movento® 240SC (Spirotetramat) en animales y plantas.....	45
2.1.4 Efectos tóxicos de los insecticidas Movento® 240SC y Envidor® 240SC.....	49
2.2 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....	53
2.2.1 Mutagénesis en <i>Drosophila melanogaster</i>	54
2.2.2 Descripción general de <i>Drosophila melanogaster</i>	55
2.2.3 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	56
2.2.4 Sistema reproductor de las hembras	57
2.2.5 Anatomía del germario de <i>Drosophila melanogaster</i>	59
2.2.6 Ovogénesis en <i>Drosophila melanogaster</i>	60
2.2.7 <i>Drosophila</i> como organismo modelo en estudios de reprotoxicidad	63
2.2.8 Estudios toxicológicos realizados en <i>Drosophila</i>	64
2.2.9 Daño en el ADN en <i>Drosophila melanogaster</i>	66
2.2.10 Vía ATM/ATR en <i>Drosophila</i>	67
2.2.10.1 Tefu (<i>telomere fusion</i>)	67
2.2.10.2 Mei-41 (<i>meiotic 4I</i>)	68
2.2.10.3 Grp (<i>grappes</i>)	68
2.2.10.4 Loki (<i>localized ovarian kinase</i>)	69
2.2.10.5 Dp53.....	69
2.3 Histona 2 γ H2AX.....	69
2.3.1 Histona 2 γ H2AV en <i>Drosophila</i>	71
2.3.2 Detección y visualización de γ H2AX.....	72
2.4 Ensayo cometa alcalino	73
III JUSTIFICACIÓN.....	76
IV HIPÓTESIS	77
V OBJETIVOS.....	78
VI MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
6.1 Generación de cepas mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i>	79
6.2 Elaboración de alimento más soluciones patrón.....	81
6.3 Determinación de la dosis letal media (LD ₅₀)	81
6.4 Esquema de tratamiento de los insecticidas cetoenoles para el ensayo cometa.....	82
6.4.1 Disección ovárica.....	82
6.4.2 Ensayo de cometa alcalino.....	82
6.5 Análisis de actividad enzimática.....	83
6.5.1 Preparación de homogeneizados de tejido.....	83
6.5.2 Superóxido dismutasa	84
6.5.3 Catalasa	84
6.5.4 Determinación de la concentración de malondilaldehído	85
6.6 Esquema de tratamiento de los insecticidas cetoenoles para inmunofluorescencia.....	85
6.7 Disección de ovarios.....	86
6.7.1 Inmunofluorescencia.....	87
6.7.2 Procesamiento de imágenes.....	88
6.8 Análisis estadístico	88
VII RESULTADOS	89

7.1 Determinación de la LD ₅₀ de los insecticidas cetoenoles Movento® 240 SC y Envidor® 240 SC	89
7.2 Daño en el ADN en Ovarios <i>D. melanogaster</i> inducido por los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC.	89
7.3 Inducción de estrés oxidante por Movento® 240SC y Envidor® 240SC en ovarios de <i>Drosophila melanogaster</i>	92
7.3.1 Evaluación de la actividad enzimática de enzimas antioxidantes después de la exposición a Movento® 240SC y Envidor® 240SC	92
7.3.2 Evaluación del contenido de MDA después de la exposición a Movento® 240SC y Envidor® 240SC.	94
7.4 Inducción de daño en el ADN en el germario en la cepa silvestre de <i>Drosophila melanogaster</i> (Oregon R) por los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC	94
7.5 Respuesta de ATM, Chk1 y Chk2 en el Germario con daño en el ADN inducido por el insecticida cetoenol Movento® 240SC	97
7.6 Respuesta de ATM, ATR, Chk1, Chk2 y p53 en el germario de <i>D. melanogaster</i> con daño en el ADN inducido por el insecticida cetoenol Envidor® 240SC	100
VIII DISCUSIÓN.....	104
IX CONCLUSIÓN.....	110
X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
XI ANEXOS.....	156
11.1 Artículo requisito	156
11.2 Segundo artículo derivado de investigación doctoral	157

Resumen

Movento® 240SC y Envidor® 240SC son una nueva clase de insecticidas comerciales derivados de los ácidos tetrónicos y tetrámicos pertenecientes a la familia de plaguicidas cetoenoles. En el presente estudio se analizó el daño en el ADN, inducción de estrés oxidante y los mecanismos de respuesta al daño en el genoma ATM y ATR en el ovario de *Drosophila melanogaster* Oregon R y mutantes (ATM^{tefu} , $ATR^{mei-29D}$, $Chk1^{grp}/Chk2^{lok}$, Chk^{grp} y $p53^{dp53}$), expuestas a concentraciones de 11.2, 22.4 y 37.3 mg/L de Movento® 240SC y 12.3, 24.6, 41.1 mg/L de Envidor® 240SC después de 72 h de exposición vía oral. El daño en el genoma se evaluó mediante el ensayo cometa alcalino a través de la cuantificación de tres parámetros indicadores de daño al ADN: la longitud (LC), el momento (MC) y la intensidad de la cauda (IC) del cometa en 150 núcleos de células ováricas. Los resultados genotóxicos indican que ambos insecticidas son agentes genotóxicos en el ovario de *D. melanogaster* evidenciado por el aumento significativo de la: LC (24 — 48 μm), MC (2 — 5 %), IC (25 — 40 %) para Movento® 240SC y LC (40 — 95 μm), MC (3 — 6 %), IC (12 — 2 %) para Envidor® 240SC, comparados con el grupo testigo (0.0 mg/L de insecticidas) LC (20 μm) MC (1 %), IC (7 %). El estrés oxidante se detectó indirectamente a través de la cuantificación de la actividad enzimática de los antioxidantes citosólicos: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y el marcador de peroxidación de lípidos, malondialdehído (MDA). Los datos indican que ambos insecticidas cetoenoles inducen estrés oxidante en el ovario de *D. melanogaster* al incrementar significativamente la actividad enzimática de (CAT (0.16 — 0.20) (0.13 — 0.15), SOD (0.40 — 0.69), (0.19 — 0.54 ($U\ mg\ de\ proteína^{-1}$) y (MDA ($nmol\ mg\ de\ proteína^{-1}$) (0.32 — 0.78) (0.21 — 0.57), para Movento® y Envidor® 240SC, respectivamente con relación al grupo testigo (0.0 mg/L de insecticidas) CAT (0.05), SOD (0.15) ($U\ mg\ de\ proteína^{-1}$) y MDA (0.14) ($nmol\ mg\ de\ proteína^{-1}$).

El análisis de las vías de respuesta al daño en el ADN en el germario del ovario en las cepas mutantes y silvestre de *D. melanogaster* Oregon R, muestran que Movento® 240SC actúa como agente genotóxico a través de la formación de roturas de doble cadena del ADN (DSB) y que la vía de respuesta al daño al ADN es mediada por las cinasas $ATM^{tefu} / Chk1^{grp}$ y $Chk2^{lok}$. Además de producir muerte celular evidenciado por la ausencia de núcleos celulares, así como, reducción del tamaño del germario en hembras mutantes $Chk1^{grp}$ y $Chk2^{lok}$ comparado con los grupos testigos (0.0 mg/L de plaguicida) y mismos grupos experimentales de la cepa silvestre (Oregon R). Adicionalmente, se demuestra que los mecanismos de reparación al ADN e inducción de muerte celular no son dependientes de $p53^{dp53}$. Con relación al insecticida Envidor® 240SC, los resultados confirman que es agente genotóxico a través de dos mecanismos: induce roturas de cadena sencilla del ADN que consecuentemente conllevan a la formación de DSB, y que en este contexto se activan ambas vías de respuesta al daño al ADN, $ATM^{tefu} / Chk2^{lok}$ y $ATR^{mei-29D} / Chk1^{grp}$. De igual manera, se evidencia que Envidor® 240SC produce alteraciones morfológicas, reducción del tamaño, inhibición de la proliferación y muerte celular en el germario con relación a los grupos testigos (0.0 mg/L de plaguicida) cepas mutantes y cepa silvestre (Oregon R). Finalmente, se identifica que los mecanismos de reparación de daño al ADN son dependientes de $p53^{dp53}$, pero no la inducción de muerte celular.

Paralelamente, se determina que la LD₅₀ para Movento® 240SC es de 79.1 mg/L y 78.0 mg/L para Envidor® 240SC en *Drosophila melanogaster* Oregon R.

Abstract

Movento® 240SC and Envidor® 240SC are a new class of commercial insecticides derived from tetrionic and tetramic acids belonging to the keto-enol family of pesticides. In the present study, DNA damage, oxidant stress induction and damage response mechanisms in the ATM and ATR genome were analyzed in the ovary of *Drosophila melanogaster* Oregon R and mutants (*ATM^{tefu}*, *ATR^{mei-29D}*, *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}*, *Chk^{grp}* and *p53^{dp53}*), exposed to concentrations of 11.2, 22.4 and 37.3 mg/L of Movento® 240SC and 12.3, 24.6, 41.1 mg/L of Envidor® 240SC after 72 hours oral exposure. Genome damage was evaluated using the alkaline comet assay through the quantification of three parameters indicative of DNA damage: the tail length (TL), tail moment (TM) and tail intensity (TI) at 150 ovarian cell nuclei. The results of DNA damage indicate that both insecticides are genotoxic agents in the ovary of *D. melanogaster* evidenced by the significant increase in: TL (24 – 48 μm), TM (2 – 5 %), TI (25 – 40 %) for Movento® 240SC and TL (40 – 95 μm), TM (3 – 6 %), TI (12 – 2%) for Envidor® 240SC, compared to the control group (0.0 mg/L of insecticides) TL (20 μm) TM (1 %), TI (7 %). Oxidative stress was detected indirectly through the quantification of the enzymatic activity of cytosolic antioxidants: catalase (CAT), super oxide dismutase (SOD) and the lipid peroxidation marker, malondialdehyde (MDA). The data indicate that both keto-enol insecticides induce oxidative stress in the ovary of *D. melanogaster* by significantly increasing the enzymatic activity of (CAT (0.16 – 0.20) (0.13 – 0.15), SOD (0.40 v0.69), (0.19 – 0.54 (*U mg of protein⁻¹*) and (MDA (*nmol mg of protein⁻¹*) (0.32 – 0.78) (0.21 – 0.57), for Movento® and Envidor® 240SC respectively, in relation to the control group (0.0 mg/L of insecticides) CAT (0.05), SOD (0.15) (*U mg protein⁻¹*) and MDA (0.14) (*nmol mg protein⁻¹*).

The analysis of the response pathways to DNA damage in the ovary germarium in the mutant and wild strains of *D. melanogaster* Oregon R, show that Movento® 240SC acts as a genotoxic agent through the formation of double strand breaks of the DNA (DSB) and that the DNA damage response pathway is mediated by *ATM^{tefu}/Chk1^{grp}* and *Chk2^{lok}* kinases. In addition to producing cell death evidenced by the absence of cell nuclei, as well as a reduction in the size of the germarium in *Chk1^{grp}* and *Chk2^{lok}* mutant females compared to the control groups (0.0 mg/L of pesticide) and wild strain (Oregon R). Additionally, we demonstrate that the mechanisms of DNA repair and cell death induction are not dependent on *p53^{dp53}*. In relation to the insecticide Envidor® 240SC, the results confirm that it is a genotoxic agent through two mechanisms: it induces single-strand DNA breaks that consequently lead to the formation of DSB, and that in this context both response pathways to the DNA damage, *ATM^{tefu}/Chk2^{lok}* and *ATR^{mei-29D}/Chk1^{grp}*. Likewise, we show that Envidor® 240SC induces morphological alterations, size reduction, inhibition of proliferation and cell death in the germarium in relation to control groups (0.0 mg/L of pesticide) and wild strain. (Oregon R). Finally, we identified that DNA damage repair mechanisms are dependent on *p53^{dp53}*, but not the induction of cell death.

In parallel, we determined that the LD50 for Movento® 240SC is 79.1 mg/L and 78.0 mg/L for Envidor® 240SC in *Drosophila melanogaster* Oregon R.

I INTRODUCCIÓN

La superficie terrestre comprende 13 mil millones de hectáreas, de las cuales 1.6 mil millones son utilizadas para la producción agrícola (Dubois, 2011). En la actualidad, a causa de la demanda de alimentos derivado del crecimiento de la población, ha incrementado el uso de plaguicidas, fertilizantes y fitosanitarios que incluye amplia variedad de sustancias químicas en las zonas de producción (Popp *et al.*, 2013; Delcour *et al.*, 2015). Dicho incremento, ha desencadenado graves repercusiones en la dinámica de los ecosistemas, debido a que muchos de estos compuestos químicos son persistentes en el ambiente y tienen una elevada capacidad para movilizarse de los campos agrícolas hacia la atmósfera, el agua y el suelo (Popp, 2013; del Puerto Rodríguez *et al.*, 2014).

Estudios recientes han detectado residuos de ingredientes activos o metabolitos de plaguicidas en suelo (Joseph *et al.*, 2020), mantos acuíferos y agua superficial (Duttagupta *et al.*, 2020; de Souza *et al.*, 2020), en polen (de Oliveira *et al.*, 2016), en alimentos como la miel (Kasiotis *et al.*, 2014; Gawel *et al.*, 2019), vino (Vitali *et al.*, 2018; Dias *et al.*, 2019), vegetales y frutas (Montiel-León *et al.*, 2019; Al-Nasir *et al.*, 2020; Gomes *et al.*, 2020). Algunos plaguicidas tienen la capacidad de bioacumularse en tejidos vegetales y animales (Buah-Kwofie *et al.*, 2018a; Al-Nasir *et al.*, 2020), por lo que pueden ingresar a los organismos acumularse y biomagnificarse a través de la cadena trófica representando riesgo a la salud de los seres humanos (Gupta y Gupta, 2020). Se han cuantificado residuos de insecticidas organofosforados y piretroides en tejido adiposo de animales domésticos como los bovinos, ovinos y caprinos (Meligy *et al.*, 2019; Hamadamin y Hassan, 2020) e identificado hasta 60 diferentes tipos de agroquímicos en huevos de gallinas destinados al consumo humano (Song *et al.*, 2019). En organismos no blanco como las abejas (Moreno-González *et al.*, 2020), peces (Ernst *et al.*, 2018), reptiles (Jáuregui *et al.*, 2018; Heffernan *et al.*, 2017), aves (Bouwman *et al.*, 2019) y mamíferos (Tsygankov *et al.*, 2015; Aznar-Alemanly *et al.*, 2017). Además, la exposición a plaguicidas se ha relacionado con alteraciones en la reproducción, el desarrollo y crecimiento de estos organismos ocasionando variaciones en los parámetros poblacionales (Soare *et al.*, 2019).

En los seres humanos, las exposiciones crónicas a estos compuestos están relacionadas con infertilidad, malformaciones congénitas y alteraciones al ADN que pueden estar implicados en el desarrollo de diversos tipos de cáncer (Sabarwal *et al.*, 2018). A pesar de los efectos de los plaguicidas en el ambiente y la salud de los seres humanos, a nivel mundial se liberan 4.6 millones de toneladas al año (FAO, 2018). Se estima que ocurren entre 1 y 5 millones de casos de intoxicación por plaguicidas y 20 000 muertes al año. Las principales causas de estas intoxicaciones son la utilización, el almacenamiento, la eliminación de los plaguicidas en condiciones inadecuadas y el consumo de alimentos contaminados (Gutiérrez-Sereno, 2013). En países en vías de desarrollo como México, se siguen utilizando plaguicidas elevadamente tóxicos que causan problemas a la salud, sin proveer al usuario de la información y el entrenamiento necesarios para evitar el mal uso y los efectos adversos que estas sustancias producen en la salud pública y al ambiente.

1.1 Plaguicidas

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (**FAO**) (FAO, 2019), define a los plaguicidas como: sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y artículos de madera, así como en alimentos para animales, o que pueden aplicarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte.

1.1.1 Clasificación de los insecticidas

Diversos autores clasifican a los insecticidas con base en su persistencia en el ambiente, toxicidad, organismo blanco y la más utilizada por su clase química, que incluye a los: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides y cetoenoles (Tabla I) (Díaz y Aguilar, 2018).

Tabla I. Clasificación de insecticidas según su composición química

Clase química	Mecanismo de acción	Ejemplos
Organoclorados	Modulan los canales de sodio interrumpiendo la transmisión de impulsos nerviosos entre células nerviosas.	Aldrín, endrín, lindano, clordano, heptacloro.
Organofosforados	Inhiben la acción de la acetilcolinesterasa, bloqueando la transmisión de los impulsos nerviosos.	Malatión, clorpirifos, metamidofos, metilparation.
Carbamatos	Bloquean la acción de la acetilcolinesterasa, interrumpiendo la transmisión de los impulsos nerviosos.	Aldicarb, carbaril, carbofuran, benomil.
Piretroides	Regulan los canales de sodio interrumpiendo la transmisión de impulsos nerviosos entre células nerviosas.	Deltametrina, cipermetrina, permetrina.
Neonicotinoides	Agonistas/Antagonistas de los receptores de acetilcolina bloqueándolos e interrumpiendo la transmisión del impulso entre células nerviosas.	Imidacloprid, clotianidin.
Cetoenoles	Impiden la síntesis de lípidos por el bloqueo de la actividad de la enzima acetil-coenzima A carboxilasa (ACC).	Spirodiclofen, spiromesifen, spirotetramat.

Modificada de Denholm y Devine, 2009; Díaz y Aguilar, 2018; SADER y SENASICA, 2019.

1.2 Efectos tóxicos de los plaguicidas en organismo no blanco

El uso de plaguicidas es una de las principales causas de disminución de la biodiversidad (Brühl y Zaller, 2019). Varios estudios han reportado los efectos tóxicos de plaguicidas en organismos no blanco.

A nivel reproductor, los insecticidas diazinón y malatión reducen la viabilidad y maduración de ovocitos de ratonas (Bonilla *et al.*, 2008). La administración de metamidofos aminora el número de fetos vivos y aumenta las reabsorciones tempranas (Farag *et al.*, 2012). En ratas hembras los

insecticidas dimetoato, clorpirifos y malatión decreentan el peso de las hembras preñadas y de las crías al nacer, incrementan el peso uterino, el grosor de epitelio de la superficie uterina, de la glándula endometrial y del miometrio (Nishi y Hundal, 2013), de la frecuencia de contracciones uterinas en todas las fases del ciclo estral (Das *et al.*, 2017), la absorción y letalidad embrionaria. Además, producen cambios proliferativos (adenosis e hiperplasia atípica) en glándulas mamarias (Omran y Omer, 2015; Ventura *et al.*, 2016). Ozsoy *et al.*, (2016) indican que el malatión provoca congestión vascular, hemorragia, edema, infiltración de células inflamatorias y degeneración folicular en ovarios de ratas.

En ratas machos la exposición a los insecticidas: diclorvos, diazinón, clorpirifos y malatión, causa desprendimiento del epitelio germinal basal (Damodar *et al.*, 2012) y acumulación de espermatozoides en la luz tubular (Adamkovicova *et al.*, 2014), aumento en el porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática (Toman *et al.*, 2016), reducen la viabilidad y motilidad espermática, el número de células germinales en los túbulos seminíferos (Jalili *et al.*, 2019; Salahshoor *et al.*, 2020), la cantidad de espermátidas en la luz tubular y el grosor de la túnica albugínea (Hassan *et al.*, 2021).

En hembras de pez cebra (*Danio rerio*) el insecticida clorpirifos produce formación de folículos atrésicos en el ovario (Manjunatha y Philip, 2016). Los insecticidas malatión y diazinón inducen degeneración de las vesículas germinales, aminoran la vitelogénesis y las tasas de fecundidad y fertilidad en hembras del pez de la especie *Oryzias latipes* (Flynn *et al.*, 2018). En caracoles de agua dulce (*Planorbella duryi*) expuestos a metoxicloro también decrece las tasas de fertilidad y fecundidad (Frankel *et al.*, 2020).

de Morais *et al.* (2019) describen en abejas melipona (*Melipona scutellaris*) expuestas ambientalmente al insecticida fipronil, letargo y parálisis. En la pulga de agua (*Daphnia magna*) el neonicotinoide clotianidín afecta la velocidad de natación (Bownik *et al.*, 2019). En lombrices de tierra (*Eudrilus eugeniae*) la mezcla de clorpirifos y cipermitrina provoca cambios en el comportamiento como el enrollamiento y producción de secreciones (Tiwari *et al.*, 2019).

En ovocitos de porcinos cultivados *in vitro* el insecticida malatión disminuye la tasa de fertilización, el desarrollo, la formación de mórulas (Ducolomb *et al.*, 2009), la viabilidad

embrionaria (Salazar *et al.*, 2007; Casas *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2017), la viabilidad de las células de la granulosa e inducen alteraciones morfológicas (Wang *et al.*, 2018b).

1.3 Efectos en sistemas reproductores en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas

Los efectos de los plaguicidas en la salud humana se estudian principalmente en trabajadores expuestos, así como, en personas que residen cerca de campos agrícolas. Se tiene documentado que en estas poblaciones aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades como asma, diabetes mellitus, cáncer, Parkinson, Alzheimer y desordenes reproductivos (Kim *et al.*, 2017; Ye *et al.*, 2017). También, la exposición a diversas clases de agroquímicos se ha asociado con alteraciones en el sistema nervioso central, deterioro cognitivo, cambios en hormonas sexuales y tiroideas (Recio *et al.*, 2005; Lacasaña *et al.*, 2010; Aguilar-Garduño *et al.*, 2013), distensión pulmonar (Lee *et al.*, 2004; Beane *et al.*, 2005), cáncer de pulmón (Engel *et al.*, 2005) y leucemia (Beane *et al.*, 2005).

En el sistema reproductor masculino de los seres humanos, los plaguicidas amidofos, clorpirifos, diazinón, paratión, dimetoato, mancozeb, metoxicloro, lindano, carbaril, carbendazim y carbofurano reducen el peso de los testículos, inhiben la espermatogénesis, afectan la calidad de semen, la motilidad, morfología, densidad y viabilidad de espermatozoides, inducen daño en el ADN; además de cambios en los niveles de testosterona, hormonas hipofisarias como la: foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), (Perry *et al.*, 2011; Miranda-Contreras *et al.*, 2013; Mehrprou *et al.*, 2014; Dziewirska *et al.*, 2018). En mujeres, los plaguicidas acefato, adizinin y malation se han asociado con efectos sobre la fertilidad, abortos espontáneos, muerte fetal, parto prematuro, anormalidades en el desarrollo, bajo peso al nacer, trastornos ováricos e interrupción de la función hormonal (Schettler *et al.*, 2003). Padhi y Pati (2016), reportan residuos de plaguicidas organoclorados en sangre, tejido adiposo y leche materna de mujeres agrícolas en India. Chang *et al.* (2018) informan que el riesgo de desarrollar cáncer de mama en la edad adulta incrementa con exposiciones repetidas a diclorodifeniltricloroetano (DDT) durante la niñez. El uso de glifosato aumenta la tasa de abortos espontáneos y de anormalidades congénitas en mujeres trabajadoras de campos agrícolas en Argentina (Ávila-Vazquez *et al.*, 2018). Brahmmand *et al.* (2019) reportan presencia de residuos de clorpirifos y sus metabolitos en leche materna, en orina

de las madres y neonatos en lactancia del norte de Irán. Anand y Taneja, (2020) describen que la exposición a DDT y el hexaciclohexano, reduce el de peso y circunferencia de la cabeza del recién nacido en India.

1.4 Mecanismos moleculares de toxicidad de plaguicidas

1.4.1 Inducción de estrés oxidante

El estrés oxidante es un mecanismo mediante el cual inducen toxicidad diversos plaguicidas (Al-Nasir *et al.*, 2020). Es definido como la alteración en el balance prooxidante —antioxidante a favor de los primeros (Sies y Cadenas, 1985), dando lugar a posibles daños a biomoléculas como: carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Fig. 1) (Dal-Pizzol *et al.*, 2001; Chiumiento y Bruschi, 2009), inducción de apoptosis, necrosis y carcinogénesis (San-Miguel y Martin-Gil, 2009). Además, de estar relacionado en múltiples patologías como: alteraciones del sistema inmunológico (Kattoor *et al.*, 2017; Kopa y Pawliczak, 2020), diabetes (Poblete-Aro *et al.*, 2018; Luc *et al.*, 2019), cáncer de mama (Pilco-Ferreto y Calaf, 2016; Mazzuferi *et al.*, 2021), cáncer uterino (Scutiero *et al.*, 2017), infertilidad (Bisht *et al.*, 2017; Barati *et al.*, 2020), entre otras.

Los plaguicidas pueden inducir estrés oxidante a través de mecanismos como: a) actúan por si solos como especie reactiva; b) su o sus metabolitos son especies reactivas o generan ERO cuando son biotransformados; c) estimulan la generación endógena de ERO por la alteración del funcionamiento de las cadenas de transporte de electrones del retículo endoplásmico y la mitocondria; d) entran en ciclos redox, o bien e) interfieren con la defensa antioxidante; por ejemplo, al conjugarse con enzimas antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2007; Lushchak *et al.*, 2018).

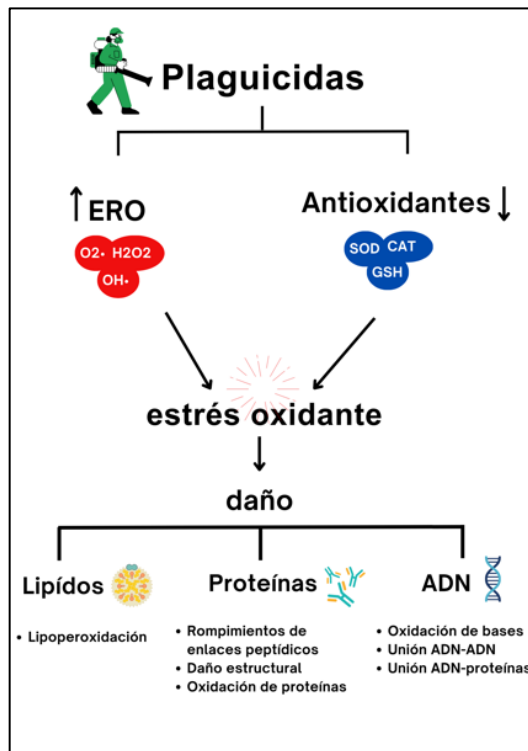


Figura 1. Plaguicidas y las implicaciones del estrés oxidante en biomoléculas: ERO (especies reactivas de oxígeno), O₂•⁻ (superóxido), OH• (hidroxilo), H₂O₂ (peróxido de hidrógeno); antioxidantes, CAT (catalasa), SOD (superóxido dismutasa), GSH (glutación) (González-Marín, 2023).

1.4.1.1 Inducción de estrés oxidante por plaguicidas en modelos animales

En organismos modelo se ha reportado inducción de estrés oxidante después de la exposición a diferentes tipos de plaguicidas.

Ratas expuestas a los insecticidas organofosforados diazinón y malatión evidencian aumento en la actividad de los antioxidantes endógenos SOD y CAT (John *et al.*, 2001), carbonilación de proteínas (Fortunato *et al.*, 2006), lipoperoxidación (Alp *et al.*, 2012), reducción de la concentración de GSH, vitamina C, vitamina E (Oksay *et al.*, 2013) y la capacidad antioxidante total espermática en testículo (Karabag-Coban *et al.*, 2016; Arab *et al.*, 2018; Jalili *et al.*, 2019). El tratamiento con los insecticidas piretroides permetrina, cipermetrina y deltametrina en ratas incrementa la producción de ERO, inducen lipoperoxidación en cerebro (Tiwari *et al.*, 2010), disminuyen la actividad enzimática de SOD y CAT en plasma sanguíneo (Fedeli *et al.*, 2012;

Uchendu *et al.*, 2018) en hígado y riñón en los cuales, adicionalmente causan carbonilación de proteínas (Afolabi *et al.*, 2019). Los herbicidas glifosfato y tebuconazol inducen decremento en el contenido del GSH, lipoperoxidación (El-Shenawy, 2019) y oxidación de proteínas en hígado de ratas expuestas (Othmène *et al.*, 2020).

En ratones la mezcla de los plaguicidas lindano, permetina y malatión, incrementa la producción de ERO, la actividad de SOD y GSH en timocitos (Olgun y Misra, 2006). El insecticida carbaril decrece la actividad de SOD, CAT y GPx y causa cambios en el potencial de membrana de células neuronales (Muthaiah *et al.*, 2013). En testículo el malatión reduce la actividad de SOD y CAT (Selmi *et al.*, 2018). Y lipoperoxidación en linfocitos de ratones expuestos (Zhao *et al.*, 2020). El imidacloprid provoca estrés oxidante, correlacionado con cambios histológicos y reducción del tamaño del hígado, así como deterioro de la función hepática de ratones macho (Yang *et al.*, 2020).

En el pez *Oreochromis niloticus* la exposición al insecticida clorpirifos decrece la actividad de los antioxidantes GST (glutación transferasa), y SOD en testículos (Oruc, 2010). Según lo reportado por Kubrak *et al.* (2012) en plasma sanguíneo del pez dorado *Carassius auratus* el tratamiento con el fungicida mancozeb incrementa la actividad de SOD, CAT y GST e induce lipoperoxidación. En agallas de peces de la especie *Cnesterodon decemmaculatus* la exposición al herbicida 2,4-diclorofenoxiacético acrecienta la actividad enzimática de SOD y CAT (Atamaniuk *et al.*, 2013).

En el pez *Clarias batrachus* el herbicida pendimetalina disminuye la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GST y GSH en agallas, hígado, riñones y cerebro (Tabassum *et al.*, 2015; Tabassum *et al.*, 2016). En agallas de la carpa común *Cyprinus carpio* el insecticida malatión estimula la producción MDA, SOD, CAT Y GSSG, y decrece el contenido de GST (Mişe *et al.*, 2017). El herbicida dicamba eleva la actividad de CAT y el contenido de GSH, GST y provoca lipoperoxidación en plasma sanguíneo del pez *Cnesterodon decemmaculatus* (Ossana *et al.*, 2019). En peces de la especie *Channa punctatus* el fungicida clorotalón reduce la actividad de SOD, CAT y el contenido de GSH en sangre, hígado y agallas (Ahmad y Ahmad, 2016). Mientras que el herbicida pendimetalina aumenta la actividad de SOD y CAT y produce lipoperoxidación en hígado (Gupta y Verma, 2020). En hígado y agallas del pez *Oncorhynchus mykiss* el insecticida fenilpirilazo, inhibe la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx, y aumenta los

niveles de MDA (malonildialdehído), de la mieloperoxidasa (MPO) y la actividad de Caspasa-3 (Uçar *et al.*, 2020).

Estudios conducidos con pez cebra *Danio rerio* evidencian que el tratamiento con el insecticida clorpirifos decrece el contenido de los antioxidantes GST (glutación transferasa), y aumenta la actividad enzimática de CAT en embriones (Jin *et al.*, 2015). Mientras que el herbicida acetocloro asciende la producción de ERO y la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx (Jiang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020a). El fungicida clorotalón reduce la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, GSH y CAT y produce lipoperoxidación en hígado de pez cebra (da Silva Barreto *et al.*, 2020).

Un estudio conducido por Leomanni *et al.* (2015) concluye que el insecticida carbaril incrementa la actividad de CAT, SOD y GPx, induce lipoperoxidación y mitiga la capacidad total antioxidante en glándulas digestivas del caracol *Cantareus apertus*. Los plaguicidas: clomazona, atrazina y propoxur ascienden la producción de ERO en músculos, branquias y hepatopáncreas del crustáceo de la especie *Aegla aff longirostri* (Cerezer *et al.*, 2020).

En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* el herbicida glifosato eleva el contenido de GSH (Bailey *et al.*, 2016). Mientras que el insecticida carbaril desciende la actividad de SOD y acrecienta la actividad de CAT y el contenido de GPx en todo el organismo (Han *et al.*, 2017).

En *Drosophila melanogaster* la exposición a mancozeb y acefato produce ERO, lipoperoxidación, aumenta la actividad de CAT y el contenido de GSH y reduce la actividad de SOD (Saraiva *et al.*, 2018). En abejas los insecticidas flupiradifurona y sulfoxaflor aumentan la producción de ERO e inducen apoptosis (Chakrabarti *et al.*, 2020).

1.4.2 Inducción de daño en el ADN

Se ha demostrado que derivado de la exposición a diversas clases de plaguicidas surgen diferentes tipos de lesiones en el ADN, incluidas **rompimientos de cadenas sencillas** (SSB) y **dobles** (DBS) en el ADN, enlaces cruzados, oxidación de las bases nitrogenadas, así como aberraciones cromosómicas (Piña-Guzmán *et al.*, 2006; Salazar-Arredondo *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2014). En trabajadores agrícolas expuestos a los insecticidas dimetiltiofosfato, dimetilditiofosfato y dietilfosfato presentan aneuploidías en el genoma espermático. La aneuploidía más frecuente es

la falta de un cromosoma sexual o sexo nulo (0.19 %), seguida de XY18 (0.15 %) y XY18-18 (0.06 %) (Recio *et al.*, 2008). Salazar-Arredondo *et al.* (2008), reportan que la exposición al insecticida clorpirifos induce daño en el ADN y alteraciones en la cromatina espermática de trabajadores agrícolas expuestos. Un análisis sobre el consumo de manzanas en niños de la región de Talca, Chile, evidencia daño en el ADN por presencia de residuos de metabolitos organofosforados (Sutris *et al.*, 2016). Otro estudio detecta residuos de organofosforados, organoclorados y piretroides en niños de zonas rurales en Carolina del Norte, E.U.A, así como, incremento de daño en el ADN de los folículos pilosos analizados, adicionalmente, se correlaciona la exposición a estos insecticidas con el riesgo de desarrollar tumores y neoplasias hematológicas (Arcury *et al.*, 2016). En productores de soja la exposición de mezclas de plaguicidas organofosforados y carbamatos produce oxidación e hipermetilación del ADN (Benedetti *et al.*, 2013). Otro estudio realizado con niños de zonas rurales de Paraguay expuestos a plaguicidas organofosforados y carbamatos describe aumento en la inducción de daño en el ADN (Leite *et al.*, 2019).

1.4.2.1 Inducción de daño en el ADN por plaguicidas en modelos animales

En ratas el insecticida diazinón induce fragmentación del ADN hemorragia, necrosis e infiltración linfocítica en el hígado (Ezzi *et al.*, 2016). Mientras que la exposición al herbicida tebuconazol produce daño al ADN en células de riñón del mismo modelo biológico (Othmène *et al.*, 2020).

En ratones, la exposición al insecticida malatión está relacionada con alteraciones en la cromatina de los espermatozoides (Piña-Guzmán *et al.*, 2006), incremento en la expresión de p53 en espermatozoides en paquiteno (Penna-Videau *et al.*, 2012) y con fragmentación del ADN espermático (Selmi *et al.*, 2015). Nair *et al.* (2014), reportan daño al ADN en ovocitos de ratonas expuestas a paratión. Urióstegui-Acosta *et al.* (2014), informan fragmentación del ADN espermático, fosforilación de proteínas en homogeneizado total de espermatozoides de ratones expuestos al insecticida metamidofos.

Los tratamientos con cipermitrina, clorpirifos y glifosato, aumentan la frecuencia de micronúcleos y otras anomalías nucleares en eritrocitos de sangre periférica de crías de caimanes *Caiman latirostris* (López *et al.*, 2016).

El insecticida profenofos fragmenta el material genético en hígado de peces de agua dulce *Labeo rohita* (Nataraj *et al.*, 2017). En la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* el insecticida imadacloprid promueve la formación de 8-OHdG (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) en cerebro (Topal *et al.*, 2017).

El insecticida monocrotofós causa en músculos y branquias del bivalvo *Lamellidens marginalis* daño primario en el ADN e incremento en la frecuencia de micronúcleos (Mundhe *et al.*, 2016). En lombrices de tierra *Eisenia fetida* la exposición fungicida piraclostrobina produce fragmentación del ADN en todo el organismo (Ma *et al.*, 2019).

En plantas de la especie *Tradescantia pallida* el tratamiento con tiametoxam, acetamiprid, imidacloprid y fipronil, asciende la frecuencia de micronúcleos (de Morais *et al.*, 2019).

Estudios conducidos en células de la granulosa porcina demuestran que el insecticida malatión causa fragmentación del ADN, y sobreexpresión de genes asociados con reparación del genoma: *nd2*, *nd4*, *citb*, *atm*, *atr*, *rad3*, *rad 51*, *mre11*, *brca1* *chek*, *prkdc*, *tp53bp1* y *xrcc6* (Wang *et al.*, 2018b) y el organofosforado diazinón provoca formación de micronúcleos en el mismo tipo celular (Wang *et al.*, 2019).

1.5 Estrés oxidante

El estrés oxidante es definido como la alteración en el balance prooxidante — antioxidante a favor de los primeros, dando lugar a posibles daños a biomoléculas (Sies y Cadenas, 1985; Miller, 1998; Sies, 2007). Las **especies reactivas de oxígeno** (ERO) y las **especies reactivas de nitrógeno** (ERN), son los principales radicales que provocan oxidación de macromoléculas biológicas como los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos (Dal-Pizzol *et al.*, 2001; Chiumiento y Bruschi, 2009).

1.5.1 Radicales libres

Los **radicales libres** (RL) son especies químicas, moléculas o átomos, capaces de existir independientemente, con uno o más electrones desapareados en su última capa u orbital electrónico (Halliwell *et al.*, 1992; Cheeseman y Slater, 1993). La existencia del electrón desapareado es lo que le confiere su reactividad con gran cantidad de moléculas biológicas, ya que tiende rápidamente a ganar o ceder un electrón para conseguir así una conformación estable, lo que hace que su vida media sea muy corta. En los seres vivos, los RL se están formando continuamente, siendo los más abundantes y reactivos los centrados en el oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1999). Dichos RL se agrupan dentro del término genérico de ERO, haciéndose referencia con este término, a un conjunto de moléculas que incluyen no sólo a los radicales de oxígeno propiamente dichos, entre los que se encuentran los radicales **anión superóxido** ($\bullet\text{O}_2^-$) y el **radical hidroxilo** ($\bullet\text{OH}$), sino también a algunas moléculas, no radicales, derivadas del oxígeno e involucradas directamente en la producción de radicales del oxígeno, como: el **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2), el **oxígeno singlete** ($^1\text{O}_2$) y el **ácido hipocloroso** (HClO) (Tabla II). También se tiene otra clase de RL que derivan del nitrógeno *especies reactivas de nitrógeno* (ERN) (Ballester, 1996; Casado *et al.*, 1996)

Tabla II. Especies reactivas de oxígeno (ERO) (Bast *et al.*, 1991; Kandaswami *et al.*, 1994).

Especies reactivas de oxígeno (ERO)		
	Radicales	No Radicales
Especies reactivas de oxígeno (ERO)	Superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
	Hidroxilo ($\text{OH}\bullet$)	Ácido hipocloroso (HOCl)
	Peroxilo ($\text{RO}_2\bullet$)	Ácido hipobromoso (HOBr)
	Alcoxilo ($\text{RO}\bullet$)	Ozono (O_3)
	Hidroperoxilo ($\text{HO}_2\bullet$)	Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

1.5.2 Especies reactivas del oxígeno (ERO)

a) Oxígeno singlete

El $^1\text{O}_2$ no es un radical, sin embargo, es considerado como una ERO capaz de reaccionar directamente con biomoléculas que contienen dobles enlaces conjugados como ácidos grasos generando endoperóxidos (Halliwell y Chirico, 1993).

b) Radical anión superóxido

El $\bullet\text{O}_2^-$, procede de la reducción univalente del oxígeno molecular (O_2) (Fig. 2) (Ramón, 1993). Esta reacción puede ocurrir en casi todas las células, los principales organelos donde se genera esta especie son: las mitocondrias, el retículo endoplasmático, los lisosomas, peroxisomas, la membrana nuclear y plasmática y en el citoplasma. Sin embargo, la principal fuente de radicales ($\bullet\text{O}_2^-$) es la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (aproximadamente entre 5 y 10 %) (Richter y Schlegel, 1993). Adicionalmente, es producido por enzimas como: la NADPH oxidasa, xantina oxidasa (XO), óxido nítrico sintasa (NOS), lipooxigenasa (LOX) y ciclooxigenasa (COX) (Fridovich, 1995; 1999). El radical anión superóxido es la base conjugada de un ácido débil el radical hidropéroxido ($\text{HOO}\bullet$) con pKa de 4.88 (Aikens y Dix, 1991). En las proximidades de la membrana, donde se produce este radical, el pH es más bajo que en el citoplasma, por lo que predominará la forma ácida. Debido a su carácter no iónico puede introducirse en la membrana celular y desencadenar procesos de peroxidación lipídica (Bielski *et al.*, 1983; Aikens y Dix, 1991). El radical hidropéroxido es mucho más reactivo, más oxidante que el radical anión superóxido, pero en disolución acuosa a pH fisiológico predomina la forma no protonada, es decir, el anión superóxido. El radical anión superóxido es más reactivo en medio hidrofóbico que en disolución acuosa, ya que en esta última se dismuta de forma espontánea (Rabani y Nielsen, 1969), también puede ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Fridovich, 1995; 1999), generando peróxido de hidrógeno (Wazawa *et al.*, 1992).



Figura 2. Reducción univalente del oxígeno (Modificada de Ramón, 1993).

c) Peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 también puede formarse por la reducción divalente del oxígeno molecular sin la formación del radical anión superóxido mediante las oxidasas de los peroxisomas, enzimas que actúan como catalizadoras de la reacción. Los niveles de concentración de peróxido de hidrógeno en las células suelen ser 1000 veces mayores que los del radical anión superóxido (Sies *et al.*, 2017). El peróxido de hidrógeno puede actuar como oxidante o como reductor y es poco reactivo en disolución acuosa. Sin embargo, en exceso resulta muy nocivo para la célula, ya que puede atravesar las membranas biológicas e inducir la formación del radical hidroxilo en puntos alejados de su lugar de origen (Sies *et al.*, 2017). El radical anión superóxido y peróxido de hidrógeno pueden dar lugar al radical hidroxilo, si en el medio de reacción existen trazas de metales de transición como el hierro (Fe) o el cobre (Cu) que actúan como catalizadores aumentando la velocidad de las reacciones hasta 10.000 veces a pH neutro, ya que en disolución acuosa la constante de equilibrio es muy baja (Elstner, 1991).

d) Radical hidroxilo

El $\cdot OH$ es la molécula más reactiva capaz de reaccionar con diferentes biomoléculas, lo que causa disfunción celular. En los organismos vivos la principal fuente de producción parece ser la descomposición del H_2O_2 en presencia de metales de transición, principalmente el hierro y cobre. A través de la reacción de Haber-Weiss se pueden generar radicales $\cdot OH$ a partir de H_2O_2 y aniones superóxido, en presencia de los cationes Fe (III), generados en la reacción de Fenton (Fig. 3) (Halliwell *et al.*, 1992; Casado *et al.*, 1996).

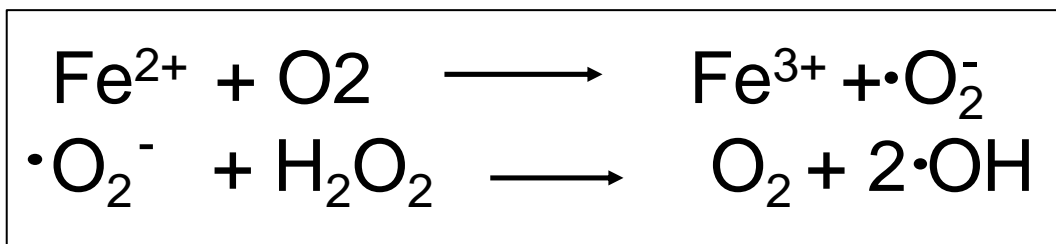


Figura 3. Reacciones de Fenton y de Haber-Weiss (Modificada de Halliwell *et al.*, 1992).

El radical hidroxilo está implicado en las reacciones del proceso de peroxidación lipídica con los ácidos grasos no saturados (RH), generando radicales alquilo (R•), radicales peroxilo (ROO•) e hidroperóxidos (ROOH). Los radicales •OH pueden iniciar la lipoperoxidación al abstraer un átomo de H de un grupo metileno (-CH₂-) de un ácido graso poliinsaturado (Casado *et al.*, 1996).

e) Radicales peroxilo y alcoxilo

Los radicales ROO• y RO• se forman cuando el radical •OH reacciona con compuestos orgánicos y también por la descomposición de peróxidos orgánicos o hidroperóxidos (ROOH), reacción catalizada por metales de transición. Son capaces de abstraer un átomo de H⁺ de otras moléculas e iniciar reacciones de gran importancia biológica como la lipoperoxidación (Halliwell y Chirico, 1993).

f) Ácido hipocloroso

El **ácido hipocloroso** (ClOH) al igual que el H₂O₂ y el ¹O₂ no se puede considerar un RL en sí, pero se incluye dentro del término ERO, por su capacidad para oxidar importantes biomoléculas, así como interaccionar y producir otros RL (Cusimano *et al.*, 1984).

1.5.3 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

Las **especies reactivas de nitrógeno** (ERN) incluyen especies derivadas de nitrógeno. Entre las ERN se encuentran los radicales de óxido nítrico (NO•), dióxido de nitrógeno (NO₂•) y peroxinitrito (ONOO⁻), entre otros (Tabla III). El NO• es capaz de reaccionar con especies como el radical •O₂⁻ para formar ONOO⁻ de gran importancia debido a su capacidad para modificar biomoléculas como proteínas (Richter y Schlegel, 1993; Halliwell y Gutteridge, 1999).

Tabla III. Especies reactivas de nitrógeno (ERN).

Especies reactivas de nitrógeno (ERN)		
ERN	Óxido nítrico (NO•)	Ácido nitroso (HNO ₂)
	Dióxido de nitrógeno (NO ₂)	Catión nitrosilo (NO ⁺)
	Anión nitroxilo (NO ⁻)	
	Peroxinitrito (ONOO ⁻)	
	Ácidoperoxinitroso (ONOOH)	
	Alquilperoxinitrito (ROONO)	

(Bast *et al.*, 1991; Kandaswami *et al.*, 1994).

1.5.4 Fuentes de producción de radicales libres

Los RL se producen fisiológicamente en pequeñas cantidades y cuando se generan niveles elevados, el origen puede ser exógeno o endógeno. Las principales fuentes de creación de RL exógenas son factores ambientales, compuestos de naturaleza prooxidante en la dieta y contaminantes químicos como metales pesados y plaguicidas, también se pueden generar por el efecto de radiaciones electromagnéticas o ionizantes y en el metabolismo de fármacos (Ryrfeldt *et al.*, 1993; Abdollahi *et al.*, 2004; Jabłońska-Trypuć *et al.*, 2017; de Souza Espindola Santos *et al.*, 2021). Uno de los principales mecanismos moleculares de producción endógena de RL es la **cadena de transporte de electrones** (CTE), ya que la mitocondria constituye la principal fuente de RL. Entre el 90 — 95 % del O₂ capturado por

un organismo es metabolizado en la mitocondria a H₂O mediante reducción tetravalente, sin formación de intermediarios tóxicos; sin embargo, entre el 5 —10 % del O₂ consumido tiene reducción monovalente por electrones provenientes de la CTE, dando lugar a la formación de radicales O₂•⁻ (Lezza *et al.*, 1994).

Las mitocondrias, presentes en todas las células aerobias, son la fuente biológica más importante de anión superóxido, producido principalmente por dos componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, la ubisemiquinona y la flavin semiquinona de la NADH deshidrogenasa (Lezza *et al.*, 1994). El radical anión superóxido no es capaz de atravesar la membrana interna por lo que se encuentra confinado en la matriz donde reacciona rápidamente con la enzima superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD) y con el óxido nítrico dando lugar al peróxido de hidrógeno y peroxinitrito, respectivamente (Lezza *et al.*, 1994; Kozlov *et al.*, 2007).

En la membrana celular se generan radicales •O₂⁻, H₂O₂, ¹O₂ y HClO mediante la acción de las enzimas NAD(P)H oxidasa, mieloperoxidasa y xantina oxidasa. Además, otras enzimas como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa también generan ERO durante la síntesis de leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas (Wolin, 2000; Genestra, 2007). En el retículo endoplasmático también se producen radicales anión superóxido y peróxido de hidrógeno por la autooxidación de la flavoproteína NADPH citocromo P-450 reductasa y el citocromo P-450. Asimismo, las monooxigenasas de función mixta, proporcionan otra fuente importante de anión superóxido (Kozlov *et al.*, 2007). En el citoplasma se encuentran enzimas como la xantina oxidasa y la aldehído-deshidrogenasa que durante sus ciclos catalíticos generan ERO como subproductos y pequeñas moléculas solubles, como catecolaminas, flavinas y tioles, que mediante procesos de autooxidación que reducen el oxígeno (Greene y Paller, 1992).

1.5.5 Funciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno

Las ERO cumplen importantes funciones celulares, de hecho, se están produciendo continuamente en el organismo y muchas de ellas son necesarias para llevar a cabo varios procesos biológicos (Hancock *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2007). Llevan a cabo funciones defensivas, como la actividad fagocítica, el ataque a virus, bacterias y células anómalas (Donkó *et al.*, 2005). Asimismo, actúan como vasodilatadores en la circulación cerebral (Terashvili *et al.*, 2006). También regulan diversas actividades enzimáticas, participan en sistemas de transducción de señales y pueden actuar como segundos mensajeros (Nose, 2000; Dröge, 2002; de Lamirande y O'Flaherty, 2008; Galaris y Pantopoulos, 2008). Además, intervienen tanto en la diferenciación celular como en los procesos apoptóticos (Dröge, 2007; Chen *et al.*, 2008).

1.5.6 Defensa antioxidante

Aunque las ERO son utilizadas en numerosos procesos celulares, su exceso puede causar daño de biomoléculas lo que podría desencadenar apoptosis. Debido a esto la mayor parte de ERO generados por el organismo son eliminados mediante mecanismos de defensa antioxidante enzimática y no enzimática presentes en todas las células (Tabla IV). Los antioxidantes se pueden definir como sustancias que a bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable retrasa o previene su oxidación (Fridovich, 1999). Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células, tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA (Halliwell y Whiteman, 2004). Los antioxidantes al interactuar con una ERO le ceden un electrón oxidándose a su vez y transformándose luego en un radical libre débil no tóxico. Su acción la ejercen en la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular, tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Alterando su propia integridad molecular evitando afectaciones de moléculas funcionalmente vitales. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, por lo que su reposición es continua (Fridovich, 1999; Halliwell y Gutteridge, 1999; Gutteridge y Halliwell, 2000).

Tabla IV. Defensa antioxidante enzimática y no enzimática (Gutteridge y Halliwell, 2000).

		<u>Reacción Enzimática</u>	
Antioxidantes enzimáticos (captadores): Superóxido dismutasa (SOD)		$2O_2^{\bullet-} + 2H^+$	$H_2O_2 + O_2$
	Glutation peroxidasa (GPx)	$2GSH + H_2O_2$	$GSSG + H_2O$
	Catalasa (CAT)	$2GSH + ROOH$ $2H_2O_2$	$GSSG + ROH + H_2O$ $O_2 + 2H_2O$
Antioxidantes no enzimáticos (captadores):	Glutación Vitamina E Vitamina C Coenzima Q Carotenoides Flavonoides Fitoestrógenos		<u>Cofactores</u> Cobre Zinc Manganeso Hierro Selenio
Preventivos:		Transferrina Ferritina Ceruloplasmina Albumina Bilirrubina Metalotioneina Ácido úrico	

1.5.6.1 Sistema antioxidante enzimático

El sistema antioxidante enzimático es un mecanismo de defensa que incluye a las enzimas: SOD, CAT, GPx, Trx y GR. Su función principal es la dismutación del radical $\bullet O_2^-$ en H_2O_2 y evitar su acumulación al transformarlo en agua y oxígeno molecular, consumiendo glutatión (GSH) y $NADPH^+$ (Miao y St Clair, 2009).

a) Superóxido dismutasa

La enzima SOD pertenece a una familia de metaloenzimas conocida por acelerar la dismutación espontánea del radical $\bullet O_2^-$ hacia H_2O_2 y O_2 , aumentando la velocidad 109 veces (Casado *et al.*, 1996). Sin embargo, también puede actuar como una peroxidasa, capaz de utilizar el H_2O_2 como reductor para formar el radical $\bullet O_2^-$ (Miao y St Clair, 2009). La familia de SODs se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos aeróbicos, en mamíferos existen tres grandes familias separadas con base a los metales que contienen y a

su localización en la célula. Dos son intracelulares, la superóxido dismutasa de cobre y zinc (Cu/Zn-SOD) y la que funciona con manganeso (Mn-SOD), y una extracelular (Ec-SOD) (Fridovich, 1995).

La SOD-Cu/Zn (SOD1), presenta un peso molecular de 32.000 Dalton, está constituida por dos subunidades idénticas, cada una contiene un átomo de Cu y otro de Zn. De estos dos metales, el Cu es el que presenta actividad catalítica, localizándose en el sitio activo de la enzima, mientras que el Zn desempeña una función básicamente estructural. Esta familia se localiza principalmente en el citosol de la célula (Miao y St Clair, 2009). La SOD-Mn (SOD2), de peso molecular de 80.000 Dalton, está constituida por cuatro subunidades idénticas, con un átomo de Mn por unidad, localizada en la mitocondria (Fridovich, 1995). La SOD-Ec (SOD3), fue descubierta en 1982 por Stefan Marklund en tejido pulmonar, tratándose de un tetrámero de 135.000 Dalton, contiene un átomo de Cu por subunidad, además es menos activa que las intracelulares (Wang *et al.*, 2018a).

Independientemente de su localización celular la familia de SODs tienen una importante función en el control de los niveles del radical $\cdot\text{O}_2^-$, siendo la primera defensa que dismuta estos radicales (Fridovich, 1995). Al generar H_2O_2 en presencia de hierro libre puede presentar acción pro-oxidante, complementada su acción con sistemas que eliminen el H_2O_2 , como lo es la CAT y GSH (de Cavanagh *et al.*, 1995).

b) Catalasa

La CAT es una enzima antioxidante que se localiza en todas las células eucariotas (Glorieux y Calderon, 2017). Es una enzima intracelular ferriporfirínica, constituida por 4 subunidades, cada una con un grupo hemo en su centro activo. Se encuentra principalmente en peroxisomas, y en menor proporción en las mitocondrias y el citosol (Eriksson *et al.*, 1992). La función de la catalasa es doble, al tener actividad catalítica y peroxidante (Aebi, 1984). Dentro de los peróxidos eliminados se encuentra el H_2O_2 y los hidroperóxidos alquilo (metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles), con reactividad inversa a la longitud de la cadena. Se ha observado que la descomposición de H_2O_2 es muy rápida, mientras que las peroxidasas

son realmente lentas (Aebi, 1984). La catalasa presenta baja afinidad por el H_2O_2 y necesita altas concentraciones de éste para poder trabajar rápido (Roberfroid, 1995), aunque se ha observado rápida inactivación de la actividad catalasa a concentraciones superiores a 0,1M de H_2O_2 (Aebi, 1984), igualmente se ha observado la inactivación de la catalasa por el radical $O_2^{\bullet-}$ (McCord, 1989; Glorieux y Calderon, 2017).

c) Glutación peroxidasa

La GPx está formada por cuatro subunidades idénticas y cada una de ellas contiene un residuo de selenio-cisteína que es esencial para su actividad enzimática. Cataliza la reducción de diferentes hidroperóxidos ($ROOH$ y H_2O_2) utilizando glutatión reducido (GSH) y dando lugar a la formación de glutatión disulfuro oxidado (GSSG) y un producto de reducción (Mannervik, 1985; Aniya y Naito, 1993; Stone *et al.*, 2022).

En los eucariotas se encuentran dos grandes grupos, la glutatión peroxidasa selenio dependiente y la selenio independiente (Mannervik, 1985). Las selenio dependientes son tetraméricas, conteniendo selenio en forma de enlaces covalentes seleniocisteína en su centro activo. Ambas se localizan principalmente en el citosol y en menor medida en la matriz y en el espacio de la membranas externa e interna de la mitocondria. (Mannervik, 1985; Benzi y Moretti, 1995). En mamíferos existen cuatro formas de GPx: GPx-C o forma celular que es ubicua, con mayor afinidad por el H_2O_2 que por hidroperóxidos; GPx-P o forma extracelular, con afinidad semejante por ambos sustratos; GPx-GI o gastrointestinal y GPx-PH, que presenta afinidad específica para los hidroperóxidos. (Mannervik, 1985; Aniya y Naito, 1993; Stone *et al.*, 2022).

d) Glutación reductasa

Se trata de una flavoproteína encargada de catalizar la reducción del glutatión disulfuro oxidado (GSSG) dependiente del $NADPH^+H^+$, hacia glutatión reducido (GSH), necesitando una coenzima de dinucleótido de flavina-adenina (FAD) (Couto *et al.*, 2016).

1.5.6.2 Sistema antioxidante no enzimático

Los antioxidantes no enzimáticos son esenciales ya que pueden prevenir la lipoperoxidación o participar en reacciones enzimáticas antioxidantes debido a que muchos actúan como cofactores de enzimas (Krinsky, 1992). El GSH es un tripéptido compuesto por cisteína, glicina y glutamato, sintetizado en dos pasos por la glutamato cisteína ligasa y la glutatión sintetasa, consumiendo una molécula de ATP en cada paso (Dalton *et al.*, 2004). El GSH se obtiene de la dieta y se encuentra prácticamente en todas las células, el principal antioxidante intracelular. El GSH puede reaccionar directamente con los RL, sin necesidad de intervención enzimática (Markovic *et al.*, 2010). Las vitaminas C y E interaccionan directamente con los RL y con los radicales lipídicos, haciendo de estos compuestos excelentes antioxidantes hidrosolubles (Buettner y Jurkiewicz, 1996; Buettner y Schafer, 2000; Du *et al.*, 2012). La coenzima Q transporta electrones en la CTE, pero además inhibe la LPx y mantiene el almacén de vitamina E, aunque es capaz de producir radicales $\bullet\text{O}_2^-$ (Stadtman, 1991; Mukai *et al.*, 1993). Los carotenoides como el β -caroteno reaccionan con el radical peroxilo, radicales $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{O}_2^-$, y otras especies reactivas. Los elementos trazas (Cu, Zn, Mn, Fe, Se) están presentes en las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx, por tanto, la regulación de estas enzimas antioxidantes no es únicamente función de los niveles de estrés oxidante, sino también de la disponibilidad de estos elementos (Harris, 1992; Handelman, 2001).

1.5.7 Daño oxidante a moléculas biológicas

La acumulación de ERO en el organismo puede provocar daños en la estructura y función celular mediante la oxidación de lípidos, proteínas y ADN (Finkel, 2003; Cui *et al.*, 2004). Las ERO también reaccionan con otras moléculas, tanto radicales como no radicales, esto justifica su amplia función en diferentes procesos fisiológicos y patológicos. Los ERO pueden dañar la mayor parte de moléculas biológicas, causando daño oxidante celular y dando lugar a nuevas especies reactivas capaces de continuar la acción oxidante (Dröge y Schipper, 2007).

1.5.7.1 Daño oxidante a carbohidratos o azúcares

Algunas ERO también provocan la disminución del contenido de ATP intracelular alterando la vía glucolítica y mitocondrica (Oettl *et al.*, 2008). Los monosacáridos, en condiciones fisiológicas se autooxidan y forman cetoaldehídos e intermediarios oxidantes como el radical $\bullet\text{O}_2^-$. Estos productos son extremadamente reactivos y capaces de alterar la estructura espacial de proteínas, lípidos y ADN (aparición de puentes, entrecruzamientos, acortamientos, cambios conformacionales, etc. (Olechnowicz *et al.*, 2018).

1.5.7.2 Daño oxidante a lípidos

En los lípidos se produce el mayor daño oxidante en un proceso que se conoce como **lipoperoxidación** (LPx) desencadenado por el O_2 , $^1\text{O}_2$, H_2O_2 y $\bullet\text{OH}$, afectando a las estructuras de ácidos grasos poliinsaturados como las membranas celulares (Halliwell y Chirico, 1993). La LPx es un proceso continuo y fisiológico que en condiciones normales actúa como un renovador de membranas biológicas, aunque su excesiva activación está relacionada con la patogénesis de numerosas enfermedades y procesos patológicos como diabetes (Kostolanská *et al.*, 2009; Bhattacharya *et al.*, 2017) o fibrosis pulmonar (Selek *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2009).

Los productos finales del proceso de LPx son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, como los n-alcanales, 2-alquenes, entre otros, incluyendo dentro de estos productos el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxi-alquenes (Frei, 1994). El MDA, formado en las últimas etapas de la ruptura de endoperóxidos durante la reestructuración intramolecular de los ácidos grasos, puede ser metabolizado a nivel celular, por ejemplo, por la aldehído deshidrogenasa hepática para posteriormente ser excretado (Halliwell y Gutteridge, 1999). En la lipoperoxidación se producen los 4-hidroxi-alquenes y en particular el 4-HNE (4-hidroxinonenal) que es muy reactivo. El 4-HNE es un producto de la oxidación del ácido araquidónico (Esterbauer *et al.*, 1991). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, causando alteraciones estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas y el ADN. Los peróxidos de hidrógeno como el MDA y 4HNE pueden afectar las vías de señalamiento de la respuesta inmune e inflamación. Los peróxidos de lípidos pueden reaccionar con aminoácidos de

proteínas, con las bases guanina y adenina del ADN, formando aductos y enlaces cruzados implicados en varias patologías (Del Rio *et al.*, 2005).

1.5.7.3 Daño oxidante a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los RL, principalmente por el radical $\bullet\text{OH}$. La oxidación de proteínas puede ser clasificada en reversible o irreversible (Stadtman, 1992). La oxidación reversible constituye, en ocasiones, una forma de activar o desactivar proteínas que tienen función en la regulación redox, en la constitución de puentes disulfuro entre grupos tioles de cisteínas cercanas dentro de la conformación tridimensional de una proteína (Kapaki *et al.*, 2007). Otras formas de oxidación reversible son la glutationilación y la S-nitrosilación. La oxidación irreversible de proteínas se da por medio de cuatro mecanismos: a) la carbonilación, b) la ruptura de enlaces peptídicos, c) la nitración y d) la formación de enlaces proteína-proteína (Tabla V).

Estas oxidaciones son ocasionadas por reacción de proteínas con ERO, algunos de los cuales son radicales libres generados por radiación ionizante y por oxidación catalizada por un metal. El sistema de oxidación catalizada por metales es el mecanismo más importante en la modificación oxidante de las proteínas (Hauck *et al.*, 2019; Choromańska *et al.*, 2021). En las células muchas proteínas intracelulares son degradadas por el complejo proteínasa multicatalítico o proteosoma. Se ha encontrado evidencia de que la oxidación proteica aumenta la ubiquitinación (el proceso de “etiquetado” para procesos proteolíticos en eucariontes) y esto a su vez, la proteólisis. Sin embargo, este mecanismo parece estar limitado a ciertos niveles de oxidación, debido a que el daño oxidativo severo causa disminución en la capacidad proteolítica de la célula (Díaz-Acosta *et al.*, 2006).

Tabla V. Posibles consecuencias del estrés oxidante en la función proteica (Stadtman, 1992).

Modificación por oxidación	Tipo	Efecto
Carbonilación	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas.
Nitración	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas.
Formación de enlaces proteína-proteína	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas.
Ruptura de enlaces peptídicos	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas.
Glutacionilación	Reversible	Protección de cisteínas o regulación de función proteica.
S-nitrosilación	Reversible	Protección de cisteínas o regulación de función proteica.

1.5.7.4 Daño oxidante en el ADN

El daño al ADN es cualquier modificación de su estructura que altera sus propiedades de codificación y/o interfiera con el metabolismo celular, como la replicación o la transcripción (Sekelsky, 2017). Las ERO afectan al ADN de distinta manera; el $\bullet\text{O}_2^-$ y el H_2O_2 a niveles fisiológicamente relevantes no reaccionan fácilmente con el ADN, sin embargo, pueden hacerlo con otras moléculas y producir ERO como los radicales $\bullet\text{OH}$, que reaccionan con el ADN o cualquier otra macromolécula (Halliwell y Gutteridge, 2007). Las alteraciones del ADN, como consecuencia de la interacción con los ERO son importantes, debido a que puede producir mayor número de mutaciones, entrecruzamientos, roturas espontáneas en las cromátidas y pérdida de fragmentos cromosómicos, llegando incluso a la pérdida total de cromosomas (Meissner, 2007).

Dentro de las alteraciones más frecuentes en las bases púricas, destaca la formación de la 8OHdG, con un alto efecto mutagénico. Respecto a las bases pirimidínicas, se encuentran los glicoles de timina (T) y citosina (C), además de los hidratos de pirimidina, los cuales dan lugar a fragmentación (Sies y Cadenas, 1985). El ADN mitocondrial presenta una mayor tasa de mutación por modificaciones oxidantes de sus bases que son responsables del mal funcionamiento de los complejos de la cadena de transporte de electrones, principal fuente de ERO mitocondriales, incrementando su producción (Fukui y Moraes, 2009). La 8OHdG es 16 veces superior a la encontrada en el ADN nuclear, esto podría traducirse en una disfunción mitocondrica dando lugar al desarrollo del fenotipo característico de la

senescencia celular (Pérez *et al.*, 2008).

1.6 Mecanismos de respuesta al daño en el ADN

De manera general, a los procesos encargados de resguardar la integridad del genoma se les denomina mecanismos de respuesta de daño al ADN, por sus siglas en inglés **DNA damage response** (DDR). Que se agrupan en aquellos que actúan cuando existe daño en una sola cadena SSB y aquellos que participan cuando se dañan ambas cadenas DSB del ADN, que son eficazmente detectados por varios miembros de proteínas quinasas las quinasas ATR y ATM (Aguilera y Gómez-González, 2008).

1.6.1 ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada)

Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM), la proteína defectuosa en el trastorno hereditario ataxia telangiectasia, es el componente central de la vía de transducción de señales que responde ante la inducción de DSB (Shiloh, 2003). El gen ATM genera un transcrito de aproximadamente 13 kb. Es una proteína predominantemente nuclear, sin embargo, existen evidencias de formas citoplasmáticas que se asocian a los peroxisomas y endosomas (Watters *et al.*, 1999). La proteína ATM es una serina-treonina quinasa perteneciente a la familia de proteínas PI3-quinasa (familia PIKK). Todas las proteínas de dicha familia están relacionadas en la señalización seguida al estrés celular, e incluye a: DNAPKcs por sus siglas en inglés (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit), mTOR (blanco de la rapamicina en mamíferos), y ATR (Uziel *et al.*, 1996). Estos miembros tienen en común una estructura que incluye en la región N-terminal repeticiones tipo HEAT por sus siglas en inglés (Huntingtin, Elongation factor 3, a subunit of protein phosphatase 2A, and TORI), dominio FAT (FRAP, ATM y TRRAP), un dominio proteína-quinasa, y un dominio carbono terminal C-FAT(FAT C-terminal) (Derheimer y Kastan, 2010).

ATM se encuentra en forma de dímeros inactivos, sin embargo, cuando se produce daño al ADN o tratamientos con agentes que alteran la estructura de la cromatina, ATM sufre su autofosforilación en la serina 1981 (S1981), resultando en la disociación del dímero inactivo hacia monómeros activos (Bakkenist y Kastan, 2003). Este proceso también es promovido por el complejo **Mre11, Rad50 y Nbs1**(MRN), que, además, se encarga del reclutamiento de ATM hacia los sitios donde se produjo la lesión. Inmediatamente después de ser reclutada en el sitio de la

ruptura, la proteína ATM, activa a la histona H2AX mediante fosforilación (Burma *et al.*, 2001). La fosforilación de H2AX promueve el reclutamiento y acumulación de otras proteínas implicadas en la reparación del daño al ADN como MDC1, 53BP1 (p53 binding protein-1) y BRCA1 por sus siglas inglés (Breast Cancer 1) (Hamer *et al.*, 2004) (Fig. 4). Adicionalmente la activación de ATM por DSB conduce a la fosforilación de varios sustratos, como Brca1, Chk2 (*Checkpoint kinasa 2*) y p53, mediando los efectos de ATM en la reparación del ADN, el arresto del ciclo celular, la apoptosis y otros procesos descendentes (Shiloh, 2003; Lavin, 2008; Sekelsky, 2017).

1.6.2 ATR (Ataxia Telangiectasia-proteína relacionada con Rad3)

Ataxia Telangiectasia-proteína relacionada con Rad3 (ATR) es una proteína de 2644 aminoácidos que al igual que ATM, es miembro de la familia de las PIKKs junto a ATM y otras cinasas son fundamentales en la señalización del daño en el ADN. ATR responde a estrés replicativo y a la presencia de roturas de ADN de cadena sencilla (SSB) (Jazayeri *et al.*, 2006). Después de la generación de SSB, el dominio FAT de ATR es fosforilado en la Thr1989 provocando su activación (Liu *et al.*, 2011a), posteriormente es reclutada a la región donde ocurrió el daño mediante ATRIP (ATR-interacting protein) para su interacción con RPA (replication protein A) (Sung y Klein, 2006). RPA es un complejo heterotrimérico formado por RPA1, RPA2 y RPA3 que estabiliza las regiones de SSB (Smith *et al.*, 2010). La formación del complejo RPA-ssbDNA tiene una función crítica en la activación de la ruta de señalización iniciada por ATR (Fig. 3). Posterior a su reclutamiento al sitio de daño, ATR lleva a cabo la fosforilación de diversos sustratos como Chk1 (*Checkpoint kinasa 1*) que conduce a la detención del ciclo celular en las fases G2-M (Ciccia y Elledge, 2010).

1.6.3 Checkpoint kinasas 1 y 2

Checkpoint kinasa 1 (Chk1) y **Checkpoint kinasa 2 (Chk2)** son otros integrantes de la familia de la proteína Ser/Thr cinasas, los dos sustratos mejor caracterizados de ATR y ATM, respectivamente (Stracker *et al.*, 2013). ATM-Chk2 y ATR-Chk1 son las quinasas que coordinan las dos principales rutas de señalización en respuesta al daño en el ADN (Bartek y Lukas 2007, Sancar *et al.*, 2004). ATM-Chk2 se activa por la generación de DSBs y ATR-Chk1 por ssADN ya sea durante la replicación o en la resección durante la reparación por HR (Smith *et al.*, 2010). Chk1

es importante para el mantenimiento del punto de control G2/M, siendo su principal sustrato CDC25A (Smith *et al.*, 2010). Chk2 actúa principalmente, pero no exclusivamente, en las fases G1/S, el sustrato crucial de Chk2 es p53, cuya fosforilación que conlleva a la transcripción de genes asociados con la reparación del ADN y apoptosis celular cuando el número de lesiones excede a la capacidad de reparación de la célula (Fig. 4) (Bartek y Lukas 2007). Otros sustratos de Chk2 son MDMX, BRCA1, FOXO1 y la familia de fosfatasas CDC25 (Takai *et al.*, 2002).

1.6.4 p53

La proteína p53 desempeña un papel importante en la regulación del destino de la célula, en respuesta a diferentes tipos de estrés, ya sea originado por agentes genotóxicos (daño al ADN inducido por radiación ionizante, radiación UV, agentes carcinógenos entre otros) o no genotóxicos (hipoxia, carencia de nucleótidos, activación de oncogenes, perturbación de los microtúbulos o pérdida de comunicación normal de la célula) por lo que se le conoce como “el guardián del genoma” (Menon y Povirk, 2014). En seres humanos esta proteína es codificada por el gen TP53, contiene 11 exones y se extiende a 20 kb. Además, p53 optimiza la reparación del ADN, ejerce su acción antiproliferativa mediante la inducción de apoptosis o la detención reversible o irreversible del ciclo celular (Lacroix *et al.*, 2006).

En células normales, el nivel y la actividad de p53 es muy baja, en estrés genotóxico, p53 se activa mediante una serie de modificaciones postraduccionales y se estabiliza (Lacroix *et al.*, 2006). El primer evento en la vía de activación de p53 es a través de ATM-Chk2 que no permiten la interacción de p53 con sus reguladores negativos (MDM2 o MDM4) (Menon y Povirk, 2014). La funcionalidad de p53 depende de su integridad génica y de las modificaciones postraduccionales que se inducen ante la activación de las vías de señalización por estrés celular (Lacroix *et al.*, 2006). p53 tiene la capacidad de activar o suprimir la expresión de genes como p21 (Fig. 4) y Gadd45 en bloqueo del ciclo celular y de la familia Bcl-2 involucrados en la vía de la apoptosis, detención del crecimiento y daño al ADN (Menon y Povirk, 2014).

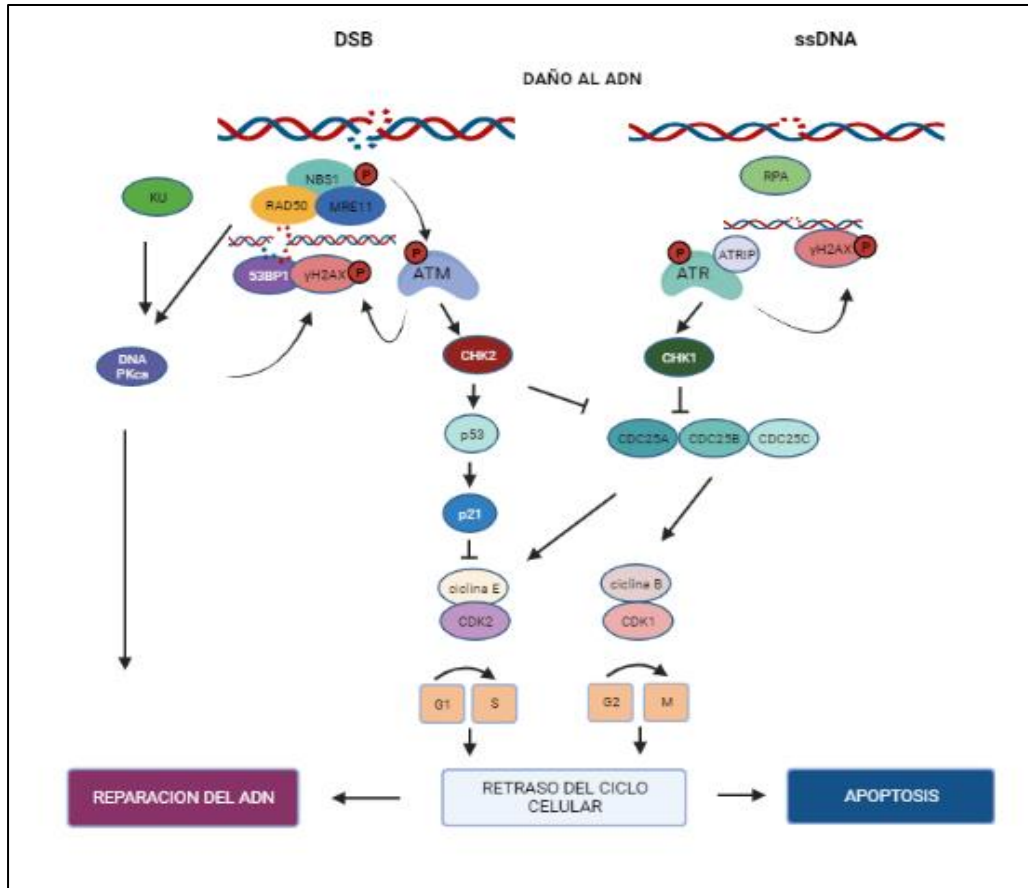


Figura 4. Mecanismos de respuesta al daño en el ADN (DDR). Después de la inducción de una ruptura de cadena sencilla (SSB), RPA media el reclutamiento de ATR, que fosforila a Chk1 que conduce a la detención del ciclo celular y reparación del daño. En presencia de una ruptura de doble cadena (DBS) del ADN, el complejo MRN y el heterodímero KU70/80 (Ku) detectan los DSBs, activando procesos de fosforilación mediados por ATM que consecuentemente activa a Chk2 el cual fosforila a p53 y las fosfatasas de la familia CDC25 inhibiendo el ciclo celular facilitando la reparación de las lesiones (González-Marín, 2022).

1.7 Mecanismos de reparación del ADN

En las células existen diferentes formas de reparar el ADN, dependiendo del tipo de daño y de los componentes que se encuentren cercanos o sean más asequibles. Mientras que algunas lesiones se reparan de forma directa, la gran mayoría lo hace a través de eventos en los que participan múltiples proteínas. Las vías más importantes para reparar los daños en una sola cadena del ADN son: la **reparación por escisión de bases** (BER, base excision repair), por **escisión de nucleótidos** (NER nucleotide excision repair) y por **mal apareamiento de las bases** (MMR, mismatch repair) (Sekelsky, 2017), mientras que la reparación por **recombinación homóloga** (HR, homologous

recombination) y la **unión de extremos no homólogos** (NHEJ, nonhomologous end joining) son más comunes para los daños originados en ambas cadenas (Lombard et al., 2005; Sekelsky, 2017).

1.7.1 Reparación por Escisión de Bases (BER)

En este tipo de reparación remueve directamente en el ADN la base dañada y la reemplaza por la base correcta. Este tipo de modificaciones corresponde a procesos de oxidación, deaminación, pérdida de bases nitrigenadas (sitios AP) o alquilación de las bases (Iyama y Wilson, 2013; Sekelsky, 2017).

1.7.2 Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)

La vía NER repara numerosas lesiones al genoma, particularmente bases modificadas que alteran la estructura normal de la hélice de doble cadena del ADN (Iyama y Wilson, 2013), por ejemplo: dímeros de ciclobutano pirimidina y fosfoproductos de pirimidina denominados pirimidonas generadas por radiación ultravioleta, aductos de bases creados por agentes químicos exógenos como cisplatino y benzopireno, lesiones de bases producidas por reacciones de peroxidación lipídica y ERO. En este mecanismo de reparación se remueve una secuencia de 30 pb que incluye la(s) base(s) dañada(s) y después se sintetiza un nuevo fragmento que reemplaza a la secuencia eliminada (Sekelsky *et al.*, 2000a; Sekelsky, 2017).

1.7.3 Reparación de Emparejamientos Erróneos (MMR)

Esta vía de reparación se ha conservado en bacterias y mamíferos, este sistema reconoce y repara daños como: inserciones y deleciones de estructuras secundarias, que se generan principalmente como errores de la replicación del ADN. Este mecanismo de reparación involucra principalmente la participación de dos factores proteicos MutS α y MutS β (mamíferos), descritos inicialmente en *E. coli* (MutS y MutL) (Iyama y Wilson, 2013; Sekelsky, 2017).

1.7.4 Recombinación Homóloga (HR)

La HR corresponde a un intercambio o transferencia de secuencias idénticas entre la molécula de ADN que presenta la ruptura y la otra molécula intacta que sirve de molde. Este mecanismo es

preferentemente activo en la fase G2 y S del ciclo celular asegurando la estabilidad del genoma. Involucra genes que codifican proteínas pertenecientes a la familia de RAD50, así como las ADN nucleasas (Exo1, Sae2, Rad1-Rad10), helicasas (Sgs1, Srs2), topoisomerasas (Top3), polimerasas (Pol32) y ligasas, las cuales son necesarias para unir la región recién sintetizada con la que no fue modificada (Sekelsky, 2000a; Krogh y Symington 2004; Sekelsky, 2017).

El primer paso esencial de la HR es el procesamiento de los extremos de doble hebra en donde se generó la ruptura por un complejo especializado de proteínas como son: el complejo MRN, ctp1, Exo1, ADN2 y proteínas helicasas (BLM) que generan un largo extremo de cadena sencilla. La proteína de replicación RPA en seres humanos, rápidamente cubre este fragmento para evitar su degradación o formación de estructuras secundarias (Pardo *et al.*, 2009).

El segundo paso es el apareamiento homólogo y el intercambio de cadenas de ADN realizado por la recombinasa RAD51 en eucariotas, RecA en *Escherichia coli*, asistida por los mediadores de la recombinasa (en seres humanos: la proteína supresora de tumor BRCA2 y parálogos de RAD51 incluyendo RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 Y XRCC3), los cuales desplazan a RPA y forman filamentos nucleoproteicos que favorecen la formación de estructuras tipo Holliday facilitando el intercambio de cadenas con el segmento homólogo molde para posteriormente llevarse a cabo la resolución por medio de las resolvasas como GEN1 y el complejo SLX1 (Svendsen y Harper, 2010; Sekelsky, 2017).

1.7.5 Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ)

La vía de reparación de NHEJ se activa después de la detección de roturas de doble cadena DSB, por lo tanto, no utiliza un molde de ADN por lo que es propensa a errores y puede involucrar la pérdida o ganancia de nucleótidos, así la integridad de la información genética no se asegura. Este mecanismo está activo en todas las fases del ciclo celular, pero es preferentemente utilizado en la fase G1 (Williams *et al.*, 2010). Para iniciar el proceso de reparación vía NHEJ se requiere de la formación de un complejo proteico denominado MRN el cual también es necesario durante el proceso de reparación por HR. En mamíferos, el complejo MRN desempeña un papel crítico en la respuesta temprana a los DSBs, actuando como su principal sensor en conjunto con el heterodímero Ku (KU70 y KU80), (Lee *et al.*, 2013). Mientras el heterodímero Ku ejerce su papel

exclusivamente en reparación, el complejo MRN actúa tanto en la reparación como en la señalización del daño (Hopfner *et al.*, 2002). El complejo MRN, recluta y activa la función catalítica de la proteína kinasa ATM la cual se encarga de fosforilar a la histona H2AX con lo cual se activan diversas vías de señalización que permiten el reclutamiento de proteínas de reparación mientras simultáneamente el ciclo celular se encuentra arrestado (Williams *et al.*, 2010). La proteína ATM y ATR son las proteínas reguladoras, responsables de amplificar la señal en las dos vías de reparación (HR y NHEJ) y de fosforilar proteínas en los puntos de control del ciclo celular o inducir apoptosis si la reparación no se lleva a cabo (Taniguchi *et al.*, 2002; Prendergast *et al.*, 2011).

1.8 Biomarcadores

Los biomarcadores son cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles en un sistema biológico, originados cuando se encuentran expuestos a un agente tóxico de naturaleza química, física o biológica. Son útiles para evaluar el estado de salud y el riesgo potencial de enfermedades por exposición a contaminantes ambientales (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007; Toro-Restrepo, 2011; Arango, 2012). Además, permiten identificar las interacciones entre el contaminante y el organismo, así como medir efectos sub-letales a bajas concentraciones y por períodos cortos de exposición (Martínez-Valenzuela *et al.*, 2009). Se clasifican en tres tipos de: a) exposición, b) efecto y c) susceptibilidad.

- a) **Biomarcadores de exposición:** se emplean para evaluar en el organismo sustancias exógenas, metabolitos o productos generados por la interacción entre una célula o molécula blanco y el xenobiótico. Se pueden medir en sangre, orina, cabello, uñas o en ADN, ARN, lípidos y proteínas (Van Cauteren *et al.*, 1996). Se sub-dividen en dos tipos:
- Los marcadores de dosis interna: cuantifican directamente la concentración del xenobiótico o sus metabolitos en tejidos, órganos o en el organismo completo (Timbrell, 1998), por ejemplo, los niveles de insecticidas piretroide en suero humano para estimar la exposición individual a estas sustancias (Li *et al.*, 2020b). Aunque este tipo de biomarcadores son una herramienta valiosa para evaluar las exposiciones a xenobióticos, no indican en qué medida un compuesto ha interactuado con objetivos moleculares y

celulares (Perera y Weinstein, 2000).

- Los biomarcadores de dosis biológicamente efectiva: indican que el agente tóxico ha interactuado con los órganos o células blanco, por lo que permiten cuantificar el producto de esa interacción (Timbrell, 1998). Por ejemplo, los aductos de ADN son moléculas sencillas o complejas que forma el agente tóxico o sus metabolitos con los ácidos nucleicos, proteínas o lípidos, mediante enlaces covalentes. De esta forma, la cuantificación de los aductos proporciona información sobre que el xenobiótico ha sido absorbido por el organismo, sometido a activación metabólica, unido al ADN celular y no ha sido reparado (Rundle *et al.*, 2002; Gallo *et al.*, 2008).

b) Biomarcadores de efecto: indican cambios bioquímicos o fisiológicos dentro de un organismo, como resultado de la exposición al xenobiótico. No identifican al xenobiótico, solo miden la respuesta tóxica en el organismo (Gil y Pla, 2001), la cual puede ser asociada con el desarrollo de patologías (Timbrell, 1998). Las lesiones en el ADN, una vez establecidas, pueden convertirse en cambios permanentes en las células dando lugar a mutaciones, que finalmente conduzcan a neoplasias (Lodish *et al.*, 2000).

c) Biomarcadores de susceptibilidad indican la sensibilidad del individuo a los efectos de un compuesto o grupo de ellos. Se engloban factores genéticos, como polimorfismos, que son variaciones en la secuencia de ADN de genes entre individuos de la misma especie y que se presentan con una frecuencia superior al 1% (Suárez-Larios, 2008).

Usos potenciales de los biomarcadores en estudios de campo son:

- i. Evaluar el efecto de un agente químico desconocido o mezcla de productos químicos.
- ii. Evidenciar biodisponibilidad o ausencia.
- iii. Proporcionar oportunidades *in vitro* de comprensión de mecanismos.
- iv. Priorizar sitios, contaminantes o muestras que requieran futuros análisis.
- v. Vigilar los contaminantes presentes.

Debido a que algunos contaminantes ambientales como metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y plaguicidas, entre otros, tienen la capacidad de dañar el material

genético, se ha implementado el uso de biomarcadores para la evaluación de genotoxicidad y el biomonitoreo de especies no blanco expuestas a estas sustancias incluyendo a los seres humanos (Gómez- Arroyo *et al.*, 2013).

Dentro de estos se encuentran pruebas como el de aberraciones cromosómicas (AC), micronúcleos (MN), intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y la electroforesis en gel de células individuales (SCGE, por sus siglas en inglés) o ensayo cometa.

Las AC son un biomarcador de efecto utilizado para detectar cambios en el número de cromosomas de una especie o alteraciones en su estructura, ya sea por reordenamientos, ganancia o pérdida de un segmento en el mismo o entre diferentes cromosomas (Jimenez-Zepeda *et al.*, 2013). Las AC se asocian con enfermedades genéticas y son consideradas como un biomarcador de efecto temprano en la predicción de cáncer (Bonassi *et al.*, 2008).

La prueba de MN es uno de los biomarcadores de efecto que se ha empleado aproximadamente durante 40 años (Sánchez-Zepeda *et al.*, 2019). Los MN se forman durante la transición metafase-anafase de la mitosis y pueden ser cromosomas completos rezagados por daño al huso mitótico, o fragmentos de cromosomas sin centrómero. En ambos casos, no se logran integrar al núcleo de las células hijas, por lo que se rodean de membrana celular y se observan como pequeños núcleos. Es ampliamente utilizado como indicador de daño cromosómico y de inestabilidad del genoma, porque evidencia alteraciones en el huso cromático o en la estructura de los cromosomas (Terradas *et al.*, 2016). Es frecuentemente empleado para el biomonitoreo en mamíferos (Iarmarcovai *et al.*, 2008).

Los ICH son cambios recíprocos que ocurren en el ADN durante el periodo de síntesis del ciclo celular entre loci homólogos sin que se lleve a cabo pérdida de material genético ni modificaciones en la morfología de los cromosomas. Es un biomarcador de efecto muy sensible y es posible detectarlos en metafase (Gómez-Arroyo *et al.*, 2013). Es utilizado en monitoreo biológico de especies expuestas a agentes potencialmente genotóxicos debido a que en dosis muy bajas se observa aumento de los ICH por encima de la frecuencia normal de incidencia poblacional, por lo que el análisis de estos intercambios ofrece la posibilidad útil y cuantitativa para medir el daño genético (Azab *et al.*, 2019).

El ensayo cometa, es un biomarcador de efecto, rápido, simple, visual y sensible. Utilizado para medir roturas en el ADN en células individuales, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas, así como la eficiencia en procesos de reparación de células (Karbashi *et al.*, 2019). Se fundamenta en que el ADN fragmentado adquiere una carga neta negativa que le permite migrar hacia el ánodo de un campo eléctrico y dependiendo del tamaño de los fragmentos su velocidad de desplazamiento será diferente. De esta manera, se pueden observar los núcleos no dañados como un círculo brillante, mientras que los fragmentos de ADN forman la figura de la cola del cometa (Moneef *et al.*, 2003). Se ha aplicado a diferentes organismos expuestos a plaguicidas (Calderón-Segura *et al.*, 2015; Calderón-Segura *et al.*, 2018; González-Marín *et al.*, 2021) y metales pesados en poblaciones humanas (Calderón-Segura *et al.*, 2022).

II ANTECEDENTES

2.1 Insecticidas cetoenoles

Los insecticidas cetoenoles son un nuevo grupo de plaguicidas desarrollados por Bayer® CropScience, su formulación química deriva de ácidos tetrónicos y tetrámicos (Nauen *et al.*, 2008). Estos ácidos se caracterizan por ser compuestos que presentan tautomería cetoenol, por lo que pueden encontrarse tanto en la forma ceto como en la enol (Abdou *et al.*, 2019). Los compuestos tautoméricos, son isómeros que modifican su estructura debido a la migración de un átomo de hidrógeno o protón de los enlaces sencillos a un enlace doble adyacente. La tautomería heterocíclica más conocida es la forma cetoenol, en la cual los hidrógenos unidos a los carbonos alfa de la cetona sustituyen al oxígeno del grupo carbonilo formando un grupo enol, que se caracteriza por la presencia de un grupo hidroxilo unido a un átomo de carbono que tiene un enlace doble con el carbono alfa (Robledo, 2015).

Los insecticidas cetoenoles contienen tres ingredientes activos formulados en tres mezclas comerciales disponibles: Spirodiclofen (Envidor® 240SC), Spiromesifen (Oberon® 240SC) y Spirotetramat (Movento® 240SC) (Fig. 5). Fueron desarrollados en la década de los 1990 y posteriormente comercializados a partir de 2000 en países como: Turquía, Estados Unidos, Brasil y México (Sparks y Nauen, 2015). Ofrecen una nueva alternativa en la protección de los cultivos

debido a su novedoso mecanismo de acción, basado en la inhibición de la síntesis de lípidos al impedir la actividad de la enzima Acetil-CoA carboxilasa (Bretschneider *et al.*, 2003). Lo anterior ocasiona que no se lleve a cabo la carboxilación de la acetil-CoA carboxilasa, por lo que, la IARC los clasifica dentro del grupo 23: “inhibidores de la síntesis de lípidos” (Lümmen *et al.*, 2014). Son principalmente eficaces contra huevos y todas las etapas de desarrollo, con toxicidad aguda limitada en adultos (Bretschneider *et al.*, 2003; Marcic *et al.*, 2010).

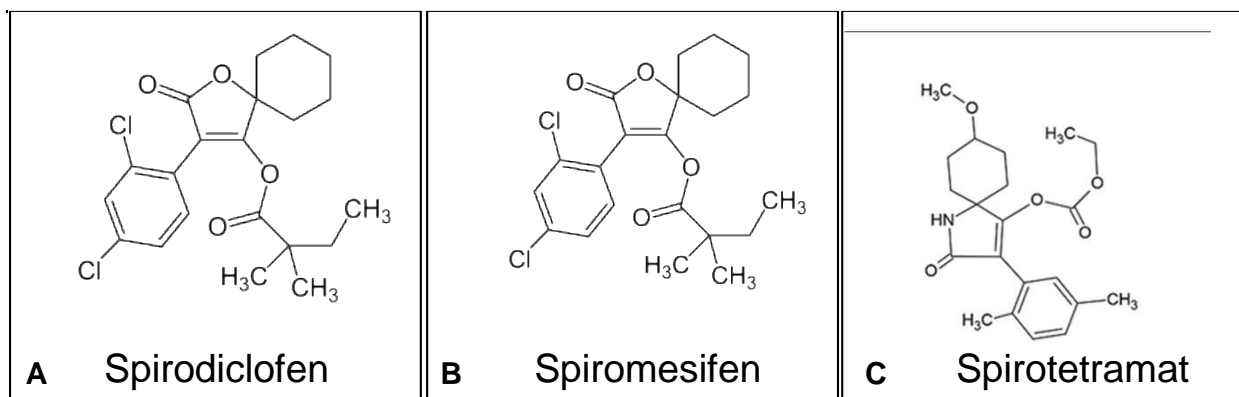


Figura 5. Estructura química de los insecticidas cetoenoles. A) Spirodiclofen (Envidor® 240SC), B) Spiromesifen (Oberon® 240SC) y C) Spirotetramat (Movento® 240SC) (Ke *et al.*, 2010).

2.1.1 Mecanismo de acción de los insecticidas cetoenoles

Los insecticidas cetoenoles actúan inhibiendo a la acetil-CoA carboxilasa, una enzima implicada en el metabolismo lipídico, que cataliza la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA, esta catálisis es dependiente de biotina y ocurre a través de dos semirreacciones separadas. En la primera se carboxila la biotina, y en la segunda se transfiere el grupo carboxilo de la carboxibiotina al aceptor de acil-CoA a través de una carboxiltransferasa (Nauen, 2005; Wei *et al.*, 2020). Los insecticidas cetoenoles interfieren con la reacción parcial de la carboxiltransferasa, actuando como inhibidores competitivos de la acetil-CoA e inhibidores no competitivos de la carboxibiotina provocando la inhibición de la biosíntesis lipídica. Debido a la ausencia de lípidos en los insectos sus cuerpos se secan y posteriormente son degradados en un periodo de tres a diez días (Wei *et al.*, 2020). Desde el 2005 no se han presentado reportes de resistencia a los cetoenoles en insectos y ácaros objetivo, tampoco resistencia cruzada con otros acaricidas o insecticidas disponibles (Nauen, 2005).

2.1.2 Envidor® 240SC (Spirodiclofen)

Envidor® 240 SC es un acaricida foliar no sistémico derivado del ácido tetrónico, contiene como ingrediente activo Spirodiclofen, su nombre y estructura química es (3-(2,4-Diclorofenil)-2-oxo-1-oxaspiro dec-3-en-4-il 2,2- dimetilbutanoato) en una concentración de 240 g/L. Su masa molecular es de 411.3 g/mol y su solubilidad en agua es de 0.00019 mg/L (20°C, pH 7) (Wachendorff *et al.*, 2002; Nauen, 2005). La dosis de administración en campos agrícolas es de 60 mL por hectárea, se realiza como máximo una aplicación en el campo y dos aplicaciones en invernaderos, se asperja por medio de pulverizadores manuales o aquellos colocados en tractores (Sverdrup, 2011; Bayer, 2018). La sustancia activa tiene una tasa de biodegradación de 2.1 — 2.6 % de acuerdo con estudios realizados en sedimentos aeróbicos de agua (Sverdrup, 2011). La vida media de Spirodiclofen por biodegradación en suelo es de 2.6 a 17.9 días (MacBean, 2010). La hidrólisis es moderada a pH 7, su estabilidad disminuye a medida que aumentan la temperatura y el pH, no obstante, la fotólisis no es una vía de degradación importante para el compuesto (Sverdrup, 2011; Bayer, 2018).

Envidor® 240SC fue el primer miembro del grupo de los cetoenoles lanzado al mercado en 2002, se utiliza como insecticida y acaricida en plantas ornamentales y en cultivos de cítricos, manzanas, peras, cerezas, ciruelas, plátanos, almendras y avellanas (Marcic *et al.*, 2011). Actúa por contacto en huevos, larvas y hembras adultas de ácaros, psílidos, tijerillas, pulgones y la mosca blanca, específicamente en las especies: *Tetranychus sp.* y *Panonychus citri*, *Phyllocoptruta oleivora*, *Brevipalpus sp.* y *Aculus sp.* (Rauch y Nauen, 2002; Wachendorff *et al.*, 2002; Marcic, *et al.*, 2011). El compuesto está registrado para su uso en varios países como: Taiwán, Egipto, Marruecos, Irak, Líbano, Lituania, Pakistán, Serbia, Eslovenia, Turquía, Rumania, Bulgaria, Croacia, Chipre, Hungría, Luxemburgo, Montenegro, Grecia, Polonia, Portugal, Suiza, Argentina, Chile y México (FAO, 2008).

En México se ha reportado el uso de Envidor® 240SC en el estado de Querétaro contra plagas de cítricos (limón, naranja, toronja y mandarina), y contra el ácaro rojo de las palmas (*Raoiella indica*) en cultivos de coco, plátano y palmas ornamentales en los estados de Colima, Quintana Roo, Yucatán, Campeche, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Sinaloa y Guerrero

(SENASICA-SAGARPA, 2014, 2015). En Puebla para el control de ninfas y adultos del ácaro rojo (*Raoiella indica*) en el cultivo de rosas. En Michoacán se ha reportado su uso para combatir plagas como barrenadores del hueso (*Heilipus lauri*, *Conotrachelus aguacatae*, *C. perseae*, *Stenoma catenifer*) y el barrenador de las ramas del aguacate (*Copturus aguacatae*) (Huerta-Pérez *et al.*, 2017). Actualmente, en México no se tiene una regulación específica acerca del límite máximo de residuos (LMR) de Spirodiclofen (Envidor® 240SC) en plantas y frutas comestibles, únicamente se limita a cumplir con los LMR definidos por el país al que se exportará el producto, LMR para Spirodiclofen en cultivos de manzana (0.2 mg/Kg), naranja (0.0005 mg/Kg) y pera (0.2 mg/Kg) (SENASICA, 2020, SENASICA, 2023).

2.1.2.1 Rutas de exposición de Envidor® 240SC (Spirodiclofen)

Envidor® 240SC, puede entrar en contacto con los seres humanos u otros organismos por inhalación, absorción cutánea o ingesta, por medio de alimentos contaminados con residuos del plaguicida. Reportes experimentales sobre la exposición de ratas a este plaguicida, han sugerido poca o nula toxicidad a nivel dérmico o por inhalación, aunque no es irritante para los ojos, pero sí para la piel (Sverdrup, 2011). Los valores de dosis letal media (LD₅₀) en ratas son: por inhalación > 5000 mg/cu m³ h, por contacto dérmico >2000 mg/Kg y por vía oral > 2500 mg/Kg (MacBean, 2010). Por lo tanto, presenta baja toxicidad aguda para mamíferos (LD₅₀: > 2500 mg/Kg pc/día) (EPA, 2005). De acuerdo con estudios realizados *in vitro* sobre tejido dérmico humano, se reportó que la tasa de absorción dérmica es de 0.6 % para la solución concentrada y del 7 % para las diluciones (Sverdrup, 2011; NCBI, 2020). No obstante, Envidor® 240SC, es considerado tóxico por vía oral (EPA, 2017). Datos experimentales en mamíferos sugieren que tras la ingesta de Envidor® 240SC este es absorbido en el tracto gastrointestinal y posteriormente distribuido en hígado, riñón, plasma, sin evidenciar potencial de bioacumulación (EPA, 2017; MacBean, 2010).

2.1.2.2 Metabolismo de Envidor® 240SC en animales y plantas

Estudios realizados en animales y plantas demostraron que las enzimas de la familia del citocromo P450, monooxigenasas, esterasas y glutatión-S-transferasas, están implicadas en la desintoxicación metabólica de Envidor® 240SC, Spirodiclofen (Sverdrup, 2011). Se ha identificado que la principal ruta de excreción es vía urinaria y sus principales metabolitos son los isómeros: 3-hidroxi- spirodiclofen-enol y 4-hidroxi-spirodiclofen-enol, mientras que, en plasma e

hígado se transforma en su principal metabolito Spirodiclofen-enol. No se ha detectado el compuesto original en orina o bilis, pero si en heces (FAO, 2014; EPA, 2017).

El metabolismo de Envidor® 240SC se ha reportado en cabras, ratas macho y hembra. Se han identificado 11 metabolitos que representan el 59 – 90 % de la dosis administrada. En estos estudios la identificación de Spirodiclofen se realizó a través de su marcaje en la posición tres del anillo de dihidrofuranona con el isotopo ^{14}C , a través de este marcaje se pudieron identificar los siguientes compuestos de referencia: Spirodiclofen (compuesto original), Spirodiclofen-enol (M01), 3-OH-spirodiclofen-enol (M02), 4-OH-spirodiclofen-enol (M03), ácido 2,4-dicloro-mandélico (M06), ácido 2,4-diclorobenzoico y ácido 2,4-diclorofenilacético (FAO, 2014).

En ratas, la ruta de excreción es a través de la orina y heces, en las hembras el principal metabolito es M01 con el 54.8 %, seguido de los isómeros M02 y M03 con el 37.3 % y resto representado por el compuesto original el cual fue excretado a través de las heces. En los machos los principales metabolitos urinarios son los isómeros M02 y M03 con 55.1 – 57.4 % seguido del metabolito M01 38 %, y el resto del compuesto original excretado también en las heces (Sverdrup, 2011). La vía metabólica implica la escisión del enlace éster con la formación del metabolito spirodiclofen-enol, seguido de hidroxilación del anillo ciclohexano de M01 (Sverdrup, 2011). En cabras se determinó que Spirodiclofen es metabolizado por completo el principal metabolito es M01 con 81.6 % seguido de M03 con el 18.6 % (Fig. 6) (FAO, 2014).

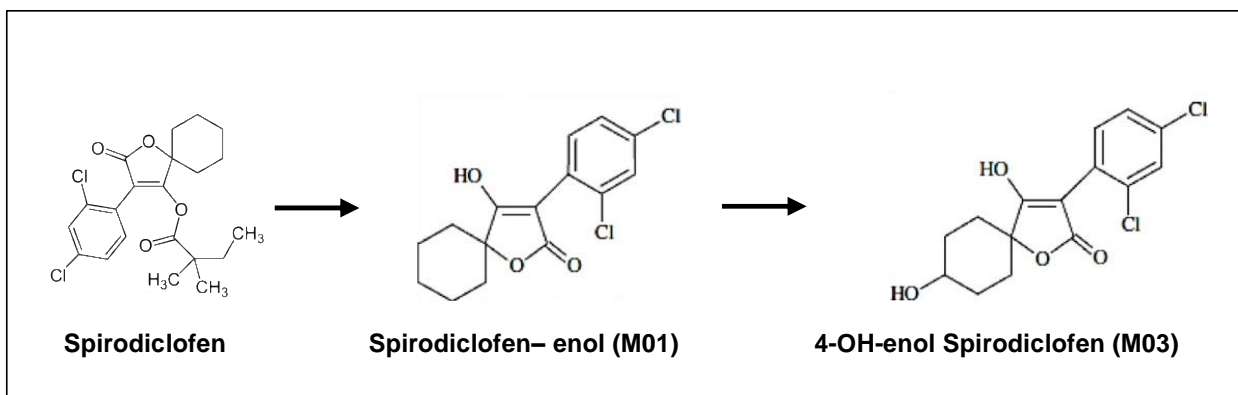


Figura 6. Estructura química de los principales compuestos metabólicos de Envidor® 240SC (Spirodiclofen) en cabras (modificada de Sverdrup, 2011).

En plantas el metabolismo de Spirodiclofen se ha seguido en cultivos de manzanas, uvas, naranjas y limones (FAO, 2014). En los cuales se identificaron los siguientes metabolitos secundarios: Spirodiclofen, Spirodiclofen-enol (M01), 3-OH-spirodiclofen enol (M02), 4-OH-spirodiclofen enol (M03), 3,4- OH-spirodiclofen-enol, 3,4-OH-spirodiclofen-enol, ácido 2,4-dicloro-mandélico (M06), ácido 2,4-dicloro-mandélico glucosilciclohexilo éster (M07), glucósido del ácido 4-dicloro-mandélico (M08), ácido 2,4-diclorobenzoico, una mezcla 60:40 de los glucósidos spirodiclofen-enol-2 y enol-4, y glucurónido de hidroxispirodiclofen-enol. Se identificó como residuo predominante a M05 en cultivos de naranjas, limones y uvas, y el metabolito M08 en manzanas y uvas (Fig. 7) (FAO, 2014).

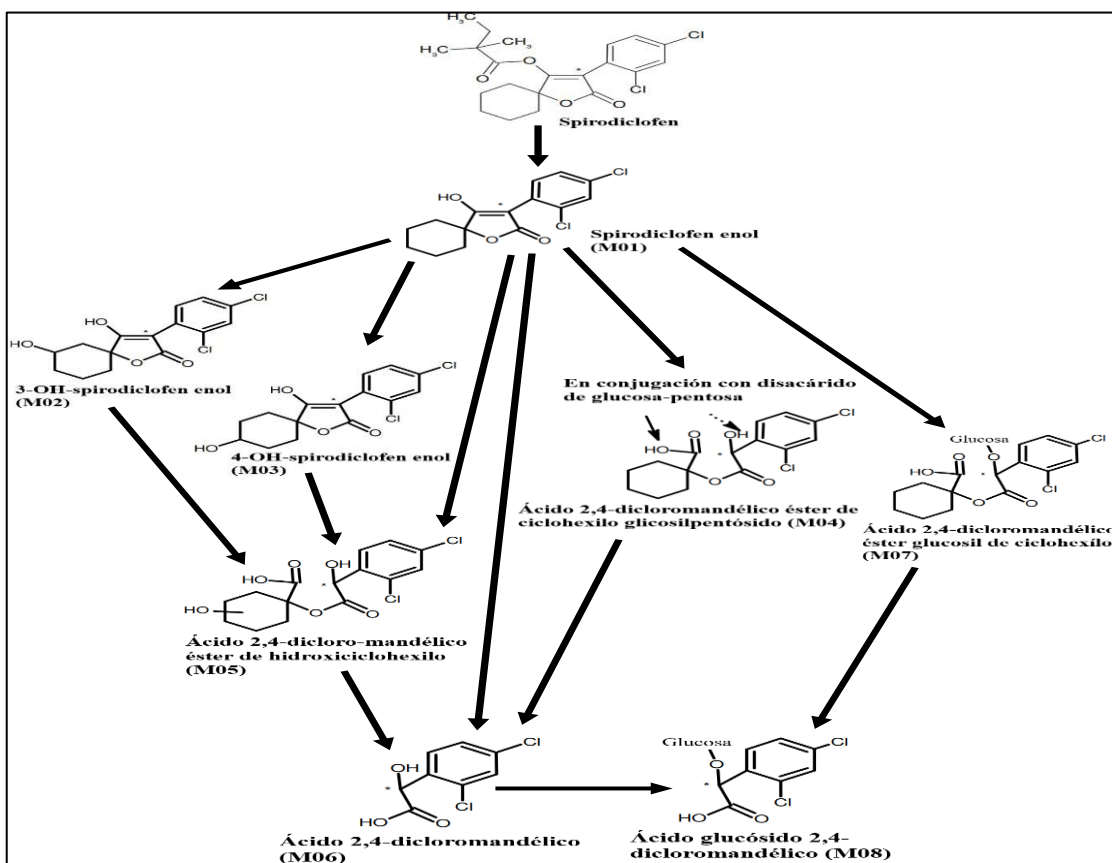


Figura 7. Principales rutas metabólicas de Envidor® 240SC (Spirodiclofen) en plantas (FAO, 2014).

2.1.3 Movento® 240SC (Spirotetramat)

Movento® 240SC es un insecticida foliar sistémico derivado del ácido tetrámico, contiene como ingrediente activo Spirotetramat su nombre y estructura química es (cis-3-(2,5-dimetilfenil)-8-metoxi-2-oxo-1-azaespiro-dec-3-en-4-il-etilcarbonato). Es de color blanco a beige, de olor débil y su log Kow = 2.5 (pH = 7). La vida media de Spirotetramat en suelo es de 0.10-0.30 días, hidrolizándose totalmente. La adsorción a las partículas del suelo se considera como moderada, por lo que la capacidad de contaminar agua subterránea es reducida (Nauen *et al.*, 2008). Los principales parámetros relacionados con la retención de Spirotetramat en el suelo son temperaturas elevadas, valores de pH relativamente elevados, bajo contenido de ácidos húmicos, así como la adición de algunos surfactantes (Sverdrup *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2018a). En el agua, la hidrólisis de Spirotetramat depende del pH y de la temperatura: a 25°C y pH = 4 la vida media es de 32.5 días, a pH = 7 es de 8.6 días y a pH = 9 es de 0.32 días, no obstante, cuando la temperatura disminuye, facilita su degradación. La fotólisis en agua también es un mecanismo importante para la disipación de Spirotetramat (Sverdrup *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2018b). En cuanto a la atmósfera, el compuesto tiene presión de vapor de 5.6×10^{-9} Pa a 20 °C, lo que indica, que presenta baja volatilidad, por lo tanto, no se espera transferencia significativa a la atmósfera (Sverdrup *et al.*, 2012).

Movento® 240SC es el tercer miembro de la familia de los cetoenoles, comercializado en 2008 (Nauen *et al.*, 2008). Es un insecticida que actúa por ingestión e ingestión causando la muerte de los organismos dentro de los 2 a 10 días posteriores de su aplicación. Tiene la capacidad de penetrar los tejidos de la planta, hidrolizarse y moverse mediante el xilema y floema, otorgando protección a la raíz y las hojas que aparezcan después de la aplicación (Marcic *et al.*, 2011; Bretschneider *et al.*, 2012). Es aplicado a cultivos de solanáceas (chile, jitomate, papa y berenjena), cucurbitáceas (calabaza, melón, pepino y sandía) y crucíferas (brócoli, col y coliflor) (Marcic *et al.*, 2011; Bretschneider *et al.*, 2012). Este insecticida es más efectivo cuando ingresa por vía oral que por contacto directo (Nauen *et al.*, 2008). Es utilizado para el control de áfidos (*Aphis gossypii*, *Myzus persicae*), moscas blancas (*Bemisia tabaci*), psílidos (*Paratrioza cockerelli*) y cochinillas blancas (*Pseudococcus longispinus*), principalmente en los estadios juveniles o inmaduros, impide el crecimiento y la eliminación completa de su exoesqueleto,

además de alterar su movilidad. También afecta la fecundidad con disminución en el número de huevos depositados, la fertilidad con la factibilidad de huevos producidos y la viabilidad de los organismos, adicionalmente, genera la acumulación de huevos en las hembras, conllevando a su muerte (Nauen *et al.*, 2008; Kühnhold *et al.*, 2008; Marcic *et al.*, 2011).

En México es utilizado para el control de ectoparásitos en ganado caprino y bovino, fue registrado para su uso ante la Comisión Federal para la Protección de Riesgo Sanitario desde noviembre de 2010 hasta junio del 2015, sin embargo, no aparece en el Catálogo de Plaguicidas, ni se reportan los límites máximo de residuos (LMR), recomendaciones o condiciones de uso (COFEPRIS, 2009). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) publicó en 2011 los LMR en diferentes vegetales y frutas (EPA, 2011) así como, la Autoridad Australiana de Pesticidas y Medicamentos Veterinarios (APVM, por sus siglas en inglés) han dado recomendaciones de uso para este agroquímico (APVMA, 2015; EPA, 2017). En 2019, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) actualizó los LMR para frutas como: piña (0.30 ppm) cítricos (0.60 ppm), chiles (2 ppm) y chile seco (15 ppm) (EFSA, 2012).

2.1.3.1 Rutas de Exposición de Movento® 240SC (Spirotetramat)

Movento® 240SC puede entrar en contacto con los seres humanos u otros organismos por inhalación, absorción cutánea (del 1 al 10 % del producto aplicado) o ingesta, por medio de alimentos contaminados con residuos del plaguicida (Sverdrup, 2012; Bayer, 2021). Las estimaciones realizadas de exposición de los operadores no superan los 0.05 mg/Kg/día. Una vez que ingresa al organismo, se distribuye mediante la sangre, presentando alta afinidad por el hígado y los riñones. Se metaboliza completamente a su principal metabolito: spirotetramat-enol. La principal vía de eliminación es la orina, mientras que la vía fecal contribuye con un 2—11 %. La excreción de los compuestos es casi completa, por lo que, la acumulación de Spirotetramat es poco probable, pero no se descarta que a concentraciones elevadas pueda bioacumularse en los organismos (Sverdrup, 2012).

2.1.3.2 Metabolismo de Movento® 240SC (Spirotetramat) en animales y plantas

Estudios realizados en el pulgón del algodón (*Aphis gossypii*), han propuesto que las enzimas de la familia del citocromo P450, específicamente de la isoforma CYP6A2, están implicadas en la desintoxicación metabólica de Movento® 240SC (Spirotetramat) (Peng *et al.*, 2016). Se ha identificado que la principal ruta de excreción es vía urinaria y sus principales metabolitos secundarios son los isómeros: spirotetramat-desmetil-enol y spirotetramat-cetohidroxi (Fig. 6). No se ha detectado el compuesto original en orina o bilis, pero si en heces (APVMA, 2009; Zhu *et al.*, 2013).

El metabolismo en animales se estudió en ratas hembra y macho, las cuales fueron expuestas por vía oral a diferentes dosis de Movento® 240SC (una única dosis de 2 o 100 mg/Kg peso corporal o dosis repetidas de 2 mg/Kg peso corporal durante 14 días. En todos los casos, la tasa de absorción fue entre 89 y 98 % (APVMA, 2009; Zhu *et al.*, 2013). El hígado y el riñón son los principales órganos blanco de Movento® 240SC. En las hembras la principal vía metabólica es la escisión del grupo éster del compuesto original (Spirotetramat) que resulta en la formación de spirotetramat-enol como metabolito primario (M01) (53 — 87 % de la dosis) a partir del cual se derivan los otros metabolitos secundarios: spirotetramat-desmetil-enol (M02) y spirotetramat-cetohidroxi (M03), spirotetramat-monohidroxi (M04) (Fig. 8) (APVMA, 2009; Zhu *et al.*, 2013). En ratas macho, el metabolismo de spirotetramat es mayor (25 —37 %) en comparación con las hembras (5 — 10 %). La eliminación de Spirotetramat ocurre principalmente a través de la orina (89 — 98 %) a partir de las 24 h (APVM, 2009).

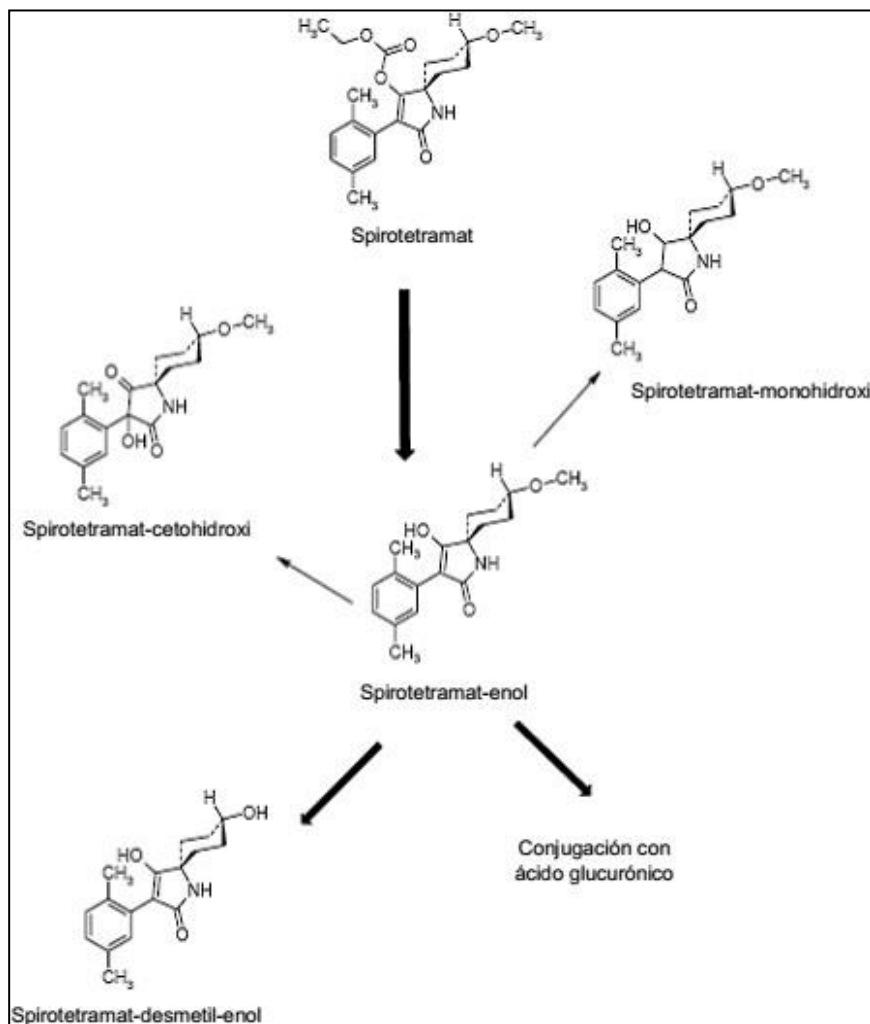


Figura 8. Estructura química de los principales compuestos metabólicos de Movento® 240SC (Spirotetramat) en ratas (Modificado de APVMA, 2009).

El metabolismo de Movento® 240SC en plantas se ha seguido en cultivos de: manzanas, lechuga, algodón, papas y espinacas. Se aplicaron foliarmente 576, 167, 264, 308 y 201.6 g i.a/ha, respectivamente; lo que representa 2.5, 1.8, 1.1 y 2 veces la dosis recomendada para su uso en manzana, lechuga, algodón, papas y espinacas (Salazar *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016). En general, la hidrólisis es la reacción que predomina para la degradación del compuesto, dando paso a la formación de spirotetramat-enol, el cual se hidroxila formando spirotetramat-enol-cetohidroxi o conjugados con glucosa, para producir spirotetramat-enol-glucosidado (Fig. 9). A pesar de que se utilizaron dosis más altas que las recomendadas, los niveles de residuos cuantificados no rebasaron

los LMR establecidos por la EPA (2011). Los cultivos con las concentraciones más altas de residuos fueron las hojas de los manzanos, de las plantas de papas, lechugas, así como en la manzana, la papa y la semilla de algodón (Tabla VI) (APVMA, 2009; Salazar *et al.*, 2016).

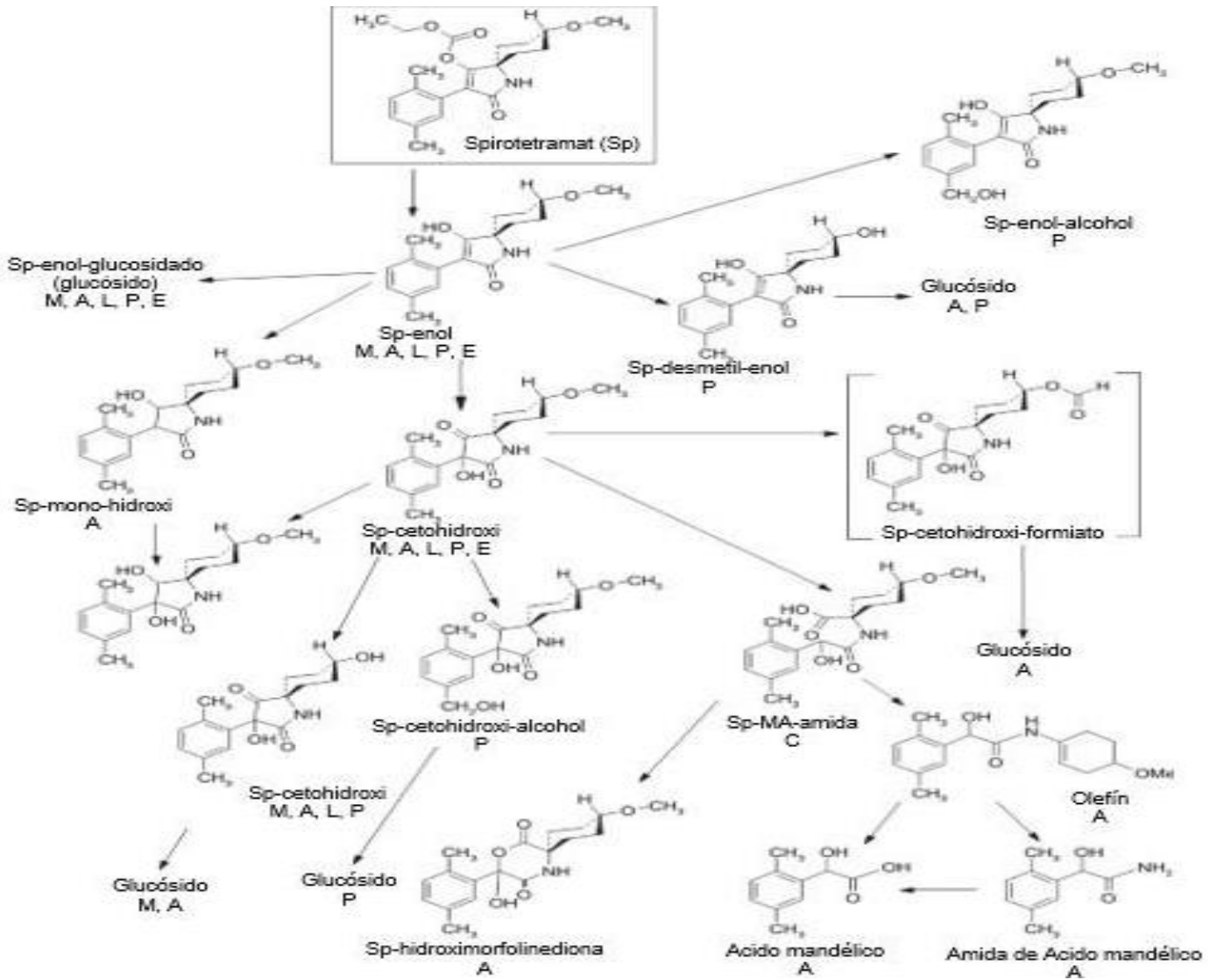


Figura 9. Metabolismo de Movento® 240SC en plantas. Sp: Spirotetramat, M: Manzanas, A: Algodón, L:Lechuga, P: Papas. (Modificado de Sur, 2008; Chen *et al.*, 2016).

Tabla VI. Niveles de metabolitos de Spirotetramat (Movento® 240SC) en diferentes cultivos.

Compuesto (mg/Kg)	Manzana (fruto)	Manzana (hojas)	Lechuga	Algodón (semilla)	Papa (tubérculo)	Papa (hoja)	Espinaca (hoja)	Espinaca (tallo)	Espinaca (raíz)
Spirotetramat	0.32	26.37	1.75	< 0.001		5.455			
Spirotetramat-enol	0.01	4.26	0.56	0.047	0.168	0.870	0.0423- 0.1043	0.0062- 0.0115	0.0030- 0.0336
Spirotetramat-enol- glucosidado	0.03		0.36	0.004	0.006	0.395	< 0.0021	0.0025- 0.0075	
Spirotetramat-enol- cetohidroxi	0.05	1.09	0.20	0.011	0.018	2.745	0.0054- 0.0748		
Spirotetramat-mono- hidroxi	0.10								
Residuos totales	0.61	36.63	3.13	0.119	0.225	11.057			
LMR ^a	0.7	NP	8	0.3	1.6	NP	NP	NP	NP

^a: Límite Máximo de residuos.

EPA(2011).NP: No publicado

Modificado de Salazar *et al.* (2016)), Sur (2008) y Chen *et al.* (2016).

2.1.4 Efectos tóxicos de los insecticidas Movento® 240SC y Envidor® 240SC

Debido a su novedoso mecanismo de acción y que no presentan resistencia cruzada con otros insecticidas, los cetoenoles están sustituyendo a los plaguicidas organoclorados, piretroides y organofosforados (Bayer, 2021). En 2013, los agroquímicos cetoenoles tenían un valor en el mercado de 456 millones de dólares (Sparks y Nauen, 2015) y en 2015 representaban el 3 % de los insecticidas que se vendían con valor de más de 500 millones de dólares (Nauen *et al.*, 2019). Se ha reportado que entre 2014 y 2020 las ganancias se incrementaron un 4.4 % cada año hasta alcanzar los 233.1 millones de dólares, además, es posible que en los próximos años sean de los insecticidas más utilizados en Medio Oriente, África y América Latina (Transparency, 2019). Por lo que ha incrementado la preocupación por analizar sus posibles efectos tóxicos en organismo no blanco y las repercusiones ambientales. Recientemente se han detectado residuos de Spirotetramat y Spirodiclofen en sedimentos de ríos, suelo, y algunos vegetales y frutas comestibles (Tabla VII).

Tabla VII. Niveles de residuos de Spirodiclofen y Spirotetramat detectados en el ambiente.

Compuesto	Medio	Referencias
Spirodiclofen	Cítricos 0.060 ± 0.020 mg/Kg Cáscara de cítricos 0.307 ± 0.069 mg/Kg Cítricos (Yuzu) 0.11-1.89 μ g/g Té de Yuzu 0.13-0.29 μ g/g Sedimentos de río 0.0881 μ g/g	Lee <i>et al.</i> , 2012; Sun <i>et al.</i> , 2013; Babić <i>et al.</i> , 2018.
Spirotetramat	Mango 0.0327-0.483 mg/kg Pepinos, manzanas y jitomates <0.08 μ g/Kg Pimienta 0.08-0.12 mg/Kg Sedimentos de río 1.750 μ g/g	Mohapatra <i>et al.</i> , 2012; Zhu <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2016; Babić <i>et al.</i> , 2018.

Sin embargo, debido a su reciente aparición en el mercado, pocos son los estudios que se han realizado sobre los insecticidas cetoenoles sobre organismos modelos, en los cuales se ha indicado su capacidad para afectar la fertilidad de organismos no blanco, inducir efectos

tóxicos en órganos sexuales, estrés oxidante, apoptosis y su potencial como agentes teratogénicos y genotóxicos (Tabla VIII).

Spirodiclofen (Envidor® 240SC) inhibe la actividad de la malato deshidrogenasa, disminuye los reductores equivalentes requeridos por varias monooxigenasas involucradas en la esteroidogénesis, cuyo efecto reduce la producción de hormonas (FAO, 2008). En ratas la exposición a Spirodiclofen y sus metabolitos; spirodiclofen 3-OH y spirodiclofen 4-OH impiden la síntesis de progesterona y testosterona (CalEPA, 2006). En mamíferos induce hipertrofia de células de Leydig, vacuolización, degeneración e hiperplasia de células intersticiales (Yoshida *et al.*, 2015; FAO, 2019); toxicidad en hígado, tiroides, yeyuno y timo (FAO, 2019) por lo que está catalogado como posible agente carcinogénico por La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2009). Además, produce alteraciones durante el desarrollo embrionario de embriones de pez cebra (*Danio rerio*) (Zhang *et al.*, 2019) y daño en ADN en meristemas de *Allium cepa* (Çavuşoğlu *et al.*, 2021).

Spirotetramat (Movento® 240SC) decrece la tasa de eclosión y causa alteraciones en la coordinación en el nado de larvas y juveniles del bagre africano *Clarias gariepinus* (Agbohessi *et al.*, 2013). También provoca estrés oxidante, peroxidación lipídica y alteraciones en la movilidad de larvas del anfibio *Bufo bufo gargarinzans* (Yin *et al.*, 2014). De igual forma, produce estrés oxidante, lipoperoxidación y daño en el ADN de celomocitos de lombrices de tierra *Eisenia fetida* (Zhang *et al.*, 2015). Otros estudios han indicado que el insecticida comercial Movento reduce el peso ovárico, afecta la ovogénesis y la expresión de los genes Fox01 y Vnn1 en células granulosa de ratones hembra BALB/c (Kafshgiri *et al.*, 2016). Inhibe el crecimiento y la reproducción normales de la pulga de agua *Daphnia magna* (Chen *et al.*, 2018c). Decrementa la tasa de oviposición e induce la feminización de la población del crustáceo *Cyclops abyssorum* (Houssou *et al.*, 2018). Este compuesto también provoca cambios bioquímicos, histopatológicos y fisiológicos en los ovarios del pez cebra adulto (*Danio rerio*) (Wu *et al.*, 2018). En embriones de pez cebra actúa como un agente teratogénico (Zhang *et al.*, 2019), y como disruptor endócrino (Zhang *et al.*, 2020b). Además, interviene con el metabolismo lipídico y produce lesiones en mitocondria (Zhang *et al.*, 2020c). Recientemente reportamos que Movento® 240SC (Spirotetramat) y Envidor®

240SC (Spirodiclofen) inducen daño al ADN en células ováricas de *Drosophila melanogaster* (González-Marín *et al.*, 2021, 2023).

Tabla VIII. Efectos tóxicos de los insecticidas cetenoles Movento® 240SC (Spirotetramat) y Envidor® 240SC (Spirodiclofen) en organismos modelo.

	Organismo modelo	Tratamiento	Efecto	Referencia
Movento® 240SC (Spirotetramat)	bagre <i>Clarias gariepinus</i>	2.5, 5, 10, 20, 30 ppm 48 h	Reduce al 50 % la tasa de eclosión de los embriones, la coordinación y movilidad de los juveniles.	Agbohessi <i>et al.</i> , 2013.
	sapo <i>Bufo bufo</i> <i>gargarinzas</i>	0.65, 3.23 mg/L 30 días	Causa estrés oxidante, peroxidación lipídica, alteraciones en el nado y coordinación.	Yin <i>et al.</i> , 2014.
	nematodo <i>Eseinia fetida</i>	1.25, 2.5 mg/Kg 14, 21, 28 días	Provoca estrés oxidante, lipoperoxidación y daño en el ADN.	Zhang <i>et al.</i> , 2015.
	ratón <i>Mus musculus</i>	25, 50, 100 mg/Kg 21 días	Afecta la expresión de los genes Fox01 y Vnn1, induce apoptosis en células de la granulosa, afecta la ovogénesis y reduce el peso ovárico.	Kafshgiri <i>et al.</i> , 2016.
	pulga de agua <i>Daphnia magna</i>	4.7 mg/L 21d	Disminuye la tasa de reproducción.	Chen <i>et al.</i> , 2018c.
	copépodo <i>Cyclops abyssorum</i>	50 mg/L 48 h	Decrementa la tasa de oviposición e induce la feminización de la población.	Houssou <i>et al.</i> , 2018.
	pez cebra <i>Danio rerio</i>	360, 720 µg/L 28 días	Induce alteraciones morfofisiológicas en ovario, estrés oxidante y lipoperoxidación.	Wu <i>et al.</i> , 2018.
		0.75, 1.50, 3.00 mg/L 8 días	Actúa como agente teratogénico y disruptor endocrino.	Zhang <i>et al.</i> , 2019, 2020b, 2020c.
	100, 500, 1000 µg/L 4 días	Interviene con el metabolismo lipídico, con la expresión de la Caspasa 3 y 9 e induce lesiones mitocondriales.		

	mosca de la fruta <i>Drosophila melanogaster</i>	11.2, 22.4 y 37.3 mg/L 72 h	Genera daño en el ADN de células ováricas.	González-Marín <i>et al.</i> , 2021.
Envidor® 240SC (Spirodiclofen)	rata	No disponible	Inhíbe de la síntesis de progesterona y testosterona.	CalEPA, 2006.
	<i>Rattus norvegicus</i>	2.9 mg/Kg	Produce adenocarcinoma uterino;	Sverdrup, 2011.
	perro <i>Canis lupus familiaris</i>	84.7 mg/Kg	adenocarcinoma en hígado, tiroides, yeyuno, timo, testículos y útero.	Sverdrup, 2011.
	ratón <i>Mus musculus</i>	4 mg/Kg 56 días		
	rata <i>Rattus norvegicus</i>	No disponible	Ocasiona hiperplasia en células testiculares.	Yoshida <i>et al.</i> , 2015.
	pez cebra <i>Danio rerio</i>	0.15, 0.21 mg/L 8 días	Afecta el desarrollo embrionario y el metabolismo lipídico.	Zhang <i>et al.</i> , 2019.
	bulbos de cebolla <i>Allium cepa</i>	20 mg/L 72 h	Causa estrés oxidante, peroxidación lipídica y daño al ADN.	Çavuşoğlu <i>et al.</i> , 2021.
	mosca de la fruta <i>Drosophila melanogaster</i>	12.3, 24.6 y 41.1 mg/L 72 h	Fragmenta el ADN de células ováricas.	González-Marín <i>et al.</i> , 2021.

Continuación Tabla VIII. Efectos tóxicos de los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC (Spirotetramat) y Envidor® 240SC (Spirodiclofen) en organismos modelo.

2.2 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Estudios genéticos de susceptibilidad en poblaciones humanas expuestas a contaminantes ambientales son un desafío debido a la diversidad de síntomas clínicos y la dificultad para determinar cuáles son por exposición directa. Los organismos modelos y bioensayos *in vitro* con líneas celulares son utilizados para evaluar los efectos de sustancias tóxicas (O'Brien, 2014), organismos como el pez cebra (*Danio rerio*) empleado para evaluar los efectos de xenobióticos sobre el desarrollo embrionario (Dai *et al.*, 2014), los roedores para determinar los efectos fisiológicos de algunas toxinas (Farraj *et al.*, 2011; Chamanza y Wright, 2015) y, *Drosophila melanogaster* un organismo modelo adecuado para los estudios genómicos a gran escala que permite la identificación de genes y proteínas implicados en mecanismos de respuesta y variación de la resistencia a diferentes agentes tóxicos (Mackay *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014).

Drosophila se introdujo como un organismo modelo en el siglo XX para estudiar enfermedades humanas y como herramienta para entender procesos celulares básicos (Chintapalli *et al.*, 2007; Ugur *et al.*, 2016; Verheyen, 2022). Actualmente es empleada para investigar la toxicidad de fármacos (Rothenfluh Heberlein, 2002; Pandey y Nichols, 2011; Sharma *et al.*, 2012; Abolaji *et al.*, 2015), enfermedades como: distrofia muscular (Potikanond *et al.*, 2018), diabetes (Inoue *et al.*, 2018), cáncer (Potter *et al.*, 2000; Villegas, 2019), nutrigenómica (Baenas y Wagner, 2019), enfermedades neurodegenerativas (Fortini y Bonini, 2000; Bolus *et al.*, 2020) entre otros.

Uno de los avances más importantes respecto a *Drosophila* se produjo a inicios del siglo XXI, cuando la secuencia completa de su genoma fue publicada (Adams *et al.*, 2000). De esta manera, se estableció que cada gen de *Drosophila* está representado normalmente por cuatro homólogos en vertebrados. Por lo tanto, la redundancia genética es relativamente rara en moscas, pero muy frecuente en modelos como el ratón (Roote y Prokop, 2013). Además, la comparación entre los genomas de *Drosophila* y del ser humano revelaron que aproximadamente el 75 % de los loci involucrados en enfermedades humanas tienen un homólogo en *Drosophila* consolidando su legitimidad como un organismo modelo para la

investigación biomédica (Berkeley Drosophila Genome Project, 1999; Banfi *et al.*, 1996; Fortini *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2000; Reiter *et al.*, 2001; Chien *et al.*, 2002; Chintapalli *et al.*, 2007; Bellen *et al.*, 2010; Prokop, 2017). También se ha establecido que la mayoría de los mecanismos biológicos fundamentales y las vías de señalización que controlan el desarrollo y la supervivencia se conservan a través de la evolución entre las especies (Yamaguchi y Yoshida, 2018). Las principales ventajas de *Drosophila* como organismo modelo son el corto periodo generacional en el cual se obtiene abundante descendencia, su mantenimiento es sencillo y de bajo costo, en espacios pequeños es posible mantener una gran cantidad de organismos (Adams *et al.*, 2000; Prokop, 2017). Además de la disponibilidad de técnicas y herramientas moleculares para su análisis, ha permitido consolidar a *Drosophila* como organismo modelo en los estudios de múltiples disciplinas. Otra de las grandes ventajas se basa en la facilidad para introducir y combinar mutaciones en su genoma. De esta forma, el fenotipo mutante permite inferir la posible función del gen durante diversos procesos (Adams *et al.*, 2000).

2.2.1 Mutagénesis en *Drosophila melanogaster*

Durante un siglo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se ha utilizado como un poderoso organismo modelo para la investigación biológica (Arias, 2008; Bellen *et al.*, 2010). Durante los últimos 50 años, la genética de moscas se ha aplicado de manera sistemática y exitosa para descifrar los mecanismos principales de numerosos procesos biológicos incluyendo la regulación del ciclo celular, mecanismos de respuesta y reparación del ADN, por mencionar algunos (Bellen *et al.*, 2010; Roote y Prokop, 2013; Sekelsky, 2017), e incluso aspectos moleculares de enfermedades humanas como el cáncer (Potter *et al.*, 2000; Bier, 2005; Villegas, 2019). Las herramientas y reglas genéticas clásicas todavía tienen un lugar fundamental en la investigación actual sobre *Drosophila*.

Además, la genética de la mosca ha revolucionado aún más con el advenimiento de la biología molecular, la secuenciación del genoma de la mosca, el descubrimiento de elementos transponibles como vehículo de transgénesis, sistemas de expresión génica dirigida, la generación sistemática de deleciones, inserciones de elementos transponibles y

transgénicos, las construcciones “knock-down” que cubren prácticamente todos los genes de *Drosophila*, así como la aplicación de recombinasas o nucleasas específicas para realizar ingeniería genómica (Venken y Bellen, 2005; Tolwinski, 2017). La vida diaria en un laboratorio de moscas requiere realizar cruzas genéticas clásicas. En estas cruzas, se utilizan moscas mutantes o genéticamente modificadas (transgénicas). Estas diferentes variantes de moscas proporcionan las herramientas mediante las cuales los genes se manipulan o visualizan en acción para investigar su función. El arte de la genética de *Drosophila* es utilizar estas herramientas, no solo en forma aislada sino a menudo combinadas en las mismas moscas (Prokop, 2017).

2.2.2 Descripción general de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, también conocida como la mosca de la fruta, es una especie perteneciente a la familia Drosophilidae (O'Grady y Markow, 2009). Presenta un número cromosómico reducido ($2n = 8$), tiene tres pares de cromosomas autosómicos y un par sexual (Rodríguez-Arnaiz, 2003). Es un insecto, cosmopolita, que al igual que otros de su clase presenta tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen; mostrando, asimismo, un par de alas funcionales y un segundo par, llamados halterios o balancines que le permite mantener el equilibrio, tres pares de patas y un par de antenas, las moscas adultas del fenotipo silvestre tienen ojos rojos y un cuerpo amarillo o marrón (Roote y Prokop, 2013; Prokop, 2017).

Los adultos presentan dimorfismo sexual, las hembras son ligeramente de mayor tamaño comparado con los machos, carecen de la fusión de los segmentos del abdomen el cual presenta una terminación puntiaguda con la placa genital en posición dorsoventral (Prokop, 2017). Los machos en comparación tienen una fusión de segmentos en la parte terminal del abdomen con fuerte melanización, terminación redondeada y posición ventral de la placa genital; además de la presencia de peines sexuales que son una serie de cerdas cortas de color negro en el primer par de patas (Fig. 9) (Demerec y Kaufmann, 2005).

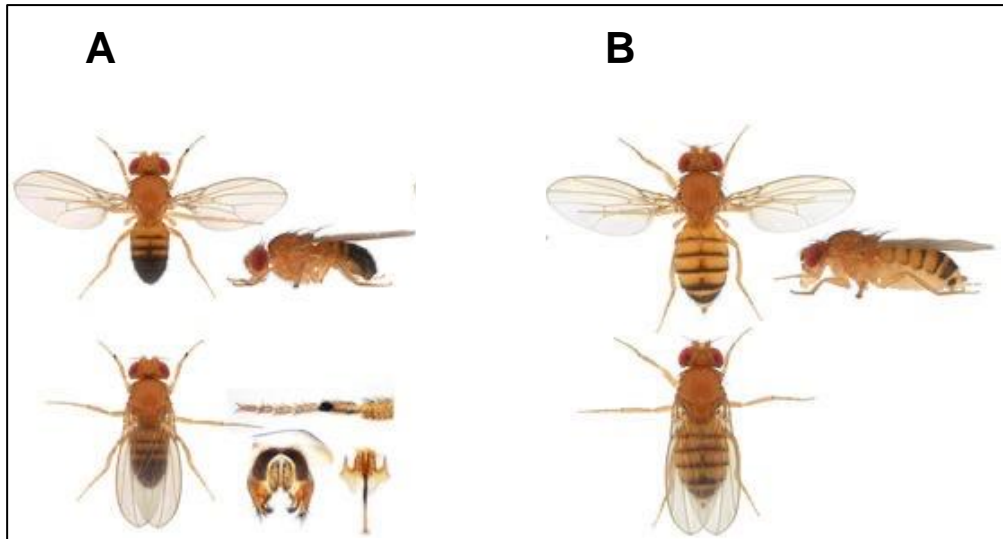


Figura 9. Vista dorsal y lateral de macho y hembra de *Drosophila melanogaster*. A) Macho, con fusión de los segmentos terminales del abdomen, peines sexuales y placa genital. B) Hembra, abdomen sin pigmentación y terminación puntiaguda (modificado de Prokop, 2017).

2.2.3 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Drosophila es un insecto holometábolo lo cual significa que pasa por una metamorfosis completa que incluye cuatro estadios de desarrollo; huevo, larva, pupa y adulto o imago. Tiene un ciclo de vida en el laboratorio de alrededor de 9 a 10 días cuando se cría en un medio nutritivo y a temperatura constante de 25 °C (Campos y Hartenstein, 1985). El ciclo inicia con la fecundación del huevo y el posterior desarrollo del embrión (embriogénesis) que dura aproximadamente de 18 a 24 h. A continuación, inicia el estadio larvario, el cual es la etapa principal de alimentación y consta de 3 estadios (L1, L2, L3) que duran en conjunto aproximadamente 4 días. Transcurrido este tiempo, la larva deja de alimentarse entra al estadio de pupa y comienza el proceso de metamorfosis. Esta etapa dura aproximadamente 3 días, al cabo de los cuales emerge una mosca adulta o imago que alcanza la madurez sexual a las 3 h para los machos y a las 7 h para las hembras (Fig. 10) (Prokop, 2017).

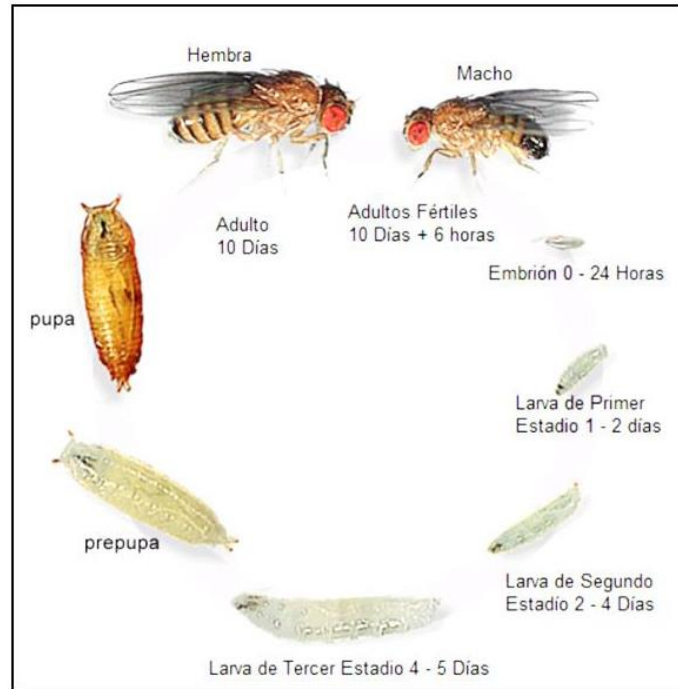


Figura 10. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. El ciclo de vida a 25 °C se completa en 10 días, conformado por cuatro estadios; huevo, larva (con tres instares), pupa y adulto (tomado de Prokop, 2017).

2.2.4 Sistema reproductor de las hembras

Drosophila melanogaster, posee un sistema reproductor femenino situado en la región ventral media posterior del abdomen, se encuentra constituido por dos ovarios y dos oviductos laterales conectados a un oviducto común que desemboca en el útero, el cual se comunica con la vagina, que se abre al exterior a través de la vulva, situada entre los gonópodos constituyendo un ovipositor contráctil. En la cámara genital o vagina desembocan, además, un receptáculo seminal, un par de espermatecas y dos glándulas accesorias (Fig. 11) (Decotto y Spradling, 2005).

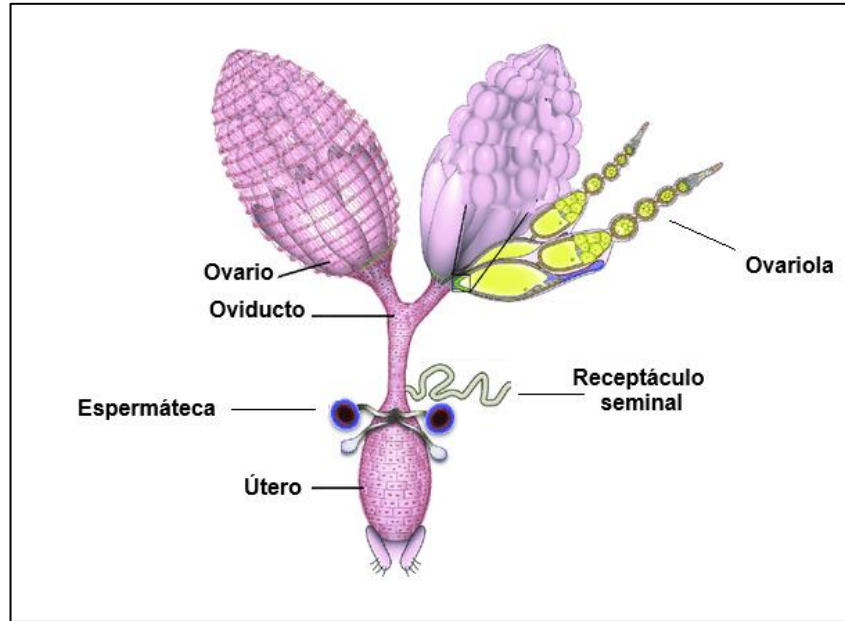


Figura 11. Sistema reproductor de *Drosophila melanogaster*. Constituido por dos ovarios (integrado por un conjunto de 16 ovariolas y huevos maduros), dos oviductos laterales, un oviducto central, útero, vulva, ovipositor y estructuras accesorias; receptáculo seminal, espermateca y glándulas accesorias (Swevers *et al.*, 2005).

El ovario está constituido por 10 a 16 unidades independientes denominadas ovariolas, lugar donde ocurre la ovogénesis, las ovariolas son una secuencia de cámaras progresivas en desarrollo del ovocito (Henderson, 2004). Cada ovariola se encuentra dividida en tres regiones principales (Fig. 12), anteroposterior con relación al útero en: filamento terminal, germario y vitelario. El filamento terminal consiste en una fila de 8 a 9 células que conectan al germario con la envoltura circundante de la ovariola y determinan la orientación de su desarrollo (Decotto y Spradling, 2005). El germario es el sitio de residencia de las células madre del linaje germinal (**GSCs**) (por sus siglas en inglés **Germline Stem Cells**) y somático (**SSCs**) (**Somatic Stem Cells**). El vitelario es donde ocurre el proceso de vitelogénesis y coriogénesis (Uryu *et al.*, 2005).

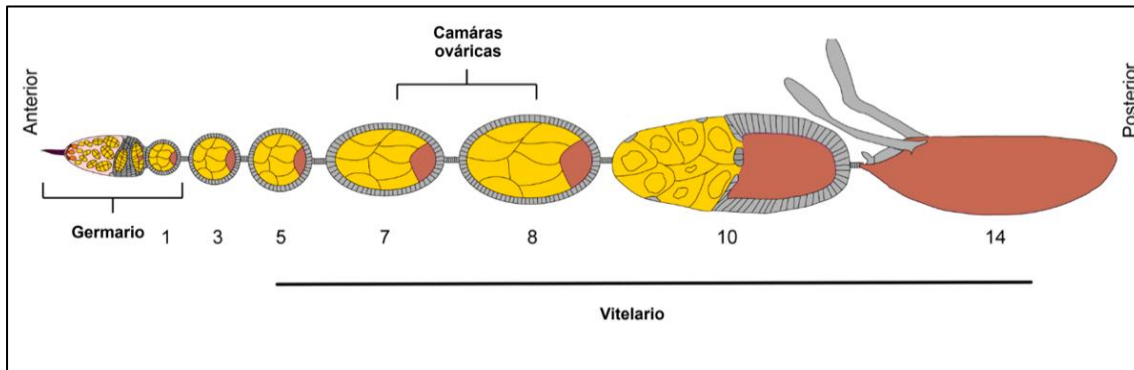


Figura 12. Imagen esquemática de la ovariola y sus componentes. Anteroposterior filamento terminal (FT), germario y vitelario (Imagen modificada de Uryu *et al.*, 2005).

2.2.5 Anatomía del germario de *Drosophila melanogaster*

El germario para su estudio se ha dividido en cuatro regiones 1, 2a, 2b y 3 (Fig. 13). En la región 1, se localizan las células madre germinales GSCs ancladas a las **células de la caperuza** (CCs, Cap Cells), que entran en contacto con las células del **filamento terminal** (TF, Terminal Filament) que en conjunto con las CCs conforman a las células apicales, además de las CCs y TF las GSCs están en contacto con un tipo de células madre somáticas denominadas **células madre acompañantes** (ESC, Escort Stem Cells), estos tres grupos de células proporcionan un nicho o microambiente para las células madre germinales, para lograr un equilibrio regulado entre la auto-renovación y la diferenciación de las GSCs, esto se logra tanto por una serie de moléculas de señalización secretadas como por conexiones adhesivas directas entre las células madre y sus componentes de nicho (Hsu y Drummond, 2011). En la región 2a, inicia la meiosis y ocurre el desarrollo y división del quiste germinal que se origina a partir de la división asimétrica de una GSC, este quiste continuará dividiéndose y recubriéndose por las Ecs células acompañantes (células hijas de las ESCs) para su correcto desarrollo hasta ubicarse en la región 2b. En la región 2b se localizan otro tipo de células madre somáticas, las **células madre foliculares** (FSCs, Follicular Stem Cells), las cuales darán origen a las células precursoras foliculares que posteriormente constituirán las células foliculares FCs que comenzarán a cubrir al quiste germinal con una monocapa de células para que éste finalmente quede completamente aislado formando así la primera cámara ovárica que pueda iniciar su desarrollo en la región 3, el cual es también el primer

estadio de la ovogénesis E1 al cual le precede el segundo estadio E2 y así sucesivamente hasta concluir la ovogénesis en el estadio E14 (Hsu y Drummond, 2011).

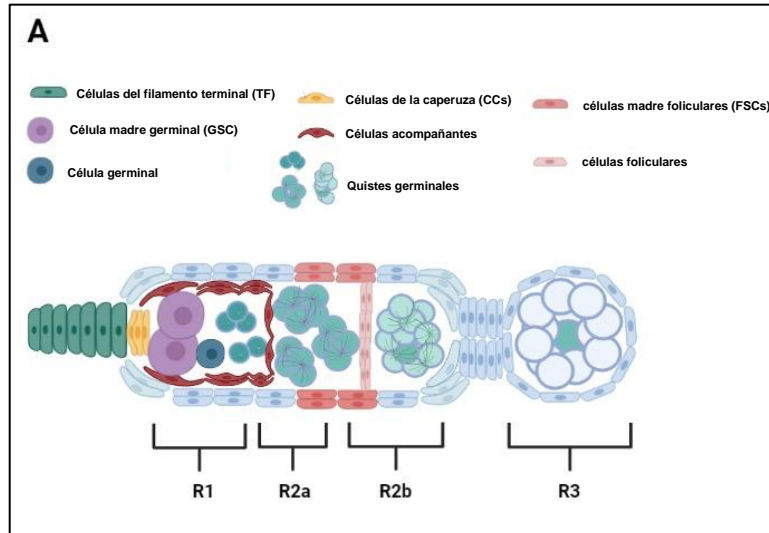


Figura 13. Anatomía del germario en *Drosophila melanogaster*. Región 1. Células del filamento terminal (TF), células de la caperuza (CCs), células madre acompañantes (GSCs) y células madre germinales (GSC). Región 2a: quiste germinales en desarrollo, borde entre las regiones 2a y 2b: células madre foliculares (FSCs). Región 2b; quiste germinales rodeado por células foliculares (FCs). Región 3; primera cámara ovárica (primer estadio de ovogénesis), constituida por células nodrizas y el ovocito rodeado por células foliculares (González-Marín *et al.*, 2023).

2.2.6 Ovogénesis en *Drosophila melanogaster*

El proceso de ovogénesis inicia en el germario, proceso que se encuentra dividido arbitrariamente, con base en criterios morfológicos en 14 estadios que van desde el estadio 1 (E1) al estadio 14 (E14) (Hsu y Drummond, 2011). La ovogénesis que lleva a cabo *Drosophila melanogaster* es de tipo meroística politrófica, en este tipo de ovogénesis las células formadas por la ovogonia mantienen entre ellas conexiones citoplasmáticas mediante la formación de canales anulares (Hsu y Drummond, 2011).

El proceso de ovogénesis inicia en la región 1 del germario con la división asimétrica de una GSC (Fig. 13), una de las dos células resultantes permanecerá anclada al nicho auto-renovándose como GSC, la otra hija se dividirá cuatro veces consecutivas para dar lugar a un quiste germinales compuesto de 16 células y permanecerán conectadas a través de canales anulares, resultado de una citocinesis incompleta (Bastock y St Johnston, 2008). Las células

germinales GSC contienen una estructura citoplasmática esférica llamada espectrosoma, que contiene componentes del citoesqueleto de la submembrana. En la primera división de una GSC, el espectrosoma es heredado por una de las dos células hijas, que dará origen al quiste germinal, cuando las 16 células de los quistes germinales se dividen por mitosis, dentro de éstas, se forma una estructura ramificada derivada del espectrosoma, llamada fusoma, que se construye asimétricamente. Esta estructura siempre crece desde el huso de una de las primeras células de la primera división y atraviesa los canales anulares de las células (Bastock y St Johnston, 2008).

El fusoma controla la orientación de las divisiones, provocando que el quiste contenga 8 células con un anillo, 4 células con dos anillos, 2 células con cuatro anillos y 2 células con tres anillos. La célula que contenga la mayor cantidad de fusoma durante la primera división, será la que se convertirá en el ovocito (Tootle y Spradling, 2008). Al entrar a la región 2a del germario el quiste germinal es envuelto por células acompañantes **Ecs** (*Escort Cells*), cuya función es proporcionar un microambiente adecuado en su diferenciación. En su paso de la región 2a a la 2b del germario, el quiste germinal pierde su unión con las Ecs, una monocapa de células foliculares FCs comenzarán a envolver y rodear al quiste germinal, formando la primera cámara ovárica que le proporciona un microambiente necesario para el desarrollo del ovocito. En el momento en que el quiste ha sido rodeado por células foliculares, los marcadores de destino celular y de emparejamiento de cromosomas meióticos se restringen a la célula que se convertirá en el ovocito que iniciará la meiosis (Tootle y Spradling, 2008).

La meiosis inicia en la región 2a del germario, lugar donde pueden ser visualizados ovocitos que se encuentran en la fase de paquiteno lo que indica que los DBS meióticos se inducen en esta región y son reparados antes de la región 3 (Jang *et al.*, 2003; Staeva-Vieira *et al.*, 2003; Gorski *et al.*, 2004). La meiosis avanza hasta ser arrestada en la profase I, en el estadio 5 de la ovogénesis. En el estadio 13, se reanuda la meiosis y progresa hasta metafase I para detenerse en el estadio 14 y se mantiene así hasta la activación del ovocito (Von-Stetina y Orr-Weaver, 2011). La activación ocurre como consecuencia de presiones mecánicas que tiene el ovocito durante su paso por el oviducto y no como en el caso de los mamíferos donde la activación depende de la fertilización (Tootle y Spradling, 2008; Hsu y Drummond, 2011).

Las 15 células restantes del quiste germinal se diferenciarán en células nodrizas con capacidad endoreplicadora (mitosis incompletas). Este tipo de células presentan un metabolismo muy activo con el objetivo de sintetizar principalmente ARNs, tanto ribosómicos como mensajeros y proteínas que se transportarán hacia el ovocito. Como consecuencia de la endoreplicación se forman células con núcleos gigantes y con presencia de 512 ejemplares cromosómicos (de Cuevas *et al.*, 1996).

La formación de la primera cámara ovárica concluirá en la región 3 del germario, constituyendo el primer estadio de la ovogénesis (Fig. 13). Una vez que esta cámara sale del germario, comenzará a aumentar de volumen antes de que inicie el proceso de vitelogénesis (acumulación de proteínas en el ovocito). Durante el estadio 2 al 7, el citoplasma aumentará considerablemente de tamaño tanto en el ovocito como las células nodrizas (Tootle y Spradling, 2008; Hsu y Drummond, 2011). Las células foliculares continuarán dividiéndose para conservar una monocapa que recubra a la cámara ovárica debido a que ésta comenzará a aumentar de tamaño. En el estadio 7, las células foliculares dejarán de dividirse siendo un total de 1000 células que rodearán finalmente a la cámara ovárica (Hsu y Drummond, 2011).

En el estadio 8, se llevará acabo el inicio del proceso de vitelogénesis que concluirá en la etapa 12 de la ovogénesis. Las células foliculares producirán proteínas vitelinas que serán absorbidas por el ovocito. En la etapa 9, un grupo de 6 a 10 células polares del epitelio folicular que reciben el nombre de células del borde, migran de la parte anterior de la cámara ovárica a la parte anterior del ovocito (Tootle y Spradling, 2008). En la etapa 10a, con una gran cantidad de nutrientes acumulados el ovocito comenzará a aumentar de tamaño ocupando la mitad del volumen de la cámara ovárica (Hudson y Cooley, 2014). Posteriormente, en la etapa 10b, en presencia de prostaglandina, las células nodrizas se prepararán para llevar a cabo la transferencia de su citoplasma al ovocito, que concluirá en la etapa 11, produciendo filamentos de actina unipolares, que servirán como una red para evitar que los núcleos de las células nodrizas bloqueen los canales de actina o pasen al ovocito (Huelsmann *et al.*, 2013).

Después de transferir su citoplasma al ovocito, las células nodrizas morirán por apoptosis (Jenkins *et al.*, 2013). Las células foliculares que se localizan en las partes dorsal y ventral de la cámara comenzarán a migrar de forma centrípeta para cubrir al ovocito y separarlo de

las células nodrizas (Hudson y Cooley, 2014). Las células del borde posteriormente formarán el micrópilo, estructura que asegura la entrada del espermatozoide para la fertilización del ovocito (Silver *et al.*, 2005).

Una vez concluida la etapa de vitelogénesis, iniciará el proceso de coriogénesis, en el cual ocurrirá la formación del corión, una estructura que cubrirá y dará protección al ovocito maduro. Las células foliculares sintetizarán la proteína coriónica desde el estadio 1, la cual dejará de sintetizarse hasta el estadio 14, cuando el huevo este completo y listo para ser ovipositado por la hembra (Tootle y Spradling, 2008; Hsu y Drummond, 2011).

2.2.7 *Drosophila* como organismo modelo en estudios de reprotoxicidad

Drosophila melanogaster tiene una alta homología anatómica en órganos con funciones equivalentes a la de los mamíferos, incluidos el cerebro, el sistema nervioso periférico, el corazón, el sistema de tráquea (similar al pulmón), el esófago, los túbulos de Malpighi (similares a los riñones), intestino y gónadas (Ugur *et al.*, 2016). En el ovario de *D. melanogaster* se puede estudiar el ciclo celular, los mecanismos de respuesta y reparación de daño al ADN, la muerte celular, diferenciación y desarrollo de las células madre (Velentzas *et al.*, 2015), por lo que, la ovogénesis es una valiosa herramienta para elucidar una amplia gama de procesos morfológicos, bioquímicos y genéticos (Horne-Badovinac y Bilder, 2005; Bilder y Haigo, 2012). Por su corto período generacional y abundante descendencia que se obtiene de *Drosophila melanogaster*, este organismo se ha usado en pruebas de reprotoxicidad, para obtener información acerca de los impactos en el aparato reproductor de hembras y machos por las similitudes que presentan con los mamíferos (Tiwari *et al.*, 2011), así como de las implicaciones transgeneracionales a largo plazo originados por estresores ambientales (Roote y Prokop, 2013).

Una variedad de estudios se ha enfocado en evaluar las alteraciones bioquímicas, morfológicas e histológicas en testículos y ovarios de *Drosophila melanogaster* y el desarrollo de su progenie cuando éstas son expuestas a contaminantes ambientales,

especialmente a plaguicidas (Nazir *et al.*, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2007; Avanesian *et al.*, 2009).

Un estudio conducido por Nazir *et al.* (2001) evidencia reducción del 100 % en la tasa de eclosión de embriones ovipositados por hembras de *Drosophila* expuestas a 3000 ppm de clorpirifos durante 24 h. La cipermetina decrece 30 % de la tasa de fertilidad de hembras expuestas durante estadios larvarios a 0.02 ppm por 30 minutos (Mukhopadhyay *et al.*, 2006). Vogel *et al.* (2015) reportan disminución en las tasas de fertilidad y apareamiento de machos expuestos a 2, 20 ppb y 2, 20 ppm de azatrina por 7 días. La administración de 10, 20, 40, 80, 100 µg/mL de fluoruro sódico en hembras expuestas por 24 h, causa alteraciones en la morfología de los ovarios de (Khatun *et al.*, 2017). La exposición de atrazina (20 mg/L) y el bisphenol (10 mg/L) por 96 h en hembras de *Drosophila* adultas disminuyen el tamaño de los ovarios, el número de ovocitos maduros, las tasas de fecundidad y fertilidad (Vimal *et al.*, 2019).

Las concentraciones de 2, 4, 8 y 16 µg/mL del insecticida tiametoxam en hembras de *Drosophila* adultas durante 24 h disminuye las tasas de fecundidad, fertilidad y de eclosión embrionaria (Li *et al.*, 2020). En larvas expuestas a 6 µg/mL de acefato presentan en etapa adulta alteraciones en la estructura de los testículos y en la viabilidad de células germinales (Mandi *et al.*, 2020). Estadios de pupa expuestas con 21.45 y 39 µg/pupa de tiametoxan en el adulto, reducen los niveles totales de carbohidratos y glucógeno en el ovario y las tasas de fecundidad y fertilidad (Kissoum *et al.*, 2020). El tratamiento con 0.5, 1.0, y 2.0 g/L del glifosfato durante 7 días acota el tamaño de los ovarios de hembras de *Drosophila* (Muller *et al.*, 2021).

2.2.8 Estudios toxicológicos realizados en *Drosophila*

Drosophila melanogaster ha sido utilizada en diferentes investigaciones toxicológicas para determinar los posibles riesgos y consecuencias de los contaminantes en organismos no blanco. El Centro Europeo para la Validación de Modelos Alternativos (CEVMA) ha recomendado el uso de *Drosophila* como organismo modelo en estudios de toxicidad (Sharma *et al.*, 2012 Abolaji *et al.*, 2015). Recientemente, ha surgido el término

Drosophotoxicología (“Drosophotoxicology”) por la implementación de *Drosophila melanogaster* en toxicología en diferentes estadios (embrión, larvas, pupas y adultos) (Affleck y Walker, 2019), para evaluar los contaminantes ambientales (de Santana *et al.*, 2018), como el mercurio (González-Marín, 2018), plomo (Hirsch *et al.*, 2003), arsénico (Ortiz *et al.*, 2009), nanopartículas de metales (Alaraby *et al.*, 2019) y plaguicidas (Castañeda-Sortibrán *et al.*, 2019; González-Marín *et al.*, 2021; González-Marín *et al.*, 2023).

La administración de 100, 120, 140, 160, 180 y 200 µg/m del insecticida fluorado criolita durante 10 días, incrementa la duración de los estadios de larvas a pupa y reduce el tamaño de las larvas y la tasa de sobrevivencia (Podder y Roy, 2014). El insecticida diclorvos a las concentraciones de 0.15, 1.5 y 15.0 ng/ml durante 48 h induce aumento en la producción de ERO, en el contenido de MDA, de la actividad de SOD y CAT y daño en el ADN en células intestinales de moscas adultas (Mishra *et al.*, 2014). El tratamiento con 2, 20 ppb y 2, 20 ppm de atrazina durante 5 días prolonga el tiempo de desarrollo de larvas a pupas reduciendo las tasas de eclosión y sobrevivencia (Marcus y Fiumera, 2016). La exposición a 25, 30, y 40 mM de paraquat durante 8 días, aumenta la producción de MDA, desciende el contenido de GSH y ocasiona deterioro locomotor y neurodegeneración en machos (Nivedhita *et al.*, 2017).

Larvas alimentadas con 1 µl/larva de azadiractina durante 24 h, presentan retraso en el desarrollo de larvas y pupas, reducción en la tasa de supervivencia y malformaciones congénitas (Ferdenache *et al.*, 2019). Las concentraciones de 0.22, 1.12, 2.24, 11.2 y 22.4 % de la mezcla del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y picloram utilizados como herbicida, disminuye la tasa de sobrevivencia, afecta el desarrollo y locomoción de larvas de *Drosophila* (Leão *et al.*, 2019). Larvas expuestas a 6.75 µg/mL del insecticida tiametoxam durante 24 h, desciende la tasa de eclosión, provoca retraso en el desarrollo, alteraciones en el desarrollo ocular y daño al ADN en larvas de *Drosophila* (Li *et al.*, 2020). Young *et al.* (2020) reportan que larvas expuestas a 0.04, 0.08, 0.12 y 0.2 ppm del insecticida imidacloprid durante la fase larvaria modifica la actividad locomotora, el comportamiento de cortejo y apareamiento de los adultos. La flubendiamida a 0.001, 0.01, 0.1 y 1 mM durante 24, 48 y 96 h disminuye significativamente la actividad locomotora e induce

fragmentación del ADN de las larvas de *Drosophila* (Ciğerci *et al.*, 2023).

2.2.9 Daño en el ADN en *Drosophila melanogaster*

Se ha demostrado que *Drosophila* es un excelente organismo modelo para descifrar de respuestas daño del ADN, la detención del ciclo celular, la reparación del ADN, la senescencia y la apoptosis (Sekelsky, 2017). En respuesta a agentes que dañan el ADN las células activan vías DDR por sus siglas en inglés que consiste en un conjunto de proteínas conservadas evolutivamente que funcionan como sensores, transductores y efectores ante el estrés genotóxico (Marechal y Zou, 2013). En *Drosophila*, las lesiones en el ADN son detectadas mediante sensores como el complejo proteico MRN. Estas proteínas activan las quinasas ATM (ataxia-telangiectasia mutada o **fusión de telómero** en *Drosophila* (Tefu)) y ATR (relacionada con ATM y Rad3 o **meiótica-41** en *Drosophila* (Mei41)) (Marechal y Zou, 2013) que responden ante la inducción de DBS y SSB, respectivamente (Khan *et al.*, 2019). ATM/Tefu y ATR/Mei-41 activados fosforilan una serie de sustratos, como las quinasas posteriores Chk1/Grapes (Grp) y Chk2/Mnk, que regulan la detención del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis (Brodsky *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2004).

Un número considerable de mutantes deficientes en genes implicados en la respuesta y reparación de daño al ADN se han generado en *Drosophila* (Laurençon *et al.*, 2003; Hernando *et al.*, 2004; Laroque *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2009). Y se han empleado en la evaluación del potencial genotóxico y mutagénico de diversos compuestos químicos incluidos los plaguicidas (Siddique *et al.*, 2005, 2008; Li *et al.*, 2015).

2.2.10 Vía ATM/ATR en *Drosophila*

2.2.10.1 Tefu (*telomere fusion*)

En *Drosophila melanogaster* ATM es codificado por el gen *telomere fusion (tefu)* fue reconocido por primera vez por su papel esencial en el mantenimiento de los telómeros (Queiroz-Machado *et al.*, 2001). Está ubicado en el brazo derecho del tercer cromosoma, codifica para una proteína de 2767 aminoácidos. Tefu contiene un dominio quinasa relacionado con PI(3)K ubicado en la región C-terminal, así como dos regiones que flanquean este dominio catalítico, denominadas FAT y FATC (Bi *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004). También, contiene en su región N-terminal múltiples secuencias HEAT repetidas (originalmente llamadas así por su presencia en Huntingtina, factor de elongación 3, subunidad reguladora alfa de la proteína fosfatasa 2A y TOR1) que se pliegan en grandes estructuras helicoidales que se cree, actúan como andamios para el ensamblaje macromolecular de grandes complejos de proteínas implicadas en la reparación del daño (Oikemus *et al.*, 2004).

Estudios estructurales realizados en *Drosophila* sugieren que cuando se produce una DBS, los dominios FAT y FATC experimentan cambios conformacionales que alteran la estructura de tefu, lo que le permite el acoplamiento y reconocimiento del daño en el ADN (Bi *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que el dominio FATC interactúa con la proteína Tip60, histona acetiltransferasa que también participa en la activación de tefu (Sekelsky *et al.*, 2000b). La activación de tefu conlleva al reclutamiento de proteínas implicadas en la reparación del daño al ADN y detención del ciclo celular principal pero no exclusivamente en las fases G1/S a través de una cascada de fosforilación que involucra a la variante de la histona γ H2AX (en mamíferos) y γ H2AV (en *Drosophila*), la quinasa loki (en *Drosophila*) y Chk2 (en mamíferos) y el supresor tumoral p53 (Shiloh, 2003; Song *et al.*, 2004).

2.2.10.2 Mei-41 (*meiotic 41*)

Meiotic 41 (mei-41) es el ortólogo de *Drosophila* de la quinasa ATR (mamíferos), conocido por regular los puntos de control del ciclo celular dependientes del daño de cadena sencilla del ADN y horquillas de replicación estancadas (Hari *et al.*, 1995, Sekelsky *et al.*, 1998). Mei-41 está localizado en el cromosoma X de *Drosophila* y codifica para una proteína de 2517 aminoácidos. Al igual que ATR, Mei-41 es una serin/treonin proteína quinasa que activa la señalización de puntos de control sobre daño genotóxico como la radiación ionizante (IR), la luz ultravioleta (UV) o el estancamiento de la replicación del ADN, actuando, así como un sensor de daño al ADN. Su sustrato mejor caracterizado es *grappes* (en *Drosophila*) y Chk1 (en mamíferos) lo que inhibe colectivamente la replicación y la mitosis promoviendo la reparación y recombinación (McKim *et al.*, 2000; Brady *et al.*, 2018).

2.2.10.3 Grp (*grappes*)

El homólogo de Chk1 en *Drosophila* es *grappes (grp)* se identificó como un gen de efecto materno necesario para la progresión normal del ciclo celular durante las divisiones nucleares que preceden a la celularización en el embrión. EL gen *grp* está localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 2 y codifica para una proteína de 512 aminoácidos (Takada *et al.*, 2007). Es una serin/treonin-proteína quinasa que se requiere para la detención del ciclo celular mediado por puntos de control y la activación de la reparación del ADN en respuesta a la presencia de daño al ADN o ADN no duplicado. También puede regular negativamente la progresión del ciclo celular durante los ciclos celulares no perturbados. Además, de fosforilar a la fosfatasa CDC25, promoviendo su degradación, lo que resulta en el aumento de la fosforilación inhibidora de tirosina de los complejos de Cdk1-ciclina y consiguientemente el bloqueo de la progresión del ciclo celular (Bartek *et al.*, 2001; Su, 2006; Antoni *et al.*, 2007; Klattenhoff *et al.*, 2007).

2.2.10.4 Loki (*localized ovarian kinase*)

Al igual que los vertebrados, el homólogo de *Drosophila* Chk2/loki es uno de los sustratos mejor caracterizados de tefu/ATM. Loki o lok (*localized ovarian kinase*) se encuentra localizado en el brazo izquierdo del segundo cromosoma, codifica para una proteína de 52 kDa de 459 aminoácidos. La activación de lok/Chk2 depende de su fosforilación en el residuo (Thr 68) dependiente de tefu/ATM, una vez activa loki/Chk2 fosforila diversos sustratos, incluyendo Cdc25, E2F1, p53, BRCA1, PP2A, HuR, FOXO1 y Tau, afectando una amplia gama de procesos celulares, incluidos los puntos de control del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis (Bartek *et al.*, 2001; Masrouha *et al.*, 2003; Dozier *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Pommier *et al.*, 2006; Abdelmohsen *et al.*, 2007; Antoni *et al.*, 2007; Iijima-Ando *et al.*, 2010).

2.2.10.5 Dp53

Drosophila melanogaster tiene un solo miembro de la familia p53 en comparación con los tres miembros de los mamíferos (p53, p63 y p73), lo que ha facilitado su estudio (Brodsky *et al.*, 2000; Ollmann *et al.*, 2000). Dp53 está localizado en el brazo derecho del cromosoma 3 y codifica para una proteína de 495 aminoácidos. Esta proteína al igual que en mamíferos está implicada en la respuesta ante el daño al ADN y es regulada a través de las quinasas tefu/loki (ATM-Chk2), al igual que por mei-41/grp (ATR/Chk1), la activación de p53 ante la respuesta al daño al ADN, provoca la detención del ciclo celular y la apoptosis celular (Brodsky *et al.*, 2000; Ollmann *et al.*, 2000; Sekelsky *et al.*, 2000b; Derry *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 2001).

2.3 Histona 2 γ H2AX

La proteína H2AX es un miembro de la familia de la histona H2A, una de las cinco familias de las histonas que empaquetan y organizan el ADN eucariota en la cromatina. La subunidad básica de la cromatina, el nucleosoma, consiste en un núcleo de ocho proteínas, dos de cada una de las familias de H2A, H2B, H3 y H4, que son rodeadas con aproximadamente 147pb

de ADN y una quinta histona de la familia H1. Esta última actúa como un puente enlazador de ADN entre los nucleosomas.

La variante H2AX constituye del 10-15 % del total de las variantes de H2A y difiere de H2A debido a que contiene una región extendida en su dominio C-terminal (Bartova *et al.*, 2008). La proteína γ H2AX se localiza en la cromatina que flanquea rompimientos de doble cadena, provocando la movilización de las proteínas de señalización que llevan a cabo la reparación del daño hacia ese sitio (Watters *et al.*, 2009). En este sentido, la modificación a la cromatina más importante en respuesta a DSB (Rogakou *et al.*, 1998) o a horquillas de replicación estancadas es la fosforilación de la variante de la histona H2AX, en un residuo de serina conservado cercano al extremo C-terminal de la molécula (Ser-139), generando así a la variante γ H2AX en mamíferos y en *D. melanogaster* γ H2AV (Rogakou *et al.*, 1998, 1999; Madigan *et al.*, 2002; Cowell *et al.*, 2007).

La fosforilación de γ H2AX no se limita al sitio donde ocurrió la lesión, sino que se expande bidireccionalmente en una región extensa de cromatina a su alrededor (1 — 2 Mb de cromatina conteniendo ~2000 moléculas de γ H2AX) (Rogakou *et al.*, 1998; Rogakou *et al.*, 1999), no siendo la expansión necesariamente simétrica en torno a la lesión. Esto permite que estas regiones puedan ser inmunodetectadas en forma específica como “foci” (sitios) de γ H2AX microscópicamente visibles (\varnothing ~ 0.4 — 1.0 μ m) empleando microscopía de fluorescencia (Hatkevich *et al.*, 2021). La modificación de H2AX en respuesta a la inducción de daño es un mecanismo evolutivamente conservado desde levaduras a seres humanos. Se ha evidenciado que, aunque la presencia de γ H2AX no es requerida para el reconocimiento inicial del daño, es crítica para un reclutamiento eficiente y/o la retención de factores de reparación (Downs *et al.*, 2004). La fosforilación de H2AX a γ H2AX en los sitios de lesión es mediada por ATM, ATR y DNA-PK. Se ha postulado que ATM es la principal quinasa implicada en la fosforilación de H2AX durante DSB, mientras que ATR y DNA-PK juegan un rol secundario (Burma *et al.*, 2001).

La activación de γ H2AX inicia cuando el complejo MRN recluta ATM hacia los extremos de ADN rotos mediante múltiples interacciones directas proteína-proteína, que contribuyen además con su activación (Lee y Paull, 2005). En lo que respecta a ADN-PK, la holoenzima

se forma luego del reclutamiento de la subunidad catalítica de ADN-PK (DNA-PKcs) por parte del heterodímero Ku70/Ku80, componente importante del sistema de reparación NHEJ (Falck *et al.*, 2005). En cualquier caso, la fosforilación de γ H2AX facilita el reclutamiento y ensamblado en los foci, proteínas de señalamiento del daño, control del ciclo celular y reparación del ADN. En contraposición, en los lugares de horquillas de replicación estancadas, la fosforilación de H2AX es mediada por ATR (Ward y Chen, 2001). ATR es activada por las regiones de ssADN asociadas a bloqueos de la replicación, a través de su reclutamiento vía ATRIP (Cortez *et al.*, 2001). Finalmente, luego de la reparación del daño, la subunidad catalítica de PP2A inicia el proceso de desfosforilación de γ H2AX, lo que promueve su remplazo por nuevas moléculas de H2AX no fosforiladas (Svetlova *et al.*, 2007), de esta manera las modificaciones de histonas y los cambios en la cromatina inducidos durante el proceso de reparación son revertidos (Chowdhury *et al.*, 2005).

2.3.1 Histona 2 γ -H2AV en *Drosophila*

Drosophila proporciona un modelo para estudiar la función de las variantes de histonas H2A en mamíferos, debido a que contiene sólo una variante H2A, (H2AV) (van Daal *et al.*, 1988, van Daal y Elgin, 1992). La caracterización inicial de la variante H2AV reveló que al igual que H2AX, la región C-terminal se fosforila en respuesta a roturas de la doble cadena de ADN (Madigan *et al.*, 2002), similar a mamíferos, la fosforilación de H2AV a γ H2AV en los sitios de lesión es mediada por Tefu/ATM, Mei 41/ATR y DNA-PK. La activación de γ -H2AV también es dependiente del complejo MRN que se encarga del reclutamiento de Tefu hacia los extremos de ADN rotos mediante múltiples interacciones directas proteína-proteína. Por lo que Tefu es la principal quinasa implicada en la fosforilación de H2AV ante la presencia de DSB, mientras que Mei 41/ATR y DNA-PK juegan un rol secundario (Burma *et al.*, 2001).

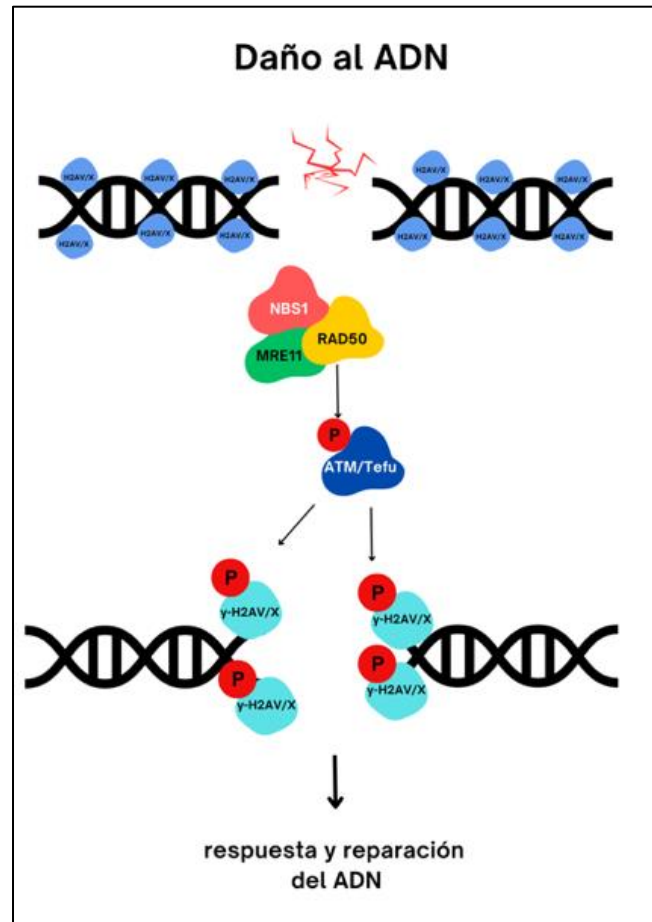


Figura 14. Reclutamiento de proteínas ante la respuesta del daño al ADN. El complejo MRN detecta los DSBs y median en el reclutamiento de ATM/Tefu, que consecuentemente fosforila a H2AV/X. La fosforilación de γ -H2AV/X conlleva al reclutamiento de proteínas asociadas con la respuesta y reparación de daño al ADN en el sitio (González-Marín, 2022).

2.3.2 Detección y visualización de γ H2AX

La fosforilación de H2AX a γ H2AX se expande una distancia considerable (rango en Mb) alrededor de la lesión, lo cual, ha permitido visualizar espacialmente las DSB como “foci” (sitios) discretos en núcleos interfásicos o cromosomas mitóticos mediante anticuerpos específicos marcados con fluoróforos que reconocen el residuo fosforilado de γ H2AX. Esta aproximación es altamente sensible, permitiendo detectar DSB incluso cuando existen pocas lesiones en el ADN (Costes *et al.*, 2010). Mediante la toma de imágenes por microscopía láser confocal y el uso de programas de procesamiento de imágenes (como el FIJI o ImageJ)

puede determinarse, por ejemplo, el número de foci de γ H2AX y o su colocación y distribución en tamaño e intensidad de fluorescencia para determinar su expresión de manera indirecta, así como su correlación espacial con otras proteínas (Dewey *et al.*, 2020). Esta metodología ha complementado los métodos fisicoquímicos tradicionales de cuantificación de DSB basados en la reducción en el tamaño de las moléculas de ADN asociado al daño, como la electroforesis en gel de células individuales (ensayo cometa) o la electroforesis en gel de campo pulsado (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE) (Rothkamm y Löbrich, 2003). Por estos motivos, la detección y cuantificación de γ H2AX por inmunofluorescencia se ha convertido en el procedimiento estándar para evaluar la inducción y reparación de DSB, generadas tanto directa como indirectamente (Hatkevich *et al.*, 2021).

2.4 Ensayo cometa alcalino

El ensayo cometa o SCGE, es un método ampliamente utilizado para estudiar daño al ADN en células eucariotas, específicamente rompimientos de cadena doble (DSB) y sencilla (SSB) en el ADN, sitios de reparación retardada, así como sitios álcali-lábiles (ALS), ocasionados por exposición a xenobióticos (Tice *et al.*, 2000). Ha sido aplicado en seres humanos y organismos modelo como los roedores, pez cebra (Calderón-Segura *et al.*, 2015, 2018) y la mosca de la fruta (Tiwari *et al.*, 2011). El ensayo cometa fue introducido en 1984 por Östling y Johanson, y se caracterizó por una lisis y electroforesis neutra (pH = 7) que solamente permitía visualizar roturas de doble cadena. Posteriormente, Singh *et al.* (1988) introdujeron la versión alcalina, modificando el pH de la lisis (pH~10) y electroforesis (pH>13), lo que permitió un mejor desenrollamiento del ADN, el incremento en la movilidad y visualización de los fragmentos de ADN originados por DSB, SSB y ALS (Singh *et al.*, 1988).

Según Tice *et al.* (2000), los parámetros que se utilizan en el ensayo cometa son:

Longitud de la cauda (“Tail length”): mide la migración del ADN. Está relacionada con los tamaños de fragmentos del ADN y será proporcional al nivel de SSB y DSB. Este parámetro mide la distancia desde el perímetro de la cabeza del cometa, hasta la última señal visible de la cauda y se expresa en unidades absolutas (μ m o pixeles). La

desventaja que presenta es que se ha evidenciado que, a dosis altas de exposición, la longitud de la cauda no aumenta, pero se sigue saturando de fragmentos de ADN (Møller *et al.*, 2014).

- a) Intensidad de la cauda (“Tail intensity or Tail DNA %”): Se calcula con base en la proporción entre la intensidad de luz emitida por la cola y la intensidad total del cometa (cabeza y cauda), indicando la cantidad de ADN presente en la cauda. Facilita la interpretación del daño genético, al establecer valores relativos porcentuales (0 a 100 %) que conceptualizan mejor la idea del daño, este parámetro ha sido empleado frecuentemente en estudios de monitoreo biológico (Zuñiga, 2009).
- b) Momento de la cauda (“Tail momento”): el Tail moment es una referencia de la medida de la longitud de la cauda multiplicado por la cantidad de ADN en la misma. Mientras que, el “Olive tail momento” (OTM) es el producto de la intensidad de la cauda y la distancia desde el centro de masa de la cabeza y de la cola. Los centros de masa son el punto que deja la mitad de la intensidad a la derecha y la otra a la izquierda. Se expresa en micrómetros o porcentaje y se considera útil para describir la heterogeneidad dentro de una población celular, debido a que se pueden detectar variaciones en la distribución de ADN dentro de la cauda (Olive *et al.*, 1990).

Aunque el momento de la cauda es el mejor parámetro para evaluar el daño al ADN resulta difícil que sea utilizado para comparaciones entre laboratorios (Rosenberger *et al.*, 2011), debido a que los centros de masa dependen de las condiciones de electroforesis (por ejemplo: el tiempo de electroforesis), de los algoritmos utilizados por los softwares para su definición y de la calibración de los equipos (Collins *et al.*, 2008). Bajo estas consideraciones y además de que tiene un comportamiento lineal con la dosis, se ha sugerido el uso de la intensidad de la cauda como medida estadística para evaluar el daño al ADN (Ceschi-Bertoli *et al.*, 2020).

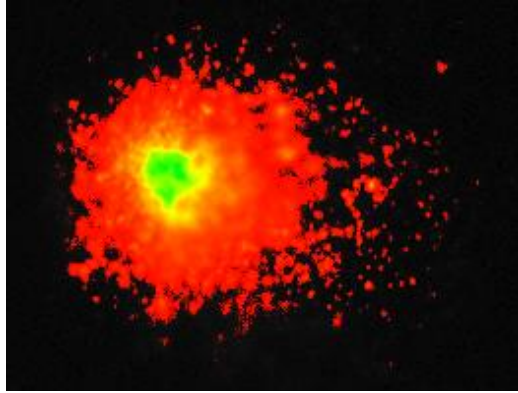


Figura 15. Ejemplo de un cometa (núcleo con fragmentación del ADN). Célula ovárica de *Drosophila melanogaster* (González-Marín *et al.*, 2021).

Dentro de las ventajas que ofrece el ensayo cometa alcalino, se encuentran su gran capacidad de detectar daño a bajas concentraciones de exposición al xenobiótico, el uso de un tamaño pequeño de muestra, la rápida realización del estudio, el análisis de datos a nivel de células individuales que permite observar respuestas mixtas de las células en la población y un costo relativamente bajo (Tice *et al.*, 2000; Zeljezic y Garaj-Vrhovac, 2001).

Desde su introducción, el ensayo cometa ha sido utilizado en ensayos *in vitro* e *in vivo*, pero en los últimos años, se ha implementado en *Drosophila melanogaster* para evaluar la genotoxicidad de compuestos químicos (González-Marín *et al.*, 2021). También, es un método aplicado en plantas, organismos terrestres y acuáticos, para evaluar riesgo ambiental (Calderón-Segura, 2015; Ku-Centurión *et al.*, 2016).

III JUSTIFICACIÓN

Los plaguicidas son compuestos químicos sintéticos utilizados en campos agrícolas y forestales como herbicidas, fungicidas e insecticidas, destinados para prevenir, controlar y erradicar vectores de enfermedades en cultivos, animales y seres humanos. Contaminan suelos, mantos acuíferos y la atmósfera, además, son tóxicos para múltiples organismos, incluyendo a los seres humanos (Valdéz-Salas *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2018).

Actualmente, la población mexicana está expuesta a diversas fuentes de contaminación, pero una de las más dañinas es la exposición a plaguicidas, esta puede ser a través del consumo de agua y alimentos contaminados con residuos de agroquímicos, sus metabolitos o ambos, que constituyen factores de riesgo para la salud (Calderón-Segura *et al.*, 2015, 2018). Diversos agroquímicos han mostrado dañar el ADN tanto *in vivo* como *in vitro*, inducir estrés oxidante y alteraciones el sistema reproductor (González-Marín *et al.*, 2021; González-Marín *et al.*, 2023). Las modificaciones en la estructura del ADN pueden ser rompimientos de una o dos hebras del genoma, oxidación de sus bases entre otros (Carbajal-López *et al.*, 2016). No obstante, si el daño al ADN no es reparado, se modifica la integridad del genoma, lo cual es vital para la homeostasis y el funcionamiento celular (Bassil *et al.*, 2007; Calderón-Segura *et al.*, 2018).

En México, no hay estadísticas confiables sobre la cantidad total de intoxicaciones que se producen por plaguicidas, debido a que no se reportan y cuando se registran no se exige que se identifique el tipo de compuesto químico causante de la intoxicación (Carbajal-López *et al.*, 2016). Lamentablemente, en el ser humano las alteraciones se determinan cuando éstas ya han ocurrido, además, por razones éticas no es posible realizar experimentación en él, por ello, y con el fin de detectar daño en el genoma y su repercusión en el sistema reproductor por agroquímicos, se han desarrollado modelos biológicos tales como los roedores, pez cebra y la mosca de la fruta, los cuales han resultado ser organismos muy adecuados para aplicar diversos biomarcadores genotóxicos como el ensayo cometa alcalino y la fosforilación de la histona 2 γ H2AX mediante los cuales se detecta daño en el ADN (Sekelsky, 2017; Hatkevich *et al.*, 2021).

Drosophila se ha establecido como un excelente organismo recomendado por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) para investigación y pruebas en toxicología (Rajak *et al.*, 2018). Se ha utilizado para realizar estudios de reprotoxicidad (Mirzoyan *et al.*, 2019; Cohen *et al.*, 2021). Adicionalmente, el ovario de *Drosophila* ha funcionado como un sistema modelo para caracterizar los mecanismos de respuesta y reparación del daño al ADN, específicamente el germario, lugar de residencia de las células madre germinales (GSC) y sitio de división, diferenciación y formación del ovocito, y en el cual de forma programada se generan roturas de doble cadena (DBS), durante el proceso de recombinación meiótica (Hatkevich *et al.*, 2021). Un número considerable de mutantes deficientes en genes implicados en la respuesta y reparación de daño al ADN se han generado en *Drosophila* (Laurençon *et al.*, 2003; Hernando *et al.*, 2004; Laroque *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2009), empleados en la evaluación del potencial genotóxico y mutagénico de diversos compuestos químicos como los plaguicidas (Siddique *et al.*, 2005, 2008; Li *et al.*, 2015).

Con tales antecedentes y en vista de los pocos estudios genotóxicos de los insecticidas cetenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC, la presente investigación analizó el daño en el ADN y estrés oxidante inducido por los insecticidas comerciales cetenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC en los ovarios de *Drosophila melanogaster* y los mecanismos de respuesta al daño al ADN mediante el uso de cepas mutantes.

IV HIPÓTESIS

Sí los insecticidas cetenoles han demostrado inducir daño en el ADN y estrés oxidante en algunos organismos, entonces estos mismos efectos se observarán en el ovario de *D. melanogaster* expuestos a los insecticidas cetenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC visualizados con el incremento significativo de los biomarcadores genotóxicos: el ensayo cometa alcalino y la fosforilación de la histona γ H2AV y alteraciones en la expresión de antioxidantes endógenos y sus efectos en la proliferación y diferenciación de las células germinales mediante el uso de cepas mutantes.

V OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el daño en el ADN y estrés oxidante en el ovario de *Drosophila melanogaster*, así como su impacto en la proliferación y diferenciación de las células germinales, causado por los insecticidas comerciales cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC.

Objetivos específicos

- 1) Realizar experimentos preliminares para determinar las concentraciones de los insecticidas Movento® 240SC y Envidor® 240SC, en hembras de *D. melanogaster* silvestre (Oregón R) vía oral por 72 h, para determinar las concentraciones adecuadas que induzcan daño en el ADN detectado mediante el ensayo cometa alcalino.
- 2) Determinar si la inducción de daño al ADN es vía estrés oxidante cuantificando la actividad de enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidante en hembras de *Drosophila melanogaster* silvestre expuesta y no expuesta a los insecticidas Movento® 240SC y Envidor® 240SC.
- 3) Determinar mediante el uso de cepas mutantes los mecanismos implicados en la respuesta al daño al ADN inducido por insecticidas Movento® 240SC y Envidor® 240SC.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Generación de cepas mutantes de *Drosophila melanogaster*

En la Tabla IX, se describen las cepas de *D. melanogaster* utilizadas en los ensayos de exposición a diferentes concentraciones de los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC. Las cepas *ATR^{mei-29D}*, *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* y *Chk1^{grp}* las generamos en el laboratorio a través de esquemas de apareamiento tal como se muestran en las Figura 16, 17 y 18. Todas las cepas fueron mantenidas a 25 °C ± 2 C, en viales con medio de cultivo estándar a base de levadura, agar, sacarosa y harina.

Tabla IX. Cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en los esquemas de tratamiento con los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC.

Genotipo en el escrito	Genotipo ^a	Característica
Oregon R	+	Cepa silvestre competente en todos los mecanismos de respuesta al daño del ADN.
<i>ATM^{tefu}</i>	w; tefu e ⁶ [b ^e]	Mutante deficiente en la proteína cinasa tefu (<i>telomere fusión</i>) homólogo de ATM en mamíferos
<i>ATR^{mei-29D}</i>	w; mei-41 ^{29D} /y{UASp41} mei-41 ^{29D} ; p{mta}/+	Mutante deficiente en la proteína cinasa mei-41 (<i>meiotic 41</i>) ortólogo de ATR en mamíferos.
<i>Chk1^{grp}/Chk2^{lok}</i>	w/+; grp ²⁰⁹ lok ³⁰ /grp ^{Z5170} lok ³⁰	Mutante deficiente en las proteínas cinasas: grp (<i>grappes</i>) y lok (<i>localized ovarian kinase</i>) ortólogos respectivamente, de Chk1 y Chk2 en mamíferos.
<i>Chk1^{grp}</i>	w/+; grp ²⁰⁹ /grp ^{Z5170}	Mutante deficiente en la proteína cinasa grp (<i>grappes</i>) ortólogo de Chk1 en mamíferos.
<i>p53^{dp53}</i>	y ¹ w ¹¹¹⁸ ; p53 ^{5A-1-4}	Mutante deficiente en la proteína dp53 (supresor tumoral) ortólogo de p53 en mamíferos

Los organismos los generamos en el laboratorio de Jeff Sekelsky, en la Universidad de Carolina del Norte.

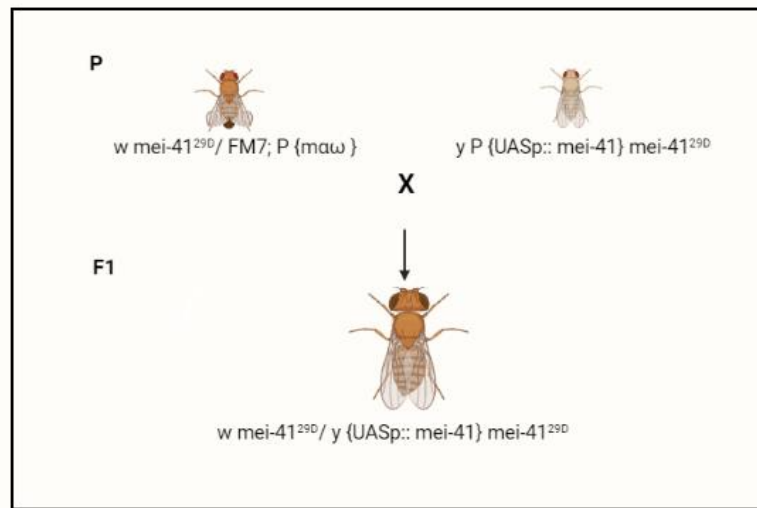


Figura 16. Esquema de apareamiento para la generación de la cepa mutante *mei-41^{29D/29D}* (ATR) (González-Marín, 2022).

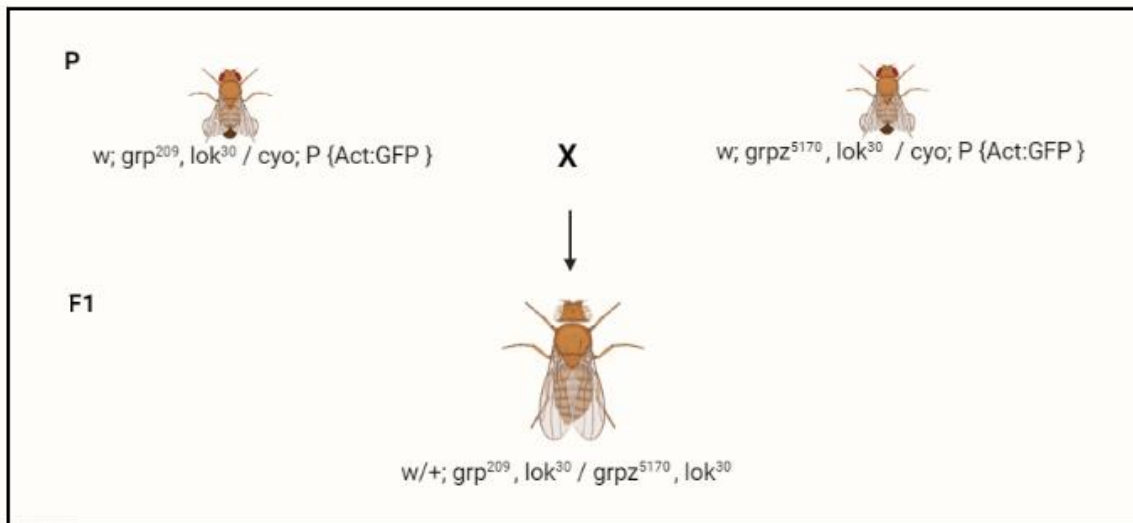


Figura 17. Esquema de apareamiento para la generación de la cepa doble mutante *grp^{209/5170} lok^{30/30}* (Chk1/Chk2) (González-Marín, 2022).

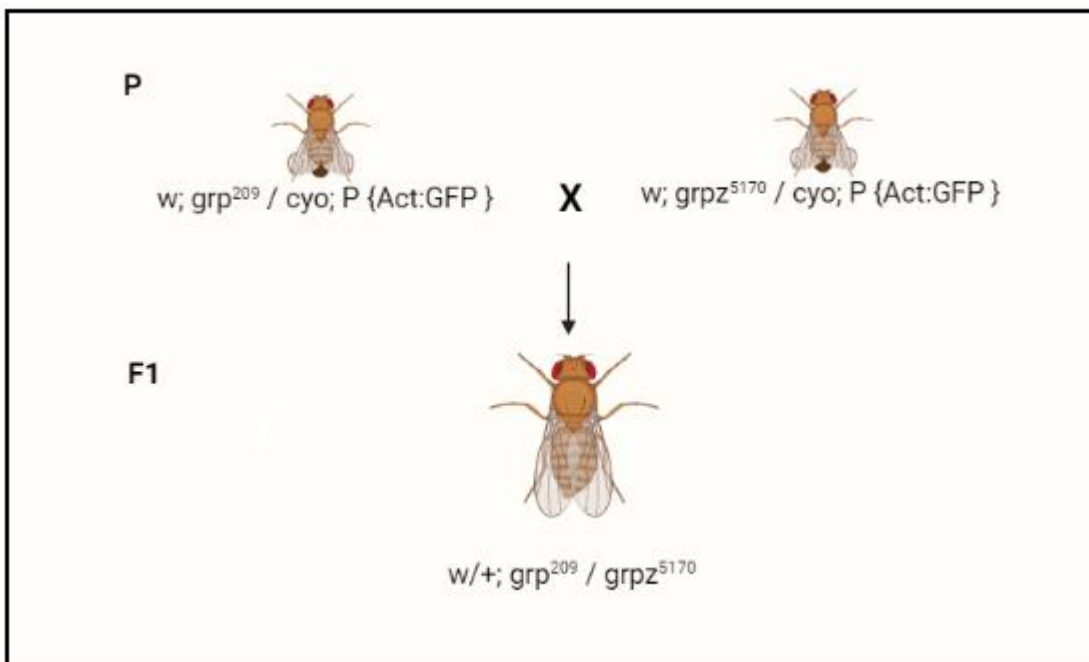


Figura 18. Esquema de apareamiento para la generación de la cepa mutante $grp^{209/z5170}$ (Chk1) (González-Marín 2022).

6.2 Elaboración de alimento más soluciones patrón

Los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC (con Spirotetramat como ingrediente activo (cis-4-(etoxicarboniloxi)-8-metoxi-3-(2,5-xilil)-1-azaspiro [4.5] dec-3-en-2-ona)), número de registro (RSCO-INAC-0103Z-301-409-015) y Envidor® 240SC (con Spirodiclofen como ingrediente activo (3-(2,4-diclorofenil)-2-oxo-1-oxaspiro [4.5] dic-3-en-4-il 2,2-dimetilbutirato)), número de registro (RSCO-INAC-0103R-301-064-022) fueron donados por Bayer-México. Ambos insecticidas fueron diluidos con agua desionizada a concentraciones finales de (11.2, 22.4, 37.3 mg/L) de Movento® 240SC y (12.3, 24.6, 41.1 mg/L) de Envidor® 240SC. Doscientos microlitros de cada concentración fueron mezclados con levadura hasta formar una pasta que fue depositada en el fondo de viales de alimento de *Drosophila* Genesee Scientific (U.K.). Las concentraciones de ambos insecticidas que indujeron daño en el ADN en células ováricas fueron las reportadas en un estudio previo y utilizadas en tres experimentos independientes (González-Marín *et al.*, 2021).

6.3 Determinación de la dosis letal media (LD₅₀)

La LD₅₀ se determinó a partir de varios experimentos preliminares (datos no mostrados). Las hembras vírgenes de *D. melanogaster* fueron expuestas por vía oral a 79.1 mg/L de Movento® 240SC y 78.0 mg/L de Envidor® 240SC mezclados con levadura más un grupo

testigo (alimento sin plaguicida) durante 24, 48 y 72 h. Se realizaron tres experimentos independientes.

6.4 Esquema de tratamiento de los insecticidas cetoenoles para el ensayo cometa

Cincuenta hembras vírgenes de *D. melanogaster* Oregón R fueron recolectadas en un solo período de 24 h. Posteriormente, 5 grupos de 10 hembras fueron incubados y alimentados de manera independiente en viales que contenían una mezcla de levadura más (11.2, 22.4, 37.3 mg/L) concentración final de Movento® 240SC y (12.3, 24.6, 41.1 mg/L) de Envidor® 240SC durante 72 h a 25 ± 2 °C. Como grupo testigo, se utilizó levadura mezclada con agua (alimento sin plaguicidas (0.0 mg/L)) y como grupo testigo positivo, se utilizó 17.5 mg/L de bleomicina más levadura, ambos grupos testigos se mantuvieron bajo las mismas condiciones que los grupos tratados con los plaguicidas.

6.4.1 Disección ovárica

Después de 72 h de exposición, las hembras de todos los grupos experimentales y de testigos fueron sacrificadas para la disección ovárica. Se obtuvieron veinte ovarios (2 por organismo) para cada grupo experimental y testigos, los ovarios fueron transferidos a tubos Eppendorf con 50 µL de PBS frío 1X e inmediatamente se mezclaron con una pipeta automática para dispersar las células. Se eliminaron fragmentos de tejido y se utilizó la suspensión celular para realizar un ensayo de cometa alcalino. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes para cada tratamiento.

6.4.2 Ensayo cometa alcalino

Se realizó el ensayo cometa alcalino para la detección *in vivo* del daño en el ADN en ovarios *D. melanogaster* a partir del protocolo original modificado por Mojica-Vázquez *et al.* (2019). La suspensión celular de cada grupo experimental y testigos que contenía células ováricas fue mezclada con 100 µL de agarosa de bajo punto de fusión LMPA (0.5 % 28.5 °C). Se utilizaron 100 µL de la mezcla y se colocó por duplicado (dos laminillas por concentración de insecticida) en un portaobjetos cubierto con una capa de agarosa normal al 1 %. Los

portaobjetos fueron cubiertos con un cubreobjetos y se almacenaron a 4°C durante 5 min para permitir que la agarosa se solidificara, el cubreobjetos fue retirado cuidadosamente y los portaobjetos se sumergieron en un frasco Coplin que contenía la solución de lisis (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris y 1 % Tritón X-100, pH = 10) a 4 °C donde permanecieron durante 1 h. A continuación, los portaobjetos fueron colocados en una cámara de electroforesis horizontal (Búho A5; Lab System, Inc.) que contenía 1 L de amortiguador alcalino de electroforesis frío recién elaborado (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH = 10), las laminillas se mantuvieron durante 20 min sin corriente para permitir el desenrollamiento del ADN. Posteriormente, la electroforesis se llevó a cabo a 25 V (0.7 V/cm) y 300 mA durante 20 min en completa oscuridad para evitar daños adicionales en el ADN.

Una vez concluida la electroforesis, los portaobjetos se lavaron tres veces con amortiguador neutro fresco (0.4 M Tris, pH 7.5) durante 5 min, se fijaron con metanol absoluto frío durante 5 min y se secaron a temperatura ambiente. Finalmente, fueron teñidos con 60 µL de GelRed® (4 µg/mL) para poder visualizar el ADN. Las laminillas fueron etiquetadas con un código desconocido para el observador y analizadas con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse NI equipado con un filtro de excitación (515–560 nm) y un filtro de barrera (590 nm), a 40× utilizando el software Comet IV (Perceptive Instruments, Reino Unido). El análisis se realizó en 75 núcleos seleccionados al azar en cada portaobjetos (dos portaobjetos por concentración) para un total de 150 núcleos por experimento para cada concentración, se evaluaron tres parámetros de genotoxicidad: (a) longitud de la cola, (b) momento de la cauda y (c) intensidad de la cauda. Los cometas con ADN completamente fragmentado (figuras sin cabeza definida) fueron excluidos de la evaluación (Calderón-Segura *et al.*, 2015).

6.5 Análisis de actividad enzimática

6.5.1 Preparación de homogeneizados de tejido

Los homogeneizados de tejido se prepararon a partir de 100 ovarios según lo reportado por Khatun *et al.*, (2017). Los ovarios se obtuvieron a partir de la disección de 50 moscas de la cepa Oregón-R expuesta de forma independiente a (11.2, 22.4, 37.3 mg/L de Movento® 240

SC), (12.3, 24.6, 41.1 mg/L de Envidor® 240 SC) y el grupo testigo (0.0 mg/L). Los ovarios fueron mantenidos en 200 μ L de PBS 1X a -4 °C y posteriormente sonicados a una amplitud de 1.5 dos veces durante 5 seg sobre hielo y centrifugados a 14 000 g durante 20 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante de cada muestra para llevar a cabo los ensayos enzimáticos y cuantificación de MDA. Antes del ensayo enzimático, las muestras se utilizaron para la estimación de proteínas según el método de Lowry *et al.* (1951).

6.5.2 Superóxido dismutasa

Para la determinación de la actividad de la enzima SOD se utilizó el sistema xantina/xantina oxidasa como generador constante de $\bullet\text{O}_2^-$. El nitroazul de tetrazolio (NBT) reduce al $\bullet\text{O}_2^-$ y forma un producto de color rosa llamado formazán que es detectado a 560 nm cuando la enzima SOD inhibe la reducción del NTB (nitrobluetetrazólio) (Suzuki, 2000). En una microplaca multipozos Costar® se mezcló solución estándar (solución amortiguadora sodio-carbonato 50 mM, xantina 0.1 mM, NBT 0.025 mM, EDTA 0.1 mM), XO (1 U mL⁻¹ en sulfato de amonio 2 M) y 20 μ L del homogeneizado diluido 1:2 (como blanco) o muestra. Se registró el cambio en la absorbancia cada 30 seg durante 5 min en un lector de microplacas para absorbancia. ELx800™ y se obtuvo el cambio en la absorbancia por minuto a 560 nm (ΔA_{560}) mediante el “software” para análisis de datos Gen5™ de BioTek. Los resultados se expresaron en U SOD mg proteína⁻¹ y cada unidad de actividad de SOD que se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50 % de la reacción del $\bullet\text{O}_2^-$ con el NBT.

6.5.3 Catalasa

Para determinar la actividad de CAT se utilizó H₂O₂ como sustrato y se dio seguimiento al decremento continuo de la concentración de H₂O₂ a 240 nm (Aebi, 1984).

En una microplaca UV se leyó la absorbancia de la solución de trabajo (amortiguador de fosfatos 0.1 mM y solución patrón de H₂O₂ 20 mM) para calcular la concentración de H₂O₂, manteniéndola en el rango de 0.45 a 0.5 mmol L⁻¹; posteriormente, se agregó 12 μ L del

homogeneizado (muestra). Se registró la absorbancia en un lector de microplacas para absorbancia ELx800™ cada 5 seg durante 45 seg a 240 nm y se calculó el ΔA_{240} mediante el programa para análisis de datos Gen5™ de BioTek. Los resultados se expresaron en U CAT mg proteína⁻¹; donde una unidad de catalasa se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un μmol de H_2O_2 min⁻¹.

6.5.4 Determinación de la concentración de malondilaldehído

Para esta determinación se usó el método del N-metil-2-fenilindol, cuyo ensayo se basa en la reacción de un reactivo cromogénico, el N-metil-2-fenilindol, con el MDA a 45 °C. Un mol de MDA reacciona con dos moles del N-metil-2-fenilindol para producir un cromóforo estable con una absorbancia máxima a 586 nm.

En tubo Eppendorf se colocaron 160 μL del sobrenadante del homogeneizado (muestra), 375 μL de la mezcla de reacción elaborado con una solución diluida de N-metil-2-fenilindol (preparado a la concentración de 10.3 mM en acetonitrilo y diluido en la proporción de 3:1 con metanol, ambos de grado HPLC). A la mezcla se le adicionó 75 μL de HCl, se agitó y dejó incubar por 45 min a 45 °C, las muestras fueron centrifugadas a 3000 g por 3 min. Posteriormente, en una microplaca multipozos Costar® se colocaron 160 μL del sobrenadante, y se registró el cambio de absorbancia en un lector de microplacas para absorbancia ELx800™ a 586 nm mediante el “software” para análisis de datos Gen5™ de BioTek. Se utilizó como estándar: 1,1,3,3 tetrametoxipropano de Sigma, preparado a la concentración de 10 mM en amortiguador tris-HCl 20 mM, pH 7.4.

6.6 Esquema de tratamiento de los insecticidas cetoenoles para inmunofluorescencia

Cuarenta hembras vírgenes de las cepas de *Drosophila melanogaster* cepas: Oregon R, *ATM^{tefu}*, *ATR^{mei-29D}*, *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}*, *Chk1^{grp}* y *p53^{dp53}*, fueron recolectadas durante 3 días, y agrupadas en 4 grupos con 10 hembras cada uno, para ser incubadas y alimentadas en viales que contenían una mezcla de levadura con una concentración de 11.2, 22.4 y 37.3 mg/L de Movento® 240SC y con concentraciones de 12.3, 24.6, 41.1 mg/L de Envidor® 240SC de forma independiente, durante 72 h a 25 °C. Como grupo testigo se utilizó alimento sin

plaguicida (0.0 mg/L), bajo las mismas condiciones que los grupos experimentales (Fig. 19). Se realizaron tres experimentos independientes.

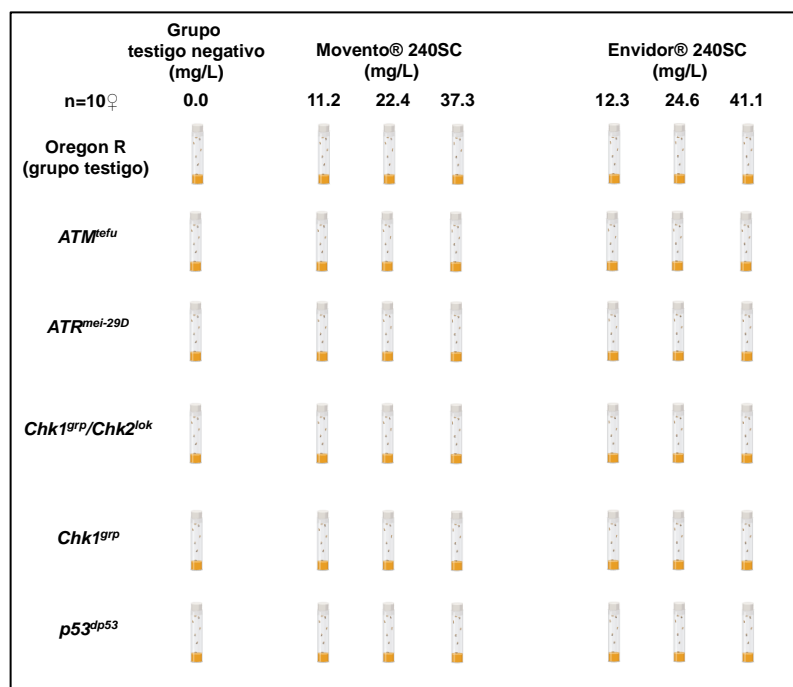


Figura 19. Esquema de tratamiento de los insecticidas cetenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC en hembras silvestres Oregon R y mutantes DDR.

6.7 Disección de ovarios

Después de 72 h de exposición a los insecticidas cetenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC, las hembras de las cepas: Oregon R, *ATM^{tefu}*, *ATR^{mei-29D}*, *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}*, *Chk1^{grp}* y *p53^{dp53}*, de cada grupo experimental y control fueron sacrificadas para la disección de ovarios. Por cada grupo, se obtuvieron 20 ovarios (dos por organismo), los cuales fueron disgregados en ovariolas (unidad estructural del ovario) (Fig. 20). Las ovariolas fueron fijadas en 800 µL de solución fijadora (165 µL de PBS 1X fresco, 600 µL de heptano, 25 µL de formaldehído al 16 % y 10 µL de NP40), durante 20 min. Posteriormente, fueron lavadas con 1 mL de PBST 1X (PBS 1X + Tween-20 al 0.1 %), 3 veces durante 10 min.

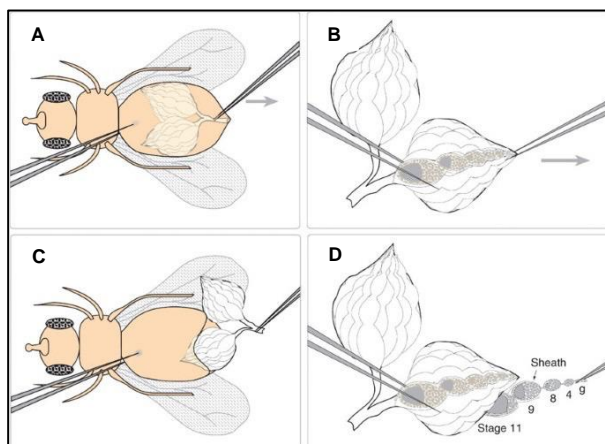


Figura 20. Imagen esquemática de disección de ovarios de *Drosophila melanogaster*. **(A)** La mosca es sujeta con una pinza por el tórax o por la parte anterior del abdomen y con otras pinzas se realiza una incisión en la parte media del abdomen. **(B)** A continuación, se toma la parte posterior del abdomen y se jala lentamente para extraer los ovarios. **(C)** Con ambas pinzas se limpian cuidadosamente los ovarios y se remueven residuos de otros tejidos. **(D)** Con ayuda de una aguja de disección se disgrega el ovario en ovariolos (Imagen tomada de Prasad *et al.*, 2007).

6.7.1 Inmunofluorescencia

Las ovariolos de las cepas de *D. melanogaster* DDR mutantes ATM^{tefu} , $ATR^{mei-29D}$, $Chk1^{grp}/Chk2^{lok}$, $Chk1^{grp}$ y $p53^{dp53}$, y silvestre Oregon R, después de 72 h de exposición a las tres concentraciones de los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor 240SC fueron incubadas durante 1 h en 1 mL de PBST + BSA al 1 % (10 mL de PBST + 0.1 g de BSA). Después de este tiempo, se incubaron durante la noche en 500 μ L de anticuerpo primario diluido en 1 mL de (PBST + BSA al 1 %) a 4 °C en agitación constante. Después, las ovariolos fueron lavadas tres veces con PBST e incubadas en 500 μ L de anticuerpo secundario diluido a 1:500 en (PBST + BSA al 1 %) durante 2 h, y por 10 min con 5 μ L de DAPI. Posteriormente, fueron lavadas con PBST 1X tres veces durante 15 min y montadas en un portaobjetos con 35 μ L de ProLong Gold (Hatkevich *et al.*, 2021).

Se utilizaron los anticuerpos: primario (conejo α - γ H2AvD (p5137), 1:1000), secundario (Alexa fluor-488 cabra α -conejo IgG (H+L), 1:500) y DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), para la tinción de los núcleos. El anticuerpo primario γ H2AvD se utilizó como marcador de roturas de doble cadena en el ADN del germario de *Drosophila* según lo descrito por Tanaka *et al.* (2007).

6.7.2 Procesamiento de imágenes

Se tomaron imágenes del germario (región apical de las ovariolas) de hembras de la cepa (Oregon R, *ATM^{tefu}*, *ATR^{mei-29D}*, *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}*, *Chk1^{grp}* y *p53^{dp53}*) de cada grupo experimental y testigo con un microscopio de barrido láser confocal Zeiss LSM880 utilizando un objetivo de inmersión en aceite NA de 63x/0,65, mediante el software ZEN. Las imágenes se guardaron como archivos. czi para su procesamiento con el software FIJI. La intensidad de la fluorescencia emitida de γ H2AV se reportó como el promedio del porcentaje total de γ H2AV expresado en el germario (modificado de Dewey *et al.*, 2020). Finalmente, se seleccionaron las imágenes del germario más representativas de cada grupo experimental y testigo de cada cepa mutante y silvestre, las imágenes se recortaron y crearon paneles de figuras en Adobe Photoshop CC.

6.8 Análisis estadístico

Para determinar la LD₅₀, se realizó una prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon. La relación entre el daño en el ADN y las concentraciones de los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC se determinó mediante análisis de regresión lineal. Los valores obtenidos de los análisis del ensayo cometa: longitud, momento e intensidad de la cauda y los de la actividad enzimática de SOD y CAT, así como los de la cuantificación de MDA y de expresión de γ H2AV en el germario se reportaron como promedios \pm desviación estándar de tres experimentos independientes para cada grupo experimental. Los datos fueron examinados con análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y una prueba *post-hoc* de comparación múltiple (Tukey), para determinar diferencias significativas entre los grupos experimentales y los respectivos grupos testigos ($p < 0.005$ y $p < 0.0001$), el análisis se realizó utilizando el programa GraphPad Prism versión 9.

VII RESULTADOS

7.1 Determinación de la LD₅₀ de los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC

A partir de resultados obtenidos de experimentos preliminares (datos no mostrados) se registró que a las 72 h la LD₅₀ para Movento® 240SC fue de 79.1 mg/L, y 78.0 mg/L para Envidor® 240SC la mortalidad de *D. melanogaster* fue del 50 % comparado con el grupo testigo de acuerdo con la prueba estadística Gehan- Breslow-Wilcoxon ($p < 0.0001$) (Fig. 21).

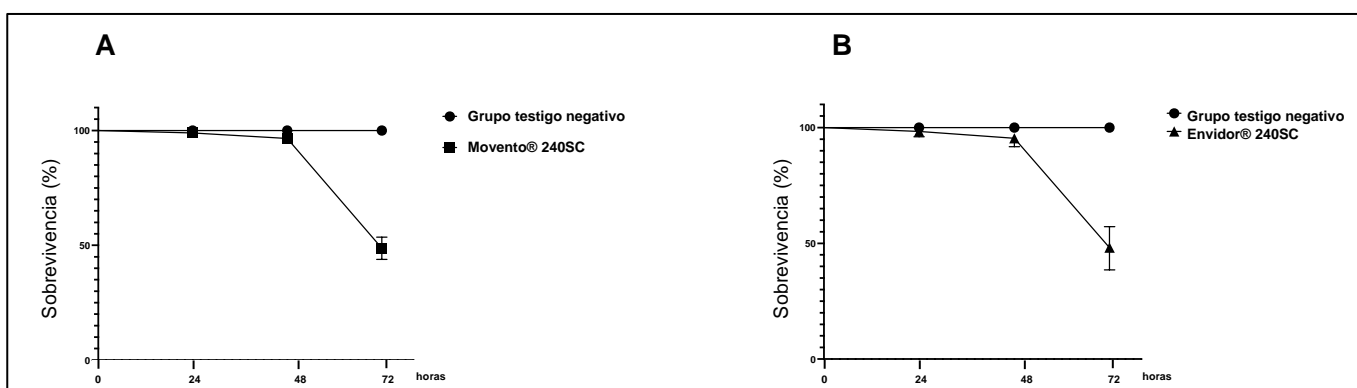


Figura 21. Sobrevivencia de organismos expuestos: (A) 79.1 mg/L de Movento® 240SC y (B) 78.0 mg/L Envidor® 240SC por 24, 48 y 72 h.

7.2 Daño en el ADN en Ovarios *D. melanogaster* inducido por los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC.

Los resultados de tres experimentos independientes evidencian que a 11.2 mg/L Movento® 240 SC, no hubo diferencias significativas en los valores promedio de longitud y momento de la cauda (Fig. 22-24A), sin embargo, a esta concentración induce aumento significativo en la intensidad de la cauda (Fig. 24A) comparado con los valores promedios del grupo testigo (0.0 mg/L) ($p < 0.0001$). No obstante, a 22.4 y 37.3 mg/L de Movento® 240 SC, los valores promedio de los tres parámetros genotóxicos evaluados en el grupo experimental aumentan significativamente con relación a los valores promedios del grupo testigo ($p < 0.0001$) (Fig. 22-24A). Los gráficos de regresión lineal muestran efecto dependiente de la

concentración de Movento® 240 SC sobre la intensidad ($r^2 = 0.987$) y el momento ($r^2 = 0.933$) pero no en la longitud de la cauda ($r^2 = 0.57$) (Fig. 22-24B). Con relación a los valores promedios de Envidor® 240 SC, incrementan significativamente los tres parámetros genotóxicos (longitud, momento e intensidad de la cauda) de los tres grupos experimentales (12.3, 24.6 y 41.1 mg/L) con respecto al grupo testigo (0.0 mg/L) ($p < 0.0001$) (Fig. 22-24A). Los gráficos de regresión muestran efecto dependiente de la concentración sobre la longitud ($r^2 = 0.99$), intensidad ($r^2 = 0.98$) y el momento de la cauda ($r^2 = 0.98$) (Fig. 22-24B). La bleomicina, como grupo testigo positivo (17.5 mg/L), aumenta significativamente los tres parámetros genotóxicos (longitud, momento e intensidad de la cauda) en los núcleos celulares de *D. melanogaster* comparado con (0.0 mg/L) ($p < 0.0001$) (Fig. 22-24A).

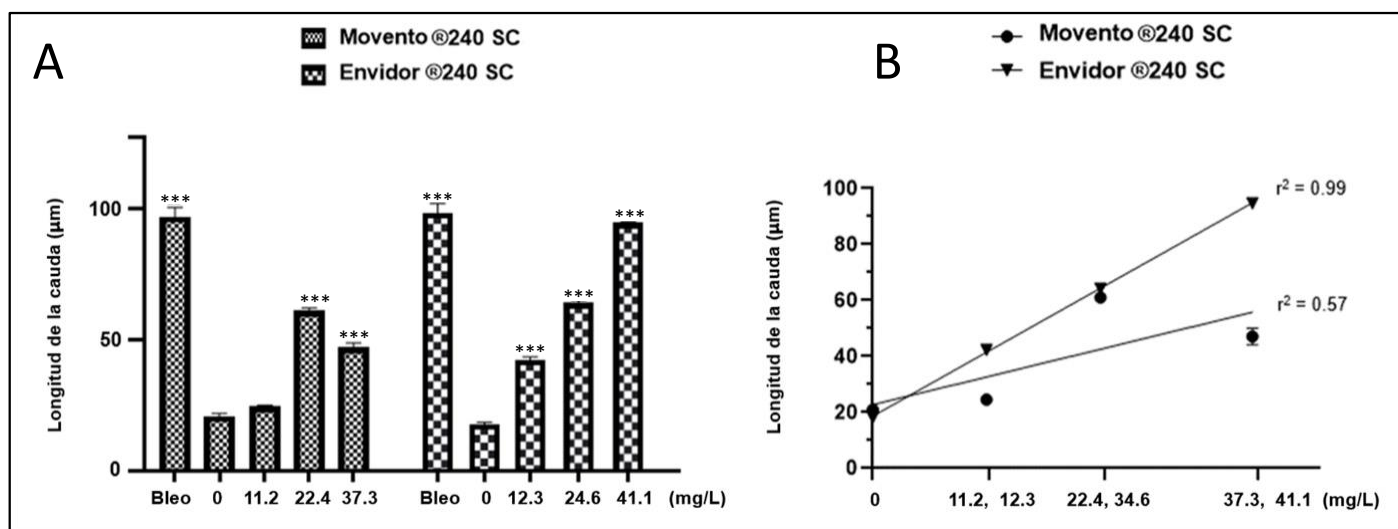


Figura 22. (A) Promedios de longitud de la cauda (μm). (B) Regresión lineal de la longitud de la cauda (μm) del cometa en núcleos de células ováricas de *D. melanogaster* con y sin exposición a los insecticidas cetoenoles Movento® 240 SC y Envidor® 240 SC. *** Diferencias significativas ($p < 0.0001$) ANOVA de dos vías prueba post-hoc Tukey.

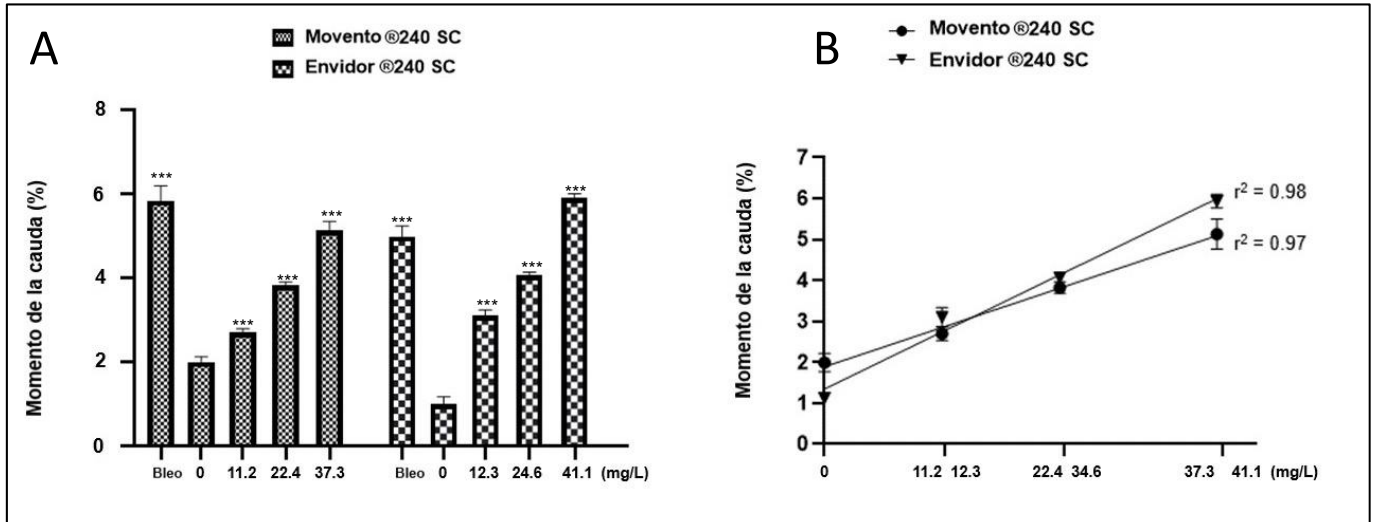


Figura 23. (A) Promedios del momento de la cauda (%). (B) Regresión lineal del momento de la cauda (%) del cometa en núcleos de células ováricas de *D. melanogaster* con y sin exposición a los insecticidas cetenoles Movento® 240SC y Envirdor® 240SC. *** Diferencias significativas ($p < 0.0001$) ANOVA de dos vías prueba post-hoc Tukey.

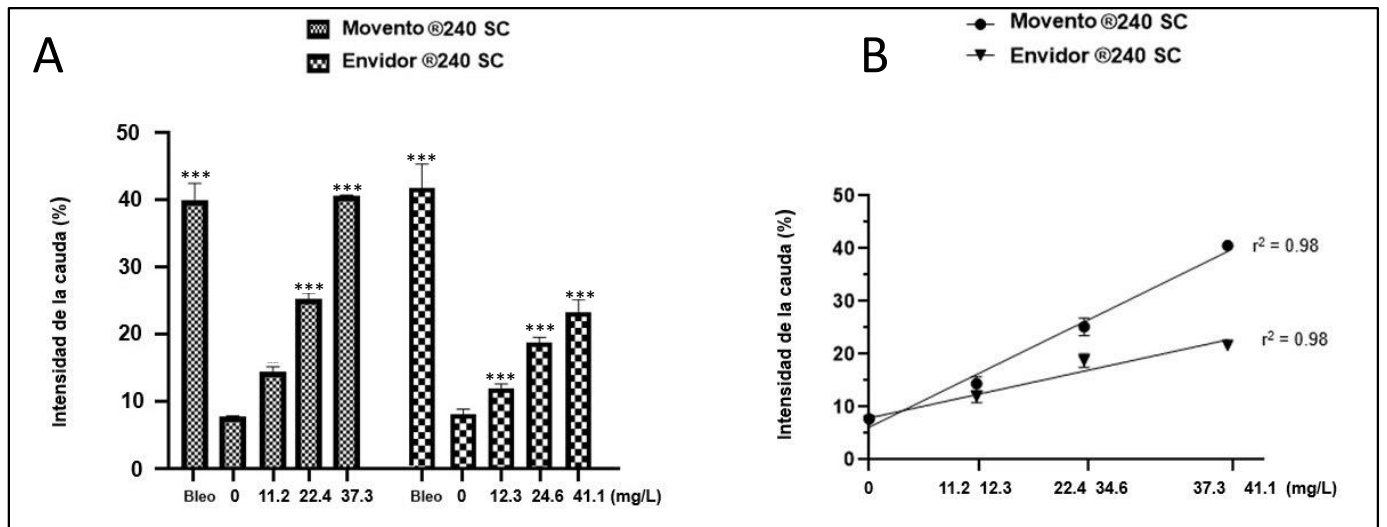


Figura 24. (A) Promedios de la intensidad de la cauda (%). (B) Regresión lineal de la intensidad de la cauda (%) del cometa en núcleos de células ováricas de *D. melanogaster* con y sin exposición a los insecticidas cetenoles Movento® 240 SC y Envirdor® 240 SC. *** Diferencias significativas ($p < 0.0001$) ANOVA de dos vías post-hoc Tukey

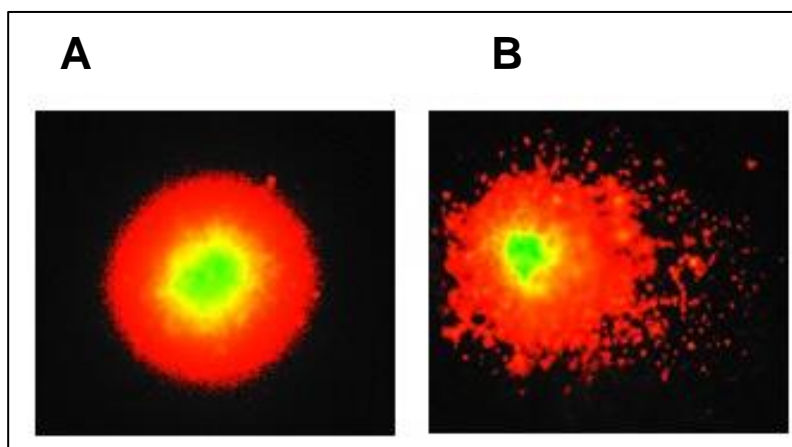


Figura 25. (A) Núcleo de célula germinal de hembras de *Drosophila melanogaster* sin daño en el ADN (sin cometa). (B) Núcleo de célula germinal con daño en el ADN (con cometa) (González-Marín *et al.*, 2021).

7.3 Inducción de estrés oxidante por Movento® 240SC y Envidor® 240SC en ovarios de *Drosophila melanogaster*

Para determinar si Movento® 240 SC y Envidor® 240 SC inducen daño al ADN en células ováricas vía estrés oxidante, indirectamente se cuantificó la actividad enzimática de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y un marcador de peroxidación de lípidos MDA en ovarios de hembras de la cepa silvestre Oregón R de *Drosophila melanogaster*.

7.3.1 Evaluación de la actividad enzimática de enzimas antioxidantes después de la exposición a Movento® 240SC y Envidor® 240SC

Los resultados de tres experimentos independientes evidencian que las concentraciones de 11.2, 22.4 y 37.3 mg/L de Movento® 240 SC y 12.3, 24.6 y 41.1 mg/L de Envidor® 240 SC, incrementan significativamente los valores promedio de la actividad enzimática de la enzima SOD (SOD, U mg de proteína⁻¹) y CAT (CAT, U mg de proteína⁻¹) comparados con los valores promedios del grupo testigo (0.0 mg/L) ($p < 0.0001$) (Fig. 26, 27A). Los gráficos de regresión lineal muestran efecto dependiente de la concentración sobre la actividad enzimática de SOD después de la exposición a Envidor® 240 SC ($r^2 = 0.99$), pero no con Movento® 240 SC ($r^2 = 0.25$), o con relación a la actividad enzimática de CAT después de la exposición a Envidor® 240 SC ($r^2 = 0.62$) y Movento® 240 SC ($r^2 = 0.46$) (Fig. 26, 27B).

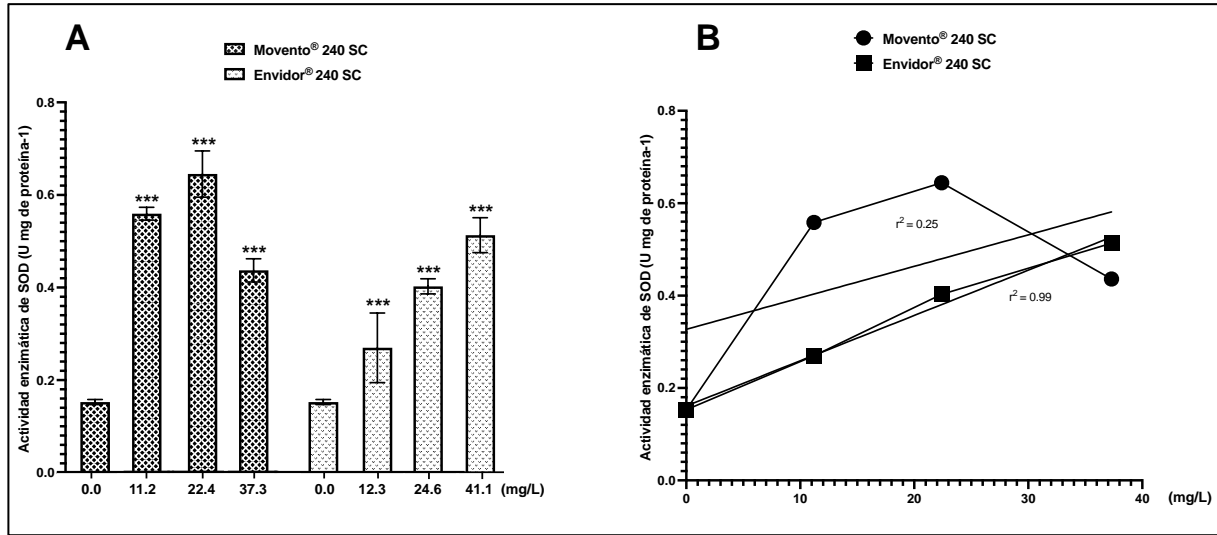


Figura 26. (A) Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD, U mg de proteína⁻¹). (B) Regresión lineal en células ováricas de *D. melanogaster* con y sin exposición a los insecticidas cetenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC. *** Diferencias significativas ($p < 0.0001$) ANOVA de dos vías y prueba post-hoc Tukey.

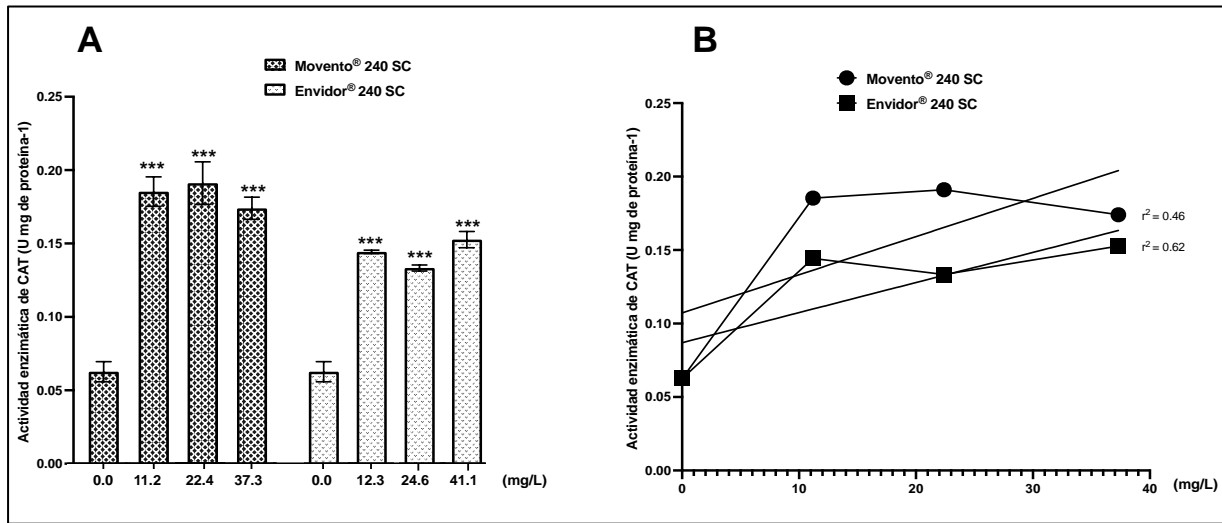


Figura 27. (A) Actividad enzimática de catalasa (CAT, U mg de proteína⁻¹). (B) Regresión lineal en células ováricas de *D. melanogaster* con y sin exposición a los insecticidas cetenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC. *** Diferencias significativas ($p < 0.0001$) ANOVA de dos vías prueba post-hoc Tukey.

7.3.2 Evaluación del contenido de MDA después de la exposición a Movento® 240SC y Envidor® 240SC

Los resultados de tres experimentos independientes evidencian que las concentraciones de 11.2, 22.4 y 37.3 mg/L de Movento® 240SC y 24.6 y 41.1 mg/L de Envidor® 240SC, incrementan significativamente la producción de MDA (MDA nmol mg de proteína⁻¹) marcador de peroxidación lipídica, no obstante la concentración de 12.3 mg/L de Envidor® 240SC no evidencia diferencias significativas con relación a los valores promedios del grupo testigo (0.0 mg/L) ($p < 0.0001$) (Fig. 28A). El análisis de regresión lineal demuestra efecto dependiente de la concentración en la producción de MDA después de la exposición a Movento® 240 SC ($r^2 = 0.98$) y Envidor® 240 SC ($r^2 = 0.97$) (Fig. 28B).

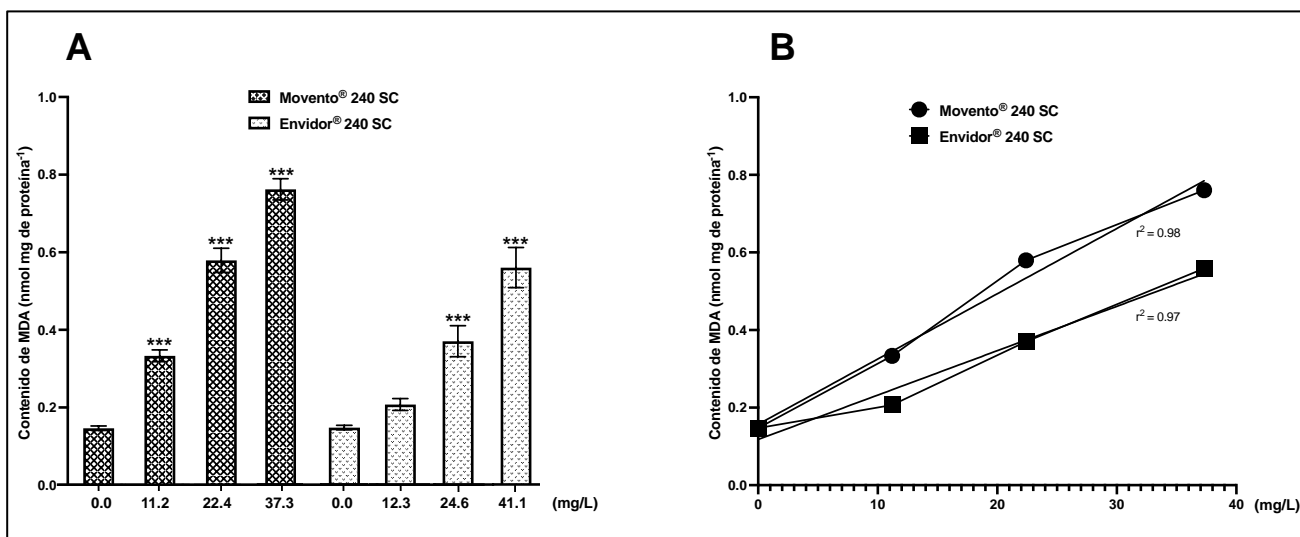


Figura 28. (A) Contenido total de malondialdehído (MDA nmol mg de proteína⁻¹). (B) Regresión lineal en células ováricas de *D. melanogaster* con y sin exposición a los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC 72h. *** Diferencias significativas ($p < 0.0001$) ANOVA de dos vías prueba post-hoc Tukey.

7.4 Inducción de daño en el ADN en el germario en la cepa silvestre de *Drosophila melanogaster* (Oregon R) por los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC

Las figuras 29B3-B8 y D, muestran el incremento significativo de rompimientos de doble cadena en el ADN y del porcentaje de expresión de γ H2AV en R2b y R3 del germario de

Drosophila melanogaster silvestre (Oregon R), después de 72 h de exposición oral a las concentraciones de 11.2, 22.4, y 37.3 mg/L del insecticida Movento® 240SC, comparado con el valor promedio de daño basal en el ADN del germario del grupo testigo (0.0 mg/L de plaguicida) ($p < 0.0001$) (Fig. 29B1-B2 y D).

A la concentración de 12.3 mg/L del insecticida Envidor® 240SC, no hubo diferencias significativas de daño en el ADN y en el porcentaje de expresión γ H2AV, con relación al valor promedio del grupo testigo (0.0 mg/L de plaguicida) ($p < 0.0001$) (Fig. 29C1-C4 y D). Sin embargo, las concentraciones de 24.6 y 41.1 mg/L de Envidor® 240SC, aumentan significativamente los de rompimientos de doble cadena en el ADN en las R2b y R3 del germario de *D. melanogaster* (Oregon R) (Figs. 29C5-C8), y en la expresión de γ H2AV con relación al grupo testigo (0.0 mg/L de plaguicida) ($p < 0.0001$) (Fig. 29D). Adicionalmente, evidencia inducción de alteraciones morfológicas en el germario de *D. melanogaster* (Oregon R) expuestos a las tres concentraciones del insecticida Envidor® 240SC, comparado con la morfología del germario del grupo testigo (0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 29C1-C8). El análisis de regresión lineal de los promedios de la expresión de γ H2AV inducido por los insecticidas Movento® 240SC y Envidor® 240SC evidencia que la respuesta de concentración-efecto es para Envidor® 240SC ($r^2 = 0.92$), pero no para Movento® 240SC ($r^2 = 0.55$) (Fig. 29E).

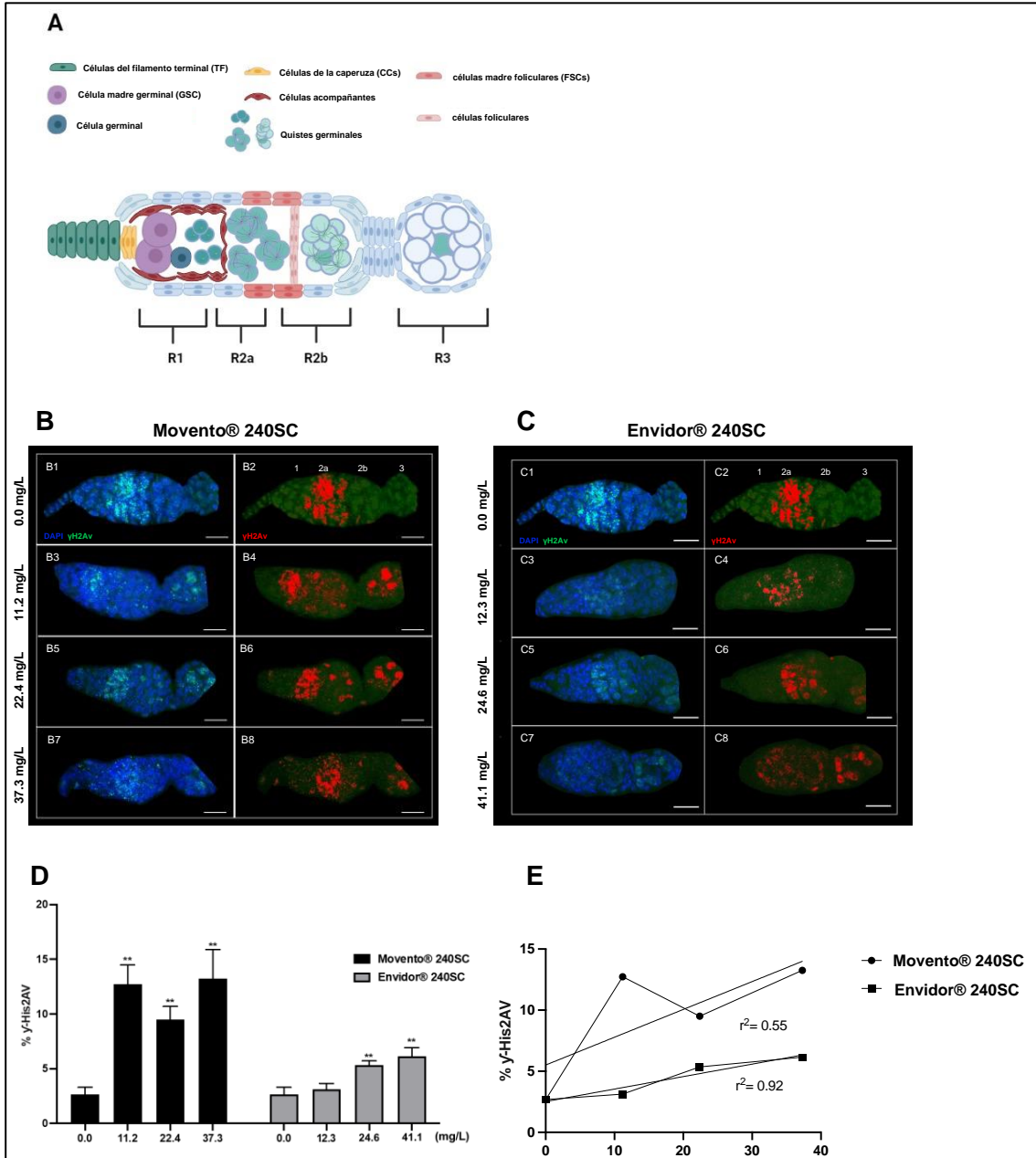


Figura 29. Germario de hembras silvestres Oregon R inmunoteñidas contra anti- γ H2AV. (A) Imagen esquemática del germario. Región 1: TFC, CC, GSC, GC, EC, Cistoblasto. Región 2a: Quistes, FSC. Región 2b: FC y ovocito quiste. Región 3: FC, primera cámara ovárica (primer estadio de ovogénesis). (B–C) anticuerpo monoclonal anti- γ H2AV (verde) para detectar DSB en el ADN mediante inmunofluorescencia y DAPI para tinción de núcleos, inmunolocalización roja de γ H2AV en el germario, la barra de escala representa 10 μ m. (B1,B2,C1,C2) Grupo testigo (0.0 mg/L), γ H2AV (rojo) en la región 2a del germario. (B3–B8) Germario de hembras expuestas a 11.2, 22.4, 37.3 mg/L de Movento® 240SC, γ H2AV (rojo) en las regiones 2b y 3. (C3–C8) Germario de hembras expuestas a 12.3, 24.6, 41.1 mg/L de Envidor® 240SC con alteraciones morfológicas. (C3,C4) γ H2AV (rojo) en la región 2a. (C5,C6) γ H2AV (rojo) en las regiones 2b y 3. (C7,C8) γ H2AV (rojo) en todas las regiones del germario. (D) Promedios de tres experimentos independientes de (%) expresión de γ H2AV en el germario de la cepa silvestre Oregon R con y sin exposición a los insecticidas

cetoenol Movento® 240SC y Envidor® 240SC. ***Diferencias significativas ($p < 0.0001$), ANOVA de dos vías y prueba post hoc de Tukey. (E) Análisis de regresión lineal.

7.5 Respuesta de ATM, Chk1 y Chk2 en el germario con daño en el ADN inducido por el insecticida cetoenol Movento® 240SC

La figura 30A3-A8, evidencia roturas de cadena doble (DBS) en el ADN en todas las regiones del germario de hembras mutantes *ATM^{tefu}*, después de 72 h exposición a concentraciones de 11.2, 22.4 y 37.3 mg/L de Movento® 240SC (Fig. 30A¹), mediante el incremento significativo en el porcentaje de expresión de γ H2AV comparado con los valores de los grupos testigos (*ATM^{tefu}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 30A1-A2), y cepa silvestre (Oregon R) (expuesta a las mismas concentraciones del insecticida) ($p < 0.0001$) (Fig. 31A). Adicionalmente, las tres concentraciones de Movento® 240SC inducen alteraciones morfológicas en el germario (Fig. 30A3-A8) comparado con la morfología del germario del grupo testigo (*ATM^{tefu}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 30A1-A2). El análisis de regresión lineal evidencia que hay respuesta de concentración-efecto en la cepa *ATM^{tefu}* ($r^2 = 0.82$) (Fig. 31B).

En hembras mutantes *ATR^{mei-29D}*, después de 72 h de exposición a las concentraciones de 11.2, 22.4 y 37.3 mg/L de Movento® 240SC, aumentan significativamente los DBS en el ADN, en la R2b y R3 del germario (Fig. 30B3-B8) y el porcentaje de expresión de γ H2AV comparado con los valores del grupo testigo (*ATR^{mei-29D}* 0.0 mg/L de plaguicida) ($p < 0.0001$) (Fig. 30B1-B2), sin embargo, las concentraciones de 11.2 y 22.4 mg/L no muestran diferencias significativas en el porcentaje de expresión de γ H2AV en el germario, no obstante, la concentración de 37.3 mg/L de Movento® 240SC incrementa significativamente los DBS en el ADN y el porcentaje de expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario (Fig. 30B7-B8) con relación a los mismos grupos experimentales de la cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.0001$) (Fig. 31A). El análisis de regresión lineal demuestra que el insecticida Movento® 240SC no induce daño en el ADN en *D. melanogaster ATR^{mei-29D}* dependiente de la concentración ($r^2 = 0.75$) (Fig. 31C).

En hembras mutantes *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}*, la exposición oral a las concentraciones de 11.2 y 37.3 mg/L de Movento® 240SC, incrementan significativamente los DBS en el ADN en todas las regiones del germario (Fig. 30C3-C4, C7-C8) y el porcentaje de expresión de γ H2AV,

comparado con los grupos testigos (*Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 30C1-2) y cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.0001$) (Fig. 31A). A la concentración de 22.4 mg/L de Movento® 240SC no hubo diferencias significativas en la inducción de daño al ADN de células del germario (Fig. 30C5-C6) comparado con los grupos testigos (*Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 30C1-2) y cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.0001$) (Fig. 31A). No obstante, la exposición a las tres concentraciones del insecticida Movento® 240SC produce muerte celular evidenciado por la ausencia de núcleos en las R1 y R2a del germario (Fig. 30C3-C8 línea punteada amarilla) y a las concentraciones 22.4 y 37.3 mg/L induce cambios morfológicos en el germario (Fig. 30C5-C8) comparado con el germario del grupo grupo testigo (*Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 30C1-C2). El análisis de regresión lineal muestra que el efecto genotóxico del insecticida Movento® 240SC en hembras *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* no es dependiente de la concentración ($r^2 = 0.20$) (Fig. 31D).

En *D. melanogaster Chk1^{grp}*, expuestas por 72 h a la concentración 11.2 mg/L no incrementa significativamente los DBS en el ADN y el porcentaje de expresión de γ H2AV, en el germario (Fig. 30D3-D4) comparado con los valores de los grupos testigos (*Chk1^{grp}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 30D1-D2) y cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.0001$) (Fig. 31A). Pero a las concentraciones 22.4 y 37.3 mg/L de Movento® 240SC, aumentan significativamente los DBS en el ADN, en las R2a y R3 del germario (Fig. 30D5-D8) y el porcentaje de expresión de γ H2AV comparado con los valores de los grupos testigos (*Chk1^{grp}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 30D1-D2) y cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.0001$) (Fig. 31A). Adicionalmente, la concentración de 37.3 mg/L de Movento® 240SC induce muerte celular evidenciado por la ausencia de núcleos celulares en la R1 y reducción del tamaño del germario (Fig. 30D7-D8 línea punteada amarilla) comparado con el grupo testigo (*Chk1^{grp}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 30D1-D2). El análisis de regresión lineal evidencia que el insecticida Movento® 240SC tiene respuesta genotóxica dependiente de la concentración en hembras *Chk1^{grp}* ($r^2 = 0.91$) (Fig. 31E).

Finalmente, en hembras mutantes *p53^{dp53}*, después de la exposición las concentraciones 11.2 y 22.4 mg/L de Movento® 240SC incrementan significativamente rompimientos de doble cadena en el ADN y el porcentaje de expresión de γ H2AV en el germario (Fig. 30E3-E4)

comparado con los valores de los grupos testigos ($p53^{dp53}$ 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 30E1-E2) y silvestre (Oregon R) (Fig. 31A). Sin embargo, la concentración de 37.3 mg/L de Movento® 240SC, aumenta significativamente rompimientos de doble cadena en el ADN en todas las regiones el germario (Fig. 30E7-E8) y el porcentaje de expresión de γ H2AV, comparado con los valores de los grupos testigos ($p53^{dp53}$ 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 30E1-E2), y cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.005$) (Fig. 31A). El análisis de regresión lineal demuestra que la respuesta genotóxica del insecticida Movento® 240SC en hembras mutantes $p53^{dp53}$ es dependiente de la concentración ($r^2 = 0.88$) (Fig.31F).

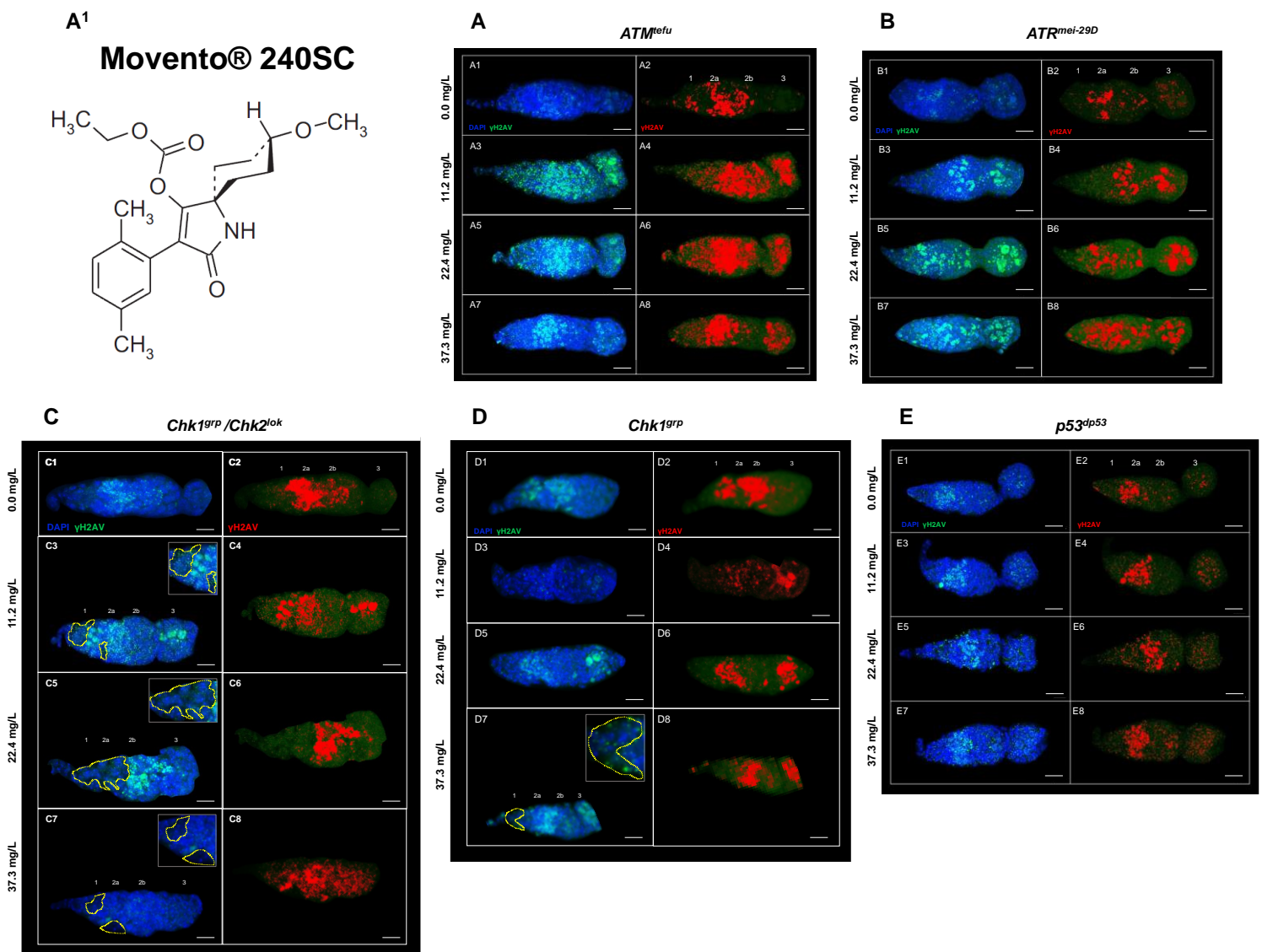


Figura 30. (A-E) Germario de hembras mutantes DDR inmunoteñidos contra anti- γ H2AV después de 72 h de exposición a concentraciones de 0.0, 11.2, 22,4 y 37.3 mg/l de Movento® 240SC. Imagen compuesta en azul

DAPI marcando los núcleos celulares y en verde γ H2AV, en rojo inmunolocalización de γ H2AV en el germario, la barra de escala representa 10 μ m. (A¹) (Spirotetramat i.a. Movento® 240SC). (A) *ATM^{tefu}*. (A1-A2) expresión de γ H2AV en las regiones 1, 2a, 2b del germario. (A3-A8) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario y alteraciones morfológicas. (B) *ATR^{mei-29D}*. (B1-B4) expresión de γ H2AV en las regiones 2a, 2b y 3 del germario. (B5-B8) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario. (C) *Chk1^{87P}/Chk2^{10k}*. (C1-C2) expresión de γ H2AV en las regiones 2a y 2b del germario. (C3-C4) expresión de γ H2AV en las regiones 1, 2a y 3 del germario y ausencia de núcleos en las regiones 1 y 2a (línea punteada amarilla). (C5-C6) expresión de γ H2AV en las regiones 2a y 2b del germario, ausencia de núcleos en las regiones 1 y 2a (línea de puntos amarilla) y cambios morfológicos. (C7-C8) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario, ausencia de núcleos en las regiones 1 y 2a (línea punteada amarilla) y cambios morfológicos. (D) *Chk1^{87P}*. (D1-D2) expresión de γ H2AV en las regiones 1, 2a y 2b del germario. (D3-D4) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario. (D5-D6) expresión de γ H2AV en las regiones 2a y 3 del germario. (D7-D8) expresión de γ H2AV en las regiones 2a, 2b y 3 del germario, ausencia de núcleos en la región 1 (línea punteada amarilla) y reducción del tamaño del germario. (E) *p53^{4p53}*. (E1-E4) expresión de γ H2AV en las regiones 2a y 3 del germario. (E5-E8) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario.

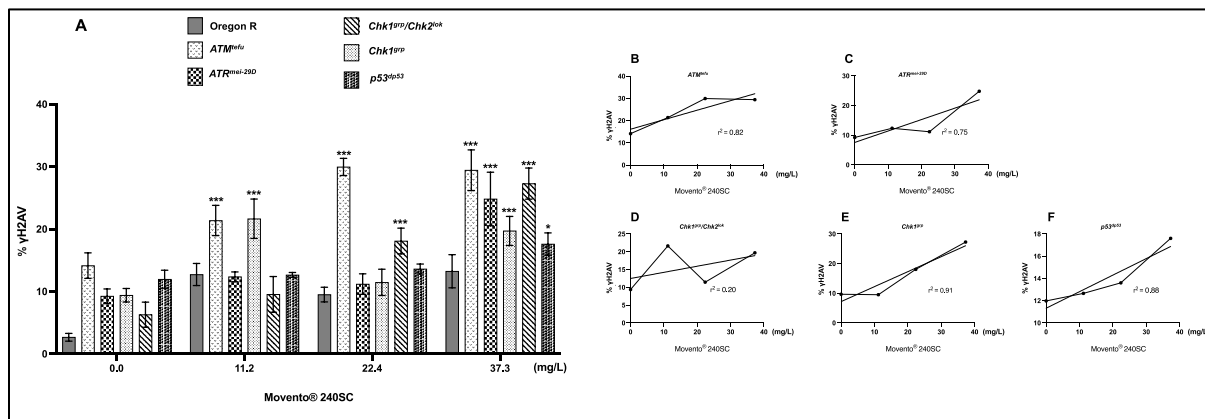


Figura 31. (A) Promedios de tres experimentos independientes del (%) de expresión de γ H2AV en el germario de la cepa silvestre Oregon R y DDR deficientes, con y sin exposición al insecticida cetoenol Movento® 240SC. ***Diferencias significativas ($p < 0.0001$), *diferencias significativas ($p < 0.005$), ANOVA de dos vías y prueba post-hoc Tukey. (B-F) Análisis de regresión lineal.

7.6 Respuesta de ATM, ATR, Chk1, Chk2 y p53 en el germario de *D. melanogaster* con daño en el ADN inducido por el insecticida cetoenol Envidor® 240SC.

La figura 32A3-A8 muestra aumento significativo de DBS en el ADN, en todas las regiones del germario de las hembras mutantes *ATM^{tefu}*, después de 72 h exposición a las concentraciones de 12.3, 24.6 y 41.1 mg/L de Envidor® 240SC (Fig. 32A¹), y del porcentaje de expresión de γ H2AV comparados con los grupos testigos (*ATM^{tefu}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 32A1-A2) y cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.0001$) (Fig. 33A). Adicionalmente, la concentración de 24.6 mg/L de Envidor® 240SC evidencia ausencia de núcleos en la R3 (Fig. 32A5-A6, línea punteada amarilla), comparado con el grupo testigo (*ATM^{tefu}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 32A1-A2). El análisis de regresión lineal evidencia que la respuesta

genotóxica del insecticida Envidor® 240SC en hembras *ATM^{tefu}* no es dependiente de la concentración ($r^2 = 0.77$) (Fig. 33B).

En hembras mutantes *ATR^{mei-29D}* a las 72 h de exposición las concentraciones de 12.3, 24.6 y 41.1 mg/L de Envidor® 240SC, aumentan significativamente los DBS en el ADN del germario (Fig. 32B3-B8) y el porcentaje de expresión de γ H2AV comparado con los grupos testigos *ATR^{mei-29D}* (0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 32B1-B2) y cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.0001$) (Fig. 33A). A la concentración de 24.6 mg/L de Envidor® 240SC se evidencia ausencia de núcleos en la región 3 (Fig. 32B5-B6, línea punteada amarilla) comparado con el grupo testigo (*ATR^{mei-29D}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 32B1-B2). El análisis de regresión lineal muestra que la respuesta genotóxica del insecticida Envidor® 240SC en hembras mutantes *ATR^{mei-29D}* no es dependiente de la concentración ($r^2 = 0.29$) (Fig. 33C).

En hembras de *Drosophila* *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* expuestas a las concentraciones 12.3 y 41.1 mg/L de Envidor® 240SC por 72 h, aumentan significativamente los rompimientos de doble cadena en el ADN en las R1 y R3 del germario (Fig. 32C3-C4, C7-C8) y el porcentaje de expresión de γ H2AV, comparado con los grupos testigos (*Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 32C1-C2) y cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.0001$) (Fig. 33A). La concentración de 24.6 mg/L de Envidor® 240SC, no incrementa los DBS en el ADN y el porcentaje de expresión de γ H2AV en el germario (Fig. 32C5-C6) con relación a los grupos testigos (*Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 32C1-C2) y cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.0001$) (Fig. 31A). Sin embargo, la exposición a las tres concentraciones del insecticida Envidor® 240SC inhibe la proliferación celular evidenciado por la ausencia de núcleos en todas las regiones del germario, así como alteraciones en la morfología (Fig. 32C3-C8 línea punteada amarilla) comparado con el grupo testigo (*Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 32C1-C2). El análisis de regresión lineal evidencia que no hay respuesta de concentración-efecto del insecticida Envidor® 240SC en hembras *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* ($r^2 = 0.11$) (Fig. 33D).

En hembras mutantes *Chk1^{grp}* expuestas las concentraciones 12.3, 24.6 y 41.1 mg/L de Envidor® 240SC incrementan significativamente los DBS en el ADN en todas las regiones del germario (Fig. 32D3-D8) y el porcentaje de expresión de γ H2AV, comparado con los

grupos testigos (*Chk1^{grp}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 32D1-D2) y cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.0001$) (Fig. 33A). El análisis de regresión lineal evidencia que no hay respuesta de concentración-efecto con el insecticida Envidor® 240SC en hembras *Chk1^{grp}* ($r^2 = 0.69$) (Fig. 32E).

Finalmente, en hembras de *D. melanogaster* mutantes *p53^{dp53}*, las concentraciones 12.3, 24.6 y 41.1 mg/L de Envidor® 240SC aumentan significativamente los DBS en el ADN en todas las regiones del germario (Fig. 32E3-E8) y el porcentaje de expresión de γ H2AV comparado con los grupos testigos (*p53^{dp53}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 32E1-E2) y cepa silvestre (Oregon R) ($p < 0.0001$) (Fig. 33A). La concentración de 41.1 mg/L produce alteraciones morfológicas y reduce el tamaño del germario (Fig. 32E7) comparado con el grupo testigo (*p53^{dp53}* 0.0 mg/L de plaguicida) (Fig. 32E1-E2). El análisis de regresión lineal evidencia que no hay respuesta de concentración-efecto con el insecticida Envidor® 240SC en la mutante *p53^{dp53}* ($r^2 = 0.52$) (Fig. 33F).

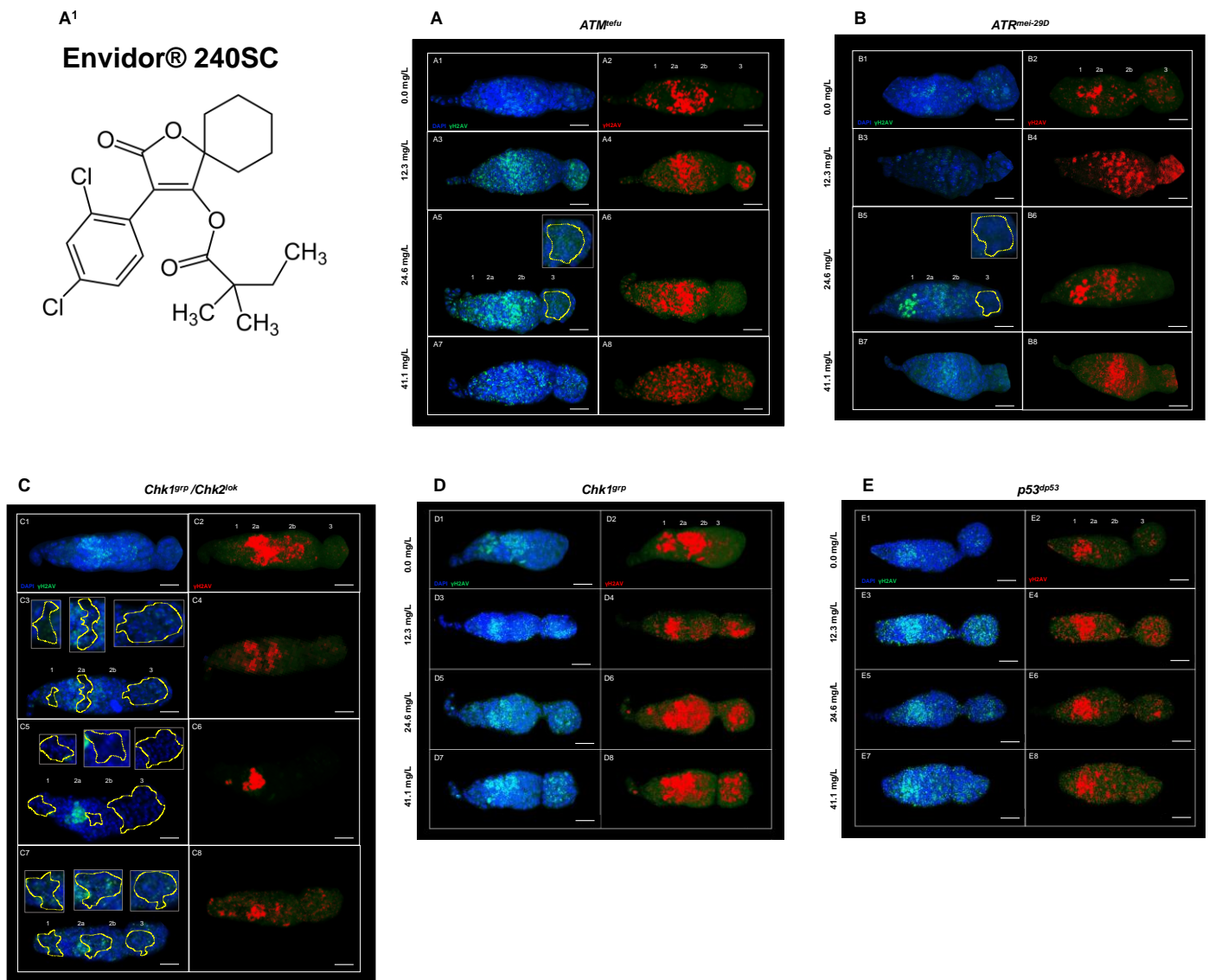


Figura 32. (A-E) Germario de hembras mutantes DDR inmunoteñidos contra anti- γ H2AV después de 72 h de exposición a concentraciones de 0.0, 12.3, 24.6 y 41.1 mg/l a Envidor® 240SC. Imagen compuesta en azul DAPI marcando los núcleos celulares y en verde γ H2AV, inmunolocalización roja de γ H2AV en el germario, la barra de escala representa 10 μ m. (A¹) Estructura química del Spirodiclofen (i.a. Envidor® 240SC). (A) *ATM^{efu}*. (A1-A2) expresión de γ H2AV en las regiones 1, 2a, 2b del germario. (A3-A4) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario. (A5-A6) expresión de γ H2AV en las regiones 1, 2a y 2b del germario y ausencia de núcleos en la región 3 (línea punteada amarilla). (A7-A8) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario. (B) *ATR^{mei-29D}*. (B1-B4) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario. (B5-B6) expresión de γ H2AV en las regiones 1, 2a y 2b del germario, ausencia de núcleos en la región 3 (línea punteada amarilla) y cambios morfológicos. (B7-B8) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario. (C) *Chk1^{srp}/Chk2^{lok}*. (C1-C2) expresión de γ H2AV en las regiones 2a y 2b del germario. (C3-C4) expresión de γ H2AV en las regiones 1 y 2a del germario y ausencia de núcleos en las regiones 1, 2a y 3 (línea punteada amarilla). (C5-C6) expresión de γ H2AV en la región 2a del germario, ausencia de núcleos en las regiones 1, 2a y 3 (línea punteada amarilla) y cambios morfológicos. (C7-C8) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario y ausencia de núcleos en las regiones 1, 2b y 3 (línea punteada amarilla). (D) *Chk1^{srp}*. (D1-D2) expresión de γ H2AV en las regiones 1, 2a y 2b del germario. (D3-D8) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario. (E) *p53^{dp53}*. (E1-E2) expresión de γ H2AV en las regiones 2a y 3 del germario. (E3-E6) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario. (E7-E8) expresión de γ H2AV en todas las regiones del germario, cambios morfológicos y reducción del tamaño del germario.

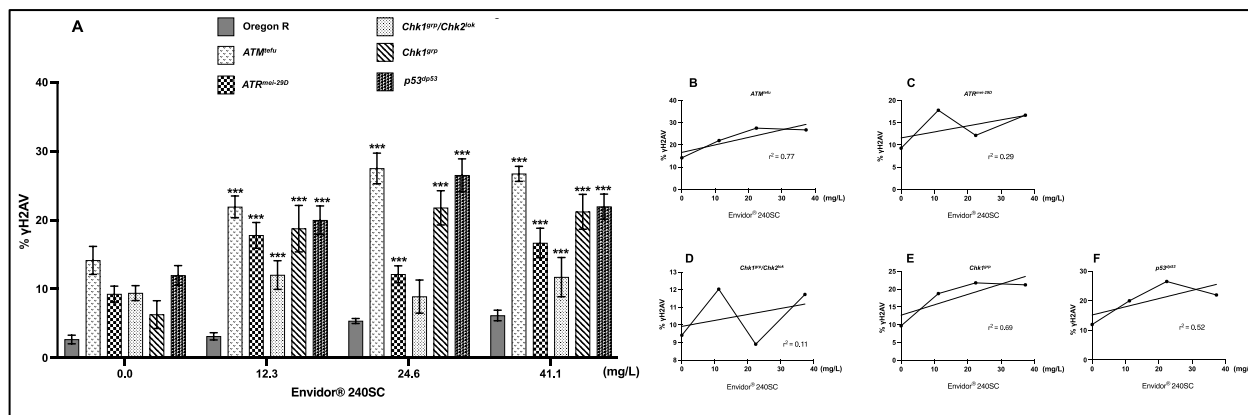


Figura 33. (A) Promedios de tres experimentos independientes del (%) de expresión de γ H2AV en el germario de la cepa silvestre Oregon R y DDR deficientes, con y sin exposición al insecticida cetoenol Envidor® 240SC. ***Diferencias significativas ($p < 0.0001$), ANOVA de dos vías y prueba post-hoc Tukey. (B-F) Análisis de regresión lineal.

VIII DISCUSIÓN

Los resultados del estudio revelan que las concentraciones de 22.4 y 37.3 mg/L de Movento® 240SC y 12.3, 24.6 y 41.1 mg/L de Envidor® 240SC por 72 h inducen daño en el ADN de células ováricas de hembras silvestres de *D. melanogaster* (Oregon R), evidenciado por el aumento significativo en el promedio de tres parámetros genotóxicos: longitud, momento e intensidad de la cauda. Sin embargo, a la concentración de 11.2 mg/L de Movento® 240SC, únicamente incrementa la intensidad de la cauda comparado con el grupo testigo. La inducción de daño en el genoma de células ováricas es dependiente de la concentración para ambos insecticidas. Posiblemente, uno de los mecanismos de genotoxicidad de los insecticidas Movento® 240SC y Envidor® 240SC en el ovario de hembras silvestres Oregon R es a través de la inducción de estrés oxidante al incrementar la producción de ERO como el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), evidenciado por el aumento de la actividad de los antioxidantes endógenos SOD y CAT y del marcador de peroxidación lipídica MDA en todos los grupos experimentales comparado con el grupo testigo, dependiente de concentración. Los resultados genotóxicos y de las actividades de los antioxidantes endógenos obtenidos en esta investigación están sustentados por los datos reportados en celomocitos de lombrices de tierra (*Esenia fétida*) expuestas a 1.25 y 2.5 mg/Kg de Spirotetramat (principio activo de Movento® 240SC) durante 14, 21 y 28 días, en

los cuales se evidencia aumento de estrés oxidante y lipoperoxidación correlacionado con fragmentación del material genético (Zhang *et al.*, 2015). Similarmente en meristemos de *Allium cepa* expuestas a 20 mg/L de Spirodiclofen por 72 h, determinaron aumento de daño al ADN, estrés oxidante y lipoperoxidación (Çavuşoğlu *et al.*, 2021).

La lipoperoxidación en ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares produce diversas alteraciones en la estructura como fragmentación, cambios en el potencial producto de las ERO y alteraciones en las vías de señalamiento celular (Pérez *et al.*, 2008), está confirmado que el MDA, interacciona con las bases guanina del ADN, formando aductos con actividad genotóxica (Ayala *et al.*, 2014). Probablemente una de las principales interacciones de las ERO con las bases del genoma contribuyen a la formación de roturas de cadena sencilla (SSB) y doble (DSB) en el ADN (Meissner, 2007), evidenciado por el incremento significativo del porcentaje de expresión de la histona γ H2AV en las regiones 2b y 3 del germario de los ovarios de *D. melanogaster* silvestre (Oregon R) después de la exposición a las concentraciones de 11.2, 22.4 y 37.3 mg/L de Movento® 240SC y 24.6 y 41.1 mg/L de Envidor® 240SC por 72 h, dependiente de concentración del insecticida Envidor® 240SC, pero no de Movento® 240SC. La exposición a las tres concentraciones de Envidor® 240SC, produce alteraciones estructurales en el germario comparado con el germario del grupo testigo, lo más probable es que estas alteraciones morfológicas sean causadas por los peróxidos de lípidos que afectan a la membrana del germario.

Esta reportado que la inducción y visualización de los DSB mediante la expresión de γ H2AV en *Drosophila melanogaster* es exclusivamente en ovocitos en la subfase de paquiteno de la profase I de la meiosis I, en la región 2a, los cuales son reparados antes de su diferenciación en la región 3 (Jang *et al.*, 2003; Gorski *et al.*, 2004). Por lo tanto, la expresión de γ H2AV en las regiones 2b y 3 del germario después de la exposición a Movento® 240SC y Envidor® 240SC, indican que ambos insecticidas actúan como agentes genotóxicos a través de la producción de DSB.

Al comparar la acción genotóxica de ambos plaguicidas en el germario de *D. melanogaster* Oregon R, se evidencia que el insecticida Movento® 240SC induce mayor aumento en el porcentaje de expresión de γ H2AV (DSB) que el insecticida Envidor® 240SC, quizás

derivado mayor incremento ERO y lipoperoxidación inducido por Movento® 240SC que con Envidor® 240SC. Por lo que apoya que Movento® 240SC induce rompimientos de doble cadena (DSB) en el ADN mientras que Envidor® 240SC produce primariamente rompimientos de cadena sencilla (SSB) y secundariamente DSB, observado por el incremento significativo en la expresión de γ H2AV en hembras de *D. melanogaster* mutante *ATM^{tefu}* después de la exposición a 11.2, 22.4 y 37.3 de Movento® 240SC mg/L y en hembras mutantes *ATR^{mei-29D}* y *ATM^{tefu}*, después de la exposición a 12.3, 24.6 y 41.1 mg/L del insecticida Envidor® 240SC comparado con el porcentaje de expresión de hembras silvestres Oregon expuestas a las mismas concentraciones.

Adicionalmente, revela que Movento® 240SC activa la vía de respuesta al daño al ADN (DDR) mediada por la cinasa ATM, evidenciado por el incremento significativo en la expresión de γ H2AV en hembras de *D. melanogaster* mutante *ATM^{tefu}* y que únicamente a la concentración más elevada 37.3 mg/L se activan ambas cinasas *ATM^{tefu}* y *ATR^{mei-29D}*. Mientras que la exposición al insecticida Envidor® 240SC activa ambas cinasas *ATR^{mei-29D}* y *ATM^{tefu}*. Está documentado que ATM actúa ante la inducción de DSB, mientras que ATR responde a roturas de cadena sencilla (SSB) y horquillas de replicación estancadas (Sekelsky, 2017). No obstante, algunos estudios han indicado que la inducción de estrés oxidante puede conducir a la acumulación de SSB y estructuras de ADN aberrantes (sitiosapurínicos/apirimidínicos) que son difíciles de reparar y pueden conducir a la formación de DSB, si no son reparadas, el destino de las células dañadas es hacia la muerte celular (Whang *et al.*, 2003). Sin embargo ATM y ATR con frecuencia pueden ser activadas simultáneamente (Roos y Kaina, 2013), lo que podría explicar porque en hembras mutantes *ATR^{mei-29D}* se induce mayor expresión del marcador γ H2AV después de la exposición a la concentración de 37.3 mg/L (más elevada) de Movento® 240SC, e incremento en los niveles de ERO, observado por la elevada actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD, que no son capaces de contrarrestar su interacción con el genoma y la membrana celular de las células del germario. Por lo que, probablemente en las hembras mutantes *ATM^{tefu}* y *ATR^{mei-29D}* expuestas a la concentración de 24.6 mg/L de Envidor® 240SC, la reducción de diámetro y ausencia de núcleos en la región 3 (primer estadio de la ovogénesis), es por bloqueo de la proliferación celular inducida por el estrés oxidante que afectan las vías de señalamiento del ciclo y diferenciación de las células germinales del germario.

Una respuesta importante ante la inducción de daño en el ADN es la activación de los puntos de control del ciclo celular, para iniciar procesos de reparación al genoma, este mecanismo está regulado por la activación de las cinasas Chk1 y Chk2 dependiente de ATR y ATM, respectivamente (Bartek y Lukas, 2007, Zhao *et al.*, 2023). No obstante, si la extensión del daño excede la capacidad de reparación, se activan cascadas de señalización adicionales, para asegurar la eliminación de estas células dañadas (Sekelsky, 2017). El incremento significativo en la expresión de γ H2AV en hembras de las cepas mutantes *Chk1^{grp}* y *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* expuestas a las mismas concentraciones de los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC. Evidencian que la activación de las cinasas *Chk1^{grp}* y *Chk2^{lok}* es determinante para activar mecanismos de respuesta y reparación del daño al ADN inducido por ambos insecticidas cetoenoles en las células germinales. Sin embargo, la inducción de alteraciones morfológicas y ausencia de núcleos celulares en las regiones: 1 lugar de residencia de las células madre germinales, 2a y 2b regiones donde inicia y progresa la meiosis (Hatkevich *et al.*, 2021), del germario de hembras mutantes *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* se infiere que quizás la cinasa *Chk2^{lok}* tiene una función esencial para activar de los mecanismos de respuesta y reparación del daño al ADN y que su ausencia produce inhibición de la proliferación y muerte celular.

Interesantemente, en ambos insecticidas, las alteraciones morfológicas e inhibición de la proliferación fue mayor en las cepas mutantes *Chk1^{grp}/Chk2^{lok}* a concentraciones intermedias, en las cuales se observa menor incremento en la actividad de los antioxidantes endógenos SOD y CAT comparado con las concentraciones elevadas de los insecticidas Movento® 240SC y de Envidor® 240SC. Esto podría indicar que a estas concentraciones se inhibe la transcripción génica de los mecanismos de respuesta ante la inducción de estrés oxidante y de reparación al ADN. Está bien documentado que las ERO afectan diferentes vías de señalización, la transcripción génica, la traducción proteica, así como la maduración de los ovocitos, la foliculogénesis, la esteroidogénesis ovárica, la luteolisis y el desarrollo embrionario (Agarwal *et al.*, 2005, 2012). En *D. melanogaster*, el daño al material genético y la inducción de estrés oxidante está relacionado con muerte celular en las cámaras ováricas, retrasos en las etapas de la ovogénesis y disminución del tamaño de los ovarios (Panagopoulos *et al.*, 2007; Panagopoulos, 2012). Por lo que los mecanismos de respuesta y reparación del ADN en las células germinales son necesarios para controlar la proliferación

y diferenciación de la línea germinal, para mantener la estabilidad genética, para garantizar la producción de gametos, la sobrevivencia embrionaria y la permanencia de la descendencia (Drummond-Barbosa, 2019; Stringer *et al.*, 2020).

Uno de los sustratos mejor conocidos de Chk2 es la proteína supresora de tumores p53 la cual actúa como factor transcripcional regulando la actividad de genes implicados en la reparación del ADN y apoptosis (Chehab *et al.*, 2000; Shieh *et al.*, 2000). Por lo que finalmente, fue posible evidenciar que los mecanismos de reparación del ADN son dependientes de p53 para el insecticida Envidor® 240SC mediante incremento significativo de la expresión de γ H2AV en hembras mutantes $p53^{dp53}$ expuestas a las concentraciones de 12.3, 24.6 y 41.1 mg/L, pero no para Movento® 240SC en el cual únicamente fue observado aumento significativo de la expresión de γ H2AV en hembras mutantes $p53^{dp53}$ expuestas a la concentración más elevada 37.3 mg/L. Sin embargo, aunque p53 activa mecanismos de reparación de daño al ADN, posiblemente en este estudio esta proteína no está implicada en la activación de muerte celular después de la exposición al insecticida Envidor® 240SC, quizás la ausencia de núcleos celulares evidenciados por DAPI en el germario en hembras mutantes $p53^{dp53}$ y en $Chk1^{grp}/Chk2^{lok}$, es producto de las alteraciones en estructura de la membrana por los ERO y peróxidos de lípidos.

Esta publicado que Chk2 además de activar p53 puede regular la activación de factores de transcripción como FOXO1 (Tan *et al.*, 2007). FOXO1 está involucrado en el metabolismo, la proliferación y supervivencia celular (Paik *et al.*, 2007; Evans-Anderson *et al.*, 2008). Algunos estudios han indicado que FOXO1 también responde ante la inducción de estrés oxidante (Sengupta *et al.*, 2009). Esto podría sustentar porque se observan ausencia de núcleos celulares en el germario en hembras de la cepa mutante deficiente de $Chk1^{grp}/Chk2^{grp}$, pero no en hembras de la cepa mutante $p53^{dp53}$. Quizá en ausencia de Chk2, FOXO1 no pueda ser activado y consecuentemente regular la proliferación y supervivencia celular. La regulación negativa de la expresión de FOXO1 ya ha sido reportado en ovarios de ratonas expuestas a Movento, en los cuales, adicionalmente, el análisis histológico revelo daños en las membranas celulares, fragmentación nuclear y muerte celular de células de la granulosa ovárica (Kafshgiri *et al.*, 2016).

Con base a los resultados obtenidos en este estudio, se plantea como hipótesis el siguiente mecanismo de genotoxicidad (Fig. 34) y de respuesta al daño al ADN inducido por los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC (Fig. 35).

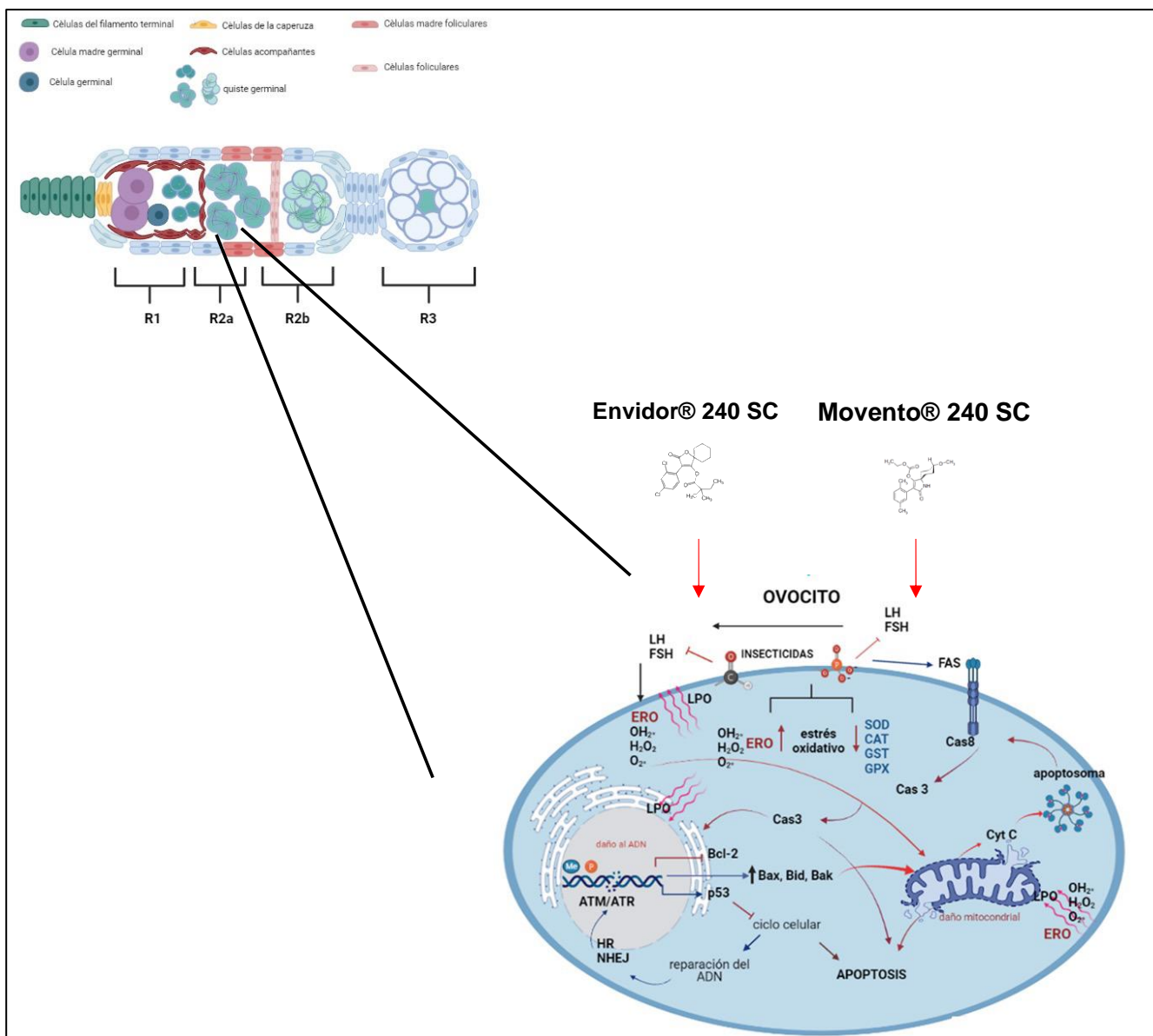


Figura 34. Mecanismo de toxicidad y genotoxicidad inducido por los insecticidas cetoenoles Movento® 240SC y Envidor® 240SC (González Marín, 2023).

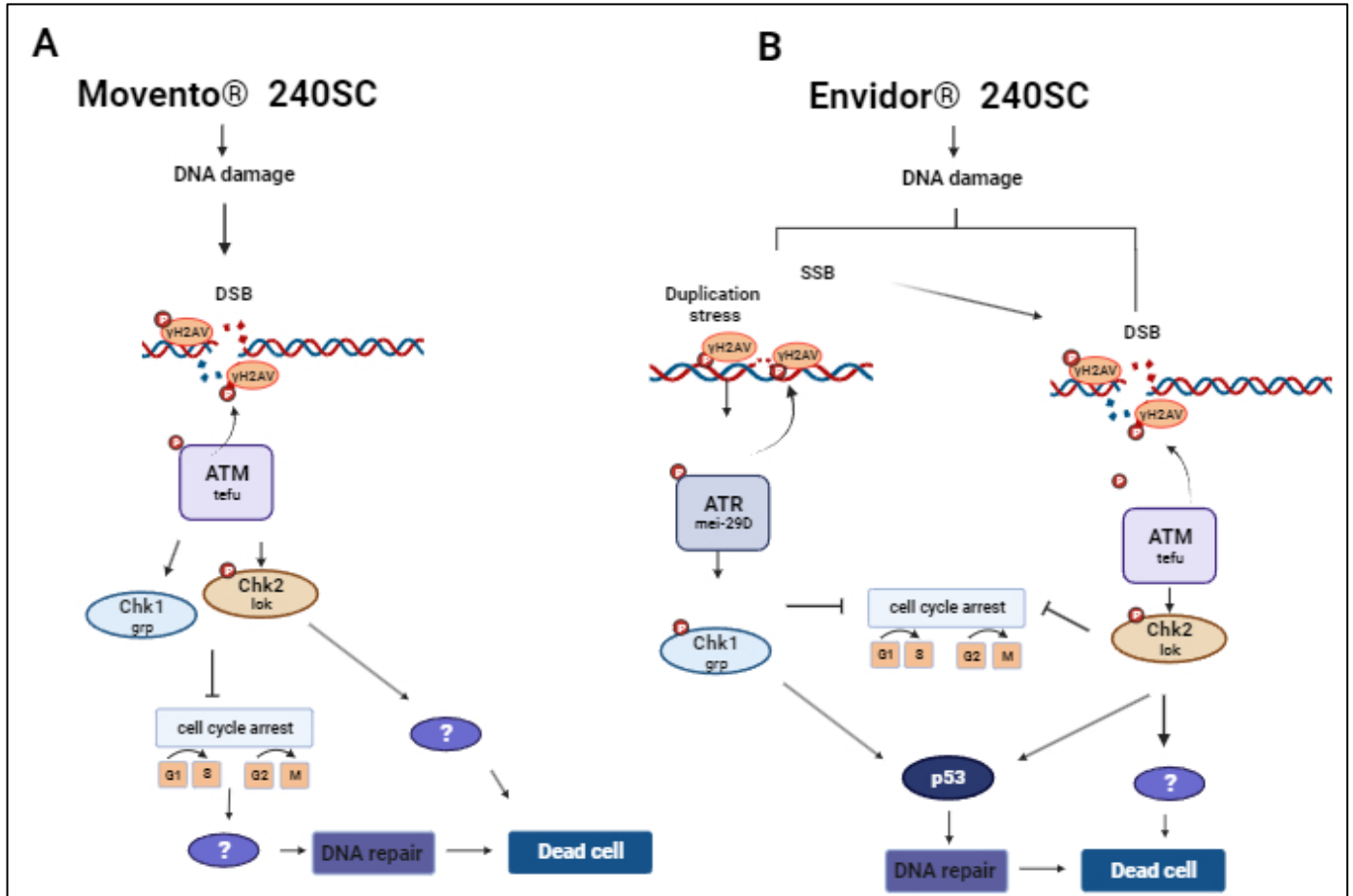


Figura 35. Mecanismo de respuesta al daño al ADN (DDR) inducido por los insecticidas cetoenoles. (A) DDR provocado por Movento® 240SC. (B) DDR inducido por Envidor® 240SC (González- Marín *et al.*, 2023).

IX CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se evidencia que los insecticidas cetoenoles comerciales Movento® 240SC y Envidor® 240SC actúan como agentes genotóxicos a través de la inducción de estrés oxidante. También se determina que Movento® 240SC induce rompimientos de cadena doble (DSB) mientras que Envidor® 240SC induce primariamente rompimiento de cadena sencilla (SSB) que conducen a la formación de DSB. Finalmente, se identifica que la DDR inducido por Movento® 240SC depende de la activación de las cinasas ATM^{tefu}, Chk1^{grp} y Chk2^{lok} y únicamente a la concentración más elevada 37.3 mg/L de Movento® 240SC responde la cinasa ATR^{mei-29D} y p53^{dp53}. Con el

insecticida Envidor® 240SC se evidencia que la DDR depende de la activación de las cinasas $ATR^{mei-29D} / Chk1^{grp}$ y $ATM^{tefu} / Chk2^{lok}$ y los mecanismos de reparación son dependientes de $p53^{dp53}$. Los datos obtenidos revelan que ambos insecticidas cetoenoles representan un riesgo potencial para el sistema reproductor femenino afectando la proliferación, maduración y desarrollo de las células germinales que consecuentemente podría repercutir en la cantidad, calidad de los ovocitos y la tasa de fertilidad y sobrevivencia embrionaria. Sin embargo, aún se requiere realizar más estudios para elucidar caracterizar completamente los mecanismos de genotoxicidad y de respuesta y reparación del ADN inducidos por esta clase de insecticidas.

X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr, Lal, A., Kim, H. H., Galban, S., Yang, X., Blethrow, J. D., Walker, M., Shubert, J., Gillespie, D. A., Furneaux, H., y Gorospe, M. (2007). Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Molecular Cell*, 25(4), 543–557. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.011>

Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., y Rezaie, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: A review. *Medical science monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 10(6), RA141–RA147.

Abdou, M.M., El-Saeed, R.A., Abozeid, M.A., Sadek, M. G., Zaki, E., Barakat, Y., y Bondock, S. (2019). Advancements in tetronic acid chemistry. Part 1. Synthesis and reactions. *Arabian Journal of Chemistry*, 12, 464–475.

Abolaji, A. O., Kamdem, J. P., Lugokenski, T. H., Farombi, E. O., Souza, D. O., da Silva Loreto, É. L., y Rocha, J. B. T. (2015). Ovotoxicants 4-vinylcyclohexene 1,2-monoepoxide and 4-vinylcyclohexene diepoxide disrupt redox status and modify different electrophile sensitive target enzymes and genes in *Drosophila melanogaster*. *Redox Biology*, 5, 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.001>

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., y Venter, J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2185–2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>

Adamkovicova, M., Toman, R., Cabaj, M., Massanyi, P., Martiniakova, M., Omelka, R., Krajcovicova, V., y Duranova, H. (2014). Effects of subchronic exposure to cadmium and diazinon on testis and epididymis in rats. *The Scientific World Journal*, 632581. <https://doi.org/10.1155/2014/632581>

Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)

Afolabi, O. K., Aderibigbe, F. A., Folarin, D. T., Arinola, A., y Wusu, A. D. (2019). Oxidative stress and inflammation following sub-lethal oral exposure of cypermethrin in rats: mitigating potential of epicatechin. *Heliyon*, 5(8), e02274. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02274>

Affleck, J. G., y Walker, V. K. (2019). *Drosophila* as a model for developmental toxicology: using and extending the drosophotoxycology model. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1965, 139–153. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9182-2_10

Agbohessi, P. T., Imorou Toko, I., Houndji, A., Gillardin, V., Mandiki, S. N., y Kestemont, P. (2013). Acute toxicity of agricultural pesticides to embryo-larval and juvenile African catfish *Clarias gariepinus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(4), 692–700. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9871-3>

Agarwal, A., Gupta, S., y Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>

Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., y Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10, 49. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>

Aguilera, A., y Gómez-González, B. (2008). Genome instability: A mechanistic view of its causes and consequences. *Nature reviews. Genetics*, 9(3), 204–217. <https://doi.org/10.1038/nrg2268>

Aguilar-Garduño, C., Lacasaña, M., Blanco-Muñoz, J., Rodríguez-Barranco, M., Hernández, A. F., Bassol, S., González-Alzaga, B., y Cebrián, M. E. (2013). Changes in male hormone profile after occupational organophosphate exposure. A longitudinal study. *Toxicology*, 307, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.11.001>

Ahmad, I., y Ahmad, M. (2016). Fresh water fish, *Channa punctatus*, as a model for pendimethalin genotoxicity testing: A new approach toward aquatic environmental contaminants. *Environmental Toxicology*, 31(11), 1520–1529. <https://doi.org/10.1002/tox.22156>

Aikens, J., y Dix, T. A. (1991). Peroxy radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *The Journal of Biological Chemistry*. 266(23), 15091–15098.

Alaraby, M., Romero, S., Hernández, A., y Marcos, R. (2019). Toxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in *Drosophila*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60(3), 277–285. <https://doi.org/10.1002/em.22262>

Ali, U., Syed, J. H., Malik, R. N., Katsoyiannis, A., Li, J., Zhang, G., y Jones, K. C. (2014). Organochlorine pesticides (OCPs) in South Asian region: A review. *The Science of the Total Environment*, 476-477, 705–717. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.107>

Al-Nasir, F., Jiries, A.G., Al-Rabadi, G.J., Alu'datt, M.H., Tranchant, C.C., Al-Dalain, S.A., Alrabadi, N., Madanat, O.Y., y Al-Dmour, R.S. (2020). Determination of pesticide residues in selected citrus fruits and vegetables cultivated in the Jordan Valley. *Lwt - Food Science and Technology*, 123, 109005.

- Alp, H., Aytakin, I., Hatipoglu, N. K., Alp, A., y Ogun, M. (2012). Effects of sulforophane and curcumin on oxidative stress created by acute malathion toxicity in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 16 Suppl 3, 144–148.
- Anand, M., y Taneja, A. (2020). Organochlorine pesticides residue in placenta and their influence on anthropometric measures of infants. *Environmental Research*, 182, 109106. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.109106>.
- Aniya, Y., y Naito, A. (1993). Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 45(1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90374-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90374-6)
- Andersen, S. L., Bergstralh, D. T., Kohl, K. P., LaRocque, J. R., Moore, C. B., y Sekelsky, J. (2009). *Drosophila* MUS312 and the vertebrate ortholog BTBD12 interact with DNA structure-specific endonucleases in DNA repair and recombination. *Molecular Cell*, 35(1), 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.019>
- Antoni, L., Sodha, N., Collins, I., y Garrett, M. D. (2007). CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nature reviews. Cancer*, 7(12), 925–936. <https://doi.org/10.1038/nrc2251>
- APVMA- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. (2009). Evaluation of the new active Spirotetramat in the product Movento 240 SC Insecticide. Consultado el 25 de abril 2020 de <http://apvma.gov.au/node/13471>
- APVMA- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. (2015). Spirotetramat in the product Movento 240 SC Insecticide. 978-1-922188-66-3. Consultado el 25 de abril 2020 de <http://apvma.gov.au/node/13471>
- Arab, S. A., Nikraves, M. R., Jalali, M., y Fazel, A. (2018). Evaluation of oxidative stress indices after exposure to malathion and protective effects of ascorbic acid in ovarian tissue of adult female rats. *Electronic Physician*, 10(5), 6789–6795. <https://doi.org/10.19082/6789>
- Arias, A. M. (2008). *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 420, 1–25. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_1
- Arcury, T. A., Laurienti, P. J., Chen, H., Howard, T. D., Barr, D. B., Mora, D. C., Summers, P., y Quandt, S. A. (2016). Organophosphate Pesticide Urinary Metabolites Among Latino Immigrants: North Carolina Farmworkers and Non-farmworkers Compared. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 58(11), 1079–1086. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000875>
- Arango, S. S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 75–82.
- Atamaniuk, T. M. Kubrak, O. I. Storey, K. B. Lushchak, y V. I. (2013). “Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): Studies with goldfish gills,” *Ecotoxicology*. 22(10), 1498-1508.
- Avila-Vazquez, M., Difilippo, F., Mac Lean, B., Maturano, E., y Etchegoyen, A. (2018). Environmental exposure to glyphosate and reproductive health impacts in agricultural population of Argentina. *Journal of Environmental Protection*, 9(03), 241.

- Avanesian, A., Semnani, S., y Jafari, M. (2009). Can *Drosophila melanogaster* represent a model system for the detection of reproductive adverse drug reactions? *Drug Discovery Today*, 14(15-16), 761–766. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.05.010>
- Azab, B., Alassaf, A., Abu-humdan, A., Dardas Z, Almousa, H., Alsalem, M., Khabour, O., Hammad, H., y Awidi, A. (2019). Genotoxicity of cisplatin and Interdisciplinary carboplatin in cultured human lymphocytes: a comparative study. *Interdisciplinary Toxicology*, 12(2), 93–97.
- Aznar-Aleman, Ò., Giménez, J., de Stephanis, R., Eljarrat, E., y Barceló, D. (2017). Insecticide pyrethroids in liver of striped dolphin from the Mediterranean sea. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 225, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.02.060>
- Babić, S., Barišić, J., Stipaničev, D., Repec, S., Lovrić, M., Malev, O., Martinović-Weigelt, D., Čož-Rakovac, R., y Klobučar, G. (2018). Assessment of river sediment toxicity: Combining empirical Zebrafish embryotoxicity testing with in silico toxicity characterization. *The Science of the Total Environment*, 643, 435–450. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.124>
- Baenas, N., y Wagner, A. E. (2019). *Drosophila melanogaster* as an alternative model organism in nutrigenomics. *Genes & nutrition*, 14, 14. <https://doi.org/10.1186/s12263-019-0641-y>
- Bailey, D. C., Todt, C. E., Orfield, S. E., Denney, R. D., Snapp, I. B., Negga, R., Montgomery, K. M., Bailey, A. C., Pressley, A. S., Traynor, W. L., y Fitsanakis, V. A. (2016). *Caenorhabditis elegans* chronically exposed to a Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide show mitochondrial Complex I inhibition and increased reactive oxygen species. *Neurotoxicology*, 56, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.07.011>
- Bakkenist, C. J., yKastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), 499–506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>
- Ballester, M. (1996). Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico [Anti-oxidants, free radicals, and health. A chemical, organic, and physical approach]. *Medicina Clinica*, 107(13), 509–515.
- Barati, E., Nikzad, H., y Karimian, M. (2020). Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(1), 93–113. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03253-8>
- Bartek, J., Falck, J., yLukas, J. (2001). CHK2 kinase--a busy messenger. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 2(12), 877–886. <https://doi.org/10.1038/35103059>
- Bartek, J., y Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.009>
- Bártová, E., Krejčí, J., Harnicarová, A., Galiová, G., y Kozubek, S. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 56(8), 711–721. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.951251>

Bastock, R., y St Johnston, D. (2008). *Drosophila* oogenesis. *Current Biology*, 18(23), R1082–R1087. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.011>

Bassil, K. L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D. C., Kaur, J. S., y Kerr, K. J. (2007). Cancer health effects of pesticides: Systematic review. *Canadian Family Physician Medecin de Famille Canadien*, 53(10), 1704–1711.

Bast, A., Haenen, G. R., y Doelman, C. J. (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American Journal of Medicine*, 91(3C), 2S–13S. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90278-6](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90278-6)

Banfi, S., Borsani, G., Rossi, E., Bernard, L., Guffanti, A., Rubboli, F., Marchitello, A., Giglio, S., Coluccia, E., Zollo, M., Zuffardi, O., y Ballabio, A. (1996). Identification and mapping of human cDNAs homologous to *Drosophila* mutant genes through EST database searching. *Nature Genetics*, 13(2), 167–174. <https://doi.org/10.1038/ng0696-167>

Bayer. (2018). Ecotoxicological profile of the insecticide cetoenoles. Consultado el 20 de julio 2020 de de www. BayerCropscience México.

Bayer. (2021). Movento 240 insecticide. Consultado el 30 de mayo 2020 de: <https://www.crop.bayer.com.au/find-crop-solutions/by-product/insecticides/movento-240-sc-insecticide>

Beane Freeman, L. E., Bonner, M. R., Blair, A., Hoppin, J. A., Sandler, D. P., Lubin, J. H., Dosemeci, M., Lynch, C. F., Knott, C., y Alavanja, M. C. (2005). Cancer incidence among male pesticide applicators in the agricultural health study cohort exposed to diazinon. *American Journal of Epidemiology*, 162(11), 1070–1079. <https://doi.org/10.1093/aje/kwi321>

Bellen, H. J., Tong, C., y Tsuda, H. (2010). 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: A history lesson for the future. *Nature reviews. Neuroscience*, 11(7), 514–522. <https://doi.org/10.1038/nrn2839>

Berkeley *Drosophila* Genome Project. (1999). Sequence similarities of human inherited disease genes with *Drosophila* DNA. <http://www.fruitfly.org/sequence/human2fly.html>

Benzi, G., yMoretti, A. (1995). Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free radical biology and Medicine*, 19(1), 77–101. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00244-e](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00244-e)

Benedetti, D., Nunes, E., Sarmiento, M., Porto, C., Dos Santos, C. E., Dias, J. F., y da Silva, J. (2013). Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation research*, 752(1-2), 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.01.001>

Bi, X., Wei, S. C., y Rong, Y. S. (2004). Telomere protection without a telomerase; the role of ATM and Mre11 in *Drosophila* telomere maintenance. *Current Biology*, 14(15), 1348–1353. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.063>

Bilder, D., y Haigo, S. L. (2012). Expanding the morphogenetic repertoire: Perspectives from the *Drosophila* egg. *Developmental Cell*, 22(1), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.003>

- Bielski, B. H., Arudi, R. L., y Sutherland, M. W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(8), 4759–4761.
- Bier, E. (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature reviews. Genetics*, 6(1), 9–23. <https://doi.org/10.1038/nrg1503>
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., y Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nature reviews. Urology*, 14(8), 470–485. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>
- Bolus, H., Crocker, K., Boekhoff-Falk, G. y Chtarbanova, S. (2020). Modeling Neurodegenerative Disorders in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3055. <https://doi.org/10.3390/ijms21093055>
- Bonilla, E., Hernández, F., Cortés, L., Mendoza, M., Mejía, J., Carrillo, E., Casas, E., & Betancourt, M. (2008). Effects of the insecticide's malathion and diazinon on the early oogenesis in mice in vitro. *Environmental Toxicology*, 23(2), 240–245. <https://doi.org/10.1002/tox.20332>
- Bonassi, S., Norppa, H., Ceppi, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Znaor, A., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., Hansteen, I. L., Knudsen, L. E., Lazutka, J., Rossner, P., Sram, R. J., y Boffetta, P. (2008). Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*, 29(6), 1178–1183. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn075>
- Bouwman, H., Yohannes, Y. B., Nakayama, S. M. M., Motohira, K., Ishizuka, M., Humphries, M. S., van der Schyff, V., du Preez, M., Dinkelmann, A., y Ikenaka, Y. (2019). Evidence of impacts from DDT in pelican, cormorant, stork, and egret eggs from KwaZulu-Natal, South Africa. *Chemosphere*, 225, 647–658. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.043>
- Bownik, A., Kowalczyk, M., y Bańcerowski, J. (2019). Lambda-cyhalothrin affects swimming activity and physiological responses of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 216, 805–811. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.192>
- Buah-Kwofie, A., Humphries, M. S., y Pillay, L. (2018a). Bioaccumulation and risk assessment of organochlorine pesticides in fish from a global biodiversity hotspot: iSimangaliso Wetland Park, South Africa. *The Science of the Total Environment*, 621, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.212>
- Buettner, G. R., y Jurkiewicz, B. A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research*, 145(5), 532–541.
- Buettner, G. R., y Schafer, F. Q. (2000). Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratology*, 62(4), 234. [https://doi.org/10.1002/1096-9926\(200010\)62:4<234::AID-TERA10>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1096-9926(200010)62:4<234::AID-TERA10>3.0.CO;2-9)
- Brühl, C.A., y Zaller, J. G. (2019). Biodiversity decline as a consequence of an inadequate environmental risk assessment of pesticides. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 177.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., y Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42462–42467. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100466200>

- Bhattacharya, S., Khan, M. M., Ghosh, C., Bank, S., y Maiti, S. (2017). The role of Dermcidin isoform-2 in the occurrence and severity of Diabetes. *Scientific Reports*, 7(1), 8252. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07958-3>
- Brady, M. M., McMahan, S., ySekelsky, J. (2018). Loss of *Drosophila* Mei-41/ATR alters meiotic crossover patterning. *Genetics*, 208(2), 579–588. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300634>
- Brahmand, M. B., Yunesian, M., Nabizadeh, R., Nasser, S., Alimohammadi, M., y Rastkari, N. (2019). Evaluation of chlorpyrifos residue in breast milk and its metabolite in urine of mothers and their infants feeding exclusively by breast milk in north of Iran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 17(2), 817–825. <https://doi.org/10.1007/s40201-019-00398-3>
- Bretschneider, T., Fischer, R., Nauen, R., Lamberth, C., y Dinges, J. (2012). Tetrone acid insecticides and acaricides inhibiting acetyl-coa carboxylase. *Scientific Reports*, 7(1), 8252. <https://doi.org/10.1002/9783527664412.ch21>.
- Brodsky, M. H., Sekelsky, J. J., Tsang, G., Hawley, R. S., y Rubin, G. M. (2000). Mus304 encodes a novel DNA damage checkpoint protein required during *Drosophila* development. *Genes and Development*, 14(6), 666–678.
- Castañeda-Sortibrán, A. N., Flores-Loyola, C., Martínez-Martínez, V., Ramírez-Corchado, M. F., & Rodríguez-Arnaiz, R. (2019). Herbicide genotoxicity revealed with the somatic wing spot assay of *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(2), 295-305.
- CalEPA. (2006). Toxicology Data Review Summary for Spirodiclofen. California Environmental Protection Agency. p.p. 10. Consultado el 3 de agosto del 2020 de: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/risk/toxsums/toxsumlist.htm>
- Calderón-Segura, M. E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Calderón-Ezquerro, M. del C., Cortés-Eslava, J., García-Martínez, R., Flores-Ramírez, D., Rodríguez-Romero, M. I., Méndez-Pérez, P., y Bañuelos-Ruíz, E. (2012). Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to neonicotinoid insecticides news. *Journal of Toxicology*, 2012, 612647. <https://doi.org/10.1155/2012/612647>
- Calderón-Segura, M. E., Rojas, J. A. M., Brito, M. d. M., TecCab, M., Calderón-Ezquerro, M. C., y Gómez-Arroyo, S. (2015). Genotoxicity of the neonicotinoid insecticide poncho (Clothianidin) on CD1 mice based on alkaline comet and micronucleus assays. In M. L. Larramendy, and S. Soloneski (Eds.), *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*. IntechOpen.
- Calderón-Segura, M. E., Gómez-Arroyo, S., Cortés-Eslava, J., Martínez-Valenzuela, C., Mojica-Vázquez, L. H., Sosa-López, M., Flores-Ramírez, D., y Romero-Velázquez, Z. E. (2018). *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity of Furia®180 SC (zeta-cypermethrin) and Bulldock 125®SC (β-cyfluthrin) pyrethroid insecticides in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 28(4), 268–278. <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1402977>
- Campos-Ortega, J.A. y Hartenstein, V. (1985). The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin. 16 (10), 947-59.
- Carbajal-López, Y., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Calderón-Segura, M. E., y Martínez-Arroyo, A. (2016). Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero

state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(3), 2513–2520. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5474-7>

Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y., y Betancourt, M. (2010). Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in vitro: an International Journal published in association with BIBRA*, 24(1), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.004>

Casado, J. A., Merino, J., Cid, J., Subirá, M. L., y Sánchez-Ibarrola, A. (1996). Oxidantes y radicales libres en biomedicina [Oxidizing agents and free radicals in biomedicine]. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 40(3), 31–40.

Çavuşoğlu, D., Yalçın, E., Çavuşoğlu, K., Acar, A., y Yapar, K. (2021). Molecular docking and toxicity assessment of spirodiclofen: Protective role of lycopene. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(40), 57372–57385. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14748-y>

Cerezer, C., Marins, A. T., Cerezer, F. O., Severo, E. S., Leitemperger, J. W., Grubel Bandeira, N. M., Zanella, R., Loro, V. L., y Santos, S. (2020). Influence of pesticides and abiotic conditions on biochemical biomarkers in *Aegla aff. longirostri* (crustacea, anomura): Implications for conservation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 110982. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110982>

Ceschi-Bertoli, L., Vidal, F. A. P., Balsamo, P. J., y Abdalla, F. C. (2020). Comet assay protocol for *Bombus atratus* fat body and pericardial cells (Hymenoptera, bombini) at a safe concentration of mercury. *Chemosphere*, 261, 127752. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127752>

Ciccia, A., y Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Molecular Cell*, 40(2), 179–204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>

Ciğerci, İ. H., Liman, R., İstifli, E. S., Akyıl, D., Özkara, A., Bonciu, E., y Colă, F. (2023). Cytogenotoxic and behavioral effects of flubendiamide in *Allium cepa* root cells, *Drosophila melanogaster* and molecular docking studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1565. <https://doi.org/10.3390/ijms24021565>

COFEPRIS. (2009). Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Catálogo de Plaguicidas. Consultado el 30 de abril de: http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/catalogo_de_plaguicidas

Cohen, J. M., Beck, B. D., y Rhomberg, L. R. (2021). Historical perspective on the role of cell proliferation in carcinogenesis for DNA-reactive and non-DNA-reactive carcinogens: Arsenic as an example. *Toxicology*, 456, 152783. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152783>

Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., y Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143–151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>

Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., y Elledge, S. J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5547), 1713–1716. <https://doi.org/10.1126/science.1065521>

- Costes, S. V., Chiolo, I., Pluth, J. M., Barcellos-Hoff, M. H., y Jakob, B. (2010). Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutation Research*, 704(1-3), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.12.006>
- Couto, N., Wood, J., y Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology & Medicine*, 95, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>
- Cowell, I. G., Sunter, N. J., Singh, P. B., Austin, C. A., Durkacz, B. W., y Tilby, M. J. (2007). gammaH2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. *PloS One*, 2(10), e1057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001057>
- Cui, K., Luo, X., Xu, K., y Ven Murthy, M. R. (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(5), 771–799. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.05.023>
- Cusimano, R., Cusimano, M., y Cusimano, S. (1984). The genius of Alexis Carrel. *Canadian Medical Association Journal*, 131(9), 1142–1150.
- Chakrabarti, P., Carlson, E. A., Lucas, H. M., Melathopoulos, A. P., y Sagili, R. R. (2020). Field rates of Sivanto™ (flupyradifurone) and Transform® (sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honeybees (*Apis mellifera L.*). *PloS One*, 15(5), e0233033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233033>
- Chamanza, R., y Wright, J. A. (2015). A review of the comparative anatomy, histology, physiology and pathology of the nasal cavity of rats, mice, dogs and non-human primates. Relevance to inhalation toxicology and human health risk assessment. *Journal of Comparative Pathology*, 153(4), 287–314. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.08.009>
- Chang, S., El-Zaemey, S., Heyworth, J., y Tang, M. C. (2018). DDT exposure in early childhood and female breast cancer: Evidence from an ecological study in Taiwan. *Environment International*, 121(Pt 2), 1106–1112. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.10.023>
- Cheeseman, K. H., y Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625>
- Cehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., Halazonetis, y T. D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G (1) by stabilizing p53. *Genes and Development*, 14(3), 278–288.
- Chen, Z.H., Saito, Y., Yoshida, Y., y Niki, E. (2008). Effect of oxygen concentration on free radical-induced cytotoxicity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 72(6), 1491–1497
- Chen, X., Meng, Z., Song, Y., Zhang, Q., Ren, L., Guan, L., Ren, Y., Fan, T., Shen, D., y Yang, Y. (2018a). Adsorption and desorption behaviors of spirotramat in various soils and its interaction mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(47), 12471–12478. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03424>

- Chen, X., Ren, L., Meng, Z., Zhang, Q., Song, Y., Guan, L., y Shen, D. (2018b). Environmental behaviors of spirotetramat in water. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 24162–24171.
- Chen, Y., Tao, F., Liu, X., Wang, M., Rao, Q., Gu, D. y Wu, H. (2018c): Acute and chronic toxicities of spirotetramat to *Daphnia magna*. *Journal of Pest Science*, 20, 118-123.
- Chen, X., Meng, Z., Zhang, Y., Gu, H., Ren, Y., y Lu, C. (2016). Degradation kinetics and pathways of spirotetramat in different parts of spinach plant and in the soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 15053–15062.
- Chien, S., Reiter, L. T., Bier, E. y Gribskov, M. (2002). Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 149–151. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.149>
- Chintapalli, V. R., Wang, J. y Dow, J. A. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nature Genetics*, 39(6), 715–720. <https://doi.org/10.1038/ng2049>
- Chiumiento, L., y Bruschi, F. (2009). Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites. *Parasitology Research*, 105(3), 593–603. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1483-0>
- Choromańska, B., Myśliwiec, P., Kozłowski, T., Łuba, M., Wojskowicz, P., Dadan, J., Myśliwiec, H., Choromańska, K., Gibała, A., Starzyńska, A., Żendzian-Piotrowska, M., Zalewska, A., y Maciejczyk, M. (2021). Antioxidant barrier and oxidative damage to proteins, lipids, and DNA/RNA in adrenal tumor patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5543531. <https://doi.org/10.1155/2021/5543531>
- Chowdhury, D., Keogh, M. C., Ishii, H., Peterson, C. L., Buratowski, S., y Lieberman, J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular Cell*, 20(5), 801–809. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.003>
- Dai, Y. J., Jia, Y. F., Chen, N., Bian, W. P., Li, Q. K., Ma, Y. B., Chen, Y. L., y Pei, D. S. (2014). Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1), 11–17. <https://doi.org/10.1002/etc.2406>
- Dalton, T. P., Chen, Y., Schneider, S. N., Nebert, D. W., y Shertzer, H. G. (2004). Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(10), 1511–1526. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.040>
- Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Benfato, M. S., Bernard, E. A., y Moreira, J. C. (2001). Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat sertoli cells. *Free Radical Research*, 34(4), 395–404. <https://doi.org/10.1080/10715760100300331>
- Damodar, D., D'Souza, U., Biswas, D., y Bhat, S. (2012). Diazinon affects the cytoarchitecture of seminiferous epithelium in rat testis. *American Journal of Biomedical Engineering*, 2, 13–16.
- Das, K., Sarkar, K., Nath, P.P., Mondal, M., y Paul, G. (2017). Chlorpyrifos impairs the contraction of uterine smooth muscle by inhibiting the secretion of estradiol from ovary in rat. *International Journal of Current Research and Review*, 9,43–48.
- da Silva Barreto, J., de Melo Tarouco, F., y da Rosa, C. E. (2020). Chlorothalonil causes redox state

change leading to oxidative stress generation in *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 225, 105527. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105527>

Decotto, E., y Spradling, A. C. (2005). The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. *Developmental Cell*, 9(4), 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.08.012>

de Cavanagh, E. M., Inserra, F., Ferder, L., Romano, L., Ercole, L., y Fraga, C. G. (1995). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver. *FEBS Letters*, 361(1), 22–24. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00137-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00137-x)

de Cuevas, M., Lee, J. K., y Spradling, A. C. (1996). Alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the *Drosophila* ovary. *Development*, 122(12), 3959–3968. <https://doi.org/10.1242/dev.122.12.3959>

Delcour, I., Spanoghe, P., y Uyttendaele, M. (2015). Literature review: impact of climate change on pesticide use. *Food Research International*. 68, 7–15.

de Lamirande, E., y O'Flaherty, C. (2008). Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784(1), 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.08.024>

del Puerto Rodríguez, A., Suárez, S., y Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 52(3), 372–387.

Del Rio, D., Stewart, A. J., y Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>

Demerec, M., y Kaufmann, B.P. (2005). *Drosophila* Guide: Introduction to the genetics and cytology of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington. ark:/13960/t9s27fk0r

de Morais, C. R., Pereira, B. B., Almeida Sousa, P. C., Vieira Santos, V. S., Campos, C. F., Carvalho, S. M., Spanó, M. A., de Rezende, A. A. A., y Bonetti, A. M. (2019). Evaluation of the genotoxicity of neurotoxic insecticides using the micronucleus test in *Tradescantia pallida*. *Chemosphere*, 227, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.073>

Denholm, I., y Devine, G. (2009). Insecticide and acaricide resistance. In V. H. Reshear, R. Cardé (Eds.), *Encyclopaedia of Insects*, 2, 505–511.

de Oliveira, R. C., Queiroz, S. C. D. N., da Luz, C. F. P., Porto, R. S., y Rath, S. (2016). Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. *Chemosphere*, 163, 525–534. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.022>.

Derheimer, F. A., y Kastan, M. B. (2010). Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. *FEBS Letters*, 584(17), 3675–3681. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.031>

Derry, W. B., Putzke, A. P., y Rothman, J. H. (2001). *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5542), 591–595. <https://doi.org/10.1126/science.1065486>

de Souza, R., Seibert, D., Quesada, H., de Jesus Bassetti, F., Fagundes-Klen, M., y Bergamasco, R. (2020). Occurrence impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. *Process Safety and Environmental Protection*. 135, 22–37.

de Souza Espindola Santos, A., Parks, C. G., Senna, M. M., de Carvalho, L. V. B., y Meyer, A. (2021). Exposure to pesticides and oxidative stress in Brazilian agricultural communities. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 26(6), 539–547. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2021.1933593>

de Santana, S. L., Verçosa, C. J., de Araújo Castro, Í. F., de Amorim, É. M., da Silva, A. S., da Rocha Bastos, T. M., da Silva Neto, L. J., Dos Santos, T. O., De França, E. J., y Rohde, C. (2018). *Drosophila melanogaster* as model organism for monitoring and analyzing genotoxicity associated with city air pollution. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(32), 32409–32417. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3186-5>

Dewey, E. B., Parra, A. S., y Johnston, C. A. (2020). Loss of the spectraplakín gene short stop induces a DNA damage response in *Drosophila epithelia*. *Scientific Reports - Nature*10, 20165. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77159-y>

Dias, J. V., Nunes, M. D. G. P., Pizzutti, I. R., Reichert, B., Jung, A. A., y Cardoso, C. D. (2019). Simultaneous determination of pesticides and mycotoxins in wine by direct injection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Food Chemistry*, 293, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.088>

Díaz-Acosta, Alondra E., y Membrillo-Hernández, Jorge. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(1), 34-44.

Díaz, O. y Aguilar, C. (2018). Los pesticidas; clasificación, necesidad de un manejo integrado y alternativas para reducir su consumo indebido: una revisión. *Revista Científica Agroecosistemas*. 6(2), 14–30.

Donkó, A., Péterfi, Z., Sum, A., Leto, T., y Geiszt, M. (2005). Dual oxidases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1464), 2301–2308. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1767>.

Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S. J., Jackson, S. P., y Côté, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Molecular Cell*, 16(6), 979–990. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.003>

Dozier, C., Bonyadi, M., Baricault, L., Tonasso, L., y Darbon, J. M. (2004). Regulation of Chk2 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 2A via its B' regulatory subunit. *Biology of the Cell*, 96(7), 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.010>

Du, J., Cullen, J. J., y Buettner, G. R. (2012). Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826(2), 443–457. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.003>

Dubois, O. (2011). The state of the world's land and water resources for food and agriculture: managing systems at risk. *Earthscan*. 285, 20.

- Ducolomb, Y., Casas, E., Valdez, A., González, G., Altamirano-Lozano, M., y Betancourt, M. (2009). In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biology and Toxicology*, 25(6), 623–633. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9117-3>
- Duttagupta, S., Mukherjee, A., Das, K., Dutta, A., Bhattacharya, A., y Bhattacharya, J. (2020). Groundwater vulnerability to pesticide pollution assessment in the alluvial aquifer of Western Bengal basin, India using overlay and index method. *Geochemistry*, 80(4) 125–601.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Dröge, W., y Schipper, H. M. (2007). Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell*, 6(3), 361–370. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00294.x>
- Drummond-Barbosa, D. (2019). Local and physiological control of germline stem cell lineages in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 213(1), 9–26. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.300234>
- Dziewirska, E., Hanke, W., y Jurewicz, J. (2018). Environmental non-persistent endocrine-disrupting chemicals exposure and reproductive hormones levels in adult men. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 31(5), 551–573. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.01183>
- EFSA. (2012). Reasoned opinion on the modification of MRLs for spirodiclofen in strawberries bananas, avocado, mango and papaya. Reasoned opinion. EFSA, Parma, Italy. *EFSA Journal*, Vol. 10, N° 7. p.p. 2821.
- El-Shenawy, N. S. (2009). Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(3), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.06.001>
- Elstner, E. F. (1991). Oxygen radicals--biochemical basis for their efficacy. *Klinische Wochenschrift*, 69(21-23), 949–956. <https://doi.org/10.1007/BF01645138>
- Engel, L. S., Hill, D. A., Hoppin, J. A., Lubin, J. H., Lynch, C. F., Pierce, J., Samanic, C., Sandler, D. P., Blair, A., y Alavanja, M. C. (2005). Pesticide use and breast cancer risk among farmers' wives in the agricultural health study. *American Journal of Epidemiology*, 161(2), 121–135. <https://doi.org/10.1093/aje/kwi022>
- EPA. (2003). (Environmental Protection Agency, USA). Thiacloprid; pesticide tolerance. *Fed. Reg.* 68: 55503-55513.
- EPA. (2005). Cyfluthrin; pesticide tolerance. *Fed. Reg.* 70: 53944-53953.
- EPA. (2011). Consultado el 30 de abril del 2020 de <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2011-05-18/html/2011-11937.htm>
- EPA. (2017). Consultado el 30 de abril del 2020 de: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/000264-01050-20170628.pdf (20/Dic/2020).

Ernst, F., Alonso, B., Colazzo, M., Pareja, L., Cesio, V., Pereira, A., Márquez, A., Errico, E., Segura, A. M., Heinzen, H., y Pérez-Parada, A. (2018). Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems. *The Science of the Total Environment*, 631-632, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.320>

Eriksson, A. M., Lundgren, B., Andersson, K., y DePierre, J. W. (1992). Is the cytosolic catalase induced by peroxisome proliferators in mouse liver on its way to the peroxisomes? *FEBS Letters*, 308(2), 211–214. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81276-r](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81276-r)

Esterbauer, H., Schaur, R. J., y Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 81–128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)

Evans-Anderson, H. J., Alfieri, C. M., y Yutzey, K. E. (2008). Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors. *Circulation Research*, 102(6), 686–694. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.163428>

Ezzi, L., Haouas, Z., Salah, I. B., Sakly, A., Grissa, I., Chakroun, S., Kerkeni, E., Hassine, M., Mehdi, M., y Cheikh, H. B. (2016). Toxicopathic changes and genotoxic effects in liver of rat following exposure to diazinon. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(11), 11163–11170. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6314-0>

Falck, J., Coates, J., y Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, 434(7033), 605–611. <https://doi.org/10.1038/nature03442>

FAO. (2008). Spirodiclofen. Ficha de datos. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultado el 5 de agosto del 2020 de: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluacion09/Spirodiclofen.pdf

FAO. (2014). Pesticide residues in food 2014. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Plant Production and Protection Paper, N°221. Consultado el 1 de abril 2020 de: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report09/Spirodiclofen.pdf

FAO. (2018). Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta. Consultado el 3 de febrero 2020 de <http://www.fao.org/news/story/es/item/1141818/icode/> (3/Feb/2020).

FAO. (2019). La FAO presenta 2020 como Año Internacional de la Sanidad Vegetal. Consultado el 3 de julio 2020 de de: <http://www.fao.org/news/story/es/item/1253562/icode/>

Farag, A. T., Radwan, A. H., Eweidah, M. H., Elmazoudy, R. H., y El-Sebae, A.el-K. (2012). Evaluation of male-mediated reproductive toxic effects of methamidophos in the mouse. *Andrologia*, 44(2), 116–124. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01113.x>

Farraj, A. K., Hazari, M. S., y Cascio, W. E. (2011). The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. *Toxicological sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 121(1), 11–30. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr021>

Fedeli, D., Montani, M., Carloni, M., Nasuti, C., Amici, A., y Gabbianelli, R. (2012). Leukocyte

- Nurr1 as peripheral biomarker of early-life environmental exposure to permethrin insecticide. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 17(7), 604–609. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2012.706641>
- Ferdenache, M., Bezzar-Bendjazia, R., Marion-Poll, F., Kilani-Morakchi, S. (2019). Transgenerational effects from single larval exposure to azadirachtin on life history and behavior traits of *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*. 9(1), 17015.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 247–254. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00002-4)
- Fortunato, J. J., Feier, G., Vitali, A. M., Petronilho, F. C., Dal-Pizzol, F., y Quevedo, J. (2006). Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. *Neurochemical Research*, 31(5), 671–678. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9065-3>
- Fortini, M. E. y Bonini, N. M. (2000). Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*: on a wing and a prayer. *Trends in Genetics: TIG*, 16(4), 161–167. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(99\)01939-3](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01939-3)
- Fortini, M. E., Skupski, M. P., Boguski, M. S. y Hariharan, I. K. (2000). A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. *The Journal of Cell Biology*, 150(2), F23–F30. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.f23>
- Fukui, H., y Moraes, C. T. (2009). Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. *Human Molecular Genetics*, 18(6), 1028–1036. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn437>
- Flores, D., Souza, V., Betancourt, M., Teteltitla, M., González-Márquez, H., Casas, E., Bonilla, E., Ramírez-Noguera, P., Gutiérrez-Ruíz, M. C., y Ducolomb, Y. (2017). Oxidative stress as a damage mechanism in porcine cumulus-oocyte complexes exposed to malathion during in vitro maturation. *Environmental Toxicology*, 32(6), 1669–1678. <https://doi.org/10.1002/tox.22384>.
- Flynn, K., Lothenbach, D., Whiteman, F., Hammermeister, D., Swintek, J., Etterson, M., y Johnson, R. (2018). The effects of continuous diazinon exposure on growth and reproduction in Japanese medaka using a modified Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.088>
- Frankel, T. E., Bohannon, M. E., y Frankel, J. S. (2020). Assessing the impacts of methoxychlor exposure on the viability, reproduction, and locomotor behavior of the semiole ramshorn snail (*Planorbella duryi*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 39(1), 220–228. <https://doi.org/10.1002/etc.4613>
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American journal of medicine*, 97(3A), 5S–28S. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(94\)90292-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(94)90292-5)
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 64, 97–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>
- Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with

oxygen?Annals of the New York Academy of Sciences, 893, 13–18. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07814.x>

Galaris, D., y Pantopoulos, K. (2008). Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 45(1), 1–23. <https://doi.org/10.1080/10408360701713104>

Gallo, V., Khan, A., Gonzales, C., Phillips, D. H., Schoket, B., Györffy, E., y Kyrtopoulos, S. (2008). Validation of biomarkers for the study of environmental carcinogens: A review. *Biomarkers*,13(5), 505-534.

Genestra, M. (2007). Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*, 19(9), 1807–1819. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.04.009>

Gil, F., y Pla, A. (2001). Biomarkers as biological Indicators of xenobiotic exposure. *Applied Toxicology*, 21(4), 245–255.

Gomes, H. O., Menezes, J. M. C., da Costa, J. G. M., Coutinho, H. D. M., Teixeira, R. N. P., y do Nascimento, R. F. (2020). Evaluating the presence of pesticides in bananas: An integrative review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 110016. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110016>

Gorski, M.M., Romeijn, R.J., Eeken, J.C., de Jong, A.W., van Veen, B.L., Szuhai, K., Mullenders, L.H., Ferro W., y Pastink A. (2004). Disruption of *Drosophila* Rad50 causes pupal lethality, the accumulation of DNA double-strand breaks and the induction of apoptosis in third instar larvae. *DNA Repair (Amst.)*, 3, 603–615.

González-Marín, B. (2018). Efectos del mercurio sobre las vías de señalización WNT en ovarios adulto de *Drosophila melanogaster*. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

González-Marín, B., Calderón-Segura, M. E. González Pérez, A. K. y Moreno Ciénega, L. G. (2021). Movento® 240SC (Spirotetramat) and Envidor® 240SC (Spirodiclofen) keto-enol insecticides induce DNA damage in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Fundamental Toxicological Sciences*, 8(3), 81–88. <https://doi.org/10.2131/fts.8.81>

González-Marín, B, Calderón-Segura, M. E., y Sekelsky, J. (2023). ATM/Chk2 and ATR/Chk1 pathways respond to DNA Damage Induced by Movento® 240SC and Envidor® 240SC keto-enol insecticides in the germarium of *Drosophila melanogaster*. *Toxics MDPI* 11, (9), 754. <https://doi.org/10.3390/toxics11090754>

Gómez-Arroyo, S., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Martínez-Arroyo, A., Calderón-Segura, ME., Villalobos-Pietrini, R., y Waliszewski, S. (2013). Riesgo genotóxico por la exposición ocupacional a plaguicidas en América Latina . *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 159–180.

Gupta, S. y Gupta, K. (2020). Bioaccumulation of pesticides and its impact on biological systems. In pesticides in crop production (eds P.K. Srivastava, V.P. Singh, A. Singh, D.K. Tripathi, S. Singh, S.M. Prasad and D.K. Chauhan).

Gupta, P., y Verma, S. K. (2022). Evaluation of genotoxicity induced by herbicide pendimethalin in fresh water fish *Clarias batrachus* (linn.) and possible role of oxidative stress in induced DNA damage. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(2), 750–759. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1774603>

Gupta, S. C., Siddique, H. R., Mathur, N., Mishra, R. K., Mitra, K., Saxena, D. K. y Chowdhuri, D. K. (2007). Adverse effect of organophosphate compounds, dichlorvos and chlorpyrifos in the reproductive tissues of transgenic *Drosophila melanogaster*: 70kDa heat shock protein as a marker of cellular damage. *Toxicology*, 238(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.05.017>

Gutteridge, J. M., y Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136–147. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x>

Gutiérrez-Sereno, J. (2013). Panorama histórico de morbilidad y mortalidad por intoxicación por plaguicidas en México 1995-2012. *Boletín epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica* (Vol. 30).

Glorieux, C., y Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>

Greene, E. L., y Paller, M. S. (1992). Xanthine oxidase produces O₂⁻. in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *The American Journal of Physiology*, 263(2 Pt 2), F251–F255. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1992.263.2.F251>

Halliwell, B., Gutteridge, J. M., y Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119(6), 598–620.

Halliwell, B., y Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5 Suppl), 715S–725S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/57.5.715S>

Halliwell, B. G. y Gutteridge, J. M. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press Oxford. London. Third edition.

Halliwell, B., y Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>

Halliwell, B., y Gutteridge, J. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. 4^o Ed. Ed. Oxford

Hamadamin, A. Y., y Hassan, K. I. (2020). Gas chromatography-mass spectrometry based sensitive analytical approach to detect and quantify non-polar pesticides accumulated in the fat tissues of domestic animals. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(3), 887–893. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.12.029>

Hamer, G., Kal, H. B., Westphal, C. H., Ashley, T., y de Rooij, D. G. (2004). Ataxia telangiectasia mutated expression and activation in the testis. *Biology of Reproduction*, 70(4), 1206–1212. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024950>

- Han, Y., Song, S., Wu, H., Zhang, J., y Ma, E. (2017). Antioxidant enzymes and their role in phoxim and carbaryl stress in *Caenorhabditis elegans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 138, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.02.005>
- Handelman, G. J. (2001). The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 17(10), 818–822. [https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(01\)00640-2](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(01)00640-2)
- Hancock, J. T., Desikan, R., y Neill, S. J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 345–350. <https://doi.org/10.1042/0300-5127:0290345>
- Hari, K. L., Santerre, A., Sekelsky, J. J., McKim, K. S., Boyd, J. B., y Hawley, R. S. (1995). The mei-41 gene of *D. melanogaster* is a structural and functional homolog of the human ataxia telangiectasia gene. *Cell*, 82(5), 815–821. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90478-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90478-6)
- Harris, E. D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *The Journal of Nutrition*, 122(3 Suppl), 625–626. https://doi.org/10.1093/jn/122.suppl_3.625
- Hassan, M. A., El Bohy, K. M., El Sharkawy, N. I., Imam, T. S., El-Metwally, A. E., Hamed Arisha, A., Mohammed, H. A., y Abd-Elhakim, Y. M. (2021). Iprodione and chlorpyrifos induce testicular damage, oxidative stress, apoptosis and suppression of steroidogenic- and spermatogenic-related genes in immature male albino rats. *Andrologia*, 53(4), e13978. <https://doi.org/10.1111/and.13978>
- Hatkevich, T., Miller, D. E., Turcotte, C. A., Miller, M. C., y Sekelsky, J. (2021). A pathway for error-free non-homologous end joining of resected meiotic double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 49(2), 879–890. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1205>
- Hauck, A. K., Huang, Y., Hertzfel, A. V. y Bernlohr, D. A. (2019). Adipose oxidative stress and protein carbonylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(4), 1083–1088. <https://doi.org/10.1074/jbc.R118.003214>
- Heffernan, A. L., Gómez-Ramos, M. M., Gaus, C., Vijayasarathy, S., Bell, I., Hof, C., Mueller, J. F. y Gómez-Ramos, M. J. (2017). Non-targeted, high resolution mass spectrometry strategy for simultaneous monitoring of xenobiotics and endogenous compounds in green sea turtles on the Great Barrier Reef. *The Science of the Total Environment*, 599-600, 1251–1262. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.016>
- Hegde, S. N., Chethan, B. K., y Krishna, M. S. (2005). Mating success of males with and without wing patch in *Drosophila biarmipes*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(10), 902–909.
- Henderson, D.S. (2004). *Drosophila* cytogenetics protocols (Vol. 247). Springer Science and Business Media. 89-92.
- Hernando, J., Alvarez, L., Ferreira, J. A., Sancho, I., Comendador, M. A., y Sierra, L. M. (2004). Female germ cell mutagenicity of model chemicals in *Drosophila melanogaster*: mechanistic information and analysis of repair systems. *Mutation Research*, 545(1-2), 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.09.013>
- Hirsch, H. V., Mercer, J., Sambaziotis, H., Huber, M., Stark, D. T., Torno-Morley, T., Hollocher, K., Ghiradella, H., y Ruden, D. M. (2003). Behavioral effects of chronic exposure to low levels of lead

in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology*, 24(3), 435–442. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00021-4](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00021-4)

Hopfner, K. P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R. A., Usui, T., Owen, B. A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J. L., McMurray, C. T., Carney, J. P., Petrini, J. H., y Tainer, J. A. (2002). The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature*, 418(6897), 562–566. <https://doi.org/10.1038/nature00922>

Horne-Badovinac, S., y Bilder, D. (2005). Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 232(3), 559–574. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20286>

Houssou, A., Cocan, D., Bonou, C., Vioara, M., y Montchowui, E. (2018). Survival and reproduction of *Cyclops abyssorum* (freshwater copepod) exposed to spirotetramat and 2,4-D. *Romanian Biotechnological Letters*. 23. 13761–13770. <https://doi.org/10.26327/RBL2018.174>

Hu, F., Li, L., Wang, C., Zhang, Q., Zhang, X., Zhao, M. (2010). Enantioselective induction of oxidative stress by acetofenatate in rat PC12 cells. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 22(12), 1980–1986. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(09\)60349-1](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(09)60349-1)

Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A. M., y Hong, Y. (2009). From the Cover: Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(20), 8284–8289. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900641106>

Huang, W., Massouras, A., Inoue, Y., Peiffer, J., Ràmia, M., Tarone, A. M., Turlapati, L., Zichner, T., Zhu, D., Lyman, R. F., Magwire, M. M., Blankenburg, K., Carbone, M. A., Chang, K., Ellis, L. L., Fernandez, S., Han, Y., Highnam, G., Hjelman, C. E., Jack, J. R., y Mackay, T. F. (2014). Natural variation in genome architecture among 205 *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel lines. *Genome Research*, 24(7), 1193–1208. <https://doi.org/10.1101/gr.171546.113>

Hudson, A.M. y Cooley, L. (2014). Methods for studying oogenesis. *Methods*, 68, 207- 217.

Huelsmann, S., Ylänne, J., y Brown, N. H. (2013). Filopodia-like actin cables position nuclei in association with perinuclear actin in *Drosophila* nurse cells. *Developmental Cell*, 26(6), 604–615. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.08.01460415>.

Huerta-Pérez, J., Solís-Aguilar, J. F., Tejeda-Reyes, M. A., Ramírez- Alarcón, S., Luna-García, J., Alonso-Hernández, L., y Díaz-Nájera, J. F. (2017). Efectividad de acaricidas para el control de araña roja en rosa en Chiautzingo, Puebla. *Entomología Agrícola. Entomología Mexicana*, Vol. 4. p.p. 358–362.

Hsu, H. J., y Drummond-Barbosa, D. (2011). Insulin signals control the competence of the *Drosophila* female germline stem cell niche to respond to Notch ligands. *Developmental Biology*, 350(2), 290–300. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.11.032>

Iarmarcovai, G., Ceppi, M., Botta, A., Orsière, T., y Bonassi, S. (2008). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. *Mutation Research*, 659(3), 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.05.006>

Iijima-Ando, K., Zhao, L., Gatt, A., Shenton, C., y Iijima, K. (2010). A DNA damage-activated

checkpoint kinase phosphorylates tau and enhances tau-induced neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 19(10), 1930–1938. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq068>

Inoue, Y.H., Katsube, H., y Hinami, Y. (2018). *Drosophila Models to Investigate Insulin Action and Mechanisms Underlying Human Diabetes Mellitus*. In: Yamaguchi, M. (eds) *Drosophila Models for Human Diseases*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1076. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0_13

Iyama, T., y Wilson, D. M^{3rd}. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12(8), 620–636. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>

Jabłońska-Trypuć, A., Wołejko, E., Wydro, U. y Butarewicz, A. (2017). The impact of pesticides on oxidative stress level in human organism and their activity as an endocrine disruptor. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, food Contaminants, and Agricultural Wastes*. 52(7), 483–494.

Jalili, C., Roshankhah, S., Salahshoor, M. R., y Mohammadi, M. M. (2019). Resveratrol attenuates malathion induced damage in some reproductive parameters by decreasing oxidative stress and lipid peroxidation in male rats. *Journal of Family and Reproductive Health*, 13(2), 70–79.

Jang, J. K., Sherizen, D. E., Bhagat, R., Manheim, E. A., y McKim, K. S. (2003). Relationship of DNA double-strand breaks to synapsis in *Drosophila*. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 15), 3069–3077. <https://doi.org/10.1242/jcs.00614>

Jáuregui, M., Padilla, S., Hinojosa-Garro, D., Valdespino, C., y von Osten, J. (2018). Evaluation of the use of dermal scutes and blood samples to determine organochlorine pesticides in *Crocodylus moreletii*: A non-destructive method for monitoring crocodiles and environmental health. *Ecological Indicators*. 88, 161–168.

Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C., Lukas, J., y Jackson, S. P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, 8(1), 37–45. <https://doi.org/10.1038/ncb1337>

Jenkins, V. K., Timmons, A. K., y McCall, K. (2013). Diversity of cell death pathways: insight from the fly ovary. *Trends in Cell Biology*, 23(11), 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.005>

Jin, Y., Liu, Z., Peng, T., y Fu, Z. (2015). The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: a survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. *Fish and Shellfish Immunology*, 43(2), 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.010>

Jiang, J., Wu, S., Liu, X., Wang, Y., An, X., Cai, L., y Zhao, X. (2015). Effect of acetochlor on transcription of genes associated with oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption in the early life stage of zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(2), 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.08.005>

Jimenez-Zepeda, V. H., Chng, W. J., Schop, R. F., Braggio, E., Leis, J. F., Kay, N., y Fonseca, R. (2013). Recurrent chromosome abnormalities define nonoverlapping unique subgroups of tumors in patients with chronic lymphocytic leukemia and known karyotypic abnormalities. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 13(4), 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2013.05.003>

John, S., Kale, M., Rathore, N., y Bhatnagar, D. (2001). Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(9), 500–504. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(01\)00160-7](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(01)00160-7)

Joseph, L., Paulose, S. V., Cyril, N., Santhosh, S. K., Varghese, A., Nelson, A. B., Kunjankutty, V., y Kasu, S. (2020). Organochlorine pesticides in the soils of Cardamom Hill Reserve (CHR), Kerala, India: Geo spatial distribution, ecological and human health risk assessment. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2020.01.001>.

Kafshgiri, S. K., Parivar, K., Baharara, J., Kerachian, M. A., y Hayati Roodbari, N. (2016). Movento influences development of granulosa cells and ovarian follicles and FoxO1 and Vnn1 gene expression in BALB/c mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(11), 1209–1215.

Kandaswami, C., y Middleton, E., Jr (1994). Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 366, 351–376. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1833-4_25

Karbaschi, M., Ji, Y., Abdulwahed, A. M. S., Alohaly, A., Bedoya, J. F., Burke, S. L., Boulos, T. M., Tempest, H. G., y Cooke, M. S. (2019). Evaluation of the Major Steps in the Conventional Protocol for the Alkaline Comet Assay. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6072. <https://doi.org/10.3390/ijms20236072>

Kasiotis, K. M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P., y Machera, K. (2014). Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: reported death incidents in honeybees. *The Science of the Total Environment*, 485–486, 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.042>

Karabag-Coban, F., Bulduk, I., Liman, R. Ince, S. Cigerci I., y Hazman, O. (2016). Oleuropein alleviates malathion-induced oxidative stress and DNA damage in rats. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 98(1), 101-108.

Kapaki, E., Liappas, I., Lyras, L., Paraskevas, G. P., Mamali, I., Theotoka, I., Bourboulis, N., Liosis, I., Petropoulou, O., y Soldatos, K. (2007). Oxidative damage to plasma proteins in patients with chronic alcohol dependence: the effect of smoking. *In vivo (Athens, Greece)*, 21(3), 523–528.

Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., y Mehta, J. L. (2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(11), 42. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>

Ke, S., Sun, T., Zhang, Z., Zhang, Y-N., Liang, Y., Wang, K., y Yang, Z. (2010). Spirodiclofen analogues as potential lipid biosynthesis inhibitors: a convenient synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 31, 2315-2321.

Kim, K. H., Kabir, E., y Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *The Science of the total Environment*, 575, 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>

Kissoum, N., Bensafi-Gheraibia, H., Hamida, Z. C., y Soltani, N. (2020). Evaluation of the pesticide Oberon on a model organism *Drosophila melanogaster* via topical toxicity test on biochemical and reproductive parameters. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and*

Pharmacology,228, 108666. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108666>

Kopa, P. N., y Pawliczak, R. (2020). IQOS - a heat-not-burn (HnB) tobacco product - chemical composition and possible impact on oxidative stress and inflammatory response. A systematic review. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 30(2), 81–87. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1669245>.

Kostolanská, J., Jakus, V., y Barák, L. (2009). Glycation and lipid peroxidation in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus with and without diabetic complications. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*,22(7), 635–643. <https://doi.org/10.1515/jpem.2009.22.7.635>

Kozlov, A. V., Gille, L., Miller, I., Piskernik, C., Haindl, S., Staniek, K., Nohl, H., Bahrami, S., Ohlinger, W., Gemeiner, M., y Redl, H. (2007). Opposite effects of endotoxin on mitochondrial and endoplasmic reticulum functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(1), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.180>

Kubrak, O. I., Atamaniuk, T. M., Husaketal. V. V. (2012). Oxidative stress responses in blood and gills of *Carassius auratus* exposed to the mancozeb-containing carbamate fungicide Tattoo. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 85, 37-43.

Ku-Centurión, M., González-Marín, B., Calderón-Ezquerro, M. C., Martínez-Valenzuela, M. C., Maldonado, E., y Calderón-Segura, M. E. (2016). DNA damage assessment in zebrafish embryos exposed to Monceren(®) 250 SC fungicide using the alkaline comet assay. *Zebrafish*, 13(5), 442–448. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1265>

Kühnhold, J., Klueken, A., De Maeyer, L., Van Waetermeulen, X., Brück, E., y Elbert, A. (2008). Movento®, an innovative solution for sucking insect pest control in agriculture: field performance in fruits and vegetables. *Bayer CropScience Journal*, 61(2), 279-306.

Klattenhoff, C., Bratu, D. P., McGinnis-Schultz, N., Koppetsch, B. S., Cook, H. A., y Theurkauf, W. E. (2007). Drosophila rasiRNA pathway mutations disrupt embryonic axis specification through activation of an ATR/Chk2 DNA damage response. *Developmental Cell*, 12(1), 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.12.001>

Khan, C., Muliylil, S., y Rao, B. J. (2019). Genome Damage Sensing Leads to Tissue Homeostasis in Drosophila. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 345, 173–224. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.12.001>

Khatun, S., Rajak, P., Dutta, M., y Roy, S. (2017). Sodium fluoride adversely affects ovarian development and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 186, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.123>

Krogh, B. O., y Symington, L. S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annual Review of Genetics*, 38, 233–271. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091500>

Lacasaña, M., López-Flores, I., Rodríguez-Barranco, M., Aguilar-Garduño, C., Blanco- Muñoz, J., Pérez-Méndez, O., y Cebrian, M. (2010). Interaction between organophosphate pesticide exposure and PON1 activity on thyroid function. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 249(1), 16–24.

- Lacroix, M., Toillon, R. A., y Leclercq, G. (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-Related Cancer*, 13(2), 293–325. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01172>
- Laurençon, A., Purdy, A., Sekelsky, J., Hawley, R. S., y Su, T. T. (2003). Phenotypic analysis of separation-of-function alleles of MEI-41, *Drosophila* ATM/ATR. *Genetics*, 164(2), 589–601. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.2.589>
- LaRocque, J. R., Jaklevic, B., Su, T. T., y Sekelsky, J. (2007). *Drosophila* ATR in double-strand break repair. *Genetics*, 175(3), 1023–1033. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.067330>
- Lavin, M. F. (2008). Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 9(10), 759–769. <https://doi.org/10.1038/nrm2514>
- Leão, M. B., Gonçalves, D. F., Miranda, G. M., da Paixão, G. M. X., y Dalla Corte, C. L. (2019). Toxicological evaluation of the herbicide Palace® in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 82(22), 1172–1185. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1709109>
- Lee, W. J., Blair, A., Hoppin, J. A., Lubin, J. H., Rusiecki, J. A., Sandler, D. P., Dosemeci, M., y Alavanja, M. C. (2004). Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(23), 1781–1789. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh324>
- Lee, J. H., y Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5721), 551–554. <https://doi.org/10.1126/science.1108297>
- Lee, K. G., y Lee, S. K. (2012). Monitoring and risk assessment of pesticide residues in yuza fruits (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) and yuza tea samples produced in Korea. *Food Chemistry*, 135(4), 2930–2933. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.111>
- Lee, P., Martin, N. T., Nakamura, K., Azghadi, S., Amiri, M., Ben-David, U., Perlman, S., Gatti, R. A., Hu, H., y Lowry, W. E. (2013). SMRT compounds abrogate cellular phenotypes of ataxia telangiectasia in neural derivatives of patient-specific hiPSCs. *Nature Communications*, 4, 1824. <https://doi.org/10.1038/ncomms2824>
- Leite, S. B., Franco de Diana, D. M., Segovia Abreu, J. A., Avalos, D. S., Denis, M. A., Ovelar, C. C., Samaniego Royg, M. J., Thielmann Arbo, B. A., y Corvalan, R. (2019). DNA damage induced by exposure to pesticides in children of rural areas in Paraguay. *The Indian Journal of Medical Research*, 150(3), 290–296. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1497_17
- Leomanni, A., Schettino, T., Calisi, A., Gorbi, S., Mezzelani, M., Regoli, F., y Lionetto, M. G. (2015). Antioxidant and oxidative stress related responses in the Mediterranean land snail *Cantareus apertus* exposed to the carbamate pesticide Carbaryl. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and Pharmacology: CBP*, 168, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.11.003>
- Lezza, A. M., Boffoli, D., Scacco, S., Cantatore, P., y Gadaleta, M. N. (1994). Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205(1), 772–779. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2732>

- Li, S., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Xu, H., Hu, M., y Zheng, Y. (2016). Chemometric-assisted QuEChERS extraction method for the residual analysis of thiacloprid, spirotetramat and spirotetramat's four metabolites in pepper: Application of their dissipation patterns. *Food Chemistry*, 192, 893–899. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.122>
- Liu, S., Shiotani, B., Lahiri, M., Maréchal, A., Tse, A., Leung, C. C., Glover, J. N., Yang, X. H., y Zou, L. (2011a). ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation. *Molecular Cell*, 43(2), 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.019>
- Li, H. Y., Wu, S. Y., Ma, Q., y Shi, N. (2011). The pesticide deltamethrin increases free radical production and promotes nuclear translocation of the stress response transcription factor Nrf2 in rat brain. *Toxicology and Industrial Health*, 27(7), 579–590. <https://doi.org/10.1177/0748233710393400>
- Liu, T., Li, N., Yan, Y. Q., Liu, Y., Xiong, K., Liu, Y., Xia, Q. M., Zhang, H., y Liu, Z. D. (2020). Recent advances in the anti-aging effects of phytoestrogens on collagen, water content, and oxidative stress. *Phytotherapy Research: PTR*, 34(3), 435–447. <https://doi.org/10.1002/ptr.6538>
- Li, X., Liu, J., y Wang, X. (2020). Exploring the multilevel hazards of thiamethoxam using *Drosophila melanogaster*. *Journal of Hazardous Materials*, 384, 121419. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121419>
- Li, D., Huang, Q., Lu, M., Zhang, L., Yang, Z., Zong, M., y Tao, L. (2015). The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere*, 135, 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.024>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., y Darnell, J. (2000). DNA damage and repair and their role in carcinogenesis. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. WH Freeman.
- Lombard, D. B., Chua, K. F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., y Alt, F. W. (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*, 120(4), 497–512. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.028>
- López, E. (2016). Evaluación del efecto genotóxico producido por exposición a formulaciones comerciales de Cipermetrina, Clorpirifos, Endosulfán, Glifosato y mezclas de las mismas, en etapas tempranas del desarrollo de *Caiman latirostris*. [Tesis doctoral], Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Luc, K., Schramm-Luc, A., Guzik, T. J., y Mikolajczyk, T. P. (2019). Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *Journal of physiology and pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 70(6), 10.26402/jpp.2019.6.01. <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.6.01>
- Lümmen, P., Khajehali, J., Luther, K., y Van Leeuwen, T. (2014). The cyclic keto-enol insecticide spirotetramat inhibits insect and spider mite acetyl-CoA carboxylases by interfering with the carboxyltransferase partial reaction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 55, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.09.010>

Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., y Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI Journal*, 17, 1101–1136. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1710>

Ma, J., Cheng, C., Du, Z., Li, B., Wang, J., Wang, J., y vZhu, L. (2019). Toxicological effects of pyraclostrobin on the antioxidant defense system and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*). *Ecological Indicators*, 101, 111–116.

MacBean, C. (2010). Spirodiclofen. *The e-Pesticide Manual*, 15th Edition, Version 5.0.1. Surrey UK, British Crop Protection Council.

Mackay, T. F., Richards, S., Stone, E. A., Barbadilla, A., Ayroles, J. F., Zhu, D., Casillas, S., Han, Y., Magwire, M. M., Cridland, J. M., Richardson, M. F., Anholt, R. R., Barrón, M., Bess, C., Blankenburg, K. P., Carbone, M. A., Castellano, D., Chaboub, L., Duncan, L., Harris, Z., y Gibbs, R. A. (2012). The *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel. *Nature*, 482(7384), 173–178. <https://doi.org/10.1038/nature10811>

Madigan, J. P., Chotkowski, H. L., y Glaser, R. L. (2002). DNA double-strand break-induced phosphorylation of *Drosophila* histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 30(17), 3698–3705. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf496>

Maiorino, M., Gregolin, C., y Ursini, F. (1990). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 186, 448–457. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86139-m](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86139-m)

Manjunatha, B., y Philip, G. H. (2016). Reproductive toxicity of chlorpyrifos tested in zebrafish (*Danio rerio*): Histological and hormonal end points. *Toxicology and Industrial Health*, 32(10), 1808–1816. <https://doi.org/10.1177/0748233715589445>

Mannervik, B. (1985). Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 113, 490–495. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13063-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13063-6)

Mandi, M., Khatun, S., Rajak, P., Mazumdar, A., y Roy, S. (2020). Potential risk of organophosphate exposure in male reproductive system of a non-target insect model *Drosophila melanogaster*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 74, 103308. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103308>

Marcic, D., Ogurlic, I., Mutavdzic, S., y Peric, P. (2010). The effects of spiromesifen on life history traits and population growth of two-spotted spider mite (Acari: *Tetranychidae*). *Experimental and Applied Acarology*, 50(3), 255–267. <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9316-5>

Marcic, D., Perić, P., Petronijević, S., Prijovic, M., y Drobnjakovic, T. (2011). Cyclic Ketoenols Acaricides and insecticides with a novel mode of action. *Pesticidi i Fitomedicina*. <https://doi.org/26.10.2298/PIF1103185M>

Marcus, S. R., y Fiumera, A. C. (2016). Atrazine exposure affects longevity, development time and body size in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 91–92, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.06.006>

Maréchal, A., y Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), a012716. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>

- Markovic, J., García-Gimenez, J. L., Gimeno, A., Viña, J., y Pallardó, F. V. (2010). Role of glutathione in cell nucleus. *Free Radical Research*, 44(7), 721–733. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.485989>
- Martínez-Valenzuela, C., y Gómez-Arroyo, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 1,23(4), 185-200.
- Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S., y Villalobos-Pietrini, R. (2009). Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environmental International*, 35, 1155–1159.
- Masrouha, N., Yang, L., Hijal, S., Larochelle, S., y Suter, B. (2003). The *Drosophila* *chk2* gene loki is essential for embryonic DNA double-strand-break checkpoints induced in S phase or G2. *Genetics*, 163(3), 973–982. <https://doi.org/10.1093/genetics/163.3.973>
- Mazduferi, G., Bacchetti, T., Islam, M. O., y Ferretti, G. (2021). High density lipoproteins and oxidative stress in breast cancer. *Lipids in Health and Disease*, 20(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01562-1>
- Mehrpour, O., Karrari, P., Zamani, N., Tsatsakis, A. M., y Abdollahi, M. (2014). Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: A Review. *Toxicology Letters*, 230(2), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.029>
- Meissner, C. (2007). Mutations of mitochondrial DNA - cause or consequence of the ageing process? *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*, 40(5), 325–333. <https://doi.org/10.1007/s00391-007-0481-z>
- Meligy, A., Al-Taher, A., Ismail, M., Al-Naeem, A., El-Bahr, S., y El-Ghareeb, W. (2019). Pesticides and toxic metals residues in muscle and liver tissues of sheep, cattle, and dromedary camel in Saudi Arabia. *Slovenian Veterinary Research*. 56, 221.
- Menon, V., y Povirk, L. (2014). Involvement of p53 in the repair of DNA double strand breaks: Multifaceted Roles of p53 in homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end joining (NHEJ). *Sub-cellular Biochemistry*, 85, 321–336. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9211-0_17
- Miao, L., y St Clair, D. K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free radical biology and medicine*, 47(4), 344–356. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018>
- Miller, B., Pötter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D., y Madle, S. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the *in vitro* micronucleus test. *Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung. Mutation Research*, 410(1), 81–116. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(97\)00030-6](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(97)00030-6)

Miranda-Contreras, L., Gómez-Pérez, R., Rojas, G., Cruz, I., Berrueta, L., Salmen, S., Colmenares, M., Barreto, S., Balza, A., Zavala, L., Morales, Y., Molina, Y., Valeri, L., Contreras, C. A., y Osuna, J. A. (2013). Occupational exposure to organophosphate and carbamate pesticides affects sperm chromatin integrity and reproductive hormone levels among Venezuelan farm workers. *Journal of Occupational Health*, 55(3), 195–203. <https://doi.org/10.1539/joh.12-0144-fs>

Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., Valenza, A. M., Grifoni, D., y Bellosta, P. (2019). *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Frontiers in Genetics*, 10, 51. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00051>

Mişe Yonar, S., Yonar, M. E., y Ural, M. Ş. (2017). Antioxidant effect of curcumin against exposure to malathion in *Cyprinus carpio*. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 63(3), 68–72. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.3.13>

Mishra, M., Sharma, A., Shukla, A. K., Kumar, R., Dwivedi, U. N., y Kar Chowdhuri, D. (2014). Genotoxicity of dichlorvos in strains of *Drosophila melanogaster* defective in DNA repair. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 766, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.02.004>

Møller, P., Loft, S., Ersson, C., Koppen, G., Dusinska, M., y Collins, A. (2014). On the search for an intelligible comet assay descriptor. *Frontiers in Genetics*, 5, 217. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00217>

Mohapatra, S., Deepa, M., Lekha, S., Nethravathi, B., Radhika, B., y Gourishanker, S. (2012). Residue dynamics of spirotetramat and imidacloprid in/on mango and soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89(4), 862–867. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0762-0>

Mojica-Vázquez, L. H., Madrigal-Zarraga, D., García-Martínez, R., Boube, M., Calderón-Segura, M. E., y Oyallon, J. (2019). Mercury chloride exposure induces DNA damage, reduces fertility, and alters somatic and germline cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(31), 32322–32332. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06449-4>

Montiel-León, J. M., Duy, S. V., Munoz, G., Verner, M. A., Hendawi, M. Y., Moya, H., y Sauvé, S. (2019). Occurrence of pesticides in fruits and vegetables from organic and conventional agriculture by QuEChERS extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Control*, 104, 74–82.

Moreno-González, D., Cutillas, V., Hernando, M. D., Alcántara-Durán, J., García-Reyes, J. F., y Molina-Díaz, A. (2020). Quantitative determination of pesticide residues in specific parts of bee specimens by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *The Science of the Total Environment*, 715, 137005. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137005>

Moneef, M. A., Sherwood, B. T., Bowman, K. J., Kockelbergh, R. C., Symonds, R. P., Steward, W. P., Mellon, J. K., y Jones, G. D. (2003). Measurements using the alkaline comet assay predict bladder cancer cell radiosensitivity. *British Journal of Cancer*, 89(12), 2271–2276. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601333>

Mukai, K., Morimoto, H., Kikuchi, S., y Nagaoka, S. (1993). Kinetic study of free-radical-scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone)

in solution. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1157(3), 313–317. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(93\)90115-o](https://doi.org/10.1016/0304-4165(93)90115-o).

Mukhopadhyay, I., Siddique, H. R., Bajpai, V. K., Saxena, D. K., y Chowdhuri, D. K. (2006). Synthetic pyrethroid cypermethrin induced cellular damage in reproductive tissues of *Drosophila melanogaster*: Hsp70 as a marker of cellular damage. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(4), 673–680. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0169-6>

Muthaiah, V. P., Venkitasamy, L., Michael, F. M., Chandrasekar, K., y Venkatachalam, S. (2013). Neuroprotective role of naringenin on carbaryl induced neurotoxicity in mouse neuroblastoma cells. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 4(3), 192–197. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.114599>

Mundhe, A. Y., Bhilwade, H., y Pandit, S. V. (2016). Genotoxicity and oxidative stress as biomarkers in freshwater mussel, *Lamellidens marginalis* (Lam.) exposed to monocrotophos. *Indian Journal of Experimental Biology*, 54(12), 822–828.

McCord, J. M. (1989). Free radicals and heart disease. *Bibliotheca Nutritio et Dieta*, 43, 327-37.

McKim, K. S., Jang, J. K., Sekelsky, J. J., Laurencon, A., y Hawley, R. S. (2000). Mei-41 is required for precocious anaphase in *Drosophila* females. *Chromosoma*, 109(1-2), 44–49. <https://doi.org/10.1007/s004120050411>

Nair, R., Singh, V. J., Salian, S. R., Kalthur, S. G., D'Souza, A. S., Shetty, P. K., Mutalik, S., Kalthur, G., y Adiga, S. K. (2014). Methyl parathion inhibits the nuclear maturation, decreases the cytoplasmic quality in oocytes and alters the developmental potential of embryos of Swiss albino mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 279(3), 338–350. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.07.004>

Nataraj, B., Hemalatha, D., Rangasamy, B., Maharajan, K., y Ramesh, M. (2017). Hepatic oxidative stress, genotoxicity and histopathological alteration in freshwater fish *Labeo rohita* exposed to organophosphorus pesticide profenofos. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 185-190.

Nauen, R. (2005). Spirodiclofen: mode of action and resistance risk assessment in tetranychid pest mites. *Journal of Pesticide Science*, 30(3), 272-274.

Nauen, R., Reckmann, U., Thomzik, J., y Thielert, W. (2008). Biological profile of spirotetramat (Movento®)—a new two-way systemic (ambimobile) insecticide against sucking pest species. *Bayer CropScience Journal*, 61(2), 245-278.

Nauen, R., Slater, R., Sparks, T. C., Elbert, A., y Mccaffery, A. (2019). IRAC: Insecticide resistance and mode-of-action classification of insecticides. *Modern Crop Protection Compounds*, 3, 995-1012.

Nazir, A., Mukhopadhyay, I., Saxena, D. K., y Kar Chowdhuri, D. (2001). Chlorpyrifos-induced hsp70 expression and effect on reproductive performance in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(4), 443–449. <https://doi.org/10.1007/s002440010270>

Nishi, K., y Hundal, S. S. (2013). Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female

Wistar rats. Food and chemical toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 62, 732–738. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.006>

Niveditha, S., Ramesh, S. R., y Shivanandappa, T. (2017). Paraquat-Induced Movement Disorder in Relation to Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration in the Brain of *Drosophila melanogaster*. Neurochemical Research, 42(11), 3310–3320. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2373-y>

Nose, K. (2000). Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. Biological y Pharmaceutical Bulletin, 23(8), 897–903. <https://doi.org/10.1248/bpb.23.897>

NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2020). PubChem Annotation Record for Spirodiclofen. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Consultado el 5 de agosto del 2020 de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/7940>.

O'Brien, P. J. (2014). High-content analysis in toxicology: Screening substances for human toxicity potential, elucidating subcellular mechanisms and *in vivo* use as translational safety biomarkers. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 115(1), 4–17. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12227>

Oettl, K., Stadlbauer, V., Petter, F., Greilberger, J., Putz-Bankuti, C., Hallström, S., Lackner, C., y Stauber, R. E. (2008). Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. Biochimica et Biophysica Acta, 1782(7-8), 469–473. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.04.002>

O'Grady, P. M., y Markow, T. A. (2009). Phylogenetic taxonomy in *Drosophila*. Fly, 3(1), 10–14. <https://doi.org/10.4161/fly.3.1.7748>

Olechnowicz, J., Tinkov, A., Skalny, A., y Suliburska, J. (2018). Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. The journal of physiological sciences: Journal of Pharmacological Sciences, 68(1), 19–31. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0571-7>

Olive, P. L., Banáth, J. P., y Durand, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. Radiation Research, 122(1), 86–94.

Ollmann, M., Young, L. M., Di Como, C. J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W. W., Buchman, A., Duyk, G., Friedman, L., Prives, C., y Kopczynski, C. (2000). *Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. Cell, 101(1), 91–101. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80626-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80626-1).

Oikemus, S. R., McGinnis, N., Queiroz-Machado, J., Tukachinsky, H., Takada, S., Sunkel, C. E., y Brodsky, M. H. (2004). *Drosophila atm/telomere* fusion is required for telomeric localization of HP1 and telomere position effect. Genes and Development, 18(15), 1850–1861. <https://doi.org/10.1101/gad.1202504>

Olgun, S., y Misra, H. P. (2006). Pesticides induced oxidative stress in thymocytes. Molecular and Cellular Biochemistry, 290(1-2), 137–144. <https://doi.org/10.1007/s11010-006-9178-7>

Oksay, T., Nazıroğlu, M., Ergün, O., Doğan, S., Özatik, O., Armağan, A., Özorak, A., y Çelik, Ö. (2013). N-acetyl cysteine attenuates diazinon exposure-induced oxidative stress in rat testis. Andrologia, 45(3), 171–177. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2012.01329.x>

Omran, O. M., y Omer, O. H. (2015). The effects of alpha-lipoic acid on breast of female albino rats exposed to malathion: Histopathological and immunohistochemical study. *Pathology, Research and Practice*, 211(6), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.02.006>

Oruc, E. O. (2010). Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96, 160–166.

Ortiz, J. G., Opoka, R., Kane, D., y Cartwright, I. L. (2009). Investigating arsenic susceptibility from a genetic perspective in *Drosophila* reveals a key role for glutathione synthetase. *Toxicological sciences: An official Journal of the Society of Toxicology*, 107(2), 416–426. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn192>

Ossana, N. A. Pérez-Iglesias, J. M. Soloneski, S., yLarramendy, M. L. (2019). “Auxinic herbicides induce oxidative stress on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(20), 20485–20498.

Othmène, Y. B., Hamdi, H., Salem, I. B., Annabi, E., Amara, I., Neffati, F., Najjar, M. F., y Abid-Essefi, S. (2020). Oxidative stress, DNA damage and apoptosis induced by tebuconazole in the kidney of male Wistar rat. *Chemico-biological Interactions*, 330, 109114. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109114>

Ozsoy, A. Z., Nursal, A. F., Karsli, M. F., Uysal, M., Alici, O., Butun, I., Tas, U., y Delibas, I. B. (2016). Protective effect of intravenous lipid emulsion treatment on malathion-induced ovarian toxicity in female rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(11), 2425–2434.

Padhi, S., yPati, B. (2016). Severity of persistence and toxicity of hexachlorocyclohexane (HCH) to the environment-A current approach. *Academic Journal of Interdisciplinary Studies*, 4, 3158-3168.

Paik, J. H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J. W., Carrasco, D. R., Jiang, S., Gilliland, D. G., Chin, L., Wong, W. H., Castrillon, D. H., y DePinho, R. A. (2007). FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell*, 128(2), 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.029>

Pandey, U. B., y Nichols, C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 411–436. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>

Prasad, M., Jang, A. C., Starz-Gaiano, M., Melani, M., y Montell, D. J. (2007). A protocol for culturing *Drosophila melanogaster* stage 9 egg chambers for live imaging. *Nature Protocols*, 2(10), 2467–2473. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.363>

Pardo, B., Gómez-González, B., y Aguilera, A. (2009). DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cellular and Molecular Life Sciences: Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), 1039–1056. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8740-3>

Patel, A., Lakshminrusimha, S., Ryan, R. M., Swartz, D. D., Wang, H., Wynn, K.A., y Kumar, V. H. (2009). Exposure to supplemental oxygen downregulates antioxidant enzymes and increases pulmonary arterial contractility in premature lambs. *Neonatology*, 96(3), 182-192.

Panagopoulos, D. J., Chavdoula, E. D., Nezis, I. P., y Margaritis, L. H. (2007). Cell death induced by GSM 900-MHz and DCS 1800-MHz mobile telephony radiation. *Mutation Research*, 626(1-2), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.008>

Panagopoulos, D. J. (2012). Effect of microwave exposure on the ovarian development of *Drosophila melanogaster*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 63(2), 121–132. <https://doi.org/10.1007/s12013-012-9347-0>

Peng, T., Pan, Y., Yang, C., Gao, X., Xi, J., Wu, Y., Huang, X., Zhu, E., Xin, X., Zhan, C., y Shang, Q. (2016). Over-expression of CYP6A2 is associated with spirotetramat resistance and cross-resistance in the resistant strain of *Aphis gossypii* Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 126, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.07.008>

Penna-Videau, S., Bustos-Obregón, E., Cermeño-Vivas, J. R., Chirino D. (2012). Malathion affects spermatogenic proliferation in mouse. *International Journal of Morphology*30, 1399-1407.

Pérez, V. I., Lew, C. M., Cortez, L. A., Webb, C. R., Rodriguez, M., Liu, Y., Qi, W., Li, Y., Chaudhuri, A., Van Remmen, H., Richardson, A., y Ikeno, Y. (2008). Thioredoxin 2 haploinsufficiency in mice results in impaired mitochondrial function and increased oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(5), 882–892. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.018>

Perry, M. J., Venners, S. A., Chen, X., Liu, X., Tang, G., Xing, H., Barr, D. B., y Xu, X. (2011). Organophosphorous pesticide exposures and sperm quality. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.), 31(1), 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.08.006>

Peterson, E. K., Stark, A., Varian-Ramos, C. W., Hollocher, K. T., y Possidente, B. (2020). Exposure to lead (Pb²⁺) eliminates avoidance of pb-treated oviposition substrates in a dose-dependent manner in female vinegar flies. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 104(5), 588–594. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02825-w>

Perera, F., y Weinstein, I. (2000). Molecular epidemiology: Recent advances and future directions. *Carcinogenesis*, 21(3), 517–524.

Pilco-Ferreto, N., y Calaf, G. M. (2016). Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 49(2), 753–762. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3558>

Piña-Guzmán, B., Solís-Heredia, M. J., Rojas-García, A. E., Urióstegui-Acosta, M., y Quintanilla-Vega, B. (2006). Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216(2), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.05.001>

Poblete-Aro, C., Russell-Guzmán, J., Parra, P., Soto-Muñoz, M., Villegas-González, B., Cofré-Bolados, C., y Herrera-Valenzuela, T. (2018). Efecto del ejercicio físico sobre marcadores de estrés

oxidativo en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [Exercise and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus]. *Revista Medica de Chile*. 146(3), 362–372.

Podder, S., y Roy, S. (2014). Exposure-dependent variation in cryolite induced lethality in the non-target insect, *Drosophila melanogaster*. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(1), 17–22. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0003>

Pommier, Y., Weinstein, J. N., Aladjem, M. I., y Kohn, K. W. (2006). Chk2 molecular interaction map and rationale for Chk2 inhibitors. *Clinical cancer research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(9), 2657–2661. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0743>

Potikanond, S., Nimlamool, W., Noordermeer, J., y Fradkin, L.G. (2018). Muscular Dystrophy Model. In: Yamaguchi, M. (eds) *Drosophila Models for Human Diseases*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1076. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0_9

Popp, J., Pető, K., y Nagy, J. (2013). Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for sustainable development*. 33.

Potter, C. J., Turenchalk, G. S., y Xu, T. (2000). *Drosophila* in cancer research. An expanding role. *Trends in Genetics: TIG*, 16(1), 33–39. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(99\)01878-8](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(99)01878-8)

Prendergast, Á. M., Cruet-Hennequart, S., Shaw, G., Barry, F. P., y Carty, M. P. (2011). Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or γ -irradiation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(21), 3768–3777. <https://doi.org/10.4161/cc.10.21.17972>

Prokop, A. (2017). What is Developmental Biology – and why is it important? *Open Access Government*. 17, 121–12.

Queiroz-Machado, J., Perdigão, J., Simões-Carvalho, P., Herrmann, S., y Sunkel, C. E. (2001). Tef: a mutation that causes telomere fusion and severe genome rearrangements in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 110(1), 10–23. <https://doi.org/10.1007/s004120000116>

Rabani, J. y Nielsen, S.O. (1969). Absorption spectrum and decay kinetics of O₂- and HO₂ in aqueous solutions by pulse radiolysis. *Journal of Physical Chemistry*, 73, 3736–44.

Rajak, P., Khatun, S., Dutta, M., Mandi, M., y Roy, S. (2018). Chronic exposure to acephate triggers ROS-mediated injuries at organismal and sub-organismal levels of *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Research*, 7(5), 874–887. <https://doi.org/10.1039/c8tx00052b>

Ramón, J. (1993). *Radicales libres y antioxidantes en clínica humana*. Ed. IDEPSA (Internacional de Ediciones y Publicaciones, S.A.), Madrid, España. 19.

Rauch, N. y Nauen, R. (2002). Spirodiclofen resistance risk assessment in Tetranychusurticae (Acari: Tetranychidae): a biochemical approach. *Elsevier: Pesticide Biochemistry and Physiology*, 74, 91–101.

Recio, R., Ocampo-Gómez, G., Morán-Martínez, J., Borja-Aburto, V., López-Cervante, M., Uribe, M., Torres-Sánchez, L., y Cebrián, M. E. (2005). Pesticide exposure alters follicle-stimulating

hormone levels in Mexican agricultural workers. *Environmental Health Perspectives*, 113(9), 1160–1163. <https://doi.org/10.1289/ehp.7374>

Recio-Vega, R., Ocampo-Gómez, G., Borja-Aburto, V. H., Moran-Martínez, J., y Cebrian-Garcia, M. E. (2008). Organophosphorus pesticide exposure decreases sperm quality: association between sperm parameters and urinary pesticide levels. *Journal of Applied Toxicology*, 28(5), 674–680. <https://doi.org/10.1002/jat.1321>

Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., y Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 11(6), 1114–1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>

Richter, C., y Schlegel, J. (1993). Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. *Toxicology Letters*, 67(1-3), 119–127. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(93\)90050-8](https://doi.org/10.1016/0378-4274(93)90050-8)

Roberfroid, M. (1995). Toxicology: a science and an art. *Toxicology in vitro: An International Journal Published in association with BIBRA*, 9(6), 839–844. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(95\)00083-6](https://doi.org/10.1016/0887-2333(95)00083-6)

Robledo, P. W. (2015). Fenómenos tautoméricos en sistemas heterocíclicos aromáticos. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Colombia.

Rodríguez-Arnaiz, R. (2003). *Drosophila* como organismo modelo en la Biología experimental. *Biología celular y molecular* L. F. Jiménez y H. Merchant (Eds.) Editorial Pearson Education (Addison Wesley-Prentice Hall) pp 761-791. ISBN 970-26-0387-0.

Rodríguez, R. M. I., Gómez A. S., Villalobos P. R., Martinez V. C., Cortes E. J., Calderon E. M. C., Garcia M. R., Arenas H. F., y Calderon S. M. E. (2012). Evaluation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 22, 170-183.

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., y Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>

Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., y Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 146(5), 905–916. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.905>

Rosenberger, A., Rössler, U., Hornhardt, S., Sauter, W., Bickeböller, H., Wichmann, H. E., y Gomolka, M. (2011). Validation of a fully automated COMET assay: 1.75 million single cells measured over a 5 year period. *DNA Repair*, 10(3), 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.12.003>

Roos, W. P., y Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters*, 332(2), 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007>

Roote, J., y Prokop, A. (2013). How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(2), 353–358. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004820>

Rothkamm, K., y Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5057–5062. <https://doi.org/10.1073/pnas.0830918100>

Rothenfluh, A., y Heberlein, U. (2002). Drugs, flies, and videotape: the effects of ethanol and cocaine on *Drosophila* locomotion. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(6), 639–645. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(02\)00380-x](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(02)00380-x)

Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S. E., y Lewis, S. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2204–2215. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2204>

Rundle, A., Tang, D., Hibshoosh, H., Schnabel, F., Kelly, A., Levine, R., y Perera, F. (2002). Molecular epidemiologic studies of polycyclic aromatic hydrocarbon–DNA adducts and breast cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 39(2-3), 201–207.

Ryrfeldt, A., Bannenberg, G., y Moldéus, P. (1993). Free radicals and lung disease. *British Medical Bulletin*, 49(3), 588–603. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072633>

Sabarwal, A., Kumar, K., y Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health–Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>

Salahshoor, M. R., Abdolmaleki, A., Faramarzi, A., Jalili, C., y Shiva, R. (2020). Does *Tribulus terrestris* improve toxic effect of Malathion on male reproductive parameters? *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(2), 183–191. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_224_19

Salazar-Arredondo, E., de Jesús Solís-Heredia, M., Rojas-García, E., Hernández-Ochoa, I., y Quintanilla-Vega, B. (2008). Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 25(4), 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.05.055>

Salazar-López, N., Aldana-Madrid, M., Silveira-Gramont, M., y Aguiar, J. L. (2016). Spirotetramat- An Alternative for the Control of Parasitic Sucking Insects and its Fate in the Environment. *Insecticides Resistance*, 41.

Salazar, Z., Ducolomb, Y., Betancourt, M., Bonilla, E., Cortés, L., Hernández-Hernández, F., y González-Márquez, H. (2007). Gene expression analysis on the early development of pig embryos exposed to malathion. *International Journal of Toxicology*, 26(2), 143–149. <https://doi.org/10.1080/10915810701226263>

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K., y Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of Biochemistry*, 73, 39–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>

Sánchez-Zepeda, M. Y., López-Herrera, A., Gordillo-Martínez, J. C., Gaytán-Oyarzún, F., Prieto-García, P. O. (2019). Micronúcleos, índice mitótico y aberraciones cromosómicas como

biomarcadores de genotoxicidad en haba (*Vicia faba* L) por efecto de cadmio. Avances en Ciencias e Ingeniería, 10(1), 27–40

San-Miguel, A. y Martín-Gil, F.J. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. Gaceta Médica de Bilbao, 106(3), 106-113. [https://doi.org/10.1016/S0304-4858\(09\)74661-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4858(09)74661-X).

Saraiva, M. A., da Rosa Ávila, E., da Silva, G. F., Macedo, G. E., Rodrigues, N. R., de Brum Vieira, P., Nascimento, M. S., Picoloto, R. S., Martins, I. K., de Carvalho, N. R., Franco, J. L., y Posser, T. (2018). Exposure of *Drosophila melanogaster* to Mancozeb Induces Oxidative Damage and Modulates Nrf2 and HSP70/83. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 5456928. <https://doi.org/10.1155/2018/5456928>

Sengupta, A., Molkenin, J. D., y Yutzey, K. E. (2009). FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(41), 28319–28331. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024406>

Selmi, S., Tounsi, H., Safra, I., Abdellaoui, A., Rjeibi, M.R., El-Fazaa, S., y Gharbi N. (2015a). Histopathological, biochemical, and molecular changes of reproductive function after malathion exposure of prepubertal male mice. *RSC Advances*, 5, 13743-13753

Selmi, S., Rtibi, K., Grami, D., Sebai, H., y Marzouki, L. (2018). Lavandula stoechas essential oils protect against Malathion-induced reproductive disruptions in male mice. *Lipids in Health and Disease*, 17(1), 253. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0891-5>

Selek, S., Cosar, N., Kocyigit, A., Erel, O., Aksoy, N., Gencer, M., Gunak, F., y Aslan, M. (2008). PON1 activity and total oxidant status in patients with active pulmonary tuberculosis. *Clinical Biochemistry*, 41(3), 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.11.018>

Sekelsky, J. J., Burtis, K. C., y Hawley, R. S. (1998). Damage control: the pleiotropy of DNA repair genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 148(4), 1587–1598. <https://doi.org/10.1093/genetics/148.4.1587>

Sekelsky, J. J., Hollis, K. J., Eimerl, A. I., Burtis, K. C., y Hawley, R. S. (2000a). Nucleotide excision repair endonuclease genes in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 459(3), 219–228. [https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(99\)00075-0](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(99)00075-0)

Sekelsky, J. J., Brodsky, M. H., y Burtis, K. C. (2000b). DNA repair in *Drosophila*: Insights from the *Drosophila* genome sequence. *The Journal of Cell Biology*, 150(2), F31–F36. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.f31>

Sekelsky, J. (2017). DNA Repair in *Drosophila*: Mutagens, Models, and Missing Genes. *Genetics*. 205(2), 471-490. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.186759>

SENASICA-SAGARPA. (2014). Evaluación de la Campaña contra el ácaro rojo de las Palmas, operada con recursos del Componente de Sanidad del Programa de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria. Consultado el 31 de julio del 2020 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/95968/Evaluaci_n_Nacional_2014_Acaro_R_ojo.pdf

SENASICA-SAGARPA. (2015). Programa de trabajo de la campaña contra ácaro rojo de las Palmas, a operar con recursos del componente de sanidad del programa de sanidad e inocuidad agroalimentaria 2015, en el estado de Jalisco. Consultado el 7 de agosto del 2020 del sitio web: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/156343/_caro_rojo_de_las_palmas.pdf

SENASICA-SADER. (2019). Programa de trabajo específico de la campaña contra plagas reglamentadas de los cítricos a operar con recursos de del programa de sanidad e inocuidad agroalimentaria 2019, componente de campañas fotozoosanitarias en los estados de Nuevo León y Colima. Consultado el 8 de agosto del 2020 de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/561876/CITRICOS.pdf>

SENASICA. (2020). Tabla de Límites Máximos de Residuos 2020. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Gobierno de México. Consultado el 8 de agosto del 2020 del sitio web: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/limites-maximos-de-residuos-toxicos-y-contaminantes?state=published>

Siddique, H. R., Chowdhuri, D. K., Saxena, D. K., y Dhawan, A. (2005). Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 20(4), 285–290. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei032>

Siddique, H. R., Sharma, A., Gupta, S. C., Murthy, R. C., Dhawan, A., Saxena, D. K., y Chowdhuri, D. K. (2008). DNA damage induced by industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*: a mechanistic approach. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49(3), 206–216. <https://doi.org/10.1002/em.20373>

Sies, H., y Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 311(1152), 617–631. <https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0168>

Sies, H., Berndt, C., y Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.

Silva, E., Tiong, S., Pedersen, M., Homola, E., Royou, A., Fasulo, B., Siriaco, G., y Campbell, S. D. (2004). ATM is required for telomere maintenance and chromosome stability during *Drosophila* development. *Current Biology*, 14(15), 1341–1347. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.056>

Silver, D. L., Geisbrecht, E. R., y Montell, D. J. (2005). Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 132(15), 3483–3492. <https://doi.org/10.1242/dev.01910>

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., y Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

Song, N. E., Lee, J. Y., Mansur, A. R., Jang, H. W., Lim, M. C., Lee, Y., Yoo, M., y Nam, T. G. (2019). Determination of 60 pesticides in hen eggs using the QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Chemistry*, 298, 125050. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125050>

- Song, Y. H., Mirey, G., Betson, M., Haber, D. A., y Settleman, J. (2004). The *Drosophila* ATM ortholog, dATM, mediates the response to ionizing radiation and to spontaneous DNA damage during development. *Current Biology*, 14(15), 1354–1359. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.064>
- Su T. T. (2006). Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annual Review of Genetics*, 40, 187–208. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090428>
- Sun, H., Liu, C., Wang, S., Liu, Y., y Liu, M. (2013). Dissipation, residues, and risk assessment of spirodiclofen in citrus. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(12), 10473–10477. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3345-6>
- Sung, P., y Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 7(10), 739–750. <https://doi.org/10.1038/nrm2008>
- Sur, R. (2008). Metabolism of spirotetramat (Movento®) in plants. *Bayer CropScience Journal*, 61, 227-244.
- Suárez-Larios, K. (2008). Efectos de los polimorfismos de CYP1A1 y CYP2E1 en la frecuencia de micronúcleos en una población mestiza de Tlaxcala. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Sutris, J. M., How, V., Sumeri, S. A., Muhammad, M., Sardi, D., Mohd Mokhtar, M. T., Muhammad, H., Ghazi, H. F., y Isa, Z. M. (2016). Genotoxicity following organophosphate pesticides exposure among orang asli children living in an agricultural island in kuala langat, Selangor, Malaysia. *The International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 7(1), 42–51. <https://doi.org/10.15171/ijoem.2016.705>
- Sharma, A., Mishra, M., Shukla, A. K., Kumar, R., Abdin, M. Z., y Chowdhuri, D. K. (2012). Organochlorine pesticide, endosulfan induced cellular and organismal response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Hazardous Materials*, 221-222, 275–287. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.045>
- Schettler, T., Solomon, G., Kaplan, J., y Valenti, M. (2003). Generations at risk: How environmental toxicants may affect reproductive health in California. Brisbane, CA: George Lithograph. Consultado el 8 de agosto del 2021 de: www.igc.apc.org/psr/index.html
- Schumacher, B., Hofmann, K., Boulton, S., y Gartner, A. (2001). The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Current Biology*, 11(21), 1722–1727. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00534-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00534-6)
- Scutiero, G., Iannone, P., Bernardi, G., Bonaccorsi, G., Spadaro, S., Volta, C. A., Greco, P., y Nappi, L. (2017). Oxidative stress and endometriosis: A systematic review of the literature. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 7265238. <https://doi.org/10.1155/2017/7265238>
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: Safeguarding genome integrity. *Nature reviews. Cancer*, 3(3), 155–168. <https://doi.org/10.1038/nrc1011>

Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., y Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes and Development*, 14(3), 289–300.

Smith, J., Tho, L. M., Xu, N., y Gillespie, D. A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in Cancer Research*, 108, 73–112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0>

Sparks, T., y Nauen, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 122-128.

Stadtman, E. R. (1991). Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *The American journal of Clinical Nutrition*, 54(6 Suppl), 1125S–1128S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/54.6.1125s>

Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5074), 1220–1224. <https://doi.org/10.1126/science.1355616>

Staeva-Vieira, E., Yoo, S., y Lehmann, R. (2003). An essential role of DmRad51/SpnA in DNA repair and meiotic checkpoint control. *The EMBO Journal*, 22(21), 5863–5874. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg564>

Stracker, T. H., Roig, I., Knobel, P. A., y Marjanović, M. (2013). The ATM signaling network in development and disease. *Frontiers in Genetics*, 4, 37. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00037>

Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., y Pachitariu, M. (2021). Cellpose: A generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature Methods*, 18(1), 100–106. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x>

Stone, W. L., Pham, T., y Mohiuddin, S. S. (2022). *Biochemistry, Antioxidants*. In StatPearls. StatPearls Publishing.

Sverdrup, L. E., Bjørge, C., Eklo, O. M., Källqvist, T., Klingen, I., Låg, M., y Grung, M. (2011). Risk assessment of the pesticide Envirdor with the active substance spirotetramat. Opinion of the Panel on plant protection products Norwegian Scientific Committee for Food Safety. VKM Report.

Sverdrup, L., Bjorge, C., Eklo, O. M., Grung, M., Kallqvist, T., y Klingen, I. (2012). Risk assessment of the insecticide Movento 100 SC with the active substance spirotetramat. Bayer CropScience, 13, 1-25.

Svendsen, J. M., y Harper, J. W. (2010). GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution. *Genes and Development*, 24(6), 521–536. <https://doi.org/10.1101/gad.1903510>

Svetlova, M., Solovjeva, L., Nishi, K., Nazarov, I., Siino, J., y Tomilin, N. (2007). Elimination of radiation-induced gamma-H2AX foci in mammalian nucleus can occur by histone exchange. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(2), 650–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.188>

- Swevers, L., Raikhel, A.S., Sappington, T.W., Shirk, P., y Iatrou, K. (2005). Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. *Comprehensive Molecular Insect Science*. 1, 87-155.
- Tabassum, H., Afjal, M. A., Khan, J., Raisuddin, S., yParvez, S. (2015). Neurotoxicological assessment of pendimethalin in freshwater fish *Channa punctata* Bloch. *Ecological Indicators*. 58, 411-417.
- Tabassum, H., Ashafaq, M., Khan, J., Shah, M. Z., Raisuddin, S., y Parvez, S. (2016). Short term exposure of pendimethalin induces biochemical and histological perturbations in liver, kidney and gill of freshwater fish. *Ecological Indicators*. 3, 29-36.
- Takada, S., Kwak, S., Koppetsch, B. S., y Theurkauf, W. E. (2007). Grp (chk1) replication-checkpoint mutations and DNA damage trigger a Chk2-dependent block at the *Drosophila* midblastula transition. *Development (Cambridge, England)*, 134(9), 1737–1744. <https://doi.org/10.1242/dev.02831>
- Takai, H., Naka, K., Okada, Y., Watanabe, M., Harada, N., Saito, S., Anderson, C. W., Appella, E., Nakanishi, M., Suzuki, H., Nagashima, K., Sawa, H., Ikeda, K., yMotoyama, N. (2002). Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *The EMBO Journal*, 21(19), 5195–5205. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf506>
- Tan, Y., Raychaudhuri, P., y Costa, R. H. (2007). Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes. *Molecular and Cellular Biology*, 27(3), 1007–1016. <https://doi.org/10.1128/MCB.01068-06>
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Xu, B., Andreassen, P. R., Gregory, R. C., Kim, S. T., Lane, W. S., Kastan, M. B., y D'Andrea, A. D. (2002). Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell*, 109(4), 459–472. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00747-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00747-x)
- Tanaka, T., Huang, X., Halicka, H. D., Zhao, H., Traganos, F., Albino, A. P., Dai, W., y Darzynkiewicz, Z. (2007). Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry. Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 71(9), 648–661. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20426>
- Terashvili, M., Pratt, P. F., Gebremedhin, D., Narayanan, J., y Harder, D. R. (2006). Reactive oxygen species cerebral autoregulation in health and disease. *Pediatric Clinics of North America*, 53(5), 1029–xi. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2006.08.003>
- Terradas, M., Martín, M., y Genescà, A. (2016). Impaired nuclear functions in micronuclei results in genome instability and chromothripsis. *Archives of Toxicology*, 90(11), 2657–2667. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1818-4>
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., y Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206–221. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3<206:aid-em8>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206:aid-em8>3.0.co;2-j)
- Tiwari, M. N., Singh, A. K., Ahmad, I., Upadhyay, G., Singh, D., Patel, D. K., Singh, C., Prakash, O., y Singh, M. P. (2010). Effects of cypermethrin on monoamine transporters, xenobiotic

metabolizing enzymes and lipid peroxidation in the rat nigrostriatal system. *Free Radical Research*, 44(12), 1416–1424. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.512041>

Tiwari, A. K., Pragma, P., Ravi Ram, K., y Chowdhuri, D. K. (2011). Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila melanogaster* as an alternate animal model. *Theriogenology*, 76(2), 197–216. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.027>

Tiwari, R. K., Singh, S., y Pandey, R. S. (2019). Assessment of acute toxicity and biochemical responses to chlorpyrifos, cypermethrin and their combination exposed earthworm, *Eudrilus eugeniae*. *Toxicology Reports*, 6, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.03.007>

Timbrell, J. (1998). Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 129(1), 1-12

Tolwinski, N. S. (2017). Introduction: *Drosophila* a model system for developmental biology. *Journal of Developmental Biology*, 5(3), 9. <https://doi.org/10.3390/jdb5030009>

Toman, R., Hluchy, S., Cabaj, M., Massanyi, P., Roychoudhury, S., y Tunegova, M. (2016). Effect of separate and combined exposure of selenium and diazinon on rat sperm motility by computer assisted semen analysis. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 38, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.05.002>

Tootle, T. L., y Spradling, A. C. (2008). *Drosophila* Pxt: a cyclooxygenase-like facilitator of follicle maturation. *Development* (Cambridge, England), 135(5), 839–847. <https://doi.org/10.1242/dev.017590>

Topal, A., Alak, G., Ozkaraca, M., Yeltekin, A. C., Comaklı, S., Acıl, G., Kokturk, M., y Atamanalp, M. (2017). Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 175, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.047>

Toro-Restrepo, B. (2011). Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Revista Luna Azul*, (32), 121–127.

Transparency. (2019). Spirotetramat market to flourish with 4.4% CAGR due to awareness about its exceptional properties [www document]. Transparency Market Research. Consultado el 20 de diciembre del 2020 de: <https://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/spirotetramat-market.htm/> ¿

Tsygankov, V. Y., Boyarova, M. D., y Lukyanova, O. N. (2015). Bioaccumulation of persistent organochlorine pesticides (OCPs) by gray whale and Pacific walrus from the western part of the Bering Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 99(1-2), 235–239. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.020>

Uçar, A., Parlak, V., Özgeriş, F. B., Yeltekin, A. Ç., Alak, G., y Atamanalp, M. (2020). Determination of Fipronil toxicity by different biomarkers in gill and liver tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *In vitro cellular and developmental biology. Animal*, 56(7), 543–549. <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00480-3>

Ugur, B., Chen, K., y Bellen, H. J. (2016). *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Disease Models and Mechanisms*, 9(3), 235–244. <https://doi.org/10.1242/dmm.023762>

Uchendu, C., Ambali, S. F., Ayo, J. O., y Esiebo, K. A. N. (2018). Chronic co-exposure to chlorpyrifos and deltamethrin pesticides induces alterations in serum lipids and oxidative stress in Wistar rats: mitigating role of alpha-lipoic acid. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(20), 19605–19611. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2185-x>

Urióstegui-Acosta, M., Hernández-Ochoa, I., Sánchez-Gutiérrez, M., Piña-Guzmán, B., Rafael-Vázquez, L., Solís-Heredia, M. J., Martínez-Aguilar, G., y Quintanilla-Vega, B. (2014). Methamidophos alters sperm function and DNA at different stages of spermatogenesis in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 279(3), 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.06.017>

Uryu, O., Ameku, T., y Niwa, R. (2015). Recent progress in understanding the role of ecdysteroids in adult insects: Germline development and circadian clock in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Zoological Letters*. 1, 32.

Uziel, T., Savitsky, K., Platzer, M., Ziv, Y., Helbitz, T., Nehls, M., Boehm, T., Rosenthal, A., Shiloh, Y., y Rotman, G. (1996). Genomic organization of the ATM gene. *Genomics*, 33(2), 317–320. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0201>

Valdez-Salas, B., Garcia Duran, E. I., y Wiener, M. S. (2000). Impact of pesticides use on human health in Mexico: a review. *Reviews on Environmental Health*, 15(4), 399–412. <https://doi.org/10.1515/reveh.2000.15.4.399>

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., y Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

Velentzas, A. D., Velentzas, P. D., Sagioglou, N. E., Konstantakou, E. G., Anagnostopoulos, A. K., Tsioka, M. M., Mpakou, V. E., Kollia, Z., Consoulas, C., Margaritis, L. H., Papassideri, I. S., Tsangaris, G. T., Sarantopoulou, E., Cefalas, A. C., y Stravopodis, D. J. (2016). Targeted downregulation of s36 protein unearths its cardinal role in chorion biogenesis and architecture during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Scientific Reports*, 6, 35511. <https://doi.org/10.1038/srep35511>

Van Cauteren, H., de Kok, M. C. M., y Van Schooten, F. J. (1996). Cancer risk evaluation. In: *Toxicology. International Journal of Education and Research*, New York. 384-413.

van Daal, A., White, E. M., Gorovsky, M.A., y Elgin, S. C. (1988). *Drosophila* has a single copy of the gene encoding a highly conserved histone H2A variant of the H2A.F/Z type. *Nucleic Acids Research*, 16, 7487-7491.

van Daal, A., y Elgin, S. C. (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology of the Cell*, 3(6), 593–602. <https://doi.org/10.1091/mbc.3.6.593>

Venken, K. J., y Bellen, H. J. (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nature reviews. Genetics*, 6(3), 167–178. <https://doi.org/10.1038/nrg1553>

Ventura, C., Nieto, M. R., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., Rodriguez, H., Cao, G., Randi, A., Cocca, C., y Núñez, M. (2016). Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 156, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.10.010>

Verheyen, E. M. (2022). The power of *Drosophila* in modeling human disease mechanisms. *Disease Models and Mechanisms*, 15(3), dmm049549.

Villegas, S. N. (2019). One hundred years of *Drosophila* cancer research: no longer in solitude. *Disease Models and Mechanisms*, 12(4), dmm039032. <https://doi.org/10.1242/dmm.039032><https://doi.org/10.1242/dmm.049549>

Vimal, D., Saini, S., Kristipati, R. R., y Chowdhuri, D. K. (2019). Atrazine or bisphenol A mediated negative modulation of mismatch repair gene, *mlh1* leads to defective oogenesis and reduced female fertility in *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 225, 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.134>

Vitali, Čepo, D., Pelajić, M., Vinković Vrček, I., Krivohlavek, A., Žuntar, I., y Karoglan, M. (2018). Differences in the levels of pesticides, metals, sulphites and ochratoxin A between organically and conventionally produced wines. *Food Chemistry*, 246, 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.133>.

Vogel, A., Jocque, H., Sirot, L. K., y Fiumera, A. C. (2015). Effects of atrazine exposure on male reproductive performance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 72, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.11.002>

Von-Stetina, J. R., y Orr-Weaver, T. L. (2011). Developmental control of oocyte maturation and egg activation in metazoan models. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), a005553. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005553>

Wachendorff, U., Nauen R., Schnorbach, H. J., Rauch, N., y Elbert, A. (2002). The biological profile of spiroticlofen (Envidor) a new selective tetrone acid acaricide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*. 55, 149-176.

Ward, I. M., y Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 47759–47762. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100569200>

Watters, D., Kedar, P., Spring, K., Bjorkman, J., Chen, P., Gatei, M., Birrell, G., Garrone, B., Srinivasa, P., Crane, D. I., y Lavin, M. F. (1999). Localization of a portion of extranuclear ATM to peroxisomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34277–34282. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.34277>

Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., y Hekimi, S. (2018a). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *The Journal of Cell Biology*, 217(6), 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>

Wang, W., Yang, L. L., Luo, S. M., Ma, J. Y., Zhao, Y., Shen, W., y Yin, S. (2018b). Toxic effects and possible mechanisms following malathion exposure in porcine granulosa cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 64, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.11.002>.

Wang, W., Luo, S. M., Ma, J. Y., Shen, W., y Yin, S. (2019). Cytotoxicity and DNA damage caused from diazinon exposure by inhibiting the pi3k-akt pathway in porcine ovarian granulosa cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(1), 19–31. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05194>.

- Wazawa, T., Matsuoka, A., Tajima, G., Sugawara, Y., Nakamura, K., y Shikama, K. (1992). Hydrogen peroxide plays a key role in the oxidation reaction of myoglobin by molecular oxygen. A computer simulation. *Biophysical Journal*, 63(2), 544–550. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81608-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81608-9)
- Wei, P., Demaeght, P., De Schutter, K., Grigoraki, L., Labropoulou, V., Riga, M., Vontas, J., Nauen, R., Dermauw, W., y Van Leeuwen, T. (2020). Overexpression of an alternative allele of carboxyl/choline esterase 4 (CCE04) of *Tetranychus urticae* is associated with high levels of resistance to the keto-enol acaricide spiropdiclofen. *Pest Management Science*, 76(3), 1142–1153. <https://doi.org/10.1002/ps.5627>
- Williams, G. J., Lees-Miller, S. P., y Tainer, J. A. (2010). Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair*, 9(12), 1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.10.001>
- Wolin M. S. (2000). Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(6), 1430–1442. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.6.1430>
- Wu, H., Rao, Q., Zheng, J., Mao, C., Sun, Y., Gu, D., Wang, M., y Liu, X. (2018). Biochemical and histological alterations in adult zebrafish (*Danio rerio*) ovary following exposure to the tetronic acid insecticide spirotetramat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.020>
- Yamaguchi, M., y Yoshida, H. (2018). *Drosophila* as a Model Organism. In: Yamaguchi, M. (eds) *Drosophila Models for Human Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1076. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0_1
- Yang, C., Lim, W., y Song, G. (2020). Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and Pharmacology*, 234, 108758. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108758>
- Ye, M., Beach, J., Martin, J. W., y Senthilselvan, A. (2017). Pesticide exposures and respiratory health in general populations. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 51, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.11.012>
- Yin, X., Jiang, S., Yu, J., Zhu, G., Wu, H., y Mao, C. (2014). Effects of 153pirotetramat on the acute toxicity, oxidative stress, and lipid peroxidation in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) tadpoles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(3), 1229–1235. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.04.016>
- Young, H. K., Denecke, S. M., Robin, C., y Fournier-Level, A. (2020). Sublethal larval exposure to imidacloprid impacts adult behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, 33(2), 151–164. <https://doi.org/10.1111/jeb.13555>
- Yoshida, M., Inoue, K., y Takahashi, M. (2015). Predictive modes of action of pesticides in uterine adenocarcinoma development in rats. *Journal of Toxicologic Pathology*, 28(4), 207–216. <https://doi.org/10.1293/tox.2015-0026>
- Wu, H., Rao, Q., Zheng, J., Mao, C., Sun, Y., Gu, D., Wang, M., y Liu, X. (2018). Biochemical and histological alterations in adult zebrafish (*Danio rerio*) ovary following exposure to the tetronic

acid insecticide spirotetramat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.020>

Wang, X., Khadpe, J., Hu, B., Iliakis, G., y Wang, Y. (2003). An overactivated ATR/CHK1 pathway is responsible for the prolonged G2 accumulation in irradiated AT cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 30869–30874. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301876200>

Watters, G. P., Smart, D. J., Harvey, J. S., y Austin, C. A. (2009). H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutation research*, 679(1-2), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.07.007>

Zeljezic, D., y Garaj-Vrhovac, V. (2001). Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis*, 16(4), 359–363. <https://doi.org/10.1093/mutage/16.4.359>

Zuñiga, L. (2009). Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Zhang, J., Willers, H., Feng, Z., Ghosh, J. C., Kim, S., Weaver, D. T., Chung, J. H., Powell, S. N., y Xia, F. (2004). Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, 24(2), 708–718. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.708-718.2004>

Zhang, Q., Zhang, G., Yin, P., Lv, Y., Yuan, S., Chen, J., Wei, B., y Wang, C. (2015). Toxicological effects of soil contaminated with spirotetramat to the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 139, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.091>

Zhang, J., Qian, L., Teng, M., Mu, X., Qi, S., Chen, X., Zhou, Y., Cheng, Y., Pang, S., Li, X., y Wang, C. (2019). The lipid metabolism alteration of three spirocyclic tetramic acids on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 248, 715–725. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.035>

Zhang, Y., Xue, W., Long, R., Yang, H., y Wei, W. (2020a). Acetochlor affects zebrafish ovarian development by producing estrogen effects and inducing oxidative stress. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(22), 27688–27696. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09050-2>

Zhang, J., Qian, L., Wang, C., Teng, M., Duan, M., Chen, X., Li, X., y Wang, C. (2020b). UPLC-TOF MS/MS metabolomics analysis of zebrafish metabolism by spirotetramat. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 266(Pt 2), 115310. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115310>

Zhang, J., Qian, L., Wang, C., Teng, M., Duan, M., Zhou, Y., Chen, X., Bo, R., Wang, C., y Li, X. (2020c). Dysregulation of endocrine disruption, apoptosis and the transgenerational toxicity induced by spirotetramat. *Chemosphere*, 240, 124900. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124900>

Zhao, Y., Fan, C., Zhang, A., Zhang, Y., Wang, F., Weng, Q., y Xu, M. (2020). Walnut polyphenol extract protects against malathion- and chlorpyrifos-induced immunotoxicity by modulating TLRx-NOX-ROS. *Nutrients*, 12(3), 616. <https://doi.org/10.3390/nu12030616>

Zhao, X., Zhuang, Y., Wang, B., Yuan, B., Du, S., y Zeng, Z. (2023). The miR-34a-5p-c-MYC-CHK1/CHK2 axis counteracts cancer stem cell-like properties and enhances radiosensitivity in

hepatocellular cancer through repression of the DNA damage response. *Radiation Research*, 199(1), 48–60. <https://doi.org/10.1667/RADE-22-00098.1>

Zhu, Y., Liu, X., Xu, J., Dong, F., Liang, X., Li, M., Duan, L., y Zheng, Y. (2013). Simultaneous determination of spirotetramat and its four metabolites in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1299, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.049>

XI ANEXOS

11.1 Artículo requisito



Article

ATM/Chk2 and ATR/Chk1 Pathways Respond to DNA Damage Induced by Movento[®] 240SC and Envidor[®] 240SC Keto-Enol Insecticides in the Germarium of *Drosophila melanogaster*

Berenyce González-Marín ^{1,2} , María Elena Calderón-Segura ^{2,*} and Jeff Sekelsky ³

- ¹ Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Edificio D, 1^o Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico; berenyce@ciencias.unam.mx
 - ² Laboratorio de Toxicología Ambiental, Departamento de Ciencias Ambientales, Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico
 - ³ Department of Biology and Integrative Program for Biological and Genome Sciences, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599, USA; sekelsky@unc.edu
- * Correspondence: mcalderon@atmosfera.unam.mx

Abstract: DNA damage response (DDR) pathways in keto-enol genotoxicity have not been characterized, and few studies have reported genotoxic effects in non-target organisms. The present study shows that concentrations of 11.2, 22.4, 37.3 mg/L of Movento[®] 240SC and 12.3, 24.6, 41.1 mg/L of Envidor[®] 240SC for 72 h oral exposure induced DSBs by significantly increasing the percentage of γ H2AV expression in regions 2b and 3 from the germarium of wild type females of *Drosophila melanogaster* Oregon R, compared to the control group (0.0 mg/L of insecticides), via confocal immunofluorescence microscopy. The comparison between both insecticides' reveals that only the Envidor[®] 240SC induces concentration-dependent DNA damage, as well as structural changes in the germarium. We determined that the DDR induced by Movento[®] 240SC depends on the activation of the *ATM^{tefu}*, *Chk1^{87P}* and *Chk2^{lok}* kinases by significantly increasing the percentage of expression of γ H2AV in regions 2b and 3 of the germarium, and that *ATR^{mei-29D}* and *p53^{dp53}* kinases only respond at the highest concentration of 37.3 mg/L of Movento[®] 240SC. With the Envidor[®] 240SC insecticide, we determined that the DDR depends on the activation of the *ATR^{mei-29D}/Chk1^{87P}* and *ATM^{tefu}/Chk2^{lok}* kinases, and *p53^{dp53}* by significantly increasing the percentage of expression of γ H2AV in the germarium.

Keywords: keto-enol insecticides; DNA damage response; *Drosophila germarium*



Citation: González-Marín, B.; Calderón-Segura, M.E.; Sekelsky, J. ATM/Chk2 and ATR/Chk1 Pathways Respond to DNA Damage Induced by Movento[®] 240SC and Envidor[®] 240SC Keto-Enol Insecticides in the Germarium of *Drosophila melanogaster*. *Toxics* **2023**, *11*, 754. <https://doi.org/10.3390/toxics11090754>

Academic Editors: Panagiotis Skouras, Eirini Karanastasi and John T. Margaritopoulos

Received: 25 July 2023
Revised: 24 August 2023
Accepted: 30 August 2023
Published: 6 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pesticides are considered ubiquitous pollutants in the environment. Exposure to these compounds has been associated with alterations in genetic material and the development of various types of cancer [1–3]. Keto-enol insecticides are a new group of agrochemicals derived from tetrone and tetramic acids, which have been commercialized by Bayer since 2000 in Mexico [4,5]. These contain three active ingredients: Spirodiclofen (Envidor[®] 240SC), Spiromesifen (Oberon[®] 240SC) and Spirotetramat (Movento[®] 240SC) [4,6]. They present a novel mechanism of action by interfering with lipid biosynthesis, acting as acetyl-coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibitors [6–8]. Exposure to these insecticides has been associated with various toxic effects on non-target organisms. Spirodiclofen (Envidor[®] 240SC) is classified as a possible carcinogenic agent by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2009); it induces uterine adenocarcinoma, Leydig cell hypertrophy, vacuolization, degeneration and hyperplasia of interstitial cells in mammalian testes [9,10]; it produces alterations during the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) [11], oxidative

11.2 Segundo artículo derivado de investigación doctoral



Data Report

Movento® 240SC (Spirotetramat) and Envidor® 240SC (Spirodiclofen) keto-enol insecticides induce DNA damage in *Drosophila melanogaster* ovaries

Berenyce González-Marín, María Elena Calderón-Segura, Ana Karen González Pérez
and Luis Gerardo Moreno Ciénega

Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Environmental Sciences, Center of Atmospheric Sciences,
National Autonomous University of Mexico, Ciudad Universitaria Coyoacán, 04510, Mexico

(Received June 17, 2021; Accepted June 29, 2021)

ABSTRACT — Movento® 240SC and Envidor® 240SC are new insecticide derivatives of tetramic acid belonging to a keto-enol pesticide family. However, few studies have reported genotoxic effects in non-target organisms. In the present study, the genotoxic effects of Movento® 240SC and Envidor® 240SC on *Drosophila melanogaster* ovaries were analyzed using the alkaline comet assay. Simultaneously, we determined the LD₅₀ for both insecticides. Virgin females were exposed to food at three sublethal concentrations (11.2, 22.4, 37.3 mg/L) of Movento® 240SC and (12.3, 24.6, 41.1 mg/L) of Envidor® 240SC for 72 hr. As a negative control group, females were exposed to food without insecticides, and as a positive control group, females were exposed to 17.5 mg/L bleomycin under the same experimental conditions. We analyzed three genotoxic parameters, tail length, tail moment, and tail intensity, in ovarian cells. The results showed that 11.2 mg/L Movento® 240SC insecticide significantly increased the tail intensity mean in ovarian cells compared with the negative control. However, 22.4 and 37.3 mg/L Movento® 240SC significantly increased tail length and tail moment means compared with the negative control. Envidor® 240SC insecticide at 12.3, 24.6, 41.1 mg/L significantly increased the three genotoxic parameters in ovarian cells compared with the negative control. The LD₅₀ values of Movento® 240SC and Envidor® 240SC insecticides were 79.1 mg/L and 78.0 mg/L, respectively. The genotoxic response of the two keto-enol pesticides was dependent on the concentration of each pesticide. The results demonstrated that Movento® 240SC and Envidor® 240SC keto-enol insecticides are genotoxic agents in *D. melanogaster* ovaries.

Key words: Movento® 240SC, Envidor® 240SC, Keto-enol insecticides, DNA damage

INTRODUCTION

Epidemiologic studies have indicated that there is an association between pesticide exposure and the development of diverse reproductive disorders, allergies and cancer. Pesticides are also considered to be one of the main factors involved in environmental contamination (Zaller, 2020). Keto-enol insecticides are a new group of pesticides derived from tetrionic and tetramic acids, were

developed by Bayer in the 1990s and contain three commercially available cyclic keto-enol compounds, i.e., spirodiclofen (Envidor® 240SC), spiromesifen (Oberon® 240SC) and spirotetramat (Movento® 240SC) (Sparks and Nauen, 2015) (Fig. 1A, B), which have been successfully registered in the United States, Brazil, Mexico, and other countries for the control of a broad spectrum of sucking insects, such as aphids, psyllids, mealybugs, whiteflies and oth-

Correspondence: María Elena Calderón-Segura (E-mail: mcalderon@atmosfera.unam.mx)