



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Ensayo somático sobre la genotoxicidad del herbicida
simazina en *Drosophila melanogaster***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARÍA FERNANDA RAMÍREZ CORCHADO



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROSARIO RODRÍGUEZ ARNÁIZ
2017**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos de la alumna

Ramírez Corchado María Fernanda

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

56188849

2. Datos del tutor

Dra. Rosario Rodríguez Arnaíz

3. Datos de sinodal 1

Dra. María Eugenia Gosebatt Bonaparte

4. Datos de sinodal 2

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

5. Datos de sinodal 3

Dra. María Elena Calderón Segura

6. Datos de sinodal 4

M. en C. Irma Elena Dueñas García

7. Ensayo somático sobre la genotoxicidad del herbicida simazina en *Drosophila melanogaster*.

45 p.

2017

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

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, UNAM, en especial a la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, como por su apoyo, paciencia, resolver mis dudas y por compartir sus conocimientos para poder terminar este trabajo.

A la Dra. America Nitxin Castañeda Sorbitran y a la M. en C. María Guadalupe Ortaz Tellez por su apoyo a lo largo del taller, contestando mis dudas y por compartir sus conocimientos durante mi formación.

A los miembros del jurado

Dra. María Eugenia Gosebatt Bonaparte

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

Dra. María Elena Calderón Segura

M. en C. Irma Elena Dueñas García

por la revisión del manuscrito, que con sus observaciones brindadas contribuyeron a la mejora de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Paola, Biól. Viridiana, Biól. Ana, Biól. Claudia, M. en C. Jovana y M. en C. Ricardo, con quienes pase momentos divertidos, compartimos el trabajo y me apoyaron en la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi madre Ma. De Lourdes Corchado Luna, por todo el apoyo, cariño y amor que me has dado; por estar ahí cuando lo he necesitado, por todos sus puntos de vistas en este trabajo y los consejos que me has brindado a lo largo de la vida.

A mi padre Roberto Ramírez Ortega, por brindarme el apoyo, comprensión y ayuda incondicional a lo largo de mi vida y de mi carrea.

A mis tíos Miguel, Erika, Gelos, Karina, Luis, Juan, mi abuelo Miguel y toda mi familia que se mostraron preocupados por mis avances en el estudio, por su apoyo a lo largo de mi vida y de la carrera universitaria.

A mi abuela Lucila que aunque yo no se encuentra a mi lado, por darme todo su amor y apoyo.

Los quiero mucho.

Índice

I.	Resumen.....	1
II.	Antecedentes.....	1
	2.1. Plaguicidas.....	1
	2.2. Clasificación de los plaguicidas.....	2
	2.3. Metabolismo de xenobióticos.....	8
	2.4. Citocromos P450.....	9
	2.5. Biotransformación de la simazina.....	10
	2.6. <i>Drosophila melanogaster</i> , organismo modelo.....	12
	2.7. Descripción y ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	13
	2.8. Concentración letal media (CL ₅₀).....	14
	2.9. Ensayo de mutación y recombinación somáticas (SMART).....	15
III.	Justificación.....	17
IV.	Objetivos.....	17
	4.1. Objetivo general.....	17
	4.2. Objetivos particulares.....	17
V.	Hipótesis.....	17
VI.	Materiales y métodos.....	18
	6.1. Determinación de la concentración letal media (CL ₅₀) de la simazina.....	18
	6.2. Tratamiento de larvas.....	18
	6.3. Preparación de alas para la lectura.....	18
	6.4. Análisis al microscopio de las alas.....	19
	6.5. Estadístico SMART.....	20
VII.	Resultados.....	21
	7.1. CL ₅₀ de la simazina comercial (Simanex 50 SC ®).....	21
	7.2. Ensayo SMART.....	22
	7.2.1. Frecuencias de manchas totales.....	22
	7.2.2. Distribución por tamaño de manchas.....	24
VIII.	Discusión.....	28
IX.	Conclusiones.....	33
X.	Bibliografía.....	34
XI.	Anexo.....	42

I. Resumen

Actualmente, los herbicidas se usan en actividades forestales, en ganadería, en jardinería y principalmente en la agricultura. Sin embargo, su aplicación generalmente tiene efectos adversos sobre el ambiente y en la salud de las personas. Por lo anterior, es importante estudiar los efectos que ocasionan dichos compuestos, siendo el objetivo de este trabajo, la evaluación de la genotoxicidad de la simazina en *Drosophila melanogaster* por medio del ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) en las alas. Este ensayo tiene como fin la detección de la pérdida de heterocigosis, mediante marcadores recesivos que se expresan fenotípicamente en la superficie de las alas como tricomas múltiples (*mmh*) y en forma de flama (*flr*³). Para el ensayo SMART se utilizaron dos cruza de *D. melanogaster*, la cruza estándar (ST) y la de alta bioactivación (HB). Esta última se caracteriza por tener una alta sensibilidad a promutágenos y procarcinógenos. Cada cruza se expuso a tres concentraciones de simazina comercial al 1%, al 2.5% y al 5%, así como un control negativo (H₂O) y uno positivo (mitomicina C al 0.15 mM) en larvas de 72 ± 3 h de edad. Posteriormente, al emerger los adultos, se fijaron en etanol al 70%, se realizaron las preparaciones de alas y se observaron al microscopio óptico. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico SMART versión 2.1. Los resultados nos indicaron que la simazina comercial no presenta diferencias significativas para la cruza estándar, pero sí existe un efecto genotóxico en las concentraciones de 2.5% y 5% en la cruza de alta bioactivación.

II. Antecedentes

2.1. Plaguicidas

El término plaguicida, de acuerdo al artículo 278 de la Ley General de la Salud (2015), se aplica a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten las enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, así como las sustancias defoliantes y las desecantes.

Los plaguicidas comúnmente se emplean en formulaciones, es decir, en mezclas de un ingrediente activo con una serie de sustancias que permiten obtener una máxima efectividad sobre la plaga. Los componentes principales presentes en las formulaciones son, de acuerdo con Ortiz y Fernández, 2005:

-Ingrediente activo. Es la sustancia o grupo de sustancias que actúa directamente, es decir, la que ejerce el efecto tóxico o de control sobre la plaga.

- Ingredientes inertes o diluyentes. Son sustancias que se agregan con la finalidad de ayudar a la mejor aplicación del ingrediente activo, ya que en muchos casos se requiere manejar dosis pequeñas.

-Aditivos o coadyuvante. Son sustancias incorporadas a la formulación para mejorar ciertas características de los plaguicidas; estas sustancias por sí solas no tienen propiedad de plaguicidas, dentro de ellas se encuentran agentes adherentes, dispersantes, estabilizadores, surfactantes, etcétera.

Dependiendo de la formulación y del uso al que se destinarán, los plaguicidas se venden en diferentes presentaciones: concentrado, gránulo, polvo, sólido, suspensión, botón, líquido, etcétera.

2.2. Clasificación de los plaguicidas

Existen diversas formas para clasificar a los plaguicidas, las cuales dependen de diferentes criterios: (a) según el ser vivo sobre el que actúan (Tabla 1); (b) Según al grupo químico al que pertenecen (ver ejemplo en Tabla 2); (c) según su especificidad sobre el parásito (polivalentes o de amplio espectro y específicos o selectivos); (d) según su comportamiento en la planta (Tabla 3); y (e) según el modo de acción sobre el parásito (Tabla 4).

Tabla 1. Plaguicidas según el organismo en el actúan.

PLAGUICIDA	ACTÚA EN
Insecticida	Insectos.
Fungicida	Hongos.
Ovicida	Huevos de una peste o parásitos.
Herbicida	Malezas y hierbas.
Acaricida	Ácaros.
Nematicida	Nematodos.
Antibiotico	Bacterias.
Avicida	Aves.
Helícida	Moluscos.
Rodenticida	Rodeadores.

Tabla 2. Plaguicidas por grupo químico al que pertenecen. Debido a que en esta clasificación se puede encontrar una gran variedad de grupos, aquí solo se muestra algunos ejemplos.

PLAGUICIDA	ESTRUCTURA QUÍMICA
Organoclorados	Generalmente, corresponde a los hidruros clorados aromáticos, aunque algunos tienen además cloro, oxígeno u azufre. (OPS, 2003).
Clorofenoxi	Derivados de los ácidos fenoxiacéticos (Santillo D., <i>et al.</i> , 2001).
Organoestáticos	Compuestos orgánicos que contienen al menos un enlace carbono-estaño (Santillo D., <i>et al.</i> , 2001).
Carbamatos	Esteres derivados de los ácidos N-metil o dimetil carbámico (OPS, 2003).
Organofosforados	Esteres del ácido fosfórico (OPS, 2003).
Derivados de la urea	La urea está compuesta por un grupo carboxílico y dos grupos aminas. Los hidrógenos de los grupos aminas son sustituidos por diversos radicales para obtener los herbicidas derivados de la urea (CIAT, 1982).
Biripídilos	Compuestos de amonio cuaternario (OPS, 2003).
Aceites minerales	Un aceite mineral está formado por hidrocarburos saturados y no saturados, ambos procedentes del petróleo (Porcuna, 2011).
Ftalimidas	Imida derivada del ácido ftálico con dos grupos carbonilo unidos a una amina secundaria (OPS, 2003).
Triazinas	Compuesto heterocíclico con tres átomos de carbono reemplazados por átomos de nitrógeno (CIAT, 1982).
Piretrinas y piretroides	Compuestos sintéticos que guardan alguna semejanza con las sustancias activas del piretro (ésteres de los ácidos crisantémico y piretroico) (CIAT, 1982).

Tabla 3. Tipos de plaguicidas de acuerdo a su comportamiento en la planta.

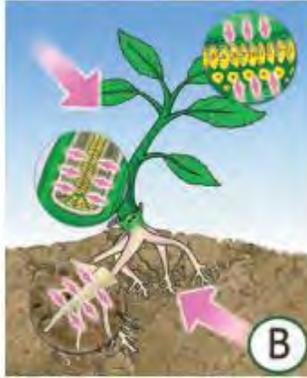
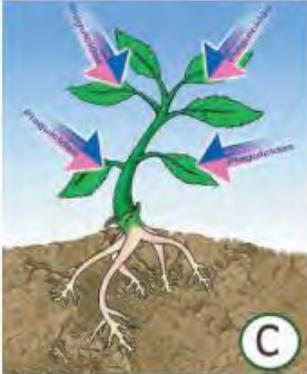
PLAGUICIDA	ACCIÓN	EJEMPLO
Sistémicos (A)	Productos que se incorporan al sistema de la planta y se transporta a todas las partes de la misma.	
Penetrantes o translaminares (B)	Productos que, aplicados en la parte aérea o en las raíces de las plantas, se introducen en el tejido, se fijan y no se trasladan a otras partes.	
Superficiales o de contacto (C)	Productos que se quedan en la superficie de la planta.	

Tabla 4. Según el modo de acción sobre el parásito. Debido a que en esta clasificación se puede encontrar una gran variedad de grupos, aquí solo se muestra algunos ejemplos.

PLAGUICIDA	ACCIÓN
Por contacto	Sobre el organismo parásito al entrar en contacto con este.
Por ingestión	Al ser ingerido por el parásito.
Por inhalación o asfixiante	A través del aparato respiratorio del insecto.
Mixto	Por ingestión, por contacto y por inhalación.
Repelentes	Se utilizan para alejar a los parásitos dañinos.

Es importante destacar que, aunque los plaguicidas se aplican en diversos ámbitos, su mayor uso se enfoca en la agricultura, seguido por las actividades forestales, de ganadería y de jardinería, razón por la cual los problemas más relevantes ocasionados por su uso, se centran en el campo (Morell, 1998). Además, su aplicación puede tener efectos adversos al medio y en el ser humano, ya sea por una exposición directa o indirecta (Rey, 2013).

En este trabajo se utilizó al herbicida denominado simazina. La simazina es un producto químico que inhibe o interrumpe el crecimiento y el desarrollo de la planta (Peterson *et al.*, 2001), se usa en la agricultura moderna para el control de las malezas en los cultivos que provocan la disminución en el rendimiento y en la calidad de las semillas cosechadas además del incremento en los costos de producción (Dieleman y Mortensen, 1998).

El 6-Cloro-N₂,N₄-dietil-1,3,5-triazin-2,4-diamina (Figura 1), conocido también como simazina, es un sólido cristalino que pertenece a los herbicidas clorotriazínicos (Tabla 5). Este herbicida se utiliza para controlar malezas de hojas anchas y gramíneas de los cultivos. La simazina controla también algunas especies resistentes a la atrazina. Entre los cultivos en los que se utiliza están: espárrago, alfalfa, manzanas, melocotones, almendras, moras, arándanos, cerezas, uvas, aceitunas, cítricos, peras, frambuesas, nueces, ciruelas, fresas, cacao, café, caña de azúcar, aguacate, árboles de navidad y maíz (Ware, 2000).

La simazina provee control en la mayor parte del ciclo del desarrollo de la planta cultivada; sin embargo, sus residuos pueden dañar a los cultivos susceptibles subsiguientes en la rotación. Este herbicida no se absorbe foliarmente, solo por la raíz, por lo que su aplicación es pre-emergente o post-emergente de las malezas en combinación con el herbicida Paraquat (Galíndez, 2010).

La Agencia de Protección del Medio Ambiente (Environmental Protection Agency: EPA) determinó que el máximo permitido de simazina en agua potable es de 4 µg/L (USEPA, 2000); en la Unión Europea (UE) se determinó un máximo de 0.1 µg/L (European Commission, 2005), mientras que en México la simazina no está regulada.

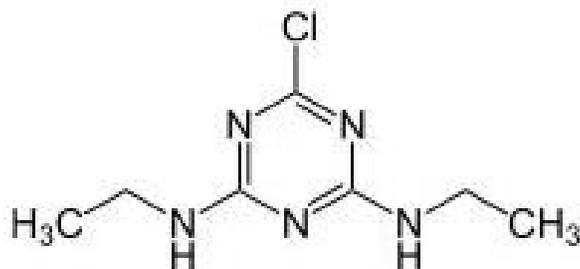


Figura 1. Estructura química del 6-Cloro-N2,N4-dietil-1,3,5-triazin-2,4-diamina; tomado de Hao yuan Industries (<http://hy-chemproduct.com/1-5-simazine/170131>)

Tabla 5. Propiedades físicas y químicas de la simazina (The Merck index, 1989).

Nombre (IUPAC)	6-Cloro-N2,N4-dietil-1,3,5-triazin-2,4-diamina
Formula molecular	C ₇ H ₁₂ ClN ₅
Nombres comerciales	Aquazine, Simanex, Herdex, Pricep, Premazine, Yodrazin, Primatol S, Desatop, G-27692, Gesatop 50 P.H., Gesatop Calibre 90 GDA, Simanex 50 SC, Simanex 50 WP, Simanex 98%, Simanex Técnico, Simazina Técnica
Peso molecular	201.69
Color	Blanco cristalino
Estado Físico	Sólido
Punto de fusión	225 a 227 °C
Solubilidad	Agua: 3.5 ppm a 20°C Metanol: 400 p.p.m. Eter de petróleo: 2 p.p.m.
Densidad	1.302 g/cm ³
Vida media en suelo	37 a 234 días

La toxicidad a corto plazo de la simazina, en las personas cuando se exponen a niveles superiores a tres partes por billón por periodos relativamente cortos, puede causar pérdida de peso y leucemia. A largo plazo, a exposiciones superiores a tres partes por billón provoca temblorina, daño en los testículos, riñones, hígado y tiroides, mutaciones genéticas y cáncer (Galíndez, 2010).

La Unión Europea creó una lista de 90 sustancias peligrosas, donde la simazina está clasificada como N; R50-53, es decir, muy tóxica para organismos tales como algas y *Daphnia* (R50) pudiendo causar efectos adversos a largo plazo en ambientes acuáticos (R53) (European Comision, 2005).

Además, se han realizado diversas investigaciones para conocer qué efectos toxicológicos y genotóxicos puede inducir su empleo (OMS, 2003) tales como:

- Toxicidad para la reproducción, embriotoxicidad y teratogenicidad.

En un estudio realizado por Ciba-Geigy (1965) no se observaron efectos reproductores en tres generaciones de ratas a las que se les administró el herbicida a dosis de hasta 100 mg/kg de alimento.

Estudios posteriores en ratas y conejos (Ciba-Geigy, 1976) se determinó que el compuesto no es embriotóxico ni teratogénico cuando se administra en dosis que no son tóxicas para la madre.

- Toxicidad genética.

En ninguno de los datos obtenidos a partir de ensayos con *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* y *Saccharomyces cerevisiae* se muestra que la simazina cause efectos mutagénicos (Simmons *et al.*, 1977; Fahring, 1974) o que produzca conversión génica y recombinación mitótica en *S. cerevisiae*, ni aneuploidía en *Neurospora crassa* (Fahrig, 1974; Siebert y Lemperle, 1974; Griffiths, 1979).

En ensayos *in vitro* con células humanas, se induce un pequeño aumento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (Ghiazza *et al.*, 1984).

En los ensayos con células de ovarios de hámster chino (CHO) no se observó intercambio de cromátidas hermanas (Biradar y Rayburn; 1995^a), pero sí se induce el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos y mutaciones inducidas en linfocitos de ratón (Clayton y Clayton, 1994); no induce daños en el DNA de los hepatocitos primarios de rata (DPR, 1993). Además, se obtuvieron resultados negativos en el ensayo cometa, ensayo de micronúcleos en médula ósea y en leucocitos de ratón (Waters *et al.*, 1982; Kligerman *et al.*, 2000^b; Tennant *et al.*, 2001).

En plantas, la simazina no da lugar a la formación de micronúcleos en *Tradescantia* (Ma *et al.*, 1984), pero induce aberraciones cromosómicas en otras especies de plantas tales como *Hordeum vulgare* (Wuu y Grant, 1966; 1967^a), *Zea mays* (Plewa *et al.*, 1984), *Fragaria ananassa* (Malone y Dix, 1990), *Vicia faba* (Wuu y Grant, 1967^b), *Crepis capillaris* (Voskanyan y Avakyan, 1984). En ensayos con semillas de cebada se encontró que induce el rompimiento y aberraciones en cromosomas, así como aumentó en la aneuploidía y poliploidía (Wuu y Grant, 1966; 1967^a; Stroev, 1970).

En estudios realizados con *Drosophila melanogaster*, la simazina indujo mutaciones letales dominantes (Valencia, 1975), y mostró un aumento en las mutaciones letales recesivas ligadas al cromosoma X cuando se inyecta a machos de *D. melanogaster*, pero no se observa el mismo efecto cuando se alimenta a los individuos en estado larvario (Murnik y Nash, 1977). Para complementar, en el anexo se muestran los ensayos realizados con la simazina por otros autores con sus resultados.

2.3. Metabolismo de xenobióticos

El metabolismo de los xenobióticos es un fenómeno dual en el que interviene tanto en la bioactivación como la desintoxicación del xenobiótico. En la mayoría de los casos, los metabolismos intermedios son bioinactivados y desintoxicados, pero en otros casos, los xenobióticos pueden provocar cambios fisiológicos y bioquímicos debido a una deficiente desintoxicación y/o reacción de los metabolitos intermedios con los constituyentes celulares, lo cual produce diversos efectos tóxicos, desde daño celular hasta la muerte (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

El equilibrio entre los fenómenos de activación y de desintoxicación determina, en última instancia, si el daño provocado por la exposición a un compuesto químico particular se expresa o no en el organismo, por medio de la biotransformación, la cual puede dividirse en dos fases (Tabla 6). La fase I se refiere a todas las reacciones que introducen grupos funcionales o reactivos a las moléculas. Se incluyen reacciones como la hidrólisis, la oxidación y la reducción, catalizadas principalmente por las enzimas de los citocromos P450 (CYP450s). Las actividades que pueden realzar éstas son de 3 tipos:

- 1) Monogenasas: Se lleva a cabo en presencia de O_2 y NADPH; a través de esta actividad los compuestos xenobioticos inertes (no polares) sufren reacciones como: $XH + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow XOH + NADP^+ + H_2O$
- 2) Oxidasas: En ella ocurre la transferencia de electrones de un P450 reducido al oxígeno molecular acompañado de la formación de radicales anionicos superóxido (O_2^-) y de peróxido de hidrógeno. Siendo la reacción general: $NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow NADP^+ + H_2O_2$
- 3) Reductasas: se da en condiciones anaerobias y en ella se da la transferencia de electrones a sustratos Para producir radicales libres.

La fase II es la conjunción de los metabolitos generados en la fase I con los aminoácidos, el ácido glucorónico, el sulfato o con el glutatión. Estas conjunciones facilitan el transporte y la eliminación de los metabolitos, fase que es catalizada fundamentalmente por las glutatión-transferasas (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

Tabla. 6. Principales reacciones de biotransformación de algunos compuestos xenobioticos en las diferentes fases del metabolismo (tomado de Rodríguez-Arnaiz, 2004).

REACCION	ENZIMA
<i>Fase I</i>	
Oxidación	citocromos P450
Oxidación	Alcohol deshidrogenasa
Reducción	citocromos P450
Hidrolisis	Esterasas
<i>Fase II</i>	
Agua	Epóxido-hidrolasa
Glutación	Glutation-transferasa
Ácido glucurónico	Glucoronil-transferas
Ácido acético (Acetil-CoA)	N-acetiltransferas

2.4. Citocromos P450

Los CP450s (Figura 2) conforman a una superfamilia de hemoproteínas que se caracterizan por mostrar un pico de absorbancia a los 450 nm, siendo unas de las familias más antiguas y más grandes; se sabe que sus genes evolucionaron a partir de un ancestro común hace alrededor de 2,500 millones de años. (Rodríguez- Arnaiz, 2003).

Las cuales están involucrados en diferentes rutas metabólicas, pues poseen actividad de monoxigenasa, oxidasa y reductasa. Localizadas a nivel celular los citocromos P450 se encuentran en los eucariontes tanto en retículo endoplásmico como en las mitocondrias. En el retículo endoplásmico se encuentran orientados hacia el citoplasma, mientras que en las mitocondrias están orientados hacia el interior del organelo, es decir, la luz (Rodríguez-Arnaiz, 2004). A nivel tisular en vertebrados se localiza en cantidades elevadas en el hígado, intestino, pulmones, riñón, ovarios, testículos, glándulas suprarrenales y placenta. En insectos, los citocromos P450 se han encontrado en cuerpo grasos pericuticulares, en el intestino medio y en los túbulos de Malpighi. (Rodríguez-Arnaiz, 2004).

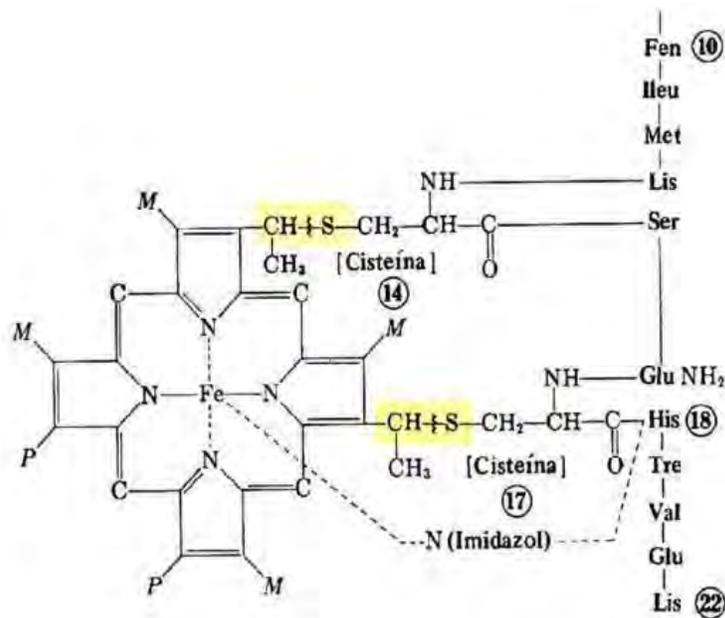


Figura 2. Estructura química del citocromo p450 con un grupo hemo, el cual el hierro se encuentra unido a un grupo tiol (-SH) de una cisteína y a una molécula de agua (tomado de Burke, 1971).

La interacción de los xenobióticos con los citocromos P450s consiste en su transformación en formas hidrosolubles para ser excretadas con una mayor facilidad; dicho de manera general, esto es posible cuando se inserta un átomo de oxígeno al sustrato y la reducción del otro átomo de oxígeno con la formación concomitante de agua (Rodríguez- Arnaiz, 2004).

2.5. Biotransformación de la simazina

La vía metabólica que siguen las clorotriazinas, tales como la simazina (Figura 3), se ha estudiado en bacterias como la *Pseudomonas* sp., donde la biodegradación de la simazina se lleva a cabo por enzimas codificadas por los genes *atzA*, *atzB* y *atzC*. Que están agrupados en el plásmido que confiere resistencia. En la vía "superior" la primera enzima, la clorohidrolasa atrazina (AtzA), codificada por el gen *atzA*, cataliza la decloración hidrolítica de la simazina (1, Figura 3) para producir hidroxisimazina (2, Figura 3), el primer metabolito de la vía catabólica. Las reacciones posteriores, catalizadas por las enzimas etilaminohidrolasa hidroxiatrazina (AtzB) codificados por el gen *atzB*, y N-isopropilameliide-isopropilaminahidrolasa (AtzC) codificados por el gen *atzC*; transforman la hidroxisimazina a N-etilameliida (3, Figura 3) y finalmente, a ácido cianúrico (4, Figura 3). Este paso es la última reacción de la vía de degradación superior (Souza *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2008^a; Hernández *et al.*, 2008^b).

La vía de degradación s-triazina "inferior" implica a las enzimas amidohidrolasa ácido cianúrico (AtzD), biuret hidrolasa (AtzE) e hidrolasa alofanato (AtzF), codificadas por los genes *atzD*, *atzE* y *atzF*, respectivamente. Estas enzimas transforman al ácido cianúrico en biuret (5, Figura

3) alofanato (6, Figura 3) y finalmente, en dióxido de carbono y amoníaco (Souza *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2005).

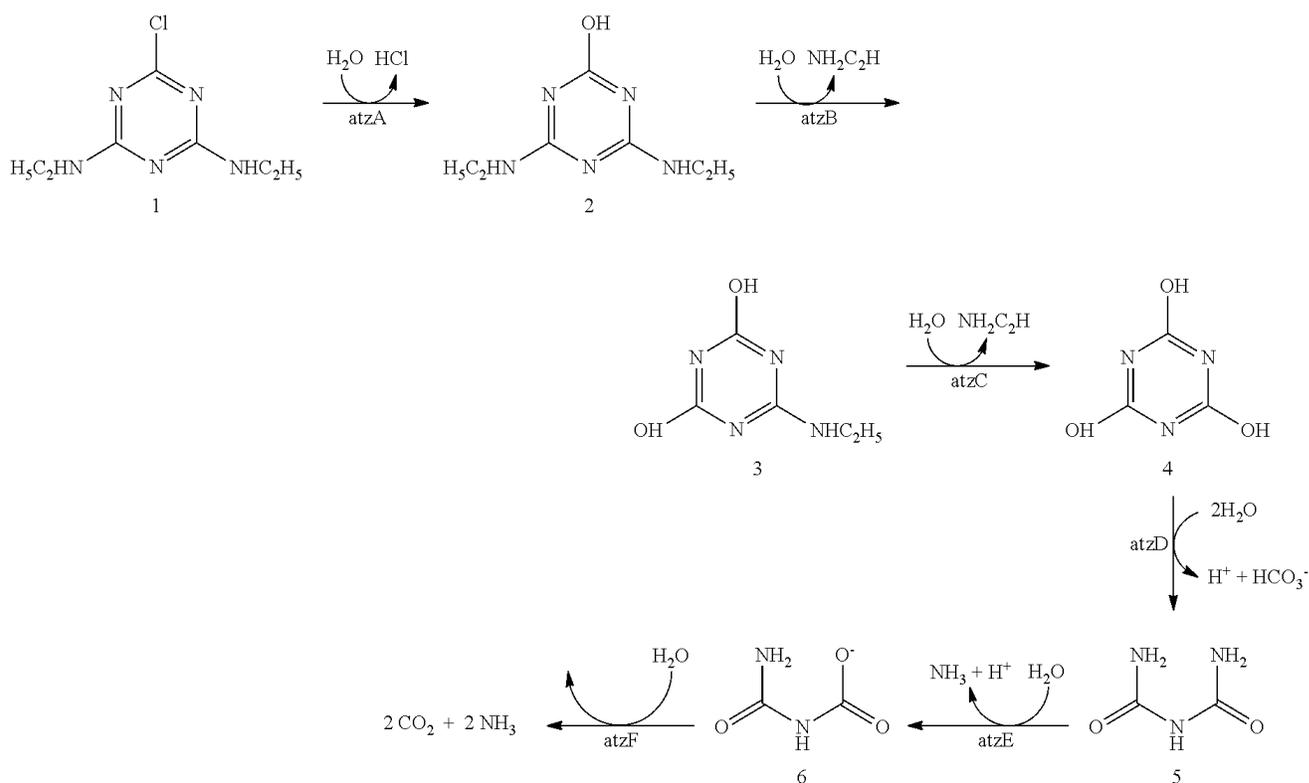


Figura 3. Degradación de la Simazina por *Pseudomonas* sp. En la vía metabólica participan los genes *atzA*, *atzB* y *atzC* de la vía superior, responsables de la conversión de la atrazina en ácido cianúrico (1-4). Mientras que los genes *atzD*, *atzE* y *atzF* de la vía inferior, mineraliza ácido cianúrico hasta obtener dióxido de carbono y amoníaco (5 y 6) (Martínez *et al.*, 2001).

También se han realizado estudios *in vivo* con microsomas de hígado de rata sobre el metabolismo de la simazina, en los cuales, los metabolitos se determinaron por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La ruta metabólica dominante de la simazina se llevó a cabo por medio de la N-monodealquilación y la isopropil hidroxilación, mediados por el sistema de los CYP450. Como resultado solo se detectó 2-cloro-4-etilamino-6-amino-1,3,5-triazina (Figura 4) en el metabolismo de la simazina (Hanioka *et al.*, 1999).

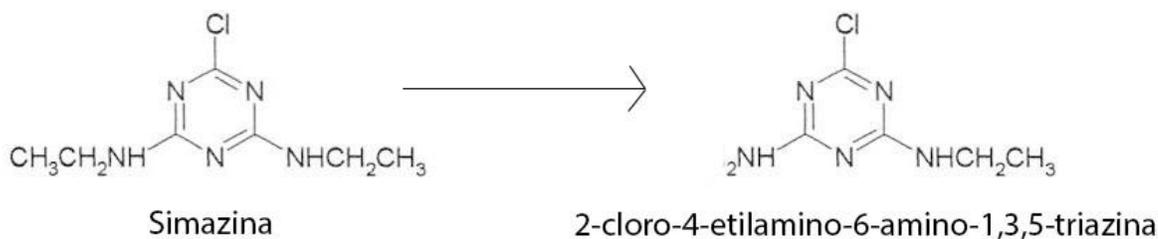


Figura 4. Reacción de N-monodealquilación e isopropil hidroxilación de la simazina observada en microsomas del hígado de la rata mediada por la CYP450.

En plantas se ha visto que la simazina se metaboliza en el cloro o en la posición 2 del anillo de la triazina por deshalogenación hidrolítica a través de 4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (benzoxazinona), un constituyente no enzimático de la savia de las plantas que hidroliza la simazina, produciendo hidroxisimazina [2,4-bis (etilamino)-6-hidroxi-s-triazina] (Wahlroos y Virtanen, 1959; Hamilton, 1964). Posteriormente, la hidroxisimazina es desalquilada y se produce 2-amino-4-etilamino-6-hidroxi-s-triazina (GS-17792). Aunque, también hay pruebas por cromatografía de la existencia de una segunda etapa de desalquilación que produce amelina, 2,4-diamino-6-hidroxi-s triazina (GS-17791) y amelida, 2-amino-4,6-dihidroxi s-triazina (G-35713) (Montgomery *et al.*, 1969), los autores concluyen que la alquilación de estos herbicidas parece ser una vía importante de desintoxicación. También en extractos de manzana se han identificado dos metabolitos principales: ammelina (GS-17791) y el conjugado de prolina diaminocloro-s- triazina (G-28273) formado por el anillo del conjugado glutamina de G-28273, o por el ataque de la prolina en cualquier parte del G-28273 o una forma activada de este metabolito (Lamoureux *et al.*, 1998).

2.6. *Drosophila melanogaster*, organismo modelo.

La mosca de la fruta, *D. melanogaster* (Figura 5), se ha empleado como organismo modelo para el estudio de la genética gracias a las investigaciones realizadas en 1909 por el Dr. Thomas Hunt Morgan. Su importancia radica en que se conoce ampliamente la estructura y la función del genoma de *Drosophila*, así como de diversos procesos esenciales de su biología, tales como el patrón de formación del embrión, el desarrollo y funciones de los órganos de los sentidos y del sistema nervioso, además de poseer un ciclo de vida corto (10 días a 25 °C), lo que permite la obtención de varias generaciones en poco tiempo y de un gran número de organismos en espacios reducidos (Rodríguez-Arnaiz, 2003).



Figura 5. Vista dorsal del macho (izquierda) y de la hembra (derecha) de *D. melanogaster*.
Fotografía de Benjamin Prud'homme (tomada de CSIC, 2015)

Dentro del área de la toxicidad genética, *D. melanogaster* constituye un modelo idóneo para la evaluación de los efectos que pueden ocasionar diferentes compuestos xenobióticos. Esto se debe a que *D. melanogaster* cuenta con cerca de 4,000 genes que producen un efecto fenotípico que sirven como marcadores para la realización de análisis cualitativos y cuantitativos, al detectar mutaciones, tales como deleciones o recombinaciones mitóticas dadas por la exposición de un xenobiótico (Carballo, 2010). Los ensayos que más se utilizan para la realización de este tipo pruebas son los siguientes.

- 1) El ensayo de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (SLRLT) (Rodríguez-Arnáiz, 2003).
- 2) Prueba de no disyunción y pérdida de cromosomas sexuales (SCLT) (Carballo, 2010).
- 3) Ensayo de mutación somática y recombinación mitótica, en su modalidad de ojos y alas (SMART) (Rodríguez-Arnáiz, 2003).

2.7. Descripción y ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Como otros insectos, *Drosophila melanogaster* presenta tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen; presentando así mismo un par de alas funcionales y otro segundo par, llamado balancines, que le permite mantener el equilibrio. Con tres pares de patas y un par de antenas, las moscas del fenotipo silvestre tienen ojos rojos, un cuerpo amarillo o marrón y dimorfismo sexual (Figura 4).

Tienen un ciclo de vida de 10 días (a 25°C), el cual, al ser un organismo holometábolo pasa por cuatro estadios de metamorfosis: huevo, larva, pupa y adulto o imago (Figura 6). Iniciando con la fecundación del óvulo y la formación del huevo (cuya longitud es de 0.5 mm aproximadamente). La embriogénesis dura 24 horas, del cual emerge la larva e inmediatamente comienza a alimentarse.

La etapa larvaria se caracteriza por pasar por tres estadios que se caracterizan por el consumo de alimentos del medio para su desarrollo, L1 y L2 que duran 24 h cada uno. La tercera etapa o L3 que dura 48 h y que dará lugar a la pupa; seguidos de un periodo de 96 h del cual emerge el imago o adulto (Carballo, 2010). Sin embargo, en el desarrollo de *D. melanogaster* intervienen varios factores, tales como la temperatura, la humedad, la disponibilidad de nutrimentos, la consistencia de las larvas e incluso la frecuencia sexual (LED, 2015), que puede afectar su ciclo de vida.

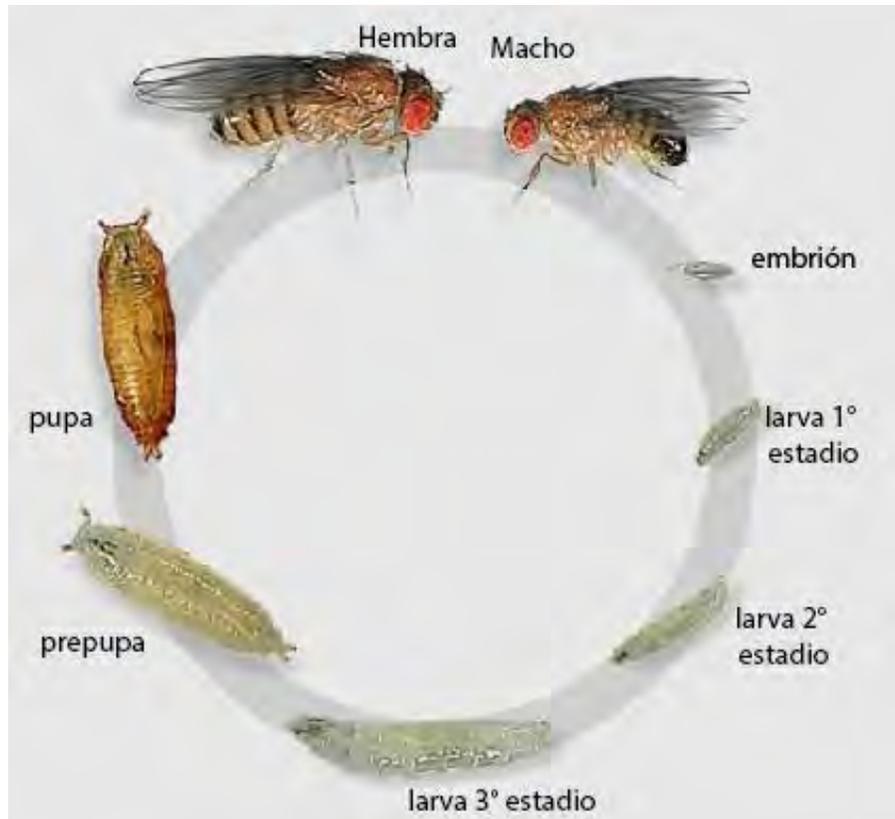


Figura 6. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* tomado de LED (2015).

2.8. Concentración letal media (CL_{50})

Con el objeto de comparar la toxicidad aguda de diversas sustancias e intentar cuantificarla, se creó un exponente numérico llamado Concentración Letal media (CL_{50}), la cual se define como la concentración en la que un compuesto produce la muerte del 50% de la población expuesta al componente tóxico. La CL_{50} es un valor estadístico que se obtiene a partir de una curva dosis – respuesta (Orellana y Guajardo, 2004).

La CL_{50} para cada una de las sustancias se establece mediante estudios experimentales en animales, generalmente ratas y conejos, y se expresa en mg (sustancia)/kg (animal). El agente

tóxico se administra a los animales por vía oral, respiratoria, dérmica o parenteral, de tal manera que la toxicidad de una sustancia se expresa de diferentes formas según hayan sido las condiciones de experimentación, por ejemplo, 13 mg/kg oral ratas, 234 mg/kg dérmica conejos (García, 2010).

2.9. Ensayo de mutación y recombinación somáticas (SMART)

Este ensayo proporciona un medio rápido para evaluar el potencial de un xenobiótico para inducir la pérdida de heterocigosis resultado de la mutación en el gen, reordenamiento cromosómico, la rotura de cromosomas o la pérdida del cromosoma (Rodríguez de Andrade *et al.*, 2004).

El SMART consiste en exponer a las larvas de 72 ± 4 h de edad, procedentes de la cruce de *D. melanogaster* con marcadores recesivos en los tricomas de las alas que están en el cromosoma 3: *mvh*, localizado en 3-0.3 (con múltiples tricomas en la célula) y *flr³* (tricomas en forma de flama) (Figura 7). Ambos fenotipos se analizan comparando las diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia y el tipo de manchas entre moscas expuestas y no expuestas al tratamiento (Graf, 1995).

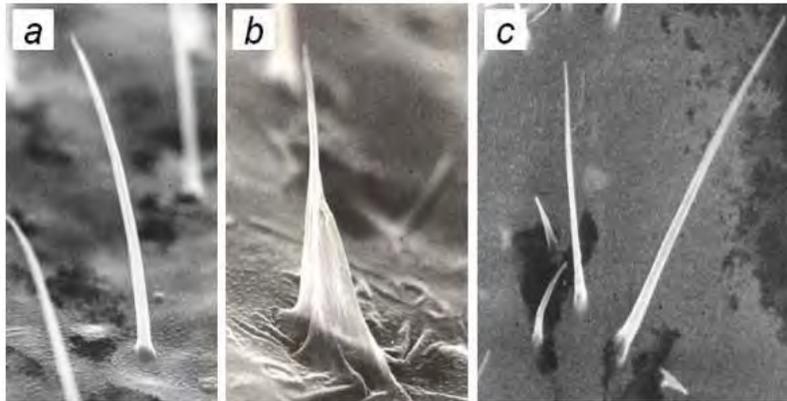


Figura 7. Micrografía electrónica de tricomas normales (a), tricomas con fenotipo *flr³* (b) y tricomas con el fenotipo *mvh* (c). Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido y donadas a Rodríguez-Arnaiz por Ulrich Graf en el 2002.

Las manchas que se producen son ocasionadas por diversos eventos genéticos: mutación puntual, deleciones, no disyunción y recombinación en células somáticas (Figura 8) (Graf *et al.*, 1984). La deleción, consiste en la pérdida de un segmento cromosómico (b) (Lewin y Aguilera, 1996). La no disyunción, dada por la separación de los cromosomas homólogos durante la mitosis, que como resultado dan origen a trisomías o aneuploidias (c) (Lewin y Aguilera, 1996). La mutación puntual es un cambio que afecta a un solo par de bases de un gen. La más común es la sustitución de un par de bases por otro (d) (Graf *et al.*, 1984). Por último la recombinación, es un proceso dado por el intercambio entre cromosomas homólogos. Cuando la recombinación ocurre cerca del centrómero da lugar a una mancha gemela (e), mientras que la recombinación más distal produce machas *mvh* y tricomas normales (f) (Rodríguez-Arnaiz, 2003).

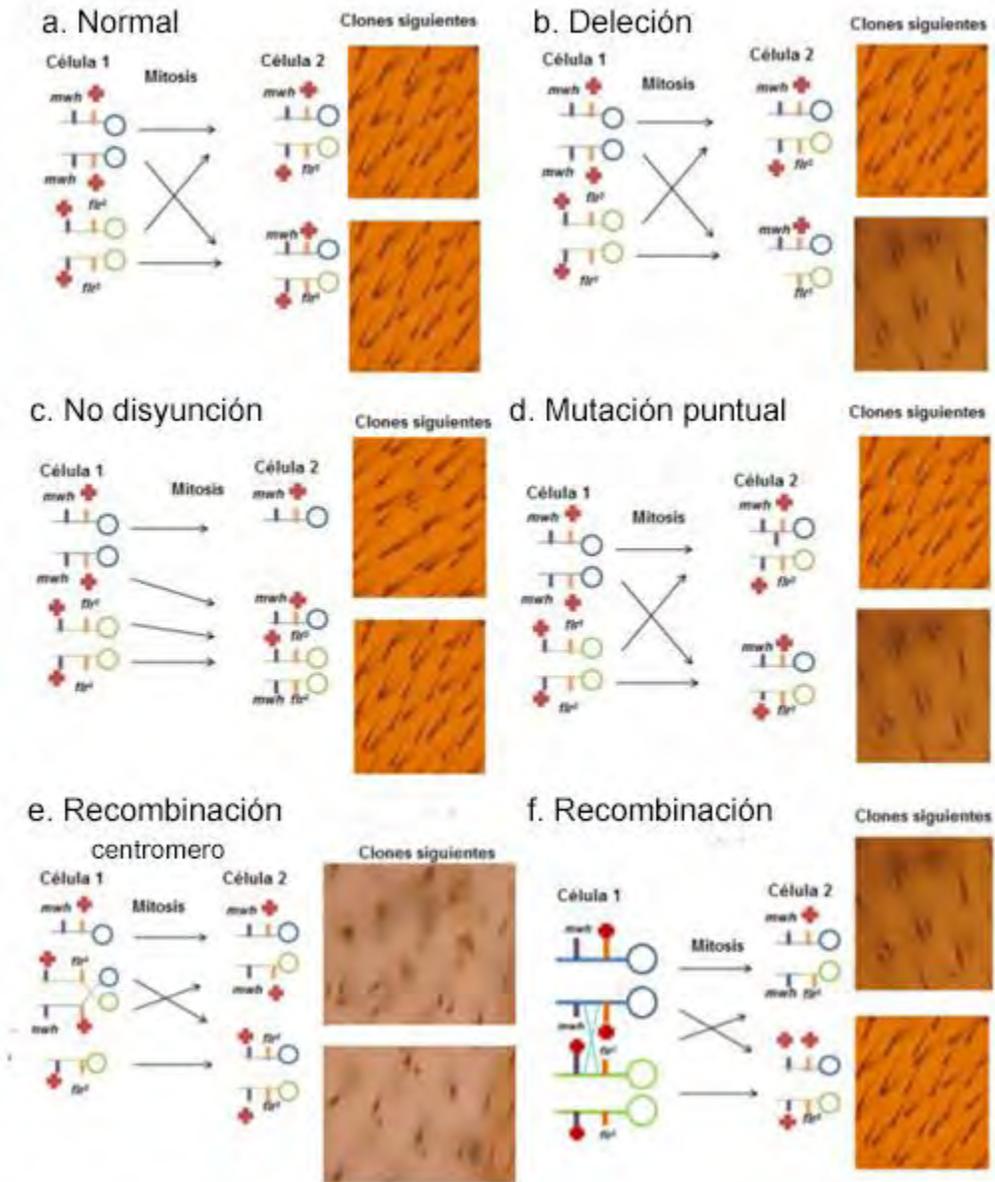


Figura 8. Eventos genéticos detectados por el ensayo de SMART. Tomado de Carballo (2010).

III. *Justificación*

Actualmente, los herbicidas se usan en diversos ámbitos, destacando la agricultura, seguido por las actividades forestales, de ganadería y jardinería. (Rey, 2013). En México se destina la mitad de la superficie agrícola (7.4 millones de hectáreas), al cultivo de maíz (*Zea mays*). Casi tres millones de personas trabajan en su cultivo (Vela, 2011), ya que forma parte de nuestra alimentación diaria, un insumo para la ganadería y para la obtención de numerosos productos industriales (CONABIO, 2012). Para una mejor producción, los agricultores utilizan diferentes tipos de agroquímicos en el cultivo de maíz, en particular, para el control de las malezas en su cultivo, entre otros, se utiliza la simazina.

La aplicación de simazina puede suponer un riesgo al ser humano que, al estar expuesto a ésta de manera directa o indirecta (World Health Organization, 2016), puede llegar a provocar daños genotóxicos; debido a esto, es importante realizar estudios relativos a la exposición de la simazina y a sus posibles efectos tóxicos. Una manera de iniciarlos es utilizando el ensayo SMART/ala de *D. melanogaster*, el cual permite la evaluación del potencial genotóxico de los xenobioticos.

IV. *Objetivos*

4.1. *Objetivo general*

- Determinar la genotoxicidad del herbicida simazina por exposición directa a larvas de *D. melanogaster* de 72 ± 3 h de edad por medio de SMART.

4.2. *Objetivos particulares*

1. Obtención de la CL_{50} de la simazina comercial (Simanex 50SC) sobre larvas de *D. melanogaster*.
2. Determinar el daño tóxico y genotóxico en el ensayo de SMART.

V. *Hipótesis*

Si la simazina comercial (Simanex 50 SC ®) es un agente genotóxico, se observará un incremento significativo en la frecuencia de manchas con respecto al control negativo al exponer directamente a larvas de 72 ± 3 h de edad de *D. melanogaster*, por medio de SMART.

VI. Materiales y métodos

6.1. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de la simazina

Antes de realizar los tratamientos, fue necesario encontrar la CL₅₀ de la simazina comercial (Simanex 50 SC ®), sobre las larvas de 72±3 h de *D. melanogaster*. Para ello, primero se realizó la crucea *flr³* X *mvb*, aislando 100 hembras *flr³* vírgenes y 50 machos de *D. melanogaster* (por frasco), se sincronizaron las cruces durante seis horas en medios de cultivo y después se aislaron los huevos retirando a los progenitores. Una vez pasados tres días (72±3 h), utilizando una solución de sacarosa al 20%, se extrajeron las larvas de los frascos y se transfirieron a viales con simazina comercial a diferentes concentraciones por quintuplicado (0%, 1%, 2.5%, 5% y 10%).

A cada vial se le adicionaron 2 mL de simazina a la concentración correspondiente, más 0.5 g de Medio Carolina; una vez que se secó el medio, se colocaron 25 larvas de 72±3 h de *D. melanogaster* por vial. Estos viales se revisaron y se contó el total de moscas que emergieron, para determinar así, la CL₅₀.

6.2. Tratamiento de larvas.

Una vez determinada la CL₅₀ de la simazina comercial sobre las larvas de *D. melanogaster*, se procedió con el SMART. Se realizaron dos cruces: (1) estándar (ST): 100 hembras *flr³* vírgenes con 50 machos *mvb*; y (2) de alta bioactivación (HB): 100 hembras ORR-*flr³* vírgenes y 50 machos *mvb* por frasco.

Se sincronizaron las cruces durante 6 h en medios de cultivo y después se aislaron los huevos retirando las cruces. Después de 72±3 h, utilizando sacarosa al 20%, se extrajeron las larvas; las larvas (50 – 100 larvas por vial) se sometieron a tratamiento con simazina al 1%, 2.5% y 5%. Una vez transcurrido el tratamiento, y que las moscas llegaron a la etapa adulta, se pudo realizar la preparación de alas.

6.3. Preparación de alas para la lectura

Para la preparación de las alas se utilizó la solución de Faure (30 g de goma árabe y 50 g de hidrato de cloral en 70ml de glicerol al 40%).

Antes de realizar las preparaciones, las moscas transheterocigotas (con fenotipo silvestre) se almacenaron en etanol al 70%; ya para la realización de cada preparación, las moscas se colocaron en una platina, se enjuagaron con agua y después, se separaron las alas del cuerpo con unas pinzas. A las alas se les agregó solución Faure y se alinearon en un dispositivo sobre el portaobjetos, se extendieron las alas (10 pares de hembras y 10 pares de machos) para una

mejor lectura de las manchas. Las alas dispuestas en el portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente, cubierta por una caja Petri. Después, se hizo prensa del portaobjetos con el cubreobjetos con una gota de la solución de Faure y se aplicó presión durante al menos 24 h para que las alas quedaran firmemente pegadas al portaobjetos.

6.4. Análisis al microscopio de las alas

Cada preparación de las alas se analizó bajo un microscopio óptico compuesto. Para el análisis de las alas, se tomó nota de la posición de las manchas de acuerdo con el sector del ala (Figura 9). Contándose el número de células afectadas por la mutación con los marcadores genéticos *mmh* y *flr³*, que se expresan fenotípicamente; los datos obtenidos se analizaron con el programa SMART.

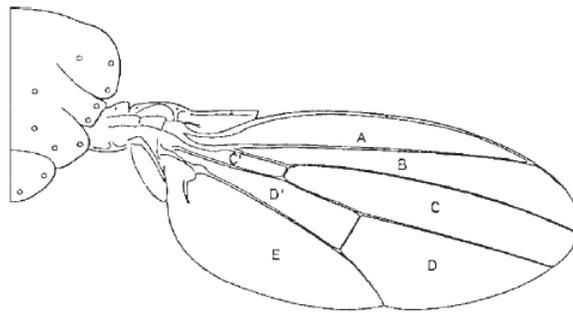


Figura 9. Diferentes áreas consideradas en la superficie del ala, A-E. Tomado de Rodrigues de Andrade (2004).

En la Figura 10 se muestran los fenotipos de ambas mutaciones dadas en el ensayo a SMART.

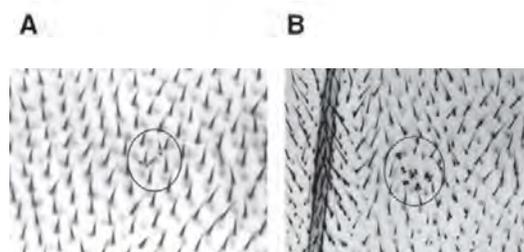


Figura 10. Tipos de manchas celulares en alas de *Drosophila melanogaster*. A) *mmh* y B) *flr³*. Tomado de Rodrigues de Andrade (2004).

6.5. Estadístico SMART

Para determinar si los resultados de los diferentes tratamientos presentan diferencias estadísticamente significativas, se comparó la frecuencia de las manchas en las alas de *D. melanogaster* que emergieron en el tratamiento, se realizó un análisis estadístico con el software SMART vs. 2.1., el cual evalúa por medio de una regla de decisión múltiple basada en la J_i^2 para proporciones (Frei y Würzler, 1988) con $p < 0.05$. Este análisis nos permite decidir si las frecuencias de manchas producidas en los tratamientos indican resultados positivos, débiles positivos, negativos o inconcluyentes.

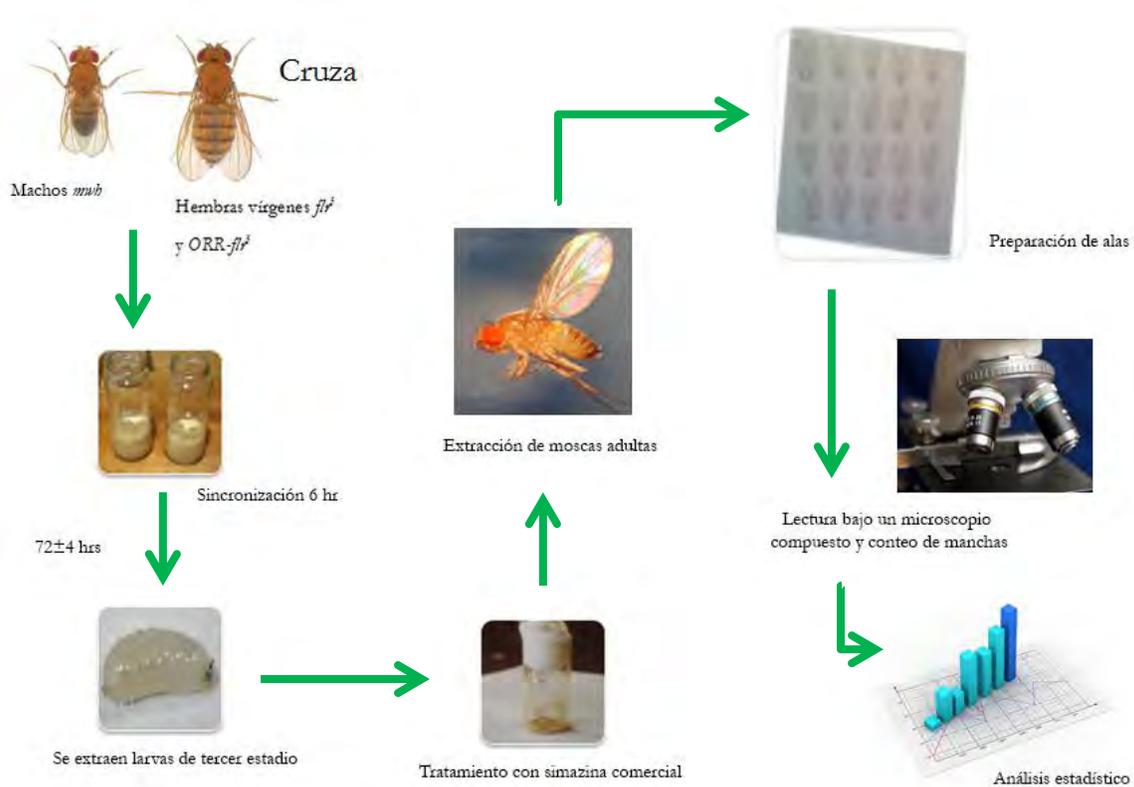


Figura 11. Esquema general del SMART

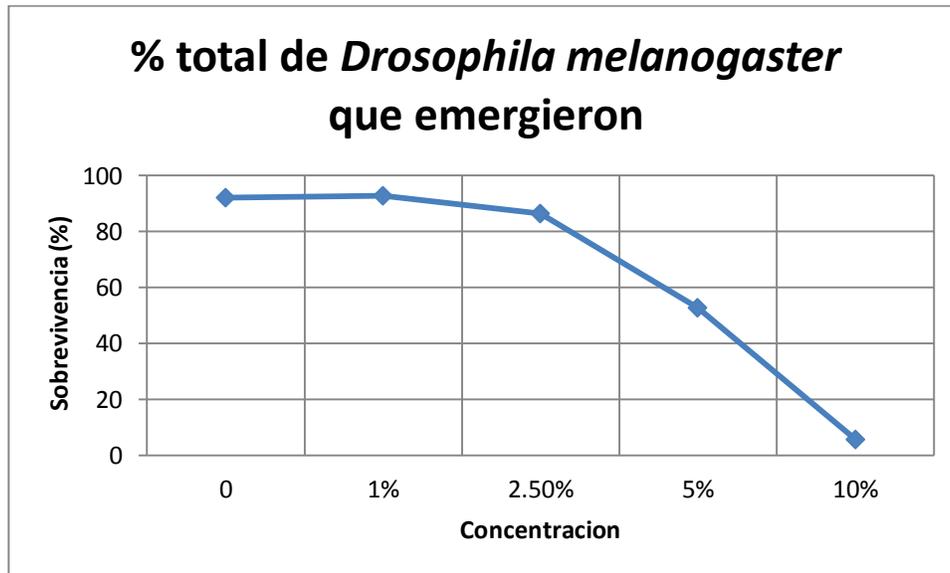
VII. Resultados

7.1. CL_{50} de la simazina comercial (Simanex 50 SC ®)

A partir de las pruebas realizadas con la simazina comercial (Simanex 50 SC®) al 1%, 2.5%, 5% y 10% más un control negativo de H₂O, se decidió trabajar con las concentraciones del 1%, 2.5% y 5% debido a que la letalidad era menor al 50% (Tabla 7 y Gráfica 1), para la realización del ensayo SMART.

Tabla 7. Respuesta a la exposición de simazina comercial; promedio total de las 25 larvas de *D. melanogaster* que emergieron en la exposición a la Simazina comercial.

Concentración (%)	Porcentaje de la supervivencia
0	92
1%	92.8
2.5%	86.4
5%	52.8
10%	5.6



Grafica 1. Porcentaje de la supervivencia de *Drosophila melanogaster* (*flr³x mmb*) a diferentes concentraciones de Simanex 50 SC ®. La dosis letal media resultó ser de 5%.

7.2. Ensayo SMART

7.2.1. Frecuencias de manchas totales.

En el ensayo de mutación y recombinación somáticas en larvas de 72 ± 3 h de *Drosophila melanogaster* se observó que en la crucea $flr^3 \times mwb$ (ST), no hay incremento significativo de la frecuencia de manchas totales producidas en las diferentes concentraciones de simazina, con respecto al control negativo (Tabla 8 y Gráfica 2); mientras que en la crucea $0RR-flr^3 \times mwb^3$ (HB), existe incremento significativo en el número total de manchas para las concentraciones 2.5% y 5% de la simazina comercial, con respecto al control negativo (Tabla 9 y Gráfica 2).

Tabla 8. Ensayo de mutación y recombinación somática en alas de *Drosophila melanogaster* crucea ST.

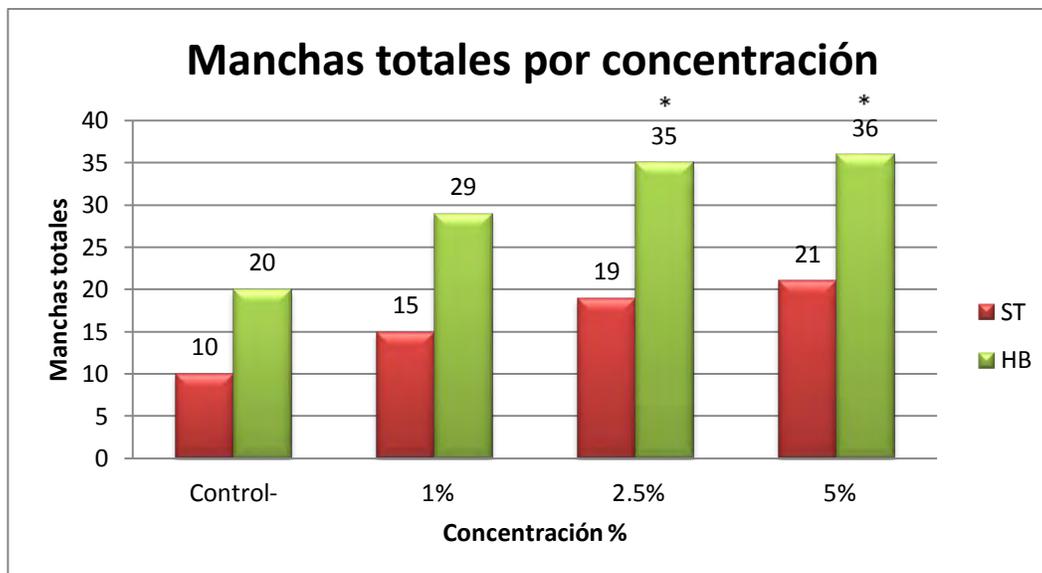
Concentraciones	No. de individuos	Frecuencia de manchas por moscas (número de manchas). Diagnostico estadístico ^Ω				Clones con manchas <i>mwb</i>	Promedio de ciclos de división celular
		Manchas pequeñas simples (1-2 cel) m=2.00	Manchas grandes simples (>2 cel) m=5.0	Manchas gemelas m= 5.00	Manchas totales m=2.00		
Control (-) H ₂ O	60	0.17 (10)	0.02(1)	0.00(0)	0.18(11)	10	1.30
Control (+) MMC 0.15 mM	6	45.50 (273) +	18.17 (109) +	4.17 (25)+	67.83 (407)+	405	2.14
Simazina 1%	60	0.17(10)-	0.05(3)i	0.03(2)i	0.25 (15)-	15	1.93
Simazina 2.5%	60	0.27(16)i	0.05(3)i	0.00(0)-	0.32 (19)-	19	1.74
Simazina 5%	60	0.28(17)i	0.07(4)i	0.00(0)-	0.35 (21)-	21	1.86

^ΩDiagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1998, 1995): (+) Positivo (-) Negativo (i) Inconcluso (m) Factor de multiplicación.

Tabla 9. Ensayo de mutación y recombinación somática en alas de *Drosophila melanogaster* cruza HB

Concentraciones	No. de individuos	Frecuencia de manchas por moscas (número de manchas). Diagnostico estadístico ^Ω				Clones con manchas <i>mmh</i>	Promedio de ciclos de división celular
		Manchas pequeñas simples (1-2 cel) m=2.00	Manchas grandes simples (>2 cel) m=5.0	Manchas gemelas m= 5.00	Manchas totales m=2.00		
Control (-)H ₂ O	60	0.27 (16)	0.07(4)	0.00 (0)	0.33 (20)	20	1.85
Control (+) MMC 0.15 mM	6	57.50 (345)+	22.0 (132)+	3.83 (23)+	83.33 (500)+	490	2.02
Simazina 1%	60	0.43 (26)i	0.03 (2)-	0.02 (1)i	0.48 (29)i	29	1.34
Simazina 2.5%	60	0.53 (32)+	0.05 (3)-	0.02 (1)i	0.60 (36)+	35	1.77
Simazina 5%	60	0.53 (32)+	0.07 (4)-	0.00 (0)-	0.60 (36)+	36	1.69

^ΩDiagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1998, 1995): (+) Positivo (-) Negativo (i) Inconcluso (m) Factor de multiplicación



Grafica 2. Número de manchas totales inducidas por la simazina comercial en alas de *Drosophila melanogaster* de la cruza ST y de la cruza HB.

7.2.2. Distribución por tamaño de manchas

En las Tablas 10, 11 y en la Gráfica 3 y 4 se muestran los datos obtenidos sobre las manchas observadas por cada tratamiento de acuerdo a la distribución de su tamaño. Se muestra un total de 7 clases, cada clase se basa en el número de células (2^n).

En la cruz ST se observó mayor número de machas sencillas (mmh) en las clases 1, 2 y 3, para los tratamientos, y en menor medida de las clases 4, 5 y 6, observándose que un número mayor de manchas en el control positivo, respecto a los otros tratamientos. En caso de las manchas gemelas (mmh/flr^3) se observaron en el control positivo, de la clase 3 a la 7, mientras que en los demás tratamientos solo se observaron dos machas de la clase 4 en simazina al 1% (Tabla 10 y Gráfica 3).

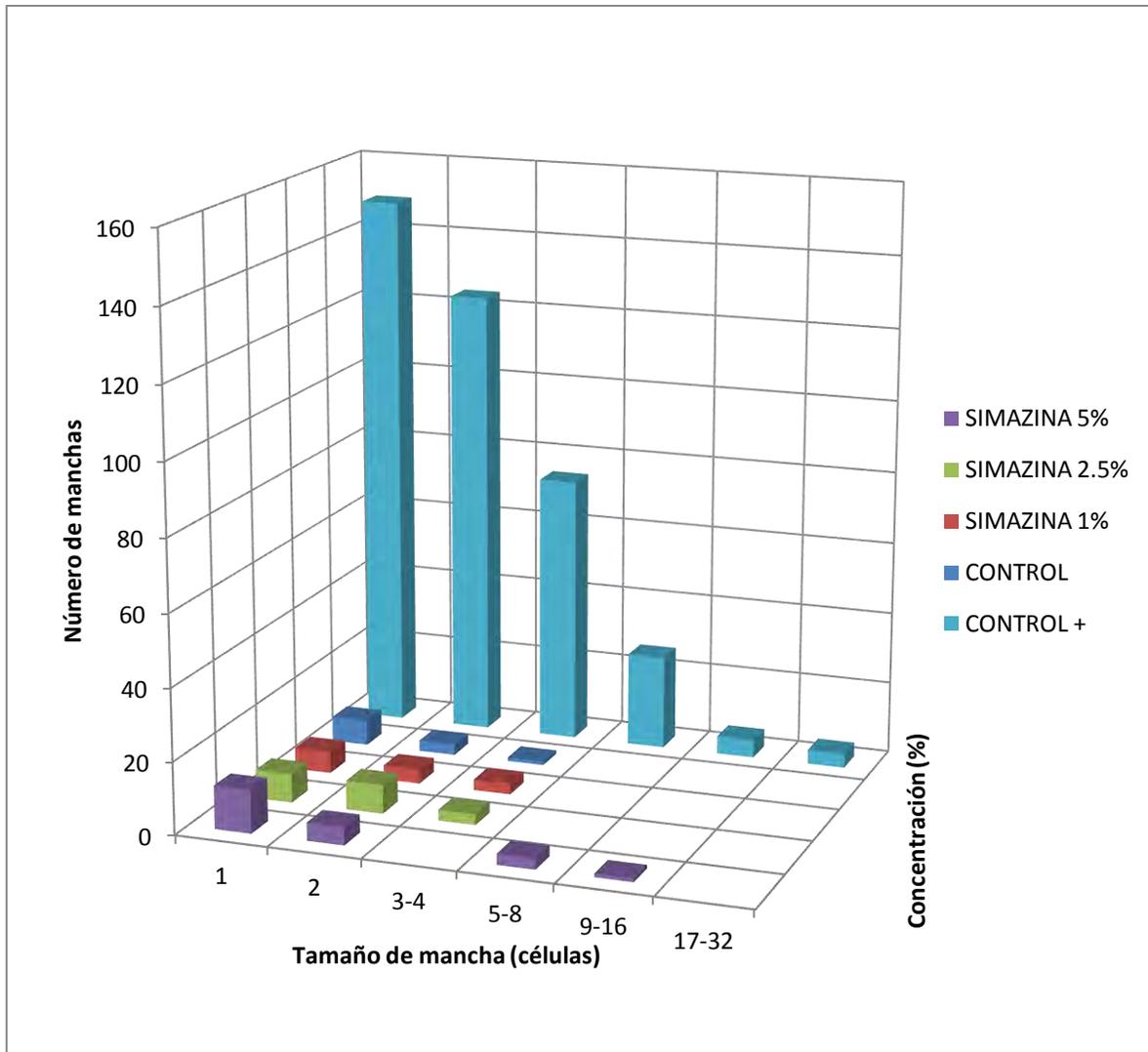
En la cruz HB se observó un mayor número de machas sencillas (mmh) en las clases 1 y 2, para los tratamientos, y en menor medida de las clases 3, 4, 5 y 6, observándose un número mayor de manchas en el control positivo, respecto a los otros tratamientos. En caso de las manchas gemelas (mmh/flr^3) se observaron en el control positivo a partir de la clase 2 hasta la 5, mientras que, en los demás tratamientos, solo se observó una macha de la clase 4 en simazina al 1% y al 2.5% (Tabla 11 y Gráfica 4).

Tabla 10. Distribución por tamaño de manchas sencillas (mmh) en la cruz ST

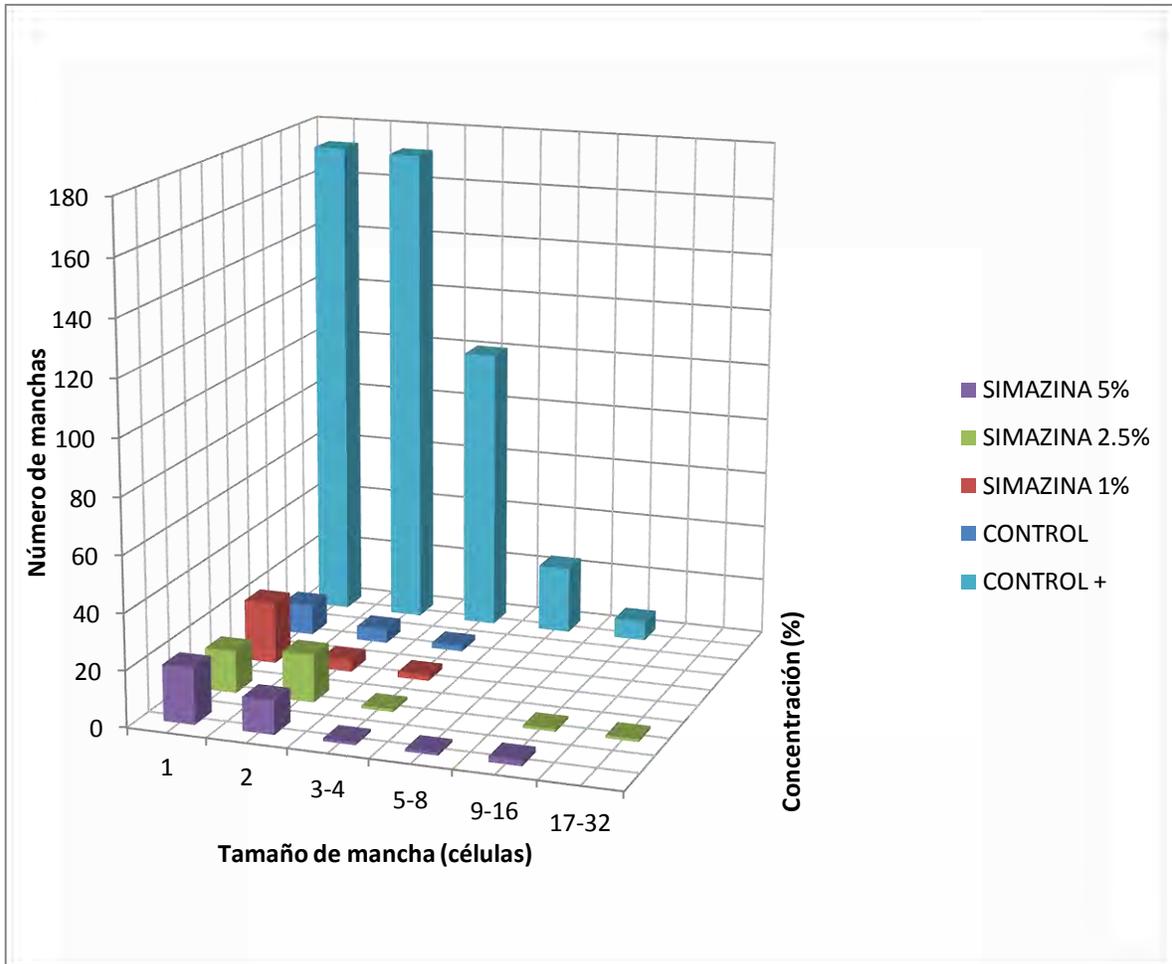
Tratamiento/ Concentración (%)	Clase de tamaño de mancha (Células 2^n)						Total de manchas	Promedio (total de manchas / número total de moscas)
	1	2	3	4	5	6		
	(1)	(2)	(3-4)	(5-8)	(9-16)	(17-32)		
Control (-) H ₂ O	7	3	1	-	-	-	11	0.18
Control (+) MMC 0.15 mM	149	124	74	26	5	4	382	63.67
Simazina 1%	6	4	3	-	-	-	13	0.22
Simazina 2.5%	8	8	3	-	-	-	19	0.32
Simazina 5%	12	5	-	3	1	-	21	0.35

Tabla 11. Distribución por tamaño de manchas sencillas (*mm/b*) en la cruza HB

Concentración (%)	Clase de tamaño de mancha (Células 2 ^a)						Total de manchas	Promedio (total de manchas / número total de moscas)
	1	2	3	4	5	6		
	(1)	(2)	(3-4)	(5-8)	(9-16)	(17-32)		
Control (-)H ₂ O	11	5	2	-	2	-	20	0.33
Control (+) MMC 0.15 mM	173	172	101	24	7	-	477	79.5
Simazina 1%	22	4	2	-	-	-	28	0.47
Simazina 2.5%	15	17	1	-	1	1	35	0.58
Simazina 5%	20	12	1	1	2	-	36	0.6



Grafica 3. Distribución por tamaño de manchas simples inducidas por la simazina comercial, en alas de *Drosophila melanogaster* de la cruza *ST*



Grafica 4. Distribución por tamaño de manchas simples inducidas por la simazina comercial, en alas de *Drosophila melanogaster* de la cruza HB.

VIII. Discusión

El incremento demográfico a nivel mundial en los últimos años, ha causado que las grandes industrias empleen como estrategia la venta de plaguicidas con el fin de generar una producción de alimentos que contribuya a cubrir su demanda mundial, fomentando así la agricultura intensiva (Rey, 2013) y causando un aumento en los daños sobre el ambiente y sobre el ser humano. Éste último al estar expuesto al plaguicida es susceptible de manera directa o indirecta a daños genéticos (World Health Organization, 2016).

Por lo anterior, es importante estudiar y determinar los efectos que ocasionan dichos plaguicidas, siendo el interés principal de este trabajo el del herbicida simazina, el cual se ha visto que provoca pérdida de peso y leucemia a corto plazo y a largo plazo produce temblorina, daño en los testículos, riñones, hígado y tiroides, mutaciones génicas y cáncer (Galíndez, 2010).

En la prueba de toxicidad de la simazina comercial Simanex 50SC sobre *Drosophila melanogaster* (Tabla 7 y Gráfica 1), se observó que el porcentaje de supervivencia de la cruda ST disminuye a medida que se incrementa la concentración del herbicida, mostrando así, una relación dependiente de la dosis y obteniéndose una CL_{50} del 5% de Simanex 50SC.

En estudios previos con simazina comercial se reporta que en ratas posee una $CL_{50} > 1.8$ mg/L en la inhalación por 4 h (Larson, 1987), una $DL_{50} > 10,000$ mg/kg (AMR Biological Research, 1972^a) y $> 5,000$ mg/kg (AMR Biological Research, 1972^b). Para los conejos, una $DL_{50} > 10,000$ mg/kg (Kuhn, 2000^a) y $> 2,000$ mg/kg (Kuhn, 2000^b) al administrarla en la piel, con la simazina comercial 4L (concentrado líquido de 40%).

Con la simazina 4G (granulado de 4%) se reporta una DL_{50} oral $> 5,070$ mg/kg en ratas y una DL_{50} dérmica $> 2,100$ mg/kg en conejos (Ciba-Geigy, 1981). En simazina 90DF (en polvo a 90%) una $CL_{50} > 2.4$ mg/L en la inhalación por 4h (Hazleton, 1978), una DL_{50} oral $> 5,000$ mg/kg en ratas (Stillmeadow, 1978^a) y una DL_{50} dérmica $> 2,000$ mg/kg en conejos (Stillmeadow, 1978^b). Por lo tanto, las DL_{50} y CL_{50} de la simazina varía dependiendo la especie y la vía de administración, así como también el grado de pureza del herbicida comercial que se aplica.

Por otro lado, estudios relacionados con la genotoxicidad de la simazina muestran resultados negativos para el ensayo de intercambios de cromátidas hermanas (SCE) a las concentraciones de 0.15, 0.5, 1.5, 5, 10, 15 y 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; en el ensayo de micronúcleos con las concentraciones de 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Dunkelberg *et al.*, 1994; Kligerman *et al.*, 2000^a; Suárez *et al.*, 2003); y para las aberraciones cromosómicas al exponerlo a concentraciones de 2.5, 5, 10, 15, 25 y 37.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Kligerman *et al.*, 2000^a), todos estos estudios realizados con linfocitos de sangre periférica humanas a partir de cultivos *in vitro*. Sin embargo, en un estudio realizado por Ghiazza *et al.* (1984) se observó un pequeño aumento en el SCE; sin tener especificación de las concentraciones utilizadas en este último. Sumado a esto, la simazina también ha dado resultados contradictorios al ser positivo (Simmons *et al.*, 1979) como negativo (Waters *et al.*,

1982) en el ensayo de síntesis de DNA no programada (UDS) realizado en fibroblastos de pulmón humano, sin tener especificación de las concentraciones.

En otros organismos se obtuvieron resultados diferentes. En *Saccharomyces cerevisiae* presentó conversión de genes a 1000 µg/mL (Siebert y Lemperle, 1974), en *Salmonella typhimurium* y en *Escherichia coli* hay efecto de mutación inversa, sin tener especificación de las concentraciones (Seiler 1973; Simmons *et al.*, 1977). En el hámster chino (*Cricetulus Griseus*) los ensayos de intercambio de cromátidas hermanas (SCE) con células de ovario (0.08 µg/mL) y pulmón V79 (2 µg/mL), los resultados fueron negativos (Waters *et al.*, 1982; Kuroda *et al.*, 1992; Biradar y Raybrun, 1995^b). Mientras que en estudios realizados en ratón (*Mus musculus*), se obtuvieron resultados negativos utilizando el ensayo cometa de micronúcleos en médula ósea y en leucocitos a concentraciones de 500, 1000, 2000 mg/kg (Waters *et al.*, 1982; Kligerman *et al.*, 2000^b; Tennant *et al.*, 2001).

Con respecto al efecto en las plantas, la simazina no dió lugar a la formación de micronúcleos en *Tradescantia paludosa*, a 200 p.p.m. (Ma *et al.*, 1984). Sin embargo, sí indujo mutaciones y aberraciones cromosómicas en otras especies, tales como *Hordeum vulgare* a 200 p.p.m. (Wuu y Grant, 1966; 1967^a), *Fragaria ananassa* a 2 p.p.m. (Malone y Dix, 1990), *Vicia faba* a 200 p.p.m. (Wuu y Grant, 1967^b), *Crepis capillaris* a 1000 p.p.m. (Voskanyan y Avakyan, 1984) y *Zea Mays* a 100 p.p.m. (Plewa *et al.*, 1984).

En estudios realizados con *D. melanogaster*, la simazina mostró un aumento en las mutaciones letales recesivas ligadas al cromosoma X cuando se inyectó el herbicida a los machos 6 ng/ kg, pero no se observó el mismo efecto cuando se alimentó a las larvas a la concentración de 6000 µg/ mL (Murnik y Nash, 1977), ni se produjo aneuploidías al inyectar 10 ng/kg de simazina (Benes y Sram, 1969).

Comparando los resultados en la literatura consultada con los que se obtuvieron en este trabajo no se observa una correlación clara, debido a que algunos de los ensayos presentan una respuesta contradictoria, ya que, se obtuvieron resultados tanto negativos como positivos en el mismo ensayo. Debido a lo anterior, hay que considerar diversos factores como las diferencias metodológicas, las fuentes y la pureza del producto químico, así como los disolventes y el análisis estadístico utilizado (Kligerman *et al.*, 2000^a). Además, en el Departamento de Regulación de Pesticidas (2013) se hace mención en que los pocos estudios de simazina reportados que mostraron efectos positivos débiles y con valores cuestionables, ya que estos estudios carecían de controles positivos, fueron mal diseñados y/o fueron preliminares; además de que en algunos ensayos de la literatura consultada no se puede acceder a las concentraciones utilizadas, por ser estudios inéditos presentados a la Agencia de Protección del Medio Ambiente o a la Organización Mundial de la Salud, dificultando así la comparación de los resultados.

Sin embargo, se puede sugerir que existen similitudes para el ensayo de SCE y el de micronúcleos, ya que se encontraron en ambos resultados negativos (Waters *et al.*, 1982;

Kuroda *et al.*, 1992; Biradar y Raybrun, 1995^b; Kligerman *et al.*, 2000^b; Tennant *et al.*, 2001). Estos ensayos permiten detectar agentes clastogénicos, es decir son el reflejo del daño al DNA (Eastmond y Tucker, 1989; Speit y Henderson, 2005), causado por la exposición a algún xenobiótico. Lo cual apoyaría los resultados negativos (Tabla 8), obtenidos en el ensayo SMART para la cruz estándar con los niveles basales de P450s.

En el caso de los ensayos realizados en plantas se puede observar que la simazina induce mutaciones y aberraciones cromosómicas en la mayoría de los ensayos en los que se ha probado. Se reportan resultados positivos en malezas como *Crepis capillaris*, *Vicia faba*, *Zea Mays* y *Fragaria ananassa*; a excepción de *Tradescantia paludosa* que mostró resultados negativos en micronúcleos. Una posible explicación de estas diferencias entre animales y plantas; es el metabolismo de compuestos xenobióticos en estas últimas, que, aunque se asemeja al de los animales al poder llevar a cabo las reacciones de fase I (hidrólisis, oxidación y reducción) y fase II (conjugación de los metabolitos generados en la fase I) (Sandermann, 1992), pero dado que en las plantas no existe un sistema excretor, para desechar los metabolitos generados en la fase II, éstos son polimerizados y/o incorporados a sus componentes estructurales, logrando almacenarse e inactivarse o, por el contrario, causar daño en la planta misma, mientras que en el caso de los animales, el sistema excretor facilita la eliminación de los metabolitos resultantes (Pimentel *et al.* 2006).

Esto explicaría el porqué la mayoría de los estudios realizados en plantas se obtienen resultados positivos (como se puede observar en el anexo). Sumado a esto, en un ensayo realizado por Means *et al.* (1983), en el que se tomaron extractos de plántulas de maíz y los analizaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase inversa, encontrando que, la exposición a 100 p.p.m. de atrazina, simazina y cianazina respectivamente, resultó en una fracción única que contenía niveles enriquecidos de mutágeno (MW 1000). La cual no estaba presente en los controles negativos de los extractos de las plántulas. Lo anterior se comprobó mediante un ensayo de cromatografía (HPLC), con los extractos de las plántulas de maíz expuestas a las s-triazinas marcadas con ¹⁴C, donde se observó que el 89% de las s-triazinas marcadas, mostraron una fracción mutagénica; reforzando la idea de que la simazina es un mutágeno bioactivado en las plantas (Plewa *et al.*, 1984), representando así, un riesgo para la salud de los animales, que como se ha mencionado anteriormente los metabolitos al ser almacenados en la planta, éstos son liberados en el tracto digestivo o en otros órganos de los animales que la consumen, entre ellos el ser humano (Sandermann, 1988).

En cuanto los estudios realizados en *D. melanogaster* con diferentes herbicidas, tales como triazoles (amitrol) y triazinas, estas últimas pertenecientes a la misma familia que la simazina; así como el metribuzin, la prometrina y la terbutrina, con las cruces ST y HB. Mostrando un aumento en la frecuencia de manchas pequeñas simples, grandes y totales en el caso del amitrol a 0.5 mM y 1mM en ambas cruces (Kaya *et al.* 2000), apoyado por un reporte previo de Tripathy *et al.* (1990) utilizando el mismo ensayo *in vivo* en *Drosophila*, reafirmando, la capacidad del mismo para ejercer un efecto genotóxico; mientras que la terbutrina indujo un ligero aumento en la frecuencia de manchas pequeñas simples y totales, a la concentración de 5 mM

para la cruza ST; sin embargo, los autores al realizar una prueba estadística de corrección de Bonferroni mostró ser un falso positivo (Kaya *et al.* 2000). En otro estudio se probó la atrazina con la cruza ST, la cual indujo un aumento significativo a las concentraciones de 1, 5 y 10 mM, en la frecuencia total de manchas y en las manchas pequeñas simples (Torres *et al.*, 1992); dadas por eventos de delección, mutaciones puntuales y no disyunciones, además de que la presencia de manchas pequeñas simples (*mvb* o *flr³*) se producen durante los últimos ciclos mitóticos en la pupa (Graf *et al.*, 1984).

Comparando las triazinas y el triazol, probados en *D. melanogaster*, con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede observar que la simazina resultó ser más genotóxica para *D. melanogaster*, dado que presentó una respuesta positiva a las concentraciones de 2.5% y 5%; para la cruza HB (0.3 mM y 0.6 mM respectivamente), las cuales resultan ser menores a la terbutrina, la atrazina y el amitrol (a excepción del 0.5 mM).

En cuanto a la respuesta en la frecuencia de manchas, se puede observar que tanto el amitrol, como la terbutrina y la atrazina producen un incremento en la frecuencia total de manchas; mientras que en la simazina, aunque indujo manchas totales en todas las concentraciones probadas (1%, 2.5% y 5%), éstas resultaron inconcluyentes en la cruza ST (Tabla 8 y Grafica 2), mientras que para la cruza de HB solo fue positivo a las concentraciones de 2.5% y 5% de simazina comercial (Tabla 9 y Grafica 2). Además, en los resultados reportados en la literatura, el amitrol, la terbutrina y la atrazina, así como en el realizado en este trabajo para la simazina, muestran resultados negativos para las manchas gemelas en ambas cruzas (Tablas 8 y 9); siendo significativamente inferiores a las frecuencias de manchas totales encontradas con la Mitomicina C (0.15 mM), agente alquilante que provoca el entrecruzamiento de la doble cadena del DNA, lo que resulta en la mutagénesis, rotura de cromosomas, recombinación genética y la inhibición de la síntesis de DNA (Kinoshita *et al.*, 1971; Tomasz, 1995; Mao *et al.*, 1999), rechazando la posibilidad de considerar al herbicida como agente que genere recombinación genética, mediante el ensayo SMART.

Por otro lado, el tamaño de las manchas es un indicador del momento en el cual ocurrió la inducción del daño. En este estudio, la simazina indujo un incremento significativo en las manchas pequeñas simples en la cruza HB (Tabla 8 y Graficas 4), lo cual puede indicar que el herbicida tiene una acción indirecta, es decir, la simazina requirió ser activada para producir un daño genotóxico, dando como resultado la formación de un mayor número de manchas pequeñas simples en relación a las manchas grandes simples, las cuales se presentan cuando el compuesto actúa en las etapas iniciales de división mitótica en la larva de tercer estadio (Jiménez *et al.*, 2011).

Mientras que, en la literatura, solo el amitrol fue positivo para las manchas grandes simples; la presencia de éstas puede deberse a que el amitrol pertenece a otra familia de herbicidas, los triazoles, con fórmula química general $C_2H_4N_4$. El amitrol actúa de manera sistémica, se absorbe por las hojas y las raíces, inhibiendo la síntesis de carotenoides (UNA, 2016). Además, éste también actúa como un inhibidor competitivo de la imidazol-glicerol fosfato deshidratasa,

codificada por el gen *HIS3*. Esta enzima cataliza la sexta reacción para la biosíntesis de la histidina (EMBL, 2016), aminoácido esencial en animales, afectando así su metabolismo (Hill *et al.*, 2014), dando una posible explicación a los resultados obtenidos por Tripathy *et al.* (1990) y Kaya *et al.* (2000) al alimentar a larvas de *D. melanogaster* con amitrol, el cual provocó un incremento en la frecuencia de manchas totales, de manchas pequeñas simples como de las grandes.

Finalmente, otro punto importante a resaltar es que solo se observaron resultados positivos en la cruza de alta bioactivación con simazina, en comparación con los otros herbicidas (terbutrina y atrazina), en los cuales sí se observó una respuesta positiva en la cruza estándar. Esta diferencia se puede atribuir a que la cruza estándar tiene un sistema enzimático con niveles basales de los citocromos P450, mientras que la de alta bioactivación es resistente al DDT por la sobreexpresión constitutiva de dichos citocromos que se encuentran en los cromosomas 1 y 2, lo que permite evaluar compuestos que necesitan ser metabolizados para reaccionar con el DNA (promutágenos o mutágenos indirectos), a diferencia de la cruza estándar donde los niveles basales de estas enzimas son suficientes para evaluar a los mutágenos de acción directa (Pilleo y Rodrigo, 2005). Tal y como se puede observar con el kaempferol, un flavonoide que no resulta ser genotóxico para las células pulmonares V79 en la ausencia de un sistema metabólico externo, pero que, en la presencia de un sistema de metabolización externo, como la fracción S9 de hígado de la rata, conduce a un aumento de su genotoxicidad dada por su biotransformación a través del sistema de monooxigenasa citocromo P450 (Silva *et al.*, 1997).

Lo anterior también puede explicarse por la biotransformación de las clorotriazinas que es llevada a cabo por procesos de alquilación, decloración y conjugación, donde posteriormente, los metabolitos resultantes pueden interactuar con otras células a través de biomoléculas que afectan células, tejido y el metabolismo de los organismos. En la literatura, Pogrmic *et al.* (2012) observaron que la sobreexpresión de citocromos aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno debido a la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes en los tejidos periféricos susceptibles, como las células intersticiales testiculares, induciendo o aumentando el estrés oxidativo; y la formación de complejos disminuye la relación entre el glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG) del hígado en presencia de una clorotriazina.

Durante el estrés oxidativo, las especies reactivas, radicales libre y/o derivados metabólicos puede dañar u oxidar lípidos, proteínas y moléculas de ácidos nucleicos que causan alteraciones metabólicas (Severi *et al.*, 2013). Por lo que esto supondría que, en presencia de la simazina, se activan por la sobreexpresión del sistema de las monooxigenasas del citocromo P450, produciendo efectos genotóxicos por lo que podría estar ocurriendo una bioactivación del herbicida vía metabolismo.

Por lo tanto, con los resultados obtenidos en el presente estudio, el uso del ensayo en células somáticas de las alas en *D. melanogaster* para la evaluación de la simazina comercial (Simanex 50

SC®), proporciona información adicional e importante sobre los mecanismos de genotoxicidad de la simazina en estos organismos.

IX. Conclusiones.

Los resultados observados en el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster* nos indican que la simazina comercial no indujo efectos genotóxicos en la craza estándar, pero sí mostró un efecto genotóxico en la craza de alta bioactivación en las concentraciones de 2.5% y 5% del herbicida.

La diferencia entre ambas cruzas puede atribuirse a que la craza de alta bioactivación, presenta una sobreexpresión constitutiva de los citocromos P450, lo que permite evaluar compuestos que necesitan ser metabolizados para reaccionar con el DNA, es decir, la biotransformación de la simazina, se llevó a cabo gracias a la presencia de enzimas P450 que están sobreexpresadas en la craza HB.

Por tanto el empleo del ensayo SMART proporcionó información adicional sobre los mecanismos de genotoxicidad inducidos por la simazina en *Drosophila melanogaster*.

X. Bibliografía.

- AMR Biological Research. (1972^a). Acute oral toxicity of GA-2-297 in rats (PRINCEP 4L). Affiliated Medical Research Inc., Princeton, NJ. Contract No. 120-1748-102; 11/3/72. En: DPR (2013). *Simazine: Risk characterization document*. California Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, California. p. 226
- AMR Biological Research. (1972^b). Acute dermal LD50 of GA-2-297 in rabbits (PRINCEP 4L). Affiliated Medical Research Inc., Princeton, NJ. Contract No. 120-1748-102; 11/3/72. En: DPR (2013). *Simazine: Risk characterization document*. California Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, California. p. 226
- Andersen, K. J., Leighty, E. G., y Takahashi, M. T. (1972). Evaluation of herbicides for possible mutagenic properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 20(3), 649-656.
- Benes V. y Sram R. (1969). *Mutagenic activity of some pesticides in Drosophila melanogaster*, *Industrial Med.* 38: 42-444.
- Biradar D. P., y Rayburn A. L. (1995^a). Chromosomal damage induced by herbicide contamination at concentrations observed in public water supplies. *J. Environ. Qual.* 24(6):1222-5.
- Biradar D. P. y Rayburn A. L. (1995^b). Flow cytogenetic analysis of whole cell clastogenicity of herbicides found in groundwater, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28:13-17.
- Burke, J. D. (1971). *Biología celular*. Ciudad de México: Nueva editorial Interamericana. p.298.
- Carballo O. M. (2010). *Evaluación del Potencial genotóxico de diversos extractos de Tecoma stans en las células somáticas de Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. UNAM. pp. 12-22.
- Centro internacional de agricultura tropical. CIAT. (1982). Los Herbicidas: modo de Actuar y síntomas de Toxicidad; Piedrahita. Colombia. p. 17.
- Cheng, G., Shapir, N., Sadowsky, M. J., y Wackett, L. P. (2005). Allophanate hydrolase, not urease, functions in bacterial cyanuric acid metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 4437-4445.
- Chubutia, R. A. y Ugulava, N. A. (1973). Cytogenetic effects of herbicides. *Tr. Nauchno.Issled. Inst. Zashch. Rast.*, 25:97-99.
- Ciba-Geigy. (1965). Three generation reproductive study in rats. (estudio inédito presentado a la OMS).
- Ciba-Geigy. (1976) Reproductive study. Rat Seg. II (estudio inédito presentado a la OMS).

- Ciba-Geigy, (1981). Reports of investigations made with respect to the safety of the pesticide PRINCEP 4G Herbicide in support of PRINCEP 1% algicide. (estudio inédito presentado a la DPR).
- Clayton, G. D. y Clayton, F. E. (1994). *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, Vol. 2*. New York: John Wiley and Sons, pp. 3419-21.
- CONABIO. (2012). *Maíces*. Noviembre 18, 2015, de CONABIO Sitio web: <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/maices/maiz.html>
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). (2015). *Drosophila melanogaster*. Noviembre 18, 2015, del Gobierno de España Sitio web: <http://seresmodelicos.csic.es/galeria/mosca.html>
- Dieleman, J. A. y Mortensen, D. A. (1998). Influence of weed biology and ecology on development of reduced dose strategies for integrated weed management systems. En: Hatfield, J.L., Buhler, D.D. y Stewart B.A. *Integrated weed and soil management*. Ann Arbor Press. Chelsea. Michigan. pp. 333-362.
- Department of Pesticide Regulation. DPR. (1993). *Summary of toxicology data, simazine*. California Environmental Protection Agency. California.p. 51.
- Department of Pesticide Regulation. DPR. (2013). *Simazine: Risk characterization document*. California Environmental Protection Agency. California. p. 226.
- Dunkelberg, H., Fuchs, J., Hengstler, J. G., Klein, E., Oesch, F., & Strüder, K. (1994). Genotoxic effects of the herbicides alachlor, atrazine, pendimethaline, and simazine in mammalian cells. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 52(4), 498-504.
- Eastmond D. A. y Turker J. D. (1989). Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 13:34-43.
- Emnova E.E., Mereniouk G. V. y Turkan L. G. (1987). Genetic study of simazine-triazine herbicides on *Saccharomyces cerevisiae*. *Tsitol. Genet.* 21:127-130.
- Environmental Protection Agency. EPA. (1977). Evaluation of Selected Pesticides as Chemical Mutagens. In Vitro and In Vivo Studies. En: IARC. *IARC Monographs on the Evaluation of simazine*. Washington. 73: 625-640.
- Environmental Protection Agency. EPA. (1984). In Vitro and In Vivo Mutagenicity Studies of Environmental Chemicals. En: IARC. *IARC Monographs on the Evaluation of simazine*. Washington. 73: 625-640.
- European Commission. (2005). *Health and consumer protection* Directorate-General simazine. SANCO/10495/2003-rev. final Review report for the substance simazine.
- European Molecular Biology Laboratory (EMBL). (2016). *Amitrole*. Abril, 26, 2016, de Campus Hinxton, Cambridgeshire. Sitio web: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:40036>
- Fahrig, R. (1974). Comparative mutagenicity studies with pesticides. *IARC. Sci. Publ.* 10:161-181.

- Frei, H. y Würigler, F. E. (1988). Statial methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negatie or inconclusive result. *Mutation. Res.* 203: 297-308.
- Frei, H. y Würigler, F. E. (1995). Optimal experimental design and simple size for the statical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Env. Mutation.* 203: 297-308.
- García, A. (2010). *Toxicología general: Apuntes Básicos*. Noviembre 18, 2015. De Sistema Integrado de Gestión. Sitio web: <http://www.sigweb.cl/biblioteca/Toxicologia.pdf>
- Galíndez, N. S. (2010). *Biodegradación simultanea de los herbicidas atrazina y simazina por cultivo bacteriano binario en un reactor de biopelícula*. Tesis de licenciatura. IPN. pp. 24-26.
- Ghiazza, G., Zavarise, G., Lanero, M., y Ferraro, G. (1984). [Sister chromatid exchanges induced in human lymphocyte chromosomes by trifluralin, atrazine and simazine]. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale.* 60(11): 2149-2153.
- Graf, U., Wurgler, F., Katz, A., Frei, H., Juon, H., Hall, C. y Kale, P. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutag.* 6:153-188.
- Graf, U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spot in the wing somatic mutation an recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Experientia.* 51:168- 173.
- Griffiths, A. (1979). Neurospora prototroph selection system for studying aneuploid production. *Environ. Health Perspectives.* 31:75–80.
- Hakeem, H. y Shehab, A. (1974). Cytological effects of simazine on *Vicia faba*. *Proc. Egypt. Acad. Sci.* 25:61–66.
- Hao yuan Industries. (Fecha desconocida). *Simazina*. Julio 11, 2016. De Hao yuan Industries. Sitio web: <http://hy-chemproduct.com/1-5-simazine/170131>
- Hamilton, R. (1964). Tolerance of several grass species to 2-chloro-s-triazine herbicides in relation to degradation and content of benzoxazinone derivatives *J. Agric. Food Chem.* 12:14–17.
- Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka, K. T., Nishimura, T. y Ando, M. (1999). In vitro metabolism of simazine, atrazine and propazine by hepatic cytochrome P450 enzymes of rat, mouse and guinea pig, and oestrogenic activity of chlorotriazines and their main metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 156:195–205.
- Hazleton Laboratories America. (1978). Four-hour inhalation toxicity in rats PRINCEP 90 WDG (FL-780545). En: DPR (2013). Simazine: Risk characterization document. California Department of Pesticide Regulation. *California Environmental Protection Agency. California.* p. 226.
- Hernández, M., Morgante, V., Ávila, M., Villalobos, P., Miralles, P., González, M. y Seeger, M. (2008^a). Novel. s-triazine-degrading bacteria isolated from agricultural soils of central Chile for herbicide bioremediation. *J. Biotechnol.* 11:01-07.

- Hernández, M., Villalobos, P., Morgante, V., González, M., Reiff, C, Moore, E. y Seeger, M. (2008^b). Isolation and characterization of a novel simazine-degrading bacterium from agricultural soil of central Chile, *Pseudomonas* sp. MHP41. *FEMS Microbiol.* 206:184-190.
- Hill, R., Wyse, G. y Anderson, M. (2014). *Fisiología Animal*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. pp. 108.
- Jiménez, A., Pillco, A., Flores, N., Gonzáles, E. y Bermejo, P. (2011). Evaluación genotóxica del aceite esencial y el extracto etanólico de *Piper elongatum*. *Vabl. BIOFARBO*. 19:13-20.
- Kahlon, P. (1980). Seedling injury and chromosome aberrations induced by Bladex, Dowpon, Princep and Tenoran. *J. Tenn. Acad. Sci.* 55:17–19.
- Kaszubiak, H. (1968). The effects of herbicides on *Rhizobium*. III. Influence of herbicides in mutation. *Acta microbiol. pol.* 17:51–58.
- Kaya, B., Yanikoğlu, A., Creus, A., y Marcos, R. (2000). Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 465(1):77-84.
- Kinoshita, S., Uzu, K., Nakano, K., Shimizu, M., y Takahashi, T. (1971). Mitomycin derivatives. 1. preparation of mitosane and mitosene compounds and their biological activities. *Journal of medicinal chemistry.* 14(2):103-109.
- Kergommeaux, D., Grant, W. y Sandhu, S. (1983). Clastogenic and physiological response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba* in vivo root tip assay system. *Mutat. Res.* 24:69–84.
- Kligerman, A., Doerr, C., Tennant, A. y Zucker, R. (2000^a). Cytogenetic studies of three triazine herbicides. I. In vitro studies. *Mut. Res.* 465: 53–59.
- Kligerman, A., Doerr, C., Tennant, A. y Peng, B. (2000^b). Cytogenetic studies of three triazine herbicides. II. In vivo micronucleus studies in mouse bone marrow. *Mut. Res.* 471:107–112.
- Kuhn, J. (2000^a). Acute oral toxicity study in rats. Stillmeadow Study Number 5756-00. En: DPR. (2013). Simazine: Risk characterization document. California Department of Pesticide Regulation. *California Environmental Protection Agency. California.* p. 226.
- Kuhn, J., (2000^b). Acute dermal toxicity study in rabbits. Stillmeadow Study Number 5757-00. En: DPR. (2013). Simazine: Risk characterization document. California Department of Pesticide Regulation. *California Environmental Protection Agency. California.* p. 226.
- Kuroda, K., Yamaguchi, Y. y Endo, G. (1992). Mitotic toxicity, sister chromatid exchange, and rec assay of pesticides. *Archives of environmental contamination and toxicology.* 23(1):13-18.
- Laboratorio de Experimentación con *Drosophila* (LED). (Fecha desconocida). *Drosofilídeos*. Noviembre 17, 2015, de Universidade Federal de Pernambuco. Sitio web: <http://www.ledufpe.net78.net/drosofilideos.html>

- Lamoureux, G., Simoneaux, B. y Larson, J. (1998). The metabolism of atrazine and related 2-chloro-4,6-bis(alkylamino)-s-triazines in plants. *American Chemical Society*. Washington. pp. 60–81.
- Larson, D. M. (1987). Acute Inhalation Evaluation of Simazine 4L. *Toxicology Pathology Services, Inc., Mount Vernon*. Indiana. 213:112-127.
- *Ley general de Salud*. (2015). Última reforma publicada el 17 de marzo, México, D.F.
- Lewin, B. y Aguilera, A. (1996). *Genes*. España. Reverte S.A.p. 68-69.
- Ma, T., Harris, M., Anderson, V., Ahmed, I., Mohammad, K., Bare, J. y Lin, G. (1984). Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutat. Res.* 138: 157–167.
- Malone, R. y Dix, P. (1990). Mutagenesis and triazine herbicide effects in strawberry shoot cultures. *J. exp. Bot.* 41:463-469.
- Mao, Y., Varoglu, M., y Sherman, D. H. (1999). Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin c from streptomyces lavendulae NRRL 2564. *Chemistry & biology*. 6(4):251-263.
- Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L. P., Wing, R., Sadowsky, M. J. 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J. Bacteriol.* 183: 5684-5697.
- Means, J., Marbury, G., Plewa, M. y Gentile, J. (1983). Mutagenicity of HPLC fractions from s-triazine treated *Zea mays*. *Environ. Mutagenesis*. 5:371-372.
- Mersch, S. V., Dickgiesser, N., Hablitzel, U. y Gruber, B. (1988). Examination of the mutagenicity of organic microcontaminations of the environment. I. Mutagenicity of selected herbicides and insecticides in the *Salmonella*-microsome test (Ames test) in relation to the pathogenic potency of contaminated ground- and drinking-water. *Zbl. Bakt. Hyg.* 186:247–260.
- Montgomery, M., Botsford, D. y Freed, V. (1969). Metabolism of hydroxysimazine by corn plants. *J. Agric. Food Chem.* 17:1241–1243.
- Morgun, V., Logvinenko, V., Merezhinskii, Y., Lapina, T. y Frigorenko, N. (1982). Cytogenetic and genetic activity of the herbicides atrazine, simazine, prometryn and linuron. *Tsitol. Genet.* 16:38–41.
- Morell, I., Candela, L. (1998). Plaguicidas: Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos. *Publicaciones de la Universidad Jaume I*. España. pp. 273-274.
- Murnik, M. y Nash, C. (1977). Mutagenicity of the triazine herbicides atrazine, cyanazine, and simazine in *Drosophila melanogaster*. *J. Toxicol. Environ. Health*. 3: 691.
- OMS. (2003). *Simazine in drinking-water. Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la OMS para la calidad del agua potable*. Diciembre 16, 2015, de Organización Mundial de la Salud Sitio web: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/simazine.pdf
- Orellana, B. M., y Guajardo, T. V. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile*. 132(1):85-94.

- Organización Panamericana de la Salud. OPS. (2003). *Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y de salud ambiental*. Agosto 27, 2016. De Organización Panamericana de la Salud. Sitio web: <http://www.bvsde.paho.org/sde/ops-sde/bvsde.shtml>
- Ortiz, F. y Fernández, M. (2005). *Aplicación de plaguicidas*. Segunda edición. Junta de Andalucía. España. pp. 46-66.
- Peterson, D. E., Thompson C. R., Regehr D. L. y Al-Khatib K. (2001). Herbicide mode of action. *Kansas State University*. C-715:24.
- Pilleo A. y Rodrigo G. (2005). Genotoxicidad/antigenotoxicidad de *Baccharis latifolia*. *BIOFARBO*. 13:95-101.
- Pimentel, E., Ortiz, A. y Breña, M. (2006). *Tópicos de Genética*. UNAM. México. p.103-10.
- Plewa, M. J., Wagner, E. D., Gentile, G. J., y Gentile, J.M. (1984). An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutat. Res.* 136:233–245.
- Pogrmic, M. K., Kaisarevic, S., Fa, S., Dakic, V., Glisic, B., Hrubik, J. y Kovacevic, R. (2012). Atrazine effects on antioxidant status and xenobiotic metabolizing enzymes after oral administration in peripubertal male rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34:495–501.
- Porcuna, J. (2011). *Aceite minerales*. Agosto 27, 2016. De Servicio de Sanidad Vegetal. Valencia. Sitio web: http://www.agroecologia.net/recursos/Revista_Ae/Ae_a_la_Practica/fichas/n6/ficha-revista-ae-6-aceites-minerales.pdf
- Rey, C. J. (2013). *Diagnóstico general del uso de plaguicidas y análisis de su proceso de registro en México*. Tesis de licenciatura. UNAM. pp. 10-13.
- Rodrigues de Andrade H. H., Reguly, M. L. y Lehmann, M. (2004). Wing Somatic Mutation and Recombination Test. *Methods in Molecular Biology*. 247: 389-412.
- Rodríguez -Arnaiz R. (2003). *Drosophila* como organismo modelo en la biología experimental. En: Jiménez, L. F., Merchant, H. (Coordinadores). *Biología Celular y Molecular*. Prentice Hall. México. pp. 761-791.
- Rodríguez -Arnaiz R. (2004). *Metabolismo de las toxinas ambientales*. La ciencia para todos. Fondo de cultura Económica. México. D.F. pp. 24-25, 34.
- Sandermann, H. (1988). Mutagenic activation of xenobiotics by plants enzymes. *Mutation research*. 197:183-194.
- Sandermann, H. (1992). Mutagenic activation of xenobiotics by plants enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*. 17:82-184.
- Santillo, D., Johnston, P. & Langston, W.J. (2001). Tributyltin (TBT) antifoulants: a tale of ships, snails and imposex. Chapter 13. En: P. Harremoës, P., Gee, D., MacGarvin M., Stirling, A., Keys J., Wynne B., Vaz, S.G. *Late Lessons from Early Warnings: the precautionary principle*. European Environment Agency Environmental

Issue Report No 22. Office for Official Publications of the European Communities. Luxembourg. pp. 135- 148.

- Seiler, J. P. (1973). A survey on the mutagenicity of various pesticides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 29(5): 622-623.
- Severi, A. G., Silva, Z. E., Campos P. F., y Alves A. A. (2013). Action mode of triazines and toxic effects on vertebrates. NOVA Science Publishers. Sao Paulo, Brazil. pp. 133-149.
- Siebert, D., y Lemperle, E. (1974). Genetic effects of herbicides: induction of mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 22(2):111-120.
- Silva, I.D., Rodrigues, A. S., Gaspar, J., Maia, R., Laires, A. y Rueff, J. (1997). Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis*. 12:383-390.
- Simmons, V. F., Mitchell, A. D. y Jorgenson, J. A. (1977). Evaluation of selected pesticides as chemical mutagens. In vitro and in vivo studies. U.S. *Environmental Protection Agency Health Effects, Research Report*. p. 239.
- Simmons, V. F., Grower, R, Emmond, G. y Korven H. (1979). In vitro mutagenicity and genotoxicity assays of 38 pesticides. *Environ Mutagen*. 1:142-3.
- Stillmeadow. (1978^a). Rat acute oral toxicity PRINCEP* 90WDG. En: DPR (2013). Simazine: Risk characterization document. *California Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency*. California. p. 226
- Stillmeadow. (1978^b). Rabbit acute dermal toxicity PRINCEP* 90WDG. En: DPR (2013). Simazine: Risk characterization document. *California Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, California*. p. 226.
- Souza, M. L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M. J., y Wackett, L. P. (1998). The Atrazine Catabolism Genes *atzABC* Are Widespread and Highly Conserved. *Journal of Bacteriology*, 180(7): 1951–1954.
- Speit, G. y Henderson, L. (2005). Review of the in vivo genotoxicity tests performed with styrene. *Mutation Research*. 589(1):67-79.
- StroeV. (1968^a). The mutagenic effect of herbicides on barley. *Genetika*, 4: 164–167.
- StroeV. (1968^b). Cytogenetic activity of the herbicides simazine and maleic acid hydrazide. *Genetika*. 4:130–134.
- StroeV. (1970). The cytogenetic activity of the herbicides atrazine, chloro-IPC and paraquat. *Genetika* 6:31-7.
- Suárez S., Rubio A., Sueiro R. A. y Garrido J. (2003). Sister chromatid exchanges and micronuclei analysis in lymphocytes of men exposed to simazine through drinking water. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 537(2): 141-149.

- Tennant, A. H., Peng, B., y Kligerman, A. D. (2001). Genotoxicity studies of three triazine herbicides: *in vivo* studies using the alkaline single cell gel (SCG) assay. *Mutation research*. 493(1-2):1-10.
- The Merck index. *Encyclopedia of chemical, drugs and biological*. (1989). 11^oedition. U.S.A. pp. 8485 -1351.
- Tomasz, M. (1995). Mitomycin c: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry & biology*. 2(9):575-579.
- Torres, C., Ribas, G., Xamena, N., Creus, A., and Marcos, R. (1992). Genotoxicity of four herbicides in the drosophila wing spot test. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 280(4):291-295.
- Tripathy N. K., Würigler F. y Frei H. (1990). Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 242:169–180.
- Tripathy, N. K., Routray, P. K., Sahu, G. P. y Kumar, A. A. (1995). Simazine: Genotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Biol. Zent. Bl.* 114:378–384.
- Universidad Nacional Heredia, Costa Rica (UNA). (2016). *Amitrol*. Abril 26, 2016, de Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET). Sitio web:<http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/30-amitrol>.
- USEPA, Office of Pesticide Programs. (2000). Pesticide Ecotoxicity Database. *Environmental Fate and Effects Division*, Washington D.C.
- Valencia, R., Abrahamson, S., Schmolesky, G., Mansfield, L., y Sernau, R. (1975). Mutagenesis screening using *Drosophila*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 31(5): 316.
- Vela, E. (2011). El maíz. *Arqueología Mexicana*. 38: 7-8.
- Voskanyan, A. Z. y Avakyan, V. A. (1984). [Cytogenetic effect of simazine and linuron herbicides on the chromosomes of *Crepis capillaris*]. *Biol. Zhuv. Armenii*. 9: 741–744.
- Wahlroos, O. y Virtanen, A. I. (1959). The precursors of 6-methoxybenzoxazolinone in maize and wheat plants, their isolation and some of their properties *Acta Chem. Scand.* 13:1906–1908.
- Ware, G. (2000). *The pesticide Book*. 5^o Edition. Thomson Publication. California. pp. 123-145.
- Waters, M. D., Sandhu, S. S., Simmon, V. F., Mortelmans, K. E., Mitchell, A. D., Jorgenson, T. A., y Garrett, N. E. (1982). Study of pesticide genotoxicity. *Basic Life Sci Series*. 21:275-326.
- Health Topics: Pesticides. (2016). *Health Topics: Pesticides*. Junio 19, 2016. De World Health Organization. Sitio web: <http://www.who.int/topics/pesticides/en/>
- Wu, K. D. y Grant, W. F. (1966). Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in barley (*Hordeum Vulgare*). *Canad J Genet Cytol.* 8:481-501.

- Wuu, K. D. y Grant, W. F. (1967^a). Chromosomal aberrations induced by pesticides in meiotic cells of barley. *Cytologica*. 32:31-41.
- Wuu, K. D. y Grant, W. F. (1967^b) Chromosomal aberrations in somatic cells of *Vicia faba* by pesticides. *Nucleus*. 10:37-46.

XI. Anexo. Caracterización de los efectos genéticos y toxicológicos de la simazina.

Ensayo	Resultados		Dosis ^b (DEB O DAI)	Referencia
	Sin el sistema metabólico exógeno	Con el sistema metabólico exógeno		
<i>Escherichia coli</i> PQ37, ensayo Inducción de genes SOS	*	-	NR	Mersch-Sundermann <i>et al.</i> (1988)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1978/TA1538 and SL525/SL4700, toxicidad diferencial	-	*	2000 µg	Environmental Protection Agency (1984)
<i>Bacillus subtilis</i> rec strains, toxicidad diferencial	-	*	1000 µg	Kuroda <i>et al.</i> (1992)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, TA1538, mutación inversa	*	-	NR	Simmon <i>et al.</i> (1977)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA98, mutación inversa	-	-	5000 µg	Environmental Protection Agency (1984)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1537, TA1538, mutación inversa	-	-	1000 µg	Environmental Protection Agency (1977)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, mutación inversa	*	+ ^c	NR	Means <i>et al.</i> (1988)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA102, TA97, mutación inversa	-	-	1000 µg	Mersch-Sundermann <i>et al.</i> (1988)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1530, TA1531, TA1532, TA1534, G46, mutación inversa	-	*	NR	Seiler (1973)

<i>Salmonella typhimurium</i> (eight unidentified strains), mutación inversa	-	*	NR	Andersen <i>et al.</i> (1972)
<i>Escherichia coli</i> , mutación directa	-	*	NR	Fahrig (1974)
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvr</i> , mutación inversa	-	-	1000 µg	Environmental Protection Agency (1984)
<i>Serratia marcescens</i> , mutación inversa	-	*	NR	Fahrig (1974)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , conversión génica	-	*	NR	Fahrig (1974)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , conversión génica	-	*	1000 ^d	Siebert y Lemperle (1974)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3, homocigosis por recombinación	-	-	50 000	Environmental Protection Agency (1977)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7, recombinación mitótica	-	-	25 000	Environmental Protection Agency (1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7, mutación inversa	-	-	25 000	Environmental Protection Agency (1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7, conversión génica	-	-	25 000	Environmental Protection Agency (1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mutación inversa	-	*	5	Emnova <i>et al.</i> (1987)
<i>Neurospora crassa</i> , aneuploidia	-	*	NR	Griffiths (1979)
<i>Hordeum vulgare</i> , mutación	+	*	1000	Wuu y Grant (1966)
<i>Hordeum vulgare</i> , mutación	-	*	200	Stroev (1968 ^a)
<i>Rizobium meliloti</i> , mutación	-	*	5000	Kaszubiak (1968)
<i>Zea mays</i> , chlorophyll, mutación	+	*	200	Morgun <i>et al.</i> (1982)
<i>Zea mays</i> , mutación	+	*	NR	Plewa <i>et al.</i> (1984)
<i>Fragaria ananassa</i> , mutación	+	*	2	Malone y Dix (1990)
<i>Tradescantia paludosa</i> , micronucleos	-	*	200	Ma <i>et al.</i> (1984)
<i>Hordeum vulgare</i> , aberraciones cromosómicas	+	*	500	Wuu & Grant (1966)
<i>Hordeum vulgare</i> ,	+	*	500	Wuu & Grant (1967 ^a)

aberraciones cromosómicas			spray	
<i>Hordeum vulgare</i> , aberraciones cromosómicas	(+)	*	500	Stroev (1968 ^b)
<i>Hordeum vulgare</i> , aberraciones cromosómicas	(+)	*	500 ^d	Kahlon (1980)
<i>Vicia faba</i> , aberraciones cromosómicas	+	*	200 ^d	Wuu & Grant (1967 ^b)
<i>Vicia faba</i> , aberraciones cromosómicas	+	*	5	Hakeem & Shehab (1974)
<i>Vicia faba</i> , aberraciones cromosómicas	(+)	*	1000	Kergommeaux <i>et al.</i> (1983)
<i>Allium cepa</i> , aberraciones cromosómicas	+	*	20	Chubutia & Ugulava (1973)
<i>Crepis capillaris</i> , aberraciones cromosómicas	+	*	1000	Voskanyan y Avakyan (1984)
<i>Drosophila melanogaster</i> , mutación letal recesiva ligada al sexo	-	*	10 ng/ inj	Benes & Šrám (1969)
<i>Drosophila melanogaster</i> , mutación letal recesiva ligada al sexo	+	*	6 ng/fly inj	Murnik y Nash (1977)
<i>Drosophila melanogaster</i> , mutación letal recesiva ligada al sexo	-	*	6000 µg/ oral	Murnik y Nash (1977)
<i>Drosophila melanogaster</i> , mutación letal recesiva ligada al sexo	+	*	2000 µg/ oral	Tripathy <i>et al.</i> (1995)
<i>Drosophila melanogaster</i> , mutación letal dominante	+	*	6000 µg/ oral	Murnik y Nash (1977)
<i>Drosophila melanogaster</i> , aneuploidia	-	*	6000 µg/ oral	Murnik y Nash (1977)
Mutación del gen, de las células del linfoma L5178Y de ratón <i>in vitro</i> , locus <i>tk in vitro</i>	-	(+)	300	Environmental Protection Agency (1984)
Intercambio de cromátidas hermanas, en células de ovario de hámster chino <i>in vitro</i>	-	*	1700	Environmental Protection Agency (1984)
Intercambio de cromátidas hermanas, en células pulmonares V79 de hámster chino <i>in vitro</i>	-	*	2	Kuroda <i>et al.</i> (1992)
Intercambio de cromátidas	-	*	0.01	Biradar & Rayburn

hermanas, en células de ovario de hámster chino <i>in vitro</i>				(1995 ^a)
Intercambio de cromátidas hermanas, en linfocitos humanos <i>in vitro</i>	(+)	*	NR	Ghiazza <i>et al.</i> (1984)
Intercambio de cromátidas hermanas, en linfocitos humanos <i>in vitro</i>	-	-	10	Dunkelberg <i>et al.</i> (1994)
formación de micronúcleos, en médula ósea y sangre periférica de ratón <i>in vivo</i>	-	*	500/ oral	Environmental Protection Agency (1984)

^a+positivo, (+) débilmente positivo; - negativo; * No probado

^bDEB dosis efectiva más baja; DAI, dosis más alta inefectiva. A menos que se indique lo contrario, ensayo in-vitro, µg /mL; ensayo in vivo, mg/kg de peso corporal por día /; NR, no reportado; inj inyección; oral

^c Ensayo probado con extracto de *Zea mays* con Simazina

^d Herbicida comercial